



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MODULAÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM CÉLULAS MIOMETRIAIS  
E CERVICAIS EM PARTOS INDUZIDOS COM  
PROSTAGLANDINAS: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO***

**TESE DE DOUTORADO**

**Cristine Kolling Konopka**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**MODULAÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM CÉLULAS MIOMETRIAS E  
CERVICAIS EM PARTOS INDUZIDOS COM  
PROSTAGLANDINAS: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO***

**Cristine Kolling Konopka**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de  
Santa Maria como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

**Orientadores:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Prof. Dr. João Francisco Oliveira (*in memoriam*)**

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Kolling Konopka, Cristine  
MODULAÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE PROSTAGLANDINA E2  
EM CÉLULAS MIOMETRIAS E CERVICAIS EM PARTOS INDUZIDOS  
COM PROSTAGLANDINAS: ESTUDO IN VIVO E IN VITRO /  
Cristine Kolling Konopka.-2015.  
120 p.; 30cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2015

1. Prostaglandina 2. Dinoprostona 3. Misoprostol 4.  
Receptor de PGE2 5. Útero I. Beatrice Mânica da Cruz,  
Ivana II. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Cristine Kolling Konopka. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com a autorização por escrito da autora, mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua José Carlos Krueel, nº 41, ap. 701, Bairro Nossa Senhora de Lourdes, Santa Maria, RS. CEP: 97060-380. Fone: (+55)5532177198. E-mail: cristine.ufsm@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Tese de Doutorado**

**MODULAÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE PROSTAGLANDINA  
E<sub>2</sub> EM CÉLULAS MIOMETRIAIS E CERVICAIS EM PARTOS  
INDUZIDOS COM PROSTAGLANDINAS: ESTUDO *IN VIVO* E *IN  
VITRO***

Elaborada por  
**Cristine Kolling Konopka**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Orientadora – Presidente)

---

**Paulo Bayard Dias Gonçalves, Prof. Dr. (UFSM)**

---

**Roberto Christ Vianna Santos, Prof. Dr. (Centro Universitário Franciscano)**

---

**Melissa Orlandin Premaor, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Bernardo Garziera Gasperin, Prof. Dr. (UFPEL)**

Santa Maria, 18 de setembro de 2015.

Esta tese é dedicada a meu marido e filhos,  
Clóvis, Ana Luíza e Gustavo,  
a meus pais Lori e José Emir e  
ao Prof. Dr. João Francisco Oliveira (*in memoriam*).  
Nós conseguimos, esta vitória é nossa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha existência, por fornecer-me todos os meios que oportunizaram eu estar finalizando este doutorado em Farmacologia: uma família maravilhosa, boa formação educacional e portas abertas para constante aperfeiçoamento. Agradeço em especial por todas as bênçãos que têm sido concedidas a mim e a minha família.

Agradeço a minha orientadora professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, que me acolheu como uma mãe acolhe seus filhos, quando tudo parecia sem rumo. Só um coração do tamanho do seu é capaz de agregar tanta diversidade, com tanta competência e afeto.

Agradeço à equipe do Laboratório de Biogenômica, especialmente à Verônica Farina Azzolin, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado, Eduardo Bortoluzzi Dornelles e Fernanda Barbisan, pela parceria na realização dos experimentos. Sua dedicação, competência e união foram fundamentais para conclusão desta tese.

Agradeço aos professores João Francisco Oliveira (*in memoriam*), Fabio Vasconcellos Comin e Alfredo Quites Antoniazzi e a toda equipe do BIOREP, pelos inestimáveis ensinamentos.

Agradeço de forma especial aos colegas de pós-graduação Melânia Lazzari Rigo, Werner Giehl Ganzler e Monique Tomazele Rovani, parceiros incansáveis nos experimentos e análise dos resultados, que foram realizados com muita competência e dedicação.

Agradeço ao professor Carlos Fernando de Mello e sua equipe, pelos inestimáveis e incansáveis ensinamentos.

Agradeço de forma carinhosa aos grandes amigos que fiz na Pós-graduação em farmacologia, LABNEURO, BIOREP e Laboratório de Biogenômica, pelo incentivo e ajudas constantes. Seria injusto citar nomes e esquecer alguém, mas de cada um com quem convivi levo uma lembrança especial.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio incondicional, mesmo sendo constantemente privados de minha presença como mãe, esposa, filha, tia, irmã, sobrinha, prima e neta. Em especial a minha avó Anna, que partiu recentemente sem receber de mim a atenção merecida nos últimos anos, devido a meus compromissos profissionais e acadêmicos.

Agradeço à UFSM, aos meus colegas de departamento e de plantão, aos funcionários do DGO e HUSM, aos diretores do HUSM e Chefia do DGO, pela liberação parcial para pós-graduação e pela tolerância com minhas ausências.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Zeli de Maria Carvalho, pela competência e presteza na execução de suas funções.

Agradeço à equipe da Deltacompy Informática, especialmente ao Edson Pedro Scherer da Silva e Fernando Echer Loro, pela competência e rapidez que deram suporte técnico para que o desenvolvimento do trabalho nunca fosse interrompido e os dados nunca fossem perdidos em todo o processo de doutoramento.

Aos órgãos de fomento CNPq/PIBIC e CAPES, pelo financiamento da pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboram para a execução deste trabalho.

“Ando devagar porque já tive pressa  
Levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei...

Todo mundo ama um dia  
Todo mundo chora um dia  
A gente chega e o outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
De ser feliz...”

(adaptação de Tocando em Frente, Amir Sater)

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **MODULAÇÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> EM CÉLULAS MIOMETRIAIS E CERVICAIS EM PARTOS INDUZIDOS COM PROSTAGLANDINAS: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO***

AUTORA: CRISTINE KOLLING KONOPKA

ORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Local e Data da Defesa: Santa Maria, RS, 18 de setembro de 2015.

Os mecanismos pelo qual a parturição humana é iniciada espontaneamente e as mudanças moleculares que ocorrem durante a transição entre a gestação e o parto não são completamente elucidados. Um dos principais fatores envolvidos são as prostaglandinas, endógenas ou administradas, entre elas a PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>, que estão relacionadas à atividade contrátil e ao amadurecimento cervical. Em casos de necessidade de antecipação do nascimento, as prostaglandinas, entre elas a Dinoprostona (PGE<sub>2</sub>) e o Misoprostol (análogo da PGE<sub>1</sub>), são utilizadas para indução do parto. Entretanto, a resposta à indução do parto é variável e os motivos pelos quais isto ocorre é desconhecido. Uma vez que o parto também envolve modulação do metabolismo oxidativo, que pode ser potencialmente afetado por ação de fármacos, no presente estudo analisamos a expressão dos genes dos receptores de prostaglandina E<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>) em células miometriais e cervicais, *in vivo* e *in vitro*, bem como marcadores oxidativos em células miometriais expostas *in vitro* a diferentes concentrações de Misoprostol. Para a realização dos dois estudos, foram obtidas biópsias teciduais em parturientes a termo; no estudo *in vivo*, em mulheres com parto espontâneo, responsivas e não responsivas à indução do parto com Dinoprostona e no estudo *in vitro*, em mulheres com partos espontâneos e não espontâneos, estes induzidos com Misoprostol. A expressão gênica foi analisada através de qRT-PCR e no estudo *in vitro*, além das análises da modulação gênica, foram conduzidas análises complementares de biomarcadores oxidativos, através de ensaios espectrofotométricos e fluorimétricos. Nos resultados obtidos a partir do estudo *in vivo*, observou-se regulação concomitante e antagônica da expressão do mRNA de EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> nos tecidos cervical e miometrial em gestantes a termo com partos induzidos com Dinoprostona. O mRNA do EP<sub>1</sub> foi superexpresso no tecido cervical de mulheres que não responderam à indução com Dinoprostona. Além disso, no miométrio, níveis significativamente mais elevados de mRNA do EP<sub>3</sub> foram observados em mulheres tratadas com Dinoprostona, independente da sua capacidade de resposta, indicando uma possível regulação da expressão do gene EP<sub>3</sub> a nível transcricional. A análise *in vitro* evidenciou que as células miometriais oriundas de mulheres com parto espontâneo apresentaram maior capacidade de resposta genômica ao Misoprostol, uma vez que uma superexpressão dos genes relacionados com a contração muscular (EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub>) foi observada. Adicionalmente, o Misoprostol foi capaz de modular diferencialmente dois importantes marcadores do metabolismo oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação de proteínas). Porém, este efeito foi dependente da origem das células (se obtida de partos espontâneos ou não espontâneos) e da concentração do fármaco. Os resultados obtidos sugerem que, em gestantes a termo, existe modulação dos genes dos receptores de PGE<sub>2</sub> no miométrio e colo em partos induzidos com Dinoprostona ou Misoprostol, e que os EPs possuem um papel relevante no sucesso do parto espontâneo e na resposta farmacológica aos análogos a prostaglandina E<sub>1</sub>. Adicionalmente, o metabolismo oxidativo também parece desempenhar um papel importante no processo da parturição, necessitando de estudos complementares para esclarecimento da sua real função neste processo.

Palavras-chave: Prostaglandina, Dinoprostona, Misoprostol, Receptor de PGE<sub>2</sub>, Útero, Gestação, Parto, Miométrio, Cérvix



## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Pharmacology Postgraduate Program  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **PROSTAGLANDIN E2 RECEPTORS GENE MODULATION IN MYOMETRIAL AND CERVICAL CELLS OF PROSTAGLANDIN INDUCED LABOR: AN *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDY**

AUTHOR: CRISTINE KOLLING KONOPKA  
ADVISOR: PROF. (PH.D.) IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ  
Place and Date of Defense: Santa Maria, RS, September 18<sup>th</sup>, 2015.

The mechanisms involved in human parturition, and the molecular changes that occur during the transition from pregnancy and birth are not completely elucidated. Endogenous or administered prostaglandins, including the PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub>, are related to contractile activity and cervical ripening, playing an important role on labor. Due to maternal or fetal causes, some pregnancies require labor induction. In many cases, prostaglandins, including Dinoprostone (PGE<sub>2</sub>) and Misoprostol (PGE<sub>1</sub> analog), are used for labor induction. However, the response to labor induction is variable, and the reasons why this occurs are unknown. Once delivery also involves modulation of oxidative metabolism, that can be potentially affected by administered drugs, in the present study, we analyzed prostaglandin E2 receptor (EP1, EP2, EP3 and EP4) gene expression of myometrial and cervical cells, *in vivo* and *in vitro*, as well as oxidative markers in myometrial cells exposed *in vitro* to different concentrations of Misoprostol. In both studies, tissue biopsies were obtained from pregnant women at term. In the *in vivo* study, from women with spontaneous deliveries or Dinoprostone induced labors, responsive or non-responsive to labor induction, and in the *in vitro* study, from women with spontaneous and non-spontaneous labors, these induced with misoprostol. Gene expression was analyzed by qtRT-PCR and oxidative biomarkers by spectrophotometric and fluorimetric analysis. The results obtained from the *in vivo* study showed a concurrent and antagonistic regulation of EP1 and EP3 mRNA expression in cervical and myometrial tissues in pregnant women at term in Dinoprostone induced labors. EP1 mRNA was upregulated in the cervical tissue of women who did not respond to Dinoprostone induction. In addition, in the myometrium, significantly higher levels of EP3 mRNA were observed in women treated with Dinoprostone, independent of their responsiveness, indicating a possible regulation of the EP3 gene at a transcriptional level. *In vitro* analysis revealed that myometrial cells derived from women with spontaneous labors showed greater capacity for misoprostol genomic response, since an overexpression of genes associated with muscle contraction (EP1 and EP3) was observed. In addition, Misoprostol was able to differentially modulate two important oxidative metabolism markers (protein carbonylation and lipid peroxidation). However, this effect was dependent on cells source (whether obtained from spontaneous or non-spontaneous labors) and drug concentration. The results suggest that, in term pregnant women, there is modulation of the PGE<sub>2</sub> receptors genes in myometrial and cervical tissues in Dinoprostone or Misoprostol-induced labors, and that the EPs have an important role in the success of spontaneous delivery and in the pharmacological response to PGE<sub>1</sub> analog administration. Additionally, oxidative metabolism also seems to play an important role in the parturition process, requiring further studies to define its real function in this process.

Keywords: Prostaglandin, Dinoprostone, Misoprostol, PGE<sub>2</sub> Receptor, Uterus, Pregnancy, Labor, Myometrium, Cervix.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Disposição das fibras musculares lisas uterinas..	16
Figura 2 – Vias de AMP cíclico no tecido miometrial..	18
Figura 3 – Contração e relaxamento miometrial.....	19
Figura 4 – Mecanismos mediados pelos receptores de progesterona (PRs) .....	22
Figura 5 – Hipótese da interação entre os fatores envolvidos na parturição em humanos..	26
Figura 6 – Biossíntese dos prostanóides. ....	27
Figura 7 – As funções da proteína G.....	28
Figura 8 – Receptores prostanoides e suas principais vias de sinalização.....	30
Figura 9 – Avaliação do colo uterino através do exame de toque vaginal.....	38
Figura 10 – Estrutura química do Misoprostol e da PGE1 natural. ....	40
Figura 11 – Estrutura química da prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> ). ....	44

### ARTIGO 1

Figure 1 – Schematic representation of prostaglandin receptors. ....	57
--	----

### ARTIGO 2

Figure .1 – Myometrial cells obtained from biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL). ....	76
Figure 2 – Misoprostol effect on prostaglandin receptors gene expression in myometrial cells obtained from biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL)..	78
Figure 3 – Misoprostol effect on oxidative metabolism biomarkers of cells obtained from myometrium biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL).....	79

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Lista abreviada dos efetores primários de cada uma das principais subunidades da proteína G .....	29
Tabela 2 – Receptores eicosanóides e seus respectivos alvos efetores. ....	30
Tabela 3 – Avaliação cervical pelo Índice de Bishop. ....	39

### ARTIGO 1

Table 1. List of primers used during prostaglandin receptor gene expression experiments....	53
Table 2. Baseline subject characteristics.....	55
Table 3. Relative mRNA expression of prostaglandin receptors in uterine tissues of women with spontaneous and dinoprostone-induced labors.....	56
Table 4. Correlation among EP1 gene expression compared to $\beta$ -actin and GAPDH gene in cervix tissue and variables related to delivery.....	58

### ARTIGO 2

Table 1. List of primers used during prostaglandin receptor gene expression experiments.....	73
Table 2. Baseline subjects characteristics. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AKAP	Proteínas de ancoragem à quinase A
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Hidrolase que hidrolisa o ATP
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
Ca <sup>2+</sup> (i)	Íon cálcio intracelular
CAPs	Proteínas associadas à contração
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
Cx43	Conexina-43
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EP	Receptor de prostaglandina E <sub>2</sub>
EPs	Receptores de prostaglandina E <sub>2</sub>
EP1	Receptor do tipo 1 da prostaglandina E <sub>2</sub>
EP2	Receptor do tipo 2 da prostaglandina E <sub>2</sub>
EP3	Receptor do tipo 3 da prostaglandina E <sub>2</sub>
EP4	Receptor do tipo 4 da prostaglandina E <sub>2</sub>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GDP	Guanosina difosfato
Gi	Proteína G inibitória
Gs	Proteína G estimulatória
G <sub>α</sub>	Subunidade alfa da proteína G
G <sub>βγ</sub>	Subunidade betagama da proteína G
G <sub>αi</sub>	Isoforma ou subunidade alfa inibitória da proteína G
G <sub>αs</sub>	Isoforma ou subunidade alfa estimulatória da proteína G
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Hidrolase do GTP (hidrolisa o GTP)
GPx	Glutaciona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
OH•	Radical hidroxila
O <sub>2</sub>	Dioxigênio; oxigênio molecular
IL	Interleucina
IP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato / inositol trifosfato
K <sup>+</sup>	Íons potássio
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído

MEC	Matriz extracelular
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
mPR $\alpha$	Receptores de membrana da progesterona, do tipo $\alpha$
mPR $\beta$	Receptores de membrana da progesterona, do tipo $\beta$
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na <sup>+</sup>	Íons sódio
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nPR	Receptor nuclear de progesterona
NSP	Parto não espontâneo
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical superóxido
OT	Ocitocina
OTR	Receptores de ocitocina
P4	Progesterona
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PG	Prostaglandina
PGs	Prostaglandinas
PGDH	15-hidroxi prostaglandina desidrogenase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF	Prostaglandina F
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGR	Receptor de prostaglandina
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PLC	Fosfolipase C
PV	Parto vaginal
RNA	Ácido ribonucleico
RL	Radical livre
RLs	Radicais livres
PR	Receptor de progesterona
PR-A	Receptor de progesterona do tipo A
PR-B	Receptor de progesterona do tipo B
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
SP	Parto espontâneo
TyKR	Receptores acoplados à tirosina quinase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Útero: considerações anatômicas e fisiológicas .....	15
1.2 Relaxamento e contração uterina .....	18
1.3 Progesterona .....	21
1.3.1 Receptores da progesterona.....	21
1.3.2 Ações genômicas e não genômicas da progesterona.....	23
1.3.3 Progesterona e o parto .....	24
1.4 Prostaglandinas.....	26
1.4.1 Receptores de prostaglandinas .....	28
1.4.2 Prostaglandinas e o parto .....	32
1.5 O papel do metabolismo oxidativo na fisiologia do parto.....	33
1.6 Indução do parto.....	37
1.7 Métodos utilizados para indução do parto.....	39
1.7.1 Métodos mecânicos .....	40
1.7.2 Misoprostol .....	40
1.7.3 Dinoprostona.....	43
1.8 Genômica farmacológica e a indução do parto .....	45
1.9 Justificativa.....	45
2. OBJETIVOS .....	47
2.1 Objetivo geral .....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3. RESULTADOS .....	48
3.1 ARTIGO 1.....	48
3.2 ARTIGO 2.....	67
4. DISCUSSÃO .....	89
5. CONCLUSÃO.....	96
6. REFERÊNCIAS .....	97

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Útero: considerações anatômicas e fisiológicas

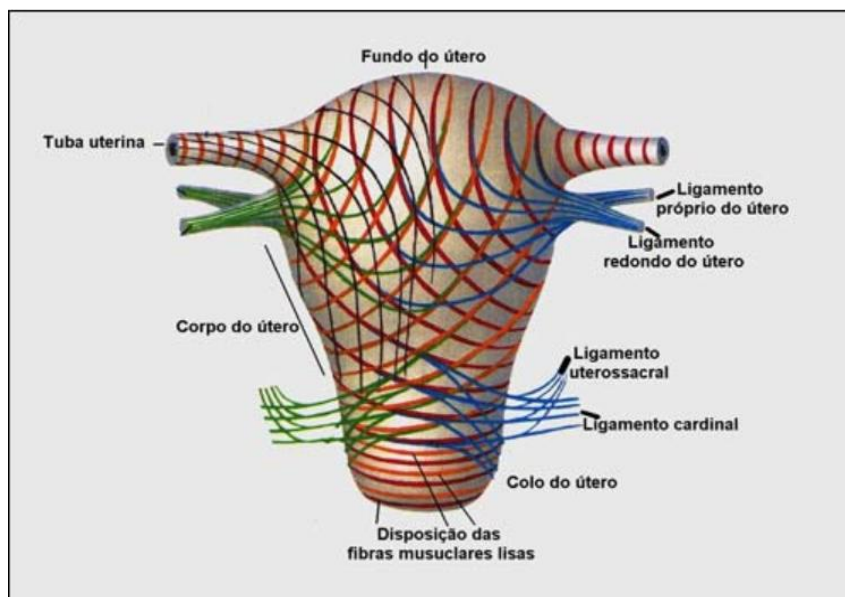
O útero é o principal órgão relacionado ao desenvolvimento embrionário e ao parto. Este órgão é composto por três camadas: o endométrio, localizado internamente; o miométrio, uma espessa camada muscular, que apresenta continuidade com o endométrio, e a serosa, que reveste exteriormente o órgão. Do ponto de vista funcional, é dividido em três partes: porção superior (corpo), porção inferior, próximo ao colo (istmo ou segmento) e colo uterino (AGUILAR e MITCHELL, 2010).

A composição miometrial, que consiste em 70% de fibras musculares e 30% de matriz extracelular (MEC), permanece estável ao longo da gestação (MAHMOUD et al., 2013). A região do istmo, entre o corpo e o colo, é rica em tecido conjuntivo, correspondendo a 75% da sua composição (GRANSTROM et al., 1989; ZUGAIB, 2008). Ao longo da gravidez os tecidos uterinos sofrem adaptações para permitir o crescimento do concepto (AGUILAR e MITCHELL, 2010). As fibras musculares apresentam três tipos de alterações: hiperplasia, hipertrofia e alongamento. Conseqüentemente, os miócitos uterinos, que habitualmente medem cerca de 50  $\mu\text{m}$ , chegam a medir 500  $\mu\text{m}$  durante a gestação. Ao mesmo tempo, em decorrência de alterações na sua fração solúvel, as fibras colágenas presentes na MEC promovem amolecimento da consistência uterina (ZUGAIB, 2008).

A disposição das fibras miometriais se dá de forma a convergir dois sistemas de fibras, que se originam de forma circular em torno das tubas uterinas e se encontram na região mediana (Figura 1). Estes sistemas envolvem todo o útero e se cruzam para formar, entre as fibras de um lado e de outro, ângulos mais agudos superiormente ou ângulos mais obtusos inferiormente (próximo à cérvix). Durante a gestação, ocorre distensão progressiva das fibras musculares para acomodação do feto em crescimento. No trabalho de parto ocorre contração rítmica até a expulsão fetal e no pós-parto contração sustentada para permitir a involução uterina e a hemostasia no pós-parto imediato (ZUGAIB, 2008).

A cérvix uterina é um órgão fibroso, constituído principalmente pela MEC e por 10-15% de músculo liso (LEPPERT, 1995). A MEC é composta por proteoglicanos, proteínas de adesão e colágeno, que se encontra disposto em fibras (STYGAR et al., 2002). As fibras de

colágeno são o componente predominante da MEC colo do útero e são responsáveis pela sua resistência (WORD et al., 2007). O teor de músculo liso diminui ao longo do comprimento da cérvix, e é maior no orifício interno, e menor no orifício externo (MAHMOUD et al., 2013). A porção inferior do colo apresenta 90-95% de tecido conjuntivo (GRANSTROM et al., 1989), 8 a 10% de músculo liso (LEPPERT, 1995; RATH et al., 1982) e 2% de elastina (MAHMOUD et al., 2013).



**Figura 1 – Disposição das fibras musculares lisas uterinas.** Fibras musculares lisas uterinas. Fibras musculares lisas uterinas representadas em vermelho e laranja; ligamentos uterinos representados em verde e azul.

Fonte: <http://www2.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/utero/histologia.htm>, acessado em 04.08.2015

O miométrio e a cérvix têm funções relacionadas e coordenadas durante a gestação e o trabalho de parto. Durante a gestação o colo do útero se mantém fechado para garantir a integridade da gestação e o miométrio apresenta-se relaxado e distensível para acomodar o feto em crescimento (CHALLIS et al., 2000a). À medida que o final da gravidez se aproxima, o colo sofre um processo lento de remodelação, observando-se amolecimento, amadurecimento e dilatação tecidual. Este processo torna-se rapidamente progressivo perto do parto, o que leva a abertura completa da cérvix para permitir a expulsão do conceito. Após o parto ocorre a reparação cervical, que garante a recuperação da integridade do tecido



(LARSEN e HWANG, 2011; LEPPERT, 1995; SENNSTROM et al., 2000). Em cada fase da remodelação ocorrem alterações dentro de um ambiente endócrino único, o que afeta o epitélio, o estroma, a função de células imunológicas e endoteliais, bem como a composição e a estrutura da matriz extracelular (TIMMONS et al., 2010; WORD et al., 2007).

O amolecimento, definido como a diminuição da resistência do tecido em comparação com o estado não gravídico, já pode ser observado por exames digitais em mulheres grávidas desde primeiro trimestre da gravidez. Esta fase ocorre de forma relativamente lenta em um ambiente rico em progesterona. Apesar do aumento progressivo da conformidade, a competência do tecido é mantida (LUDMIR e SEHDEV, 2000). Já o amadurecimento cervical, que acontece depois do amolecimento, é uma fase mais acelerada caracterizada por perda máxima da conformidade e integridade do tecido. Em mulheres, o amadurecimento ocorre nas semanas ou dias que antecedem o nascimento. Após o início das contrações uterinas, o colo do útero amadurecido pode dilatar o suficiente para permitir a passagem de um feto a termo, caracterizando a fase da dilatação (TIMMONS et al., 2010; WORD et al., 2007).

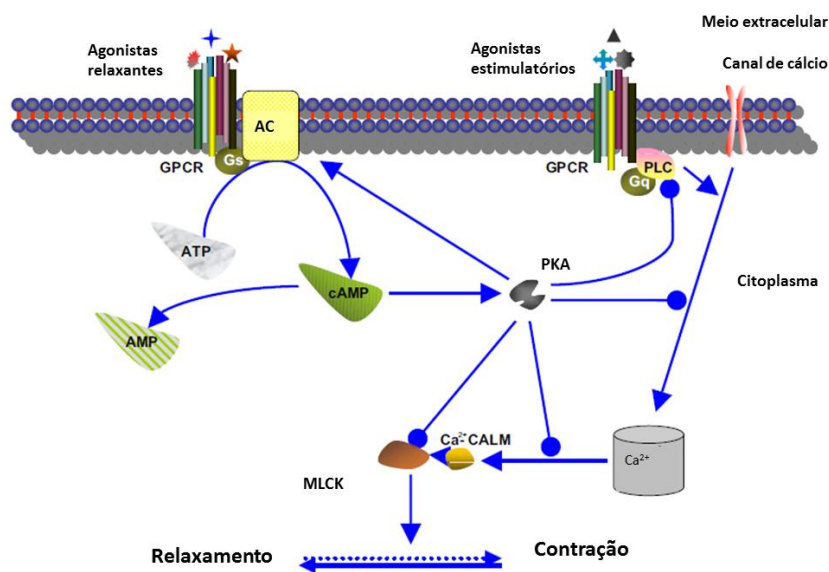
Em termos fisiológicos, o amadurecimento cervical é caracterizado por influxo de células inflamatórias no estroma cervical, o que aumenta as metaloproteinases de matriz (colagenases, gelatinases e elastases), que são enzimas proteolíticas que degradam o colágeno e levam ao rearranjo de suas fibras. Durante este processo, ocorre diminuição de 50 a 70% da concentração de colágeno e proteoglicanos, e, ao mesmo tempo ocorre apoptose de células musculares lisas, levando à perda da conformidade e integridade da cérvix, que se torna amolecida e encurtada (RATH et al., 1982).

O mecanismo exato do amadurecimento cervical ainda não foi completamente esclarecido, porém, vários fatores parecem estar envolvidos no preparo do colo uterino para o parto vaginal (PV), entre eles: perda da ação inibitória da progesterona sobre a maturação cervical, através de processos naturais ou por intervenção farmacológica (CHWALISZ, 1994; LARSEN e HWANG, 2011); mudanças bioquímicas causadas por ação de hormônios (HAYASHI, 1993); prostaglandinas, entre elas a PGE<sub>2</sub>, que medeiam a maturação celular por ativarem metaloproteinases de matriz (CHIEN et al., 2005); a diminuição da quantidade total de glicosaminoglicanos (GAG) (JI et al., 2008), o aumento de fatores como o fator nuclear kappa-B (NF-κB), de ativação plaquetária, ciclooxigenases (COXs) 1 e 2, que parecem participar da sequência de eventos que levam ao amadurecimento cervical final (STJERNHOLM-VLADIC et al., 2004); extravasamento de neutrófilos e macrófagos

(OSMAN et al., 2003) e aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas (IL) IL-6 e IL-8 (OSMAN et al., 2003; SENNSTROM et al., 2000).

## 1.2 Relaxamento e contração uterina

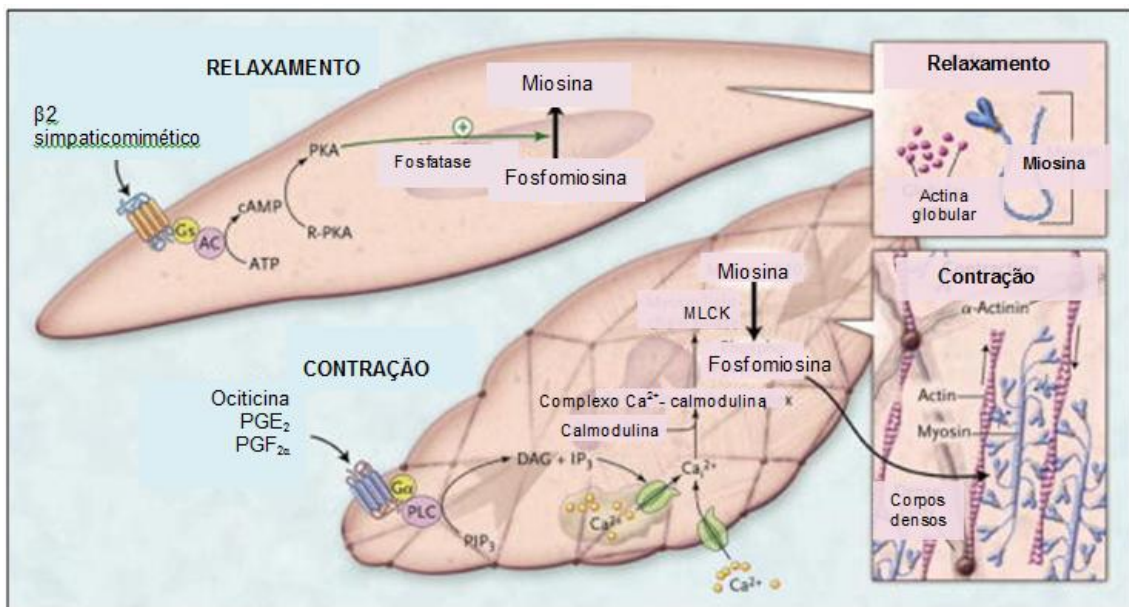
O músculo liso miometrial é composto por uma massa de fibras que relaxam e se contraem juntas, como uma só unidade. Apresenta junções de abertura ou *gap junctions*, que são proteínas ou glicoproteínas cilíndricas, que formam canais que permitem a comunicação entre as células, possibilitando que Íons e pequenas moléculas passem em ambas as direções. Desta forma, ocorre o funcionamento coordenado e harmônico das fibras miometriais (DESPOPOULOS e SILBERNAGL, 2003).



**Figura 2 – Vias de AMP cíclico no tecido miometrial.** A ativação de receptores de membrana acoplado à proteína Gs (GPCR) ativa a adenilciclase (AC), que converte ATP em AMPc. O AMPc induz ao relaxamento uterino através da ativação de uma proteína quinase A (PKA), que fosforila e inibe a cadeia leve da miosina quinase (MLCK). A PKA também pode se opor ao efeito dos receptores Gq, que operam através da fosfolipase C (PLC), permitindo a entrada do cálcio na célula.

→ Estimulação; ● Inibição (Adaptado de YUAN e LOPEZ BERNAL, 2007).

Durante toda a gestação, os miócitos uterinos são mantidos em um estado de relaxamento por uma série de fatores que, ao ativarem receptores de membrana acoplados à proteína G, isoforma  $G_{\alpha s}$ , estimulam a adenilciclase. Esta enzima ativada hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP), formando AMPc (adenosina monofosfato cíclico) intracelular (Figuras 2 e 3). O aumento de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que promove a atividade da fosfatase e desfosforilação da cadeia leve da miosina, o que mantém relaxamento miométrial (figura 3). Este também é promovido por processos que tendem a manter actina na forma globular e prevenir a formação das fibrilas de actina necessárias para a contração (CHALLIS et al., 2000a; YUAN e LOPEZ BERNAL, 2007).



**Figura 3 – Contração e relaxamento miométrial.** Os miócitos uterinos são mantidos em um estado relaxado devido a altas concentrações de AMP cíclico (AMPc) intracelular. O aumento do AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que promove a atividade da fosfatase e desfosforilação da cadeia leve da miosina, mantendo a fibra muscular relaxada. No momento do trabalho de parto, o cálcio entra na célula, por canais de cálcio, e se combina com a calmodulina para formar o complexo cálcio-calmodulina, que ativa a MLCK, fosforilando-a. A fosforilação da cadeia leve da miosina aumenta a afinidade da miosina pela actina, promovendo a contração. PGE: prostaglandina E; PGF: prostaglandina F; PKA: proteína quinase A ativa e catalítica; R-PKA: PKA inativa; PIP2: fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato; IP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; DAG: diacilglicerol; MLCK: quinase da cadeia leve de miosina (Adaptado de SMITH, 2007).

O aumento intracelular de íons cálcio é o estímulo inicial para a contração do músculo liso. Este aumento pode ser causado por estimulação nervosa da fibra muscular lisa, estimulação hormonal (por exemplo, prostaglandinas (PGs) e ocitocina (OT) no caso do útero), estiramento da fibra, ou até mesmo a alteração química no ambiente da fibra (LOPEZ BERNAL, 2003). Os principais componentes que controlam o cálcio na célula miométrial incluem as vias hormonais contráteis, que estimulam receptores acoplados à proteína G (GPCR) e receptores acoplados à tirosina quinase (TyKR). A ligação de um ligante aos receptores GPCR e TyKR ativa a fosfolipase C (PLC), que hidroliza o fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) da membrana plasmática, em inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> liga-se a receptores de IP<sub>3</sub> no retículo endoplasmático, liberando Ca<sup>2+</sup> a partir deste depósito intracelular. A diminuição das concentrações de Ca<sup>2+</sup> são resultados da ação das Ca<sup>2+</sup>-ATPase da membrana plasmática e do retículo endoplasmático e da bomba de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Há também fuga passiva de Ca<sup>2+</sup> a partir do RE. O Ca<sup>2+</sup> tem efeitos estimuladores sobre o aparelho contrátil e também atua como um sinal intracelular influenciando um número de vias do miométrio (SANBORN, 2007).

O aumento do tônus miométrial ocorre quando a concentração de Ca<sup>2+</sup> no citosol encontra-se maior que 10<sup>-6</sup> mol/L (DESPOPOULOS e SILBERNAGL, 2003). O cálcio intracelular, em abundância, se liga à calmodulina e o complexo cálcio-calmodulina ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez, fosforila a cadeia leve da miosina na presença de ATP (Figura 3) (AGUILAR e MITCHELL, 2010). Uma vez ocorrida a fosforilação, a cabeça da miosina adquire a capacidade de se ligar repetidamente aos filamentos de actina e de desenvolver os ciclos de “trações” intermitentes, provocando assim a contração muscular (GUYTON e HALL, 2006).

Durante o parto, a ligação das prostaglandinas e da ocitocina a seus receptores ativa a fosfolipase C (PLC), ligada à proteína G (figura 3). Sua ativação continua pelo tempo em que o ligante ocupa o receptor (RANG et al., 2008; SIEGEL et al., 2006), resultando em influxo de íons Ca<sup>2+</sup> e, por ação do DAG, ativação da MLCK, responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina, promovendo a contração uterina por aumento da afinidade da miosina pela actina (SANBORN, 2007). À medida que o cálcio entra na célula, ocorre queda na eletronegatividade celular, uma vez que a célula torna-se eletricamente positiva devido a altas concentrações citoplasmáticas de Ca<sup>2+</sup>. Desta forma, ocorre a despolarização, permitindo que a célula saia do seu potencial de repouso (CHALLIS et al., 2000b; SMITH, 2007).

O trabalho de parto nos seres humanos é caracterizado por um padrão contrátil específico, com contrações uterinas intermitentes, com frequência e intensidade crescentes.

Ou seja, após cada contração existe um período de relaxamento, o qual permite reestabelecer o fluxo sanguíneo para o feto (ZUGAIB, 2008). Desta forma, o útero passa por um processo de transformação, de um órgão quiescente e relaxado, que acomoda o feto em crescimento, em um útero ritmicamente contrátil, culminando com a dilatação da cérvix e expulsão fetal. Fatores como hormônios, entre eles progesterona, estrógenos e ocitocina, receptores hormonais, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias fazem parte deste processo de transformação uterina (HUSSLEIN e EGARTER, 1994).

### 1.3 Progesterona

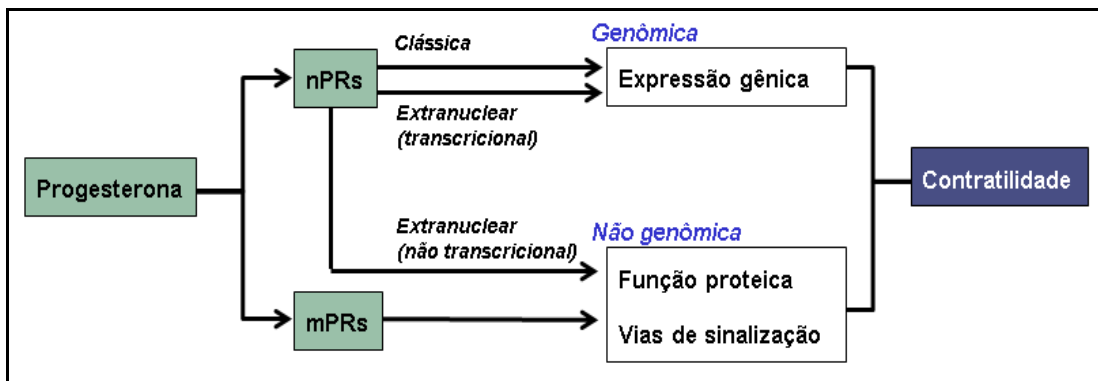
A progesterona (P4) é produzida pelo corpo lúteo nos ovários, pelas glândulas suprarrenais e, durante a gravidez, pela placenta. Na gestação de seres humanos, quantidades crescentes de progesterona são produzidas, inicialmente pelo corpo lúteo. Depois de 6-8 semanas de gravidez, a produção lútea diminui e o trofoblasto assume como a principal fonte de produção de P4 (SPEROFF e FRITZ, 2005). Este processo é chamado de mudança lúteo-placentária. A progesterona de origem placentária continua a aumentar até ao termo, podendo atingir 100-200 ng/ml. Na espécie humana, a diminuição nos níveis de P4 só ocorre após a liberação da placenta (dequitação), o que ocorre ao final do parto (SPEROFF e FRITZ, 2005; TUCKEY, 2005).

#### 1.3.1 Receptores da progesterona

Hormônios esteroides, como é o caso da progesterona, atravessam a membrana plasmática livremente. No interior da célula, podem se ligar a receptores específicos desencadeando uma cascata de sinalização celular. Assim, as ações da P4 são mediadas por uma variedade de receptores da progesterona (PRs), como pode ser visto na Figura 4, incluindo duas isoformas de seu receptor nuclear (nPR), respectivamente “A” e “B”, que medeiam especialmente ações

genômicas, e uma família de receptores ligados à membrana, que medeiam ações não-genômicas (MESIANO et al., 2011). Nos seres humanos, o gene nPR codifica os receptores de progesterona do tipo B (PR-B) e A (PR-A), sob o controle de duas regiões promotoras distintas (CONNELLY e LYDON, 2000; GIANGRANDE e MCDONNELL, 1999).

Os nPRs funcionam como fatores de transcrição ativados por um ligante. A localização do complexo ligante-receptor para a resposta transcricional de genes é no núcleo da célula. Porém, na ausência de seus ligantes, os receptores nucleares se localizam predominantemente no citoplasma. Após a entrada do ligante na célula, por difusão ou transporte, ocorre a ligação de alta afinidade com os nPRs. Estes receptores geralmente formam homodímeros e são translocados para dentro do núcleo. No interior do núcleo, o receptor ligado ao ligante recruta mais proteínas, incluindo co-ativadores ou co-repressores, a fim de modificar a expressão gênica. Desta forma, ocorre a transcrição gênica (síntese de ácido ribonucleico (RNA) a partir do ácido desoxirribonucleico (DNA) e posterior síntese proteica, através da tradução deste RNA) ou repressão gênica (inibição da transcrição) (LEONHARDT et al., 2003; RANG et al., 2008).



**Figura 4 – Mecanismos mediados pelos receptores de progesterona (PRs)**, através dos quais a progesterona afeta a contratilidade miométrial. A progesterona interage com receptores nucleares (nPRs) e receptores de membrana (mPRs) em células do miométrio. PRs nucleares medeiam ações genômicas, modulando a expressão gênica via modos de ação clássicos e extranucleares. Além disso, nPRs podem afetar a função celular de forma não genômica pela via extranuclear, através da modulação não transcricional da função da proteína. Os mPRs medeiam respostas não genômicas clássicas, através do seu acoplamento direto com moléculas de sinalização intracelular. O efeito de cada uma das vias é modular o fenótipo contrátil do miométrio, que na maior parte da gravidez se encontra num estado de relaxamento induzido pela progesterona (Adaptado de MESIANO et al., 2011).

### 1.3.2 Ações genômicas e não genômicas da progesterona

Estudos *in vitro* sugerem que o PR-B é o principal mediador das ações genômicas da progesterona. O PR-A também modula a transcrição de alguns genes, no entanto, ele atua principalmente para reprimir a atividade transcricional do PR-B. A extensão em que PR-A diminui a atividade do PR-B depende da sua quantidade relativa ao PR-B. Assim, a resposta genômica da P4 é determinada pelas ações dupla e oposta do PR-A e do PR-B, e é inversamente relacionada à relação PR-A/PR-B (GIANGRANDE et al., 2000).

Há evidências na literatura da importância dos nPRs na ação da progesterona durante a gestação. O principal mecanismo genômico pelo qual a P4 reprime a contratilidade miometrial é pela repressão da expressão de genes que codificam as proteínas associadas a contrações (CAPS), responsáveis pela promoção do parto (ZAKAR e MESIANO, 2011). Algumas CAPs importantes incluem os receptores de ocitocina (OTR) e da prostaglandina PGF2 $\alpha$ , proteína conexina-43 (Cx43) da junção *gap* e a enzima metabolizadora de PG, a 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase (PGDH). A progesterona diminui a responsividade à OT e à PGF2 $\alpha$  por inibir a expressão de seus receptores (BRODT-EPPLEY e MYATT, 1998; FANG et al., 1997). A P4 reduz os níveis de OT miometrial indiretamente por inibir a indução do estrógeno sobre a expressão dos OTR (ADACHI e OKU, 1995). Também aumenta a inativação das PGs de maneira significativa, por aumentar a expressão de PGDH no miométrio e córion (PATEL et al., 2003) e diminui a expressão da Cx43, um componente importante das junções *gap* miometriais, que servem para sincronizar as contrações em todo o útero (CHOW e LYE, 1994; DI et al., 2001; ZHAO et al., 1996).

A progesterona aumenta a atividade da cascata de sinalização do AMPc/PKA nas células miometriais, promovendo o relaxamento do músculo liso, em parte, pela inibição da via PLC/Ca<sup>2+</sup> mediada pela PKA (LOPEZ BERNAL, 2003; SANBORN, 2007). Atividade da PKA é modulada pela sua associação com proteínas de ancoragem à quinase A (AKAP), que são proteínas que têm como função a ligação com a subunidade reguladora da PKA, que concentra a PKA em compartimentos intracelulares específicos e facilita sua capacidade de fosforilar alvos específicos, especialmente a PLC (EDWARDS e SCOTT, 2000).

Porém, uma grande parte das ações da P4 são muito rápidas para serem explicadas por um mecanismo genômico, que geralmente ocorre ao longo de uma escala de tempo de horas. Desta forma, após diversos estudos desenvolvidos em diferentes tecidos, atualmente é amplamente reconhecido que a P4, pode também se acoplar aos receptores de membrana, exercendo ações rápidas iniciadas na superfície celular, que desencadeiam respostas celulares

em poucos minutos (THOMAS e PANG, 2012). Estas respostas biológicas rápidas são mediadas por uma grande variedade de sistemas de segundo mensageiro celular, podendo ativar as seguintes vias de transdução de sinal: proteína quinase ativada por mitógeno (MAP), fosfatidilinositol-3-quinase, transdutores de sinal e ativadores de transcrição, fosfatases, óxido nítrico sintase (NOS), proteinases, receptor do fator de crescimento epidérmico, SRC quinase, SHC quinase, proteína quinase C, adenilciclase e proteínas GTP (guanosina trifosfato). Em geral, estes sistemas de sinalização estão presentes no citoplasma (e às vezes perto da membrana plasmática) e produzem respostas no citoplasma e/ou membrana (por exemplo, a abertura de canais) ou participam na interferência funcional com o núcleo, modulando a transcrição gênica (NORMAN et al., 2004).

KARTERIS et al. (2006) relataram a presença de dois receptores funcionais de progesterona na membrana de células miometriais ( $mPR\alpha$  e  $mPR\beta$ ), ligados à proteína G inibitória (Gi). Neste estudo, sua ativação em culturas primárias de células humanas miometriais de gestações a termo diminuiu os níveis de AMPc e aumentou a fosforilação da cadeia leve de miosina, aumentando a contratilidade miometrial. A ativação de mPRs também leva à transativação do PR-B, que seria esperado para diminuir a contratilidade da via genômica. Para conciliar essas atividades opostas, eles propuseram que durante a maior parte da gravidez as ações genômicas do PR-B dominam para relaxar o miométrio, e que  $mPR\alpha$  e  $mPR\beta$  aumentam esta via aumentando a atividade de RP-B. No parto, a retirada funcional da P4 contradiz as ações do PR-B, permitindo que as ações não-genômicas mediadas por  $mPR\alpha$  e  $mPR\beta$  prevaleçam e, portanto, aumente a contratilidade, diminuindo a adenosina monofosfato (AMP) e aumentando a fosforilação da miosina. Este modelo propõe que, durante a maior parte da gravidez, as ações não-genômicas e genômicas da progesterona conspiram para relaxar o miométrio, enquanto as vias não-genômicas mediadas pelos  $mPR\alpha$  e  $mPR\beta$  prevalecem após a retirada funcional da progesterona, promovendo a contração.

### 1.3.3 Progesterona e o parto

A P4 é um fator importante para manter a latência uterina durante a gravidez. Na maioria das espécies, os níveis periféricos deste hormônio declinam antes do início do trabalho, e os tratamentos que inibem sua síntese ou bloqueiam sua ação causam a interrupção da gravidez e/ou partos prematuros (BROWN et al., 2004). Estes resultados, que sugerem que a retirada da P4 é necessária para o desencadeamento das contrações miometriais, levaram ao



conceito do "bloqueio de progesterona", que postula que este hormônio bloqueia a contração miometrial, enquanto a sua retirada desencadeia o trabalho de parto (CSAPO, 1956).

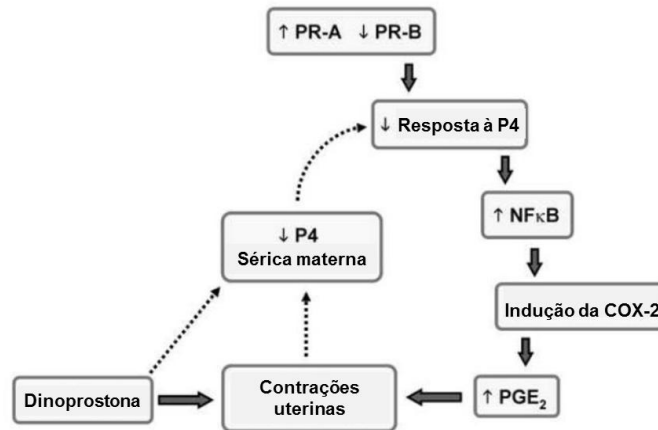
No entanto, a redução dos níveis circulantes de P4 antecedendo o nascimento não foi comprovada em humanos. Estudos mostram que nesta espécie parece haver uma retirada "funcional" da progesterona antes do parto, ou seja, ocorre perda da sensibilidade à progesterona, decorrente de diferentes mecanismos, incluindo: catabolismo da P4 no útero em compostos inativos, alterações na proporção entre as diferentes isoformas de seu receptor, expressão diferenciada de moléculas que agem como correguladores da P4 e transrepressão da P4, induzida por inflamação, através do NF- $\kappa$ B. Estes mecanismos são potencialmente capazes de comprometer a função da P4, permitindo a expressão de vias que foram originalmente bloqueadas pela P4 no início da gravidez (MENDELSON, 2009).

Fatores imunológicos, tais como citocinas e quimiocinas, ativam o NF- $\kappa$ B, que por sua vez leva à supressão funcional da progesterona. O NF- $\kappa$ B aumenta a expressão de COX-2 e de genes contráteis. A retirada funcional da progesterona em conjunto com o aumento da expressão de COX-2 e de genes contráteis resulta em aumento das contrações miométriais, o que é um componente essencial para o início do trabalho de parto (VRACHNIS et al., 2012).

Em estudo recente, TAN et al. (2012) observaram que a P4 diminuiu a expressão de genes pró-inflamatórios quando predominava PR-B e aumentou sua expressão quando predominava PR-A. A P4 via PR-B aumentou a expressão do repressor nuclear do NF- $\kappa$ B (inibidor- $\kappa$ B $\alpha$ ), promovendo relaxamento miometrial. Durante o parto, com o aumento da expressão do PR-A, houve aumento da expressão de genes pró-inflamatórios em resposta à P4.

Entretanto, os mecanismos relacionados ao efeito da P4 no parto em humanos, que diferem de outras espécies, ainda apresentam muitas questões a serem respondidas (VRACHNIS et al., 2012). Apesar da redução dos níveis circulantes de P4 antecedendo o nascimento não ter sido claramente comprovada em humanos, estudo envolvendo dosagens hormonais ao longo da gestação e do parto mostrou, no início do trabalho de parto, menor relação progesterona/estriol (SMITH et al., 2009). Em revisão de literatura realizada durante a execução do presente trabalho, não foram encontrados artigos associando os níveis dos hormônios esteroides com a resposta à indução do parto. Considerando estes aspectos, um estudo prévio conduzido por KONOPKA et al. (2013) investigou dosagens séricas de estradiol, estriol e progesterona, durante o processo do nascimento, em gestantes sem trabalho de parto, em gestantes com partos espontâneos e induzidos com Dinoprostona (PGE<sub>2</sub>). Os resultados mostraram redução significativa dos níveis séricos de progesterona ao longo do trabalho de parto, quando houve resposta positiva à indução, ou seja, nas gestantes que

entraram em trabalho de parto após a administração de Dinoprostona. A partir deste achado, e no intuito de contribuir com o entendimento dos processos envolvidos na parturição, foi formulada uma hipótese da ocorrência de interação entre os fatores envolvidos na parturição em humanos, como pode ser visto na Figura 5.



**Figura 5 – Hipótese da interação entre os fatores envolvidos na parturição em humanos.** Contrações induzidas pela Dinoprostona podem contribuir para a retirada da progesterona. O aumento da relação PR-A/PR-B diminui a atividade da progesterona (P4), por não suprimir as respostas mediadas pelo NF-KB, incluindo a indução de COX-2 e aumento da síntese dos prostanoídeos (PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>), o que causa a contração uterina. A Dinoprostona, um análogo da PGE<sub>2</sub>, diminui os níveis de P4 por mecanismos ainda desconhecidos, que podem incluir diminuição da produção/secreção placentária de P4 ou constrição de vasos uterinos devido à contratilidade uterina, contribuindo para a retirada da progesterona (Adaptado de KONOPKA et al., 2013).

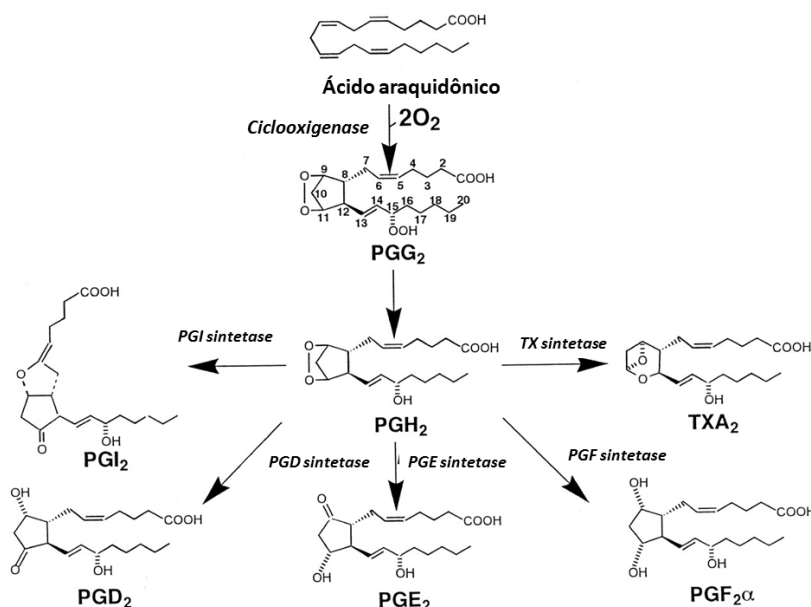
#### 1.4 Prostaglandinas

As prostaglandinas diferem dos hormônios, pois são formadas em quase todos os tecidos e não em glândulas especializadas, e em geral agem localmente, em vez de serem transportadas pelo sangue até a célula-alvo (SPEROFF e FRITZ, 2005). São produzidas por todas as células nucleadas (FORTIER et al., 2008) e liberadas para o exterior da célula, onde

exercem suas funções em locais próximos ao seu local de formação, através da ativação de receptores de membrana (MATSUOKA e NARUMIYA, 2007).

Quimicamente, as prostaglandinas são moléculas prostanoides, ou seja, metabólitos do ácido araquidônico, via COX, que incluem além das prostaglandinas PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, e PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) o tromboxano A<sub>2</sub> (figura 6). Os prostanóides são sintetizados e liberados pelas células após sua estimulação, desencadeando uma ampla faixa de respostas fisiológicas, sendo sua principal ação o relaxamento e contração de vários tipos de músculos lisos (NARUMIYA et al., 1999). As PGs dos grupos E e F são denominadas primárias e possuem a maior atividade biológica. As prostaglandinas F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>) e E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) são as prostaglandinas associadas aos processos reprodutivos (NARUMIYA et al., 1999; SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007; SUGIMOTO et al., 2015).

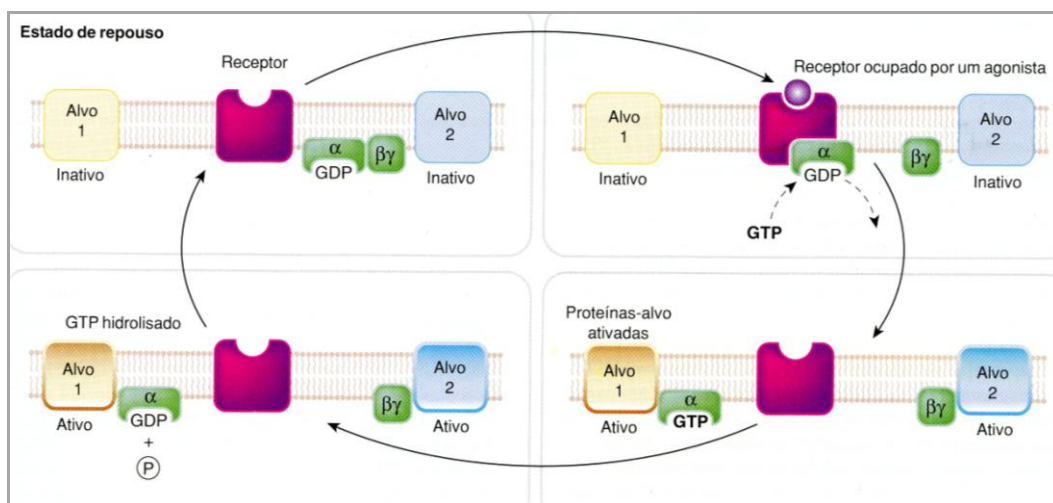
A produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e de outros eicosanóides pela unidade fetoplacentária está relacionada à atividade contrátil aumentada (CHALLIS et al., 2000b; LOPEZ BERNAL, 2003) e ao amolecimento da cérvix, decorrente da reorganização das fibras de colágeno (CHIEN et al., 2005; JI et al., 2008; MAHMOUD et al., 2013) durante o trabalho de parto.



**Figura 6 – Biossíntese dos prostanóides** (Adaptado de NARUMIYA et al., 1999).

### 1.4.1 Receptores de prostaglandinas

Existem diferentes tipos de receptores de prostaglandinas (PGRs) entre eles receptor da PGD, quatro subtipos da PGE, da PGF e da PGI (MATSUOKA e NARUMIYA, 2007). Os PGRs podem ser localizados na membrana plasmática e nuclear. Sua localização pode mudar durante a gestação e o parto (SANBORN, 2007). Os receptores de membrana se ligam a diversas proteínas G, localizadas na membrana citoplasmática. No estado de repouso a proteína G aparece como um trímero  $\alpha\beta\gamma$ , com o GDP ocupando o sítio na subunidade  $\alpha$ . Quando ocorre ligação de uma molécula agonista ao receptor acoplado à proteína G, ocorre dissociação do GDP ligado e sua substituição por GTP, ocorrendo liberação das subunidades  $\alpha$ -GTP e  $\beta\gamma$ , que são as formas ativas da proteína G, que se difundem na membrana e podem se associar a diversas enzimas e canais iônicos, causando a ativação do alvo (Figura 7). Cada subtipo de proteína G age em diferentes alvos efetores, conforme pode ser visto na tabela 1 (BRIDGES e LINDSLEY, 2008).



**Figura 7 – As funções da proteína G.** A proteína G consiste em 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), que estão ancoradas à membrana. A ligação de um agonista ao receptor acoplado à subunidade  $\alpha$  da proteína G promove a troca do GDP (guanosina difosfato), ligado à subunidade  $\alpha$ , pelo GTP (guanosina trifosfato) intracelular. O complexo  $\alpha$ GTP se dissocia do receptor e do complexo  $\beta\gamma$  e interage com uma proteína-alvo, como a adenilciclase ou canal iônico, ativando cascatas de sinalização. A atividade da GTPase (hidrolase do GTP) da subunidade  $\alpha$  aumenta quando a proteína-alvo é ligada, resultando em hidrólise do GTP ligado, para GDP, fazendo com que a subunidade  $\alpha$  se reúna com  $\beta\gamma$  novamente (Adaptado de RANG et al., 2008).

A PGE<sub>2</sub> e as demais PGs apresentam um amplo espectro de ações fisiológicas, que dependem do tipo de receptores ao qual a molécula está ligada (FORTIER et al., 2008). Dos quatro subtipos de receptores de PGE<sub>2</sub> (EPs) identificados (EP1, EP2, EP3 e EP4), o subtipo EP<sub>3</sub> apresenta diferentes isoformas (A-D), que podem surgir por meio do processamento pós-transcricional (*splicing*) do mRNA (NARUMIYA et al., 1999). Estes receptores são codificados por genes separados, e têm diferentes pesos moleculares (EP1=42 kDa, EP2=68 kDa, EP3= 62 kDa e EP4=53 kDa), estão acoplados a diferentes proteínas G, ativando efetores e vias de sinalização distintas. Como pode ser visto na tabela 2 e Figura 8, o receptor EP1, acoplado a uma proteína Gq e a canais de cálcio, aumenta o influxo do cálcio. Os receptores EP2 e o EP4, acoplados a uma proteína G estimulatória (Gs), estimulam a adenilciclase e aumentam a geração de AMPc. O EP3, acoplado à proteína Gi, inibe a adenilciclase, diminui o AMPc e aumenta o cálcio intracelular (KOTANI et al., 1995). Conseqüentemente, no útero, a ativação de EP1 e EP3 está relacionada à contração do músculo liso, enquanto a ativação de EP2 e EP4 está relacionada ao relaxamento uterino.

**Tabela 1** – Lista abreviada dos efetores primários de cada uma das principais subunidades da proteína G

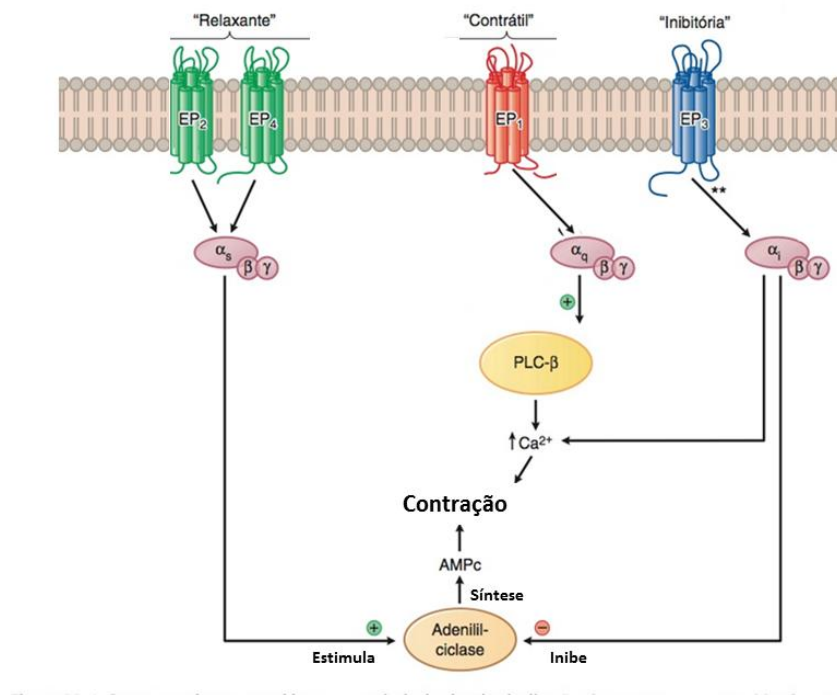
Proteína G	Alvos efetores
Gβγ	Canais iônicos, GIRK, PI3K, fosfolipases, adenilciclase
Gas	Adenilciclase (+AMPc), canais de Na <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup>
Gai/o	Adenilciclase (-cAMP), canais de K <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup> fosfolipases
Gaq/11	Fosfolipase Cβ

Fonte: BRIDGES e LINDSLEY, 2008.

**Tabela 2** – Receptores eicosanóides e seus respectivos alvos efetores.

Receptores	Alvos efetores
Eicosanóides	
EP1	ativa a via da PLC-IP <sub>3</sub> -Ca <sup>2+</sup> i por meio da Gq
EP2	ativa a adenilciclase por meio da Gs e ↑ AMPc
EP3	inibe adenilciclase por meio da Gi e ↓ AMPc; ↑ Ca <sup>2+</sup> i
EP4	ativa a adenilciclase por meio da Gs e ↑ AMPc

Fonte: BRUNTON et al., 2012.



**Figura 8** – Receptores prostanoídeos e suas principais vias de sinalização. Os receptores prostanoídeos fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína. Os termos “relaxante”, “contrátil” e “inibitório” referem-se à caracterização filogenética dos seus efeitos primários (Adaptado de BRUNTON et al., 2012).

Entretanto, os EPs não se acoplam exclusivamente nas vias descritas, mas muitas vezes de ligam a mais de uma proteína G e atuam através de outras vias de sinalização. Esta heterogeneidade molecular e bioquímica dos receptores da PGE<sub>2</sub> torna-a o prostanóide mais versátil (SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007). Além disto, a PGE<sub>2</sub> e a PGF<sub>2α</sub> podem atravessar sucessivas camadas de células através da proteína G, entrar nas células alvo para agir nos receptores nucleares ou serem inativadas pela PGDH (MATSUOKA e NARUMIYA, 2007).

Vários estudos investigaram previamente a expressão EPs em animais, entre eles SMITH et al. (1998) compararam a expressão dos receptores nas diversas regiões do útero. Estes autores observaram uma expressão de EP<sub>3</sub> significativamente mais elevada no segmento superior e a expressão do EP<sub>2</sub> significativamente mais elevada no segmento inferior. Na cérvix foi observada a expressão de EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, sendo o EP<sub>2</sub> mais abundante.

No entanto, nos seres humanos, a maioria dos estudos foi limitada a biópsias do segmento inferior (BRODT-EPPLEY e MYATT, 1999; LEONHARDT et al., 2003; MATSUMOTO et al., 1997). No caso, MATSUMOTO et al. (1997) encontraram 60% de diminuição da expressão de EP<sub>3</sub> em amostras miometriais de gestantes fora de trabalho de parto, quando comparado a amostras miometriais de úteros não gravídicos. Estes autores concluíram que a *downregulation* (diminuição da expressão gênica) do EP<sub>3</sub> durante a gestação pode colaborar para o relaxamento miometrial e a manutenção da gestação. Por outro lado, BRODT-EPPLEY e MYATT (1999), analisando amostras de miométrio de segmento uterino inferior em gestantes fora de trabalho de parto, em gestações pré-termo e a termo, observaram maior expressão de EP<sub>2</sub> nas gestações pré-termo.

LEONHARDT et al. (2003) observaram que a expressão do mRNA do EP<sub>2</sub> foi inversamente relacionada com a idade gestacional, em amostras de miométrio do segmento uterino inferior, obtidas em gestantes sem trabalho de parto. As células do músculo liso miometrial exibiram forte expressão da proteína dos receptores EP<sub>1</sub> e EP<sub>4</sub> e fraca expressão da proteína do receptor EP<sub>2</sub>. A proteína do receptor EP<sub>3</sub> não pôde ser detectada em células do músculo miometrial, mas foi somente expressa em células endoteliais e estromais. Estes autores sugerem que o efeito contrátil da PGE<sub>2</sub> no termo é provavelmente mediado diretamente pelo receptor EP<sub>1</sub> expresso em células do músculo liso miometrial e indiretamente pelo receptor EP<sub>3</sub> expresso em células estromais, e pela diminuição da expressão do receptor EP<sub>2</sub>.

#### 1.4.2 Prostaglandinas e o parto

As prostaglandinas (PGs) desempenham papéis fundamentais no trabalho de parto e estão relacionadas às contrações uterinas (CHALLIS et al., 2000b; LOPEZ BERNAL, 2003) e ao amolecimento cervical (CHIEN et al., 2005; JI et al., 2008; MAHMOUD et al., 2013). As PGs que ocorrem naturalmente são rapidamente metabolizadas na circulação humana. Desta forma, análogos de PGs resistentes à rápida inativação têm sido desenvolvidos para uso clínico, uma vez que as PGs naturais são prontamente metabolizadas na circulação humana (BYGDAMAN, 2003). Desta forma, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> são utilizadas para facilitar o parto, promovendo de forma eficaz o amadurecimento e dilatação da cérvix, sendo capazes de induzir o parto em até 24 horas. As preparações disponíveis incluem Dinoprostona (PGE<sub>2</sub>) e Misoprostol, um análogo da PGE<sub>1</sub> (BRUNTON et al., 2012).

Uma vez que as prostaglandinas estão relacionadas com o processo de parturição, vários estudos vêm sendo realizados para determinar a expressão de receptores EPs em gestantes, em associação com parto a termo ou pré-termo. ASTLE et al. (2005), ao estudarem amostras de segmento uterino superior e inferior em gestações humanas a termo e pré-termo com e sem trabalho de parto, através dos métodos de reação em cadeia da polimerase, em tempo real (RT-PCR) e imuno-histoquímica, concluíram que as alterações na localização e expressão dos receptores da PGE<sub>2</sub> desempenham papel importante na parturição. Neste estudo o EP2 e, em menor extensão, o EP4 estiveram presentes no miométrio, apesar de sua função até o presente não estar clara. O EP1 teve forte expressão e apresentou aumento da expressão gênica (*upregulation*) no parto. Por outro lado, ocorreu redução da expressão gênica (*downregulation*) do EP3. Segundo estes autores, o EP1 é o principal mediador do efeito contrátil da PGE<sub>2</sub> no miométrio (ASTLE et al., 2005)

ARULKUMARAN et al. (2012) não acharam diferenças na expressão de EP1 e EP3 no segmento uterino superior e inferior na gestação em humanos, nem alterações relacionadas com o início do trabalho de parto (ARULKUMARAN et al., 2012). Eles observaram que o EP3 é o receptor que induz a contração miometrial na gestação a termo, contrapondo a informação anterior de *downregulation* do EP3 no parto, encontrada por ASTLE et al. (2005).

Os escassos estudos acerca da expressão dos diferentes EPs nos tecidos uterinos em gestantes em trabalho de parto têm resultados divergentes, ainda não completamente elucidados. No entanto, a regulação diferencial de receptores EP no miométrio indica que eles podem desempenhar um papel no desencadeamento e na manutenção do trabalho de parto em humanos (ASTLE et al., 2005).



## 1.5 O papel do metabolismo oxidativo na fisiologia do parto

A modulação diferencial do metabolismo oxidativo das células uterinas parece ter algum nível de influência no parto (PATIL et al., 2007). A potencial influência do metabolismo oxidativo no parto está baseada no fato de que a indução da contração das fibras musculares uterinas durante o parto demanda uma grande quantidade de energia obtida através das rotas bioquímicas mitocondriais que utilizam o oxigênio e a glicose como substrato para a produção de ATP (PATIL et al., 2007).

Entretanto, o oxigênio utilizado para produção de energia pelos organismos aeróbios pode ser potencialmente prejudicial para os sistemas biológicos (BURTON e JAUNIAUX, 2011), uma vez que 1 a 4% do oxigênio consumido se desestabiliza eletronicamente, produzindo continuamente o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) no interior da mitocôndria, o que pode levar à produção de outros radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (RAHA e ROBINSON, 2000) na célula.

Portanto, as mitocôndrias são as principais organelas envolvidas na produção de EROs. Nelas o oxigênio molecular sofre redução tetravalente até a formação de água, com formação de intermediários reativos, tais como o ânion superóxido ou radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL, 2007). Para controlar os níveis de RLs e EROs o organismo conta com um sistema antioxidante endógeno no qual a enzima superóxido dismutase dismuta o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . Por fim, esta molécula é convertida em água ou pela enzima glutathione peroxidase (GPX) ou pela catalase (CAT) dependendo do compartimento celular. Moléculas antioxidantes não-enzimáticas, provenientes principalmente da dieta, podem auxiliar no controle dos níveis de EROs nas células (HALLIWELL, 2007). O metabolismo aeróbio não é a única fonte de EROs. Estas também podem ser geradas pelas oxidases (enzimas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, conseqüentemente, podem servir como segundo mensageiro em processos específicos de sinalização celular e regulação gênica (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004).

Apesar de serem moléculas potencialmente danosas ao organismo, níveis baixos de EROs e ERNs são essenciais para a manutenção de processos fisiológicos fundamentais para o funcionamento do organismo. Isto porque estas moléculas também participam em diversas rotas metabólicas envolvidas na regulação do tônus vascular, no controle da morte celular

programada e na transdução de sinais envolvidos com a função imune (DROGE, 2002). No entanto, a produção exacerbada e descontrolada das EROs e das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) leva a efeitos deletérios irreversíveis no metabolismo protéico, lipídico e no DNA, podendo causar danos celulares e o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis (FOLKERTS et al., 2001).

Outra ERO que é muito importante para a fisiologia corporal, em especial para a regulação do relaxamento muscular, é o óxido nítrico (ON). Esta molécula é sintetizada pela enzima NOS durante o processo de conversão de L-arginina a L-citrulina. Com um elétron não emparelhado o NO, que é radical livre (RL) altamente reativo, que, em níveis não controlados danifica proteínas, carboidratos, nucleotídeos e lipídios, e, em conjunto com outros mediadores inflamatórios, resulta danos celulares e teciduais (BURTON e JAUNIAUX, 2011). Devido à alta afinidade do ânion  $O_2^{\cdot-}$  com o ON, ocorre a formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), uma ERN com potente ação oxidante, que pode causar extensa lipoperoxidação das membranas (HALLIWELL, 2007).

Fatores endógenos (genéticos) e exógenos (ambientais) também podem levar a um aumento na produção de EROs e, conseqüente, produção de um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). O termo “desequilíbrio redox” ou “estresse oxidativo” é usado nas situações em que existe um desequilíbrio nas reações de oxirredução, também conhecidas como reações redox, nas quais ocorre transferência de elétrons, e têm sido utilizadas para descrever a participação das EROs nos processos de sinalização celular, e não somente como moléculas causadoras de danos oxidativos (VASCONCELOS et al., 2007).

A ação das EROs e ERNs sobre a estrutura e fisiologia das membranas celulares denomina-se peroxidação lipídica. Através da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nos lipídios, assim como pela inibição da síntese dos lipídios, desnaturações de ácidos graxos ou ativação das lipases ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com risco de ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (VASCONCELOS et al., 2007). Durante as reações que envolvem a oxidação dos lipídios vários produtos intermediários são produzidos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) que reage com o grupo amina de purinas. Este metabólito pode ser detectado através da técnica espectrofotométrica do ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo importante indicador de peroxidação lipídica (LYKKESFELDT, 2007).

As proteínas têm diversos sítios reativos e durante o estresse oxidativo, o primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração de H• do carbono  $\alpha$ , em

uma ligação peptídica. Desta forma ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção de compostos carbonilados, particularmente a partir de prolina, arginina e lisina (VASCONCELOS et al., 2007). A carbonilação também pode ocorrer através da reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (MDA) ou gerados a partir da reação de redução da glicose ou com produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (ELLIS, 2007; VASCONCELOS et al., 2007). O dano causado por aldeídos leva à perda da função de proteínas e enzimas, danifica lipídios e ainda leva à formação de adutos no DNA. Estas perturbações moleculares podem culminar com a morte celular (ELLIS, 2007).

O estresse oxidativo também pode causar genotoxicidade, ou seja, extensos danos ao DNA que pode levar ao acúmulo de mutações que prejudicam a função destas células, podendo criar instabilidade genômica e até induzir a apoptose das mesmas. Como exemplo pode ser citado o radical  $\text{OH}\cdot$ , que é produzido por reações químicas, como a reação de Fenton, possui alta afinidade com a molécula de DNA gerando quebras e outros danos genômicos (MURTAS et al., 2010). Portanto, é fundamental a existência de um mecanismo de defesa e reparo celular, uma vez que lesões oxidativas em certas biomoléculas, como no DNA e na membrana celular, podem se tornar letais para as células. A fim de combater a produção excessiva das EROs provenientes de diversas fontes, as células humanas elaboraram um mecanismo de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante (VALKO et al., 2007).

As ações biológicas das EROs também estão diretamente relacionadas com o metabolismo inflamatório corporal envolvendo, em muitos casos aumento de moléculas como a enzima pró-inflamatória COX-2, interleucina-1 $\beta$  e aumento da secreção de TNF- $\alpha$  (CINDROVA-DAVIES, 2009; CINDROVA-DAVIES et al., 2007a).

O desequilíbrio de EROs pode levar à perda de homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, com liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático, resultando na ativação de diversos processos  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes (HOOL e CORRY, 2007). O aumento da concentração citosólica de íons  $\text{Ca}^{2+}$  afeta adversamente a função mitocondrial, incluindo aumento da sua própria produção de EROs e aumento da permeabilidade de membrana. Como consequência entra em colapso o potencial de membrana mitocondrial e a síntese ATP. Se as mitocôndrias em toda a extensão da célula são afetadas, caem substancialmente as concentrações de ATP e a homeostase iônica é perdida, levando à necrose primária da célula (KOWALTOWSKI et al., 2001).

A gravidez *per se* está associada com grande demanda energética e, por consequência a um aumento da necessidade de oxigênio. Assim, acredita-se que o aumento nos níveis de oxigênio pode aumentar o estresse oxidativo neste período (PATIL et al., 2007).

Diversos estudos têm avaliado o comportamento dos marcadores de estresse oxidativo na gestação. LITTLE e GLADEN (1999), em revisão de literatura, observaram que as mulheres grávidas apresentaram níveis de peroxidação lipídica mais elevada em relação àqueles determinados para o grupo de não gestantes; este aumento foi progressivo a partir do primeiro trimestre, atingindo seu pico no segundo e decrescendo no último trimestre. Em concordância com o estudo anterior, marcadores de peroxidação lipídica, como o hidroperóxido lipídico e o malondialdeído (MDA) foram mais elevados no plasma de mulheres grávidas, comparando com não grávidas (MORRIS et al., 1998). PATIL et al. (2007) observaram que mulheres grávidas são mais suscetíveis ao dano oxidativo do que os não gestantes, como indicado pelo aumento de TBARS e diminuição de enzimas antioxidantes. Eles verificaram que ocorre um aumento gradual de MDA plasmático em gestantes, sendo menor no primeiro e maior no terceiro trimestre. Desta forma, há evidências suficientes na literatura de que ocorre aumento da geração de RL superóxido e ON durante a gravidez, o que resulta em estresse oxidativo (MYATT e CUI, 2004). Com relação ao NO, altos níveis de seus metabólitos no fluido cervical foram evidenciados em estudos comparativos entre gestações tardias e gestações precoces (VÄISÄNEN-TOMMISKA, M. et al., 2003). Para evitar os danos associados ao estresse oxidativo, a placenta, que tem alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, é identificada como uma importante fonte de peróxidos lipídicos (MUTLU-TURKOGLU et al., 1998). Ela também apresenta grande quantidade de moléculas antioxidantes, incluindo SOD, CAT, GPx e glutathione. Estas moléculas são suficientes para o controle da lipoperoxidação em gestações não complicadas (MUELLER et al., 2005).

Ao trabalho de parto também tem sido atribuído importante papel no estresse oxidativo (MYATT e CUI, 2004). Há evidências de que trabalho de parto induz aumento da peroxidação lipídica, tal como evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA e TBARS (MOCATTA et al., 2004; VAKILIAN et al., 2009). Em um estudo caso-controle os níveis séricos de hidroperóxidos foram maiores nas pacientes em trabalho de parto, em comparação com os controles, que não estavam em trabalho de parto (FAINARU et al., 2002). Foi também demonstrado que o trabalho de parto a termo causa *upregulation* da reserva de antioxidantes no compartimento fetal (BUHIMSCHI et al., 2003). Porém, apesar de ter sido demonstrado que o PV induz um maior estresse oxidativo se comparado à cesariana eletiva,

outros autores encontraram resultados discordantes, especialmente na avaliação dos níveis de peroxidação lipídica do sangue do cordão umbilical, sugerindo que o parto cesáreo não oferece vantagens sobre o PV no que se refere ao estresse oxidativo (FOGEL et al., 2005).

Quando comparado estresse oxidativo no sangue de artéria e veia umbilical notou-se que o trabalho de parto espontâneo, independentemente da via de parto, apresentava níveis de TBARS mais elevados na artéria umbilical que na veia umbilical. Estes resultados suportam o entendimento de que as EROs funcionariam como um marcador de estresse oxidativo fetal, secundário ao processo de trabalho de parto (YAACOBI et al., 1999). Resultado similar foi encontrado ao verificar-se que lipídeos de soro da artéria umbilical foram mais susceptíveis à peroxidação do que lipídeos da veia umbilical (FOGEL et al., 2005).

Experiências *in vitro* envolvendo hipóxia-reoxigenação das vilosidades placentárias induziram estresse oxidativo, que está associada com eventos celulares, incluindo a ativação da via de sinalização do NF-kB (CINDROVA-DAVIES, SPASIC-BOSKOVIC et al., 2007). Mesmo que a causa específica do estresse oxidativo não esteja completamente definida, é importante ressaltar que os níveis variáveis de oxigênio podem contribuir para o desequilíbrio redox.

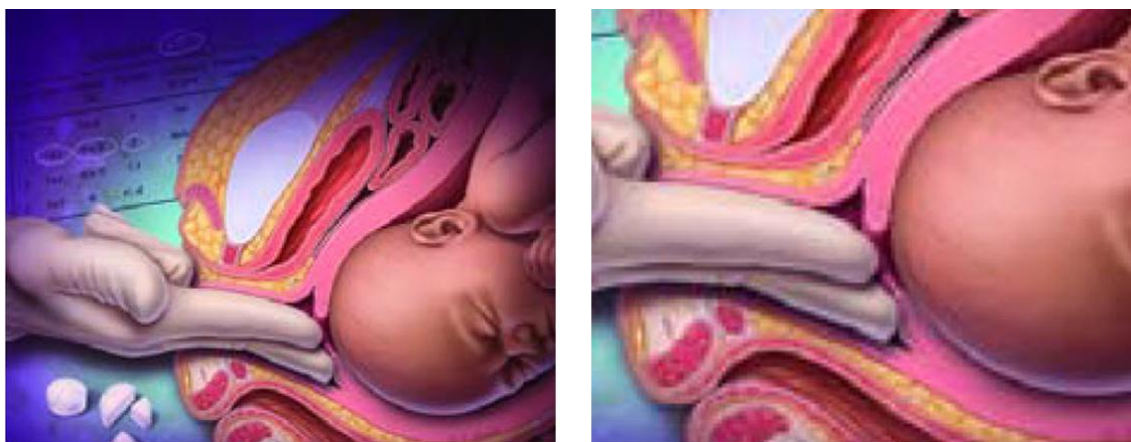
Além disto, algumas complicações da gestação que são acompanhadas por má perfusão placentária, como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal, têm sido implicadas como uma causa do estresse oxidativo, que conduz à liberação de citocinas pró-inflamatórias (MYATT e CUI 2004). Nestes casos, a hipóxia intermitente compressão da vasculatura uterina durante as contrações uterinas durante o parto causam e associada à má perfusão crônica útero-placentária pode agravar o estresse oxidativo. Estas condições podem estar associadas à necessidade de indução do parto a fim de não afetar a sobrevivência da mãe e do feto.

## **1.6 Indução do parto**

A indução do parto está indicada em situações em que os riscos, seja para a mãe ou o feto, superam os possíveis benefícios de se manter a gestação. Além de gestações pós-termo, a indução do parto está indicada em casos de hipertensão induzida pela gestação, hipertensão crônica grave, *Diabetes mellitus*, diabete gestacional, ruptura prematura de membranas,

crescimento intrauterino restrito (CIUR), feto morto, isoimunização Rh, entre outras (ZUGAIB, 2008).

Porém, a resposta à indução do parto depende das condições do colo uterino no início da indução. A avaliação cervical para a indução do parto é feita através do exame de toque (Figura 9), no qual são analisados os seguintes parâmetros: dilatação, apagamento, altura da apresentação (plano de DeLee) e consistência do colo. Estes parâmetros foram classificados segundo Bishop (1964) conforme tabela 3. Baixos escores cervicais têm sido associados à falha de indução de trabalho de parto (TP), a TP prolongado e maior índice de cesariana (ROUSE et al., 2000). Segundo estudo realizado por VROUENRAETS et al. (2005). um índice de Bishop na admissão para a indução  $\leq 5$  está associado um risco maior que o dobro de taxa de cesariana. A taxa de cesariana se mostrou inversamente proporcional ao índice de Bishop: índices  $\leq 5$  tiveram taxa de cesariana de 25,0%, índices entre 6 e 8 de 13,6% e  $\geq 9$  de 6,2%. Portanto, escores  $\geq 9$  associam-se a maior sucesso na indução do parto, enquanto escores  $\leq 5$  possuem maiores chances de falha de indução (VROUENRAETS et al., 2005).



**Figura 9 – Avaliação do colo uterino através do exame de toque vaginal.**

Fonte: <http://www.aafp.org/afp/2003/0515/p2123.pdf>, acessado em 22.08.2015.

**Tabela 3** – Avaliação cervical pelo Índice de Bishop.

Pontuação	0	1	2	3
Posição	Posterior	Intermediário	Anterior	–
Consistência do colo	Firme	Médio	Amolecido	–
Apagamento (%)	0-30	31-50	51-70	>80
Dilatação (cm)	0	1-2	3-4	≥5
Plano de DeLee	-3	-2	-1/0	+1/+2

Fonte: adaptado de Bishop (1964).

O preparo do colo uterino desfavorável à indução do parto é pré-requisito para o sucesso do apagamento e a dilatação da cérvix. O método de indução deve ser idealmente um agente simples, não invasivo, que seja efetivo em 24 horas, que não comprometa a mãe e o feto e que permita o amadurecimento do colo antes das contrações do processo de parturição (HAYASHI, 1993).

Uma vez que a falha no amadurecimento cervical, especialmente em partos induzidos, pode resultar em atraso no início do parto, bem como parto prolongado e até insucesso na indução, a escolha do método para indução é fundamental para o sucesso da indução. Taxas de sucesso mais elevadas têm sido obtidas por métodos que permitem o amadurecimento cervical, ao mesmo tempo em que estimulam gradualmente a contratilidade uterina (MORAES FILHO et al., 2005b).

### 1.7 Métodos utilizados para indução do parto

Entre as mais variadas técnicas de indução do parto citadas na literatura (MORAES FILHO et al., 2005b; TENORE, 2003), têm maior relevância científica nos casos de colos imaturos os métodos mecânicos e farmacológicos, entre eles a administração das prostaglandinas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>, Misoprostol e Dinoprostona, respectivamente.

### 1.7.1 Métodos mecânicos

Os métodos mecânicos têm baixo custo e menores efeitos colaterais, quando comparados a os métodos farmacológicos. Dentre os métodos mecânicos, a sonda de Foley continua sendo utilizada para fins de amadurecimento cervical. Esta age não somente por meio da ação mecânica, mas também liberando prostaglandinas, como consequência da separação do cório da decídua. Para que se obtenha sucesso na indução do parto a utilização da sonda de Foley deve ser geralmente associada com a administração de ocitocina, para aumento das contrações uterinas (MORAES FILHO et al., 2005b). Desta maneira, sondas Foley associadas ao uso da ocitocina podem ser tão efetivas quanto o Misoprostol para indução do parto (SCISCIONE et al., 2001).

### 1.7.2 Misoprostol

O Misoprostol é um composto sintético análogo à prostaglandina E<sub>1</sub>. É diferenciado estruturalmente da PGE<sub>1</sub> natural pela presença do grupo metil éster em C-1 e do grupo metila em C-16, em vez de C-15 (Figura 10). O grupo metil éster é responsável pelo aumento da duração de ação desse fármaco que age através do seu principal metabólito ativo, o ácido de Misoprostol (WEEKS e FAUNDES, 2007).

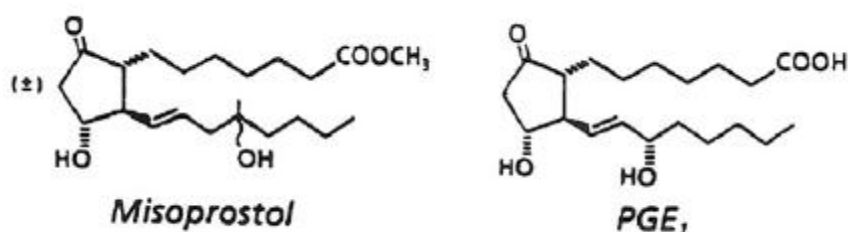


Figura 10 – Estrutura química do Misoprostol e da PGE<sub>1</sub> natural. (TANG et al., 2007)

O Misoprostol na apresentação de 25 µg é indicado para o amadurecimento cervical e indução de parto a termo, especialmente em casos de colo imaturo em gestações a termo com feto vivo, na dose de 25 µg via vaginal de seis em seis horas (PROTOCOLO MISOPROSTOL, 2012). É uma medicação segura e uma opção tão eficaz quanto, ou mais



eficiente que, as outras PGs (HOFMEYR et al., 2010; PARMAR et al., 2014). Apresenta importantes vantagens para o uso na clínica obstétrica: seu custo é inferior ao de qualquer outra PG; tem tempo de meia-vida alargado; é de fácil administração, é facilmente armazenado à temperatura ambiente, não necessitando de refrigeração para sua estocagem, apresenta poucos efeitos sistêmicos indesejáveis e é rapidamente absorvido por via oral e por via vaginal (HOFMEYR e GULMEZOGLU, 2003; MORAES FILHO et al., 2005b; PARMAR et al., 2014; TANG et al., 2002).

O Misoprostol está associado à baixa morbimortalidade perinatal sendo neste aspecto, semelhante aos outros métodos de indução. Na dose de 25 µg de 6 em 6 horas, a possibilidade de alterações da contratilidade uterina e de síndrome da hiperestimulação é baixa, ficando em torno dos 7% e 3%, respectivamente. Da mesma forma, não tem sido observado aumento da incidência de mecônio nas doses recomendadas para indução do parto (MORAES FILHO et al., 2005a).

Estudos farmacocinéticos demonstraram que a absorção e eliminação do Misoprostol pelo organismo diferem quando o fármaco é administrado por via oral, sublingual ou vaginal. Uma vez absorvido, o Misoprostol passa por um metabolismo hepático extenso no fígado, sofrendo hidrólise e transformando-se em metabólitos como o seu derivado acetilado ácido de Misoprostol. Este metabólito sofre metabolismo adicional, mediado pelos sistemas oxidativos dos ácidos graxos e uma posterior redução do grupo cetona, gerando compostos desprovidos de atividade. O Misoprostol não induz ou inibe o sistema enzimático oxidativo do citocromo P450, por isso não produz interações com fármacos que utilizam esta mesma via de metabolização. Após metabolismo hepático, o Misoprostol é eliminado principalmente por excreção urinária (73%), aparecendo na forma inalterada em menos de 1% na urina. Este fármaco também pode ser encontrado em pequenas quantidades fezes (15%), provavelmente por eliminação biliar (TANG et al., 2007).

Quando administrado por via oral o Misoprostol é rapidamente absorvido e os níveis séricos máximos são alcançados 20 a 30 minutos após a ingestão do fármaco, declinam rapidamente a cerca de 20% do pico após 60 a 80 minutos, restando níveis detectáveis até 4 horas após a ingestão (BYGDEMAN, 2003).

Quando administrado por via vaginal a biodisponibilidade do Misoprostol é três vezes maior se comparado à via oral (TANG et al., 2007). Isto ocorre, pois, o fármaco absorvido diretamente para a circulação através da parede vaginal não sofre primeiro metabolismo hepático, usual após absorção pelo trato digestivo. Desta forma, o Misoprostol permanece um período mais prolongado na circulação (WEEKS e FAUNDES, 2007). Nesta via, após um

aumento gradual, a concentração plasmática máxima do Misoprostol ocorre em cerca de 60 a 120 minutos e declina lentamente, sendo que após 4 horas detectam-se no plasma cerca de 60 a 70% do pico máximo. Os níveis plasmáticos detectáveis permanecem pelo menos até seis horas após sua administração (PROTOCOLO MISOPROSTOL, 2012).

Embora a concentração do pico na via de administração oral seja maior que na vaginal, a área abaixo da curva, correspondendo à biodisponibilidade, é maior na via vaginal. Níveis séricos do fármaco ainda são detectados após 6 horas da administração vaginal. Desta forma, como a concentração sérica do Misoprostol administrado por via vaginal é prolongada, pode ser administrado em intervalos mais longos entre as doses, se comparado à via oral (SOUZA et al., 2009; ZIEMAN et al., 1997).

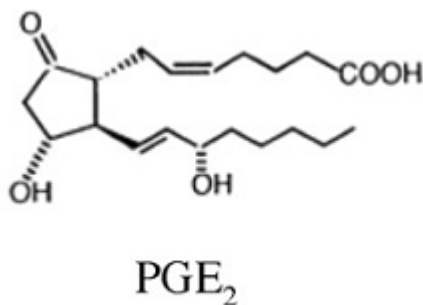
O pico de concentração plasmática e a biodisponibilidade após uma única dose de Misoprostol são mais elevados após administração sublingual do que após administração vaginal (ARONSSON et al., 2007; TANG et al., 2002), em decorrência da intensa vascularização desta região. No entanto, o nível plasmático do ácido de Misoprostol após uma única dose vaginal foi sustentado por um período de tempo maior do que na administração sublingual (ARONSSON et al., 2007; TANG et al., 2002; ZIEMAN et al., 1997). Ao final de 5 a 6 horas, os níveis séricos de ácido de Misoprostol nos grupos de administração vaginal foram maiores do que os da vias sublingual e bucal (TANG et al., 2002; ZIEMAN et al., 1997). Portanto, o efeito do Misoprostol parece perdurar por 6 h depois de uma dose única. Se o Misoprostol vaginal for administrado em um intervalo menor do que 6 horas, o nível sérico pode acumular (TANG et al., 2002).

Nos poucos estudos encontrados na literatura acerca da farmacocinética do Misoprostol nas diferentes vias de administração, observou-se que a maioria utilizou a dose de 400 µg, em dose única, que é a dose utilizada para indução de abortamento. Estudos com doses repetidas de 400 µg Misoprostol (doses de indução de abortamento) são escassos (TANG et al., 2009), e nas doses de 25 a 50 µg, que são as utilizadas para indução do trabalho parto, não foram encontrados entre os periódicos indexados. A farmacocinética do fármaco Misoprostol em casos de indução de abortamento podem não se correlacionar diretamente com os casos de indução do parto por diferir na dose. Outra questão relevante, observada por TANG et al. (2009) é que quando o abortamento é induzido com múltiplas doses, o pico de nível plasmático de ácido de Misoprostol após cada dose é mais elevado e que a biodisponibilidade é maior após a administração sublingual, em comparação com a administração vaginal (TANG et al., 2009). Os autores atribuíram este fato à provável redução na absorção do Misoprostol na presença de hemorragia vaginal significativa.

O Misoprostol exerce ação direta nos receptores das prostaglandinas, atua sobre a matriz extracelular, com dissolução das fibras colágenas, aumento do ácido hialurônico e aumento do conteúdo de água da cérvice. Além disso, relaxa o músculo liso da cérvice e facilita a dilatação, ao mesmo tempo em que permite o acréscimo do cálcio intracelular, promovendo de forma consecutiva aumento da frequência e intensidade das contrações do músculo liso uterino (ARIAS, 2000). Todos estes mecanismos permitem o progressivo apagamento e dilatação cervical, com concomitante aumento da atividade uterina e consequente descida da apresentação fetal, o que garante na maior parte dos casos uma indução bem sucedida do trabalho de parto.

### 1.7.3 Dinoproston

A Dinoproston,  $PGE_2$  (Figura 11), é o fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, com o objetivo de promover o amadurecimento cervical, porém, no Brasil este fármaco não é liberado atualmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MORAES FILHO et al., 2005b). A Dinoproston é comercializada na forma de comprimidos, de uso oral e vaginal, e gel de uso vaginal (ALFIREVIC et al., 2015a; MORAES FILHO et al., 2005b). Essas apresentações necessitam aplicações repetidas em intervalos que variam de 4 a 6 horas, até o desencadeamento do parto. A fim de aumentar a comodidade posológica da Dinoproston, foi desenvolvido um pessário de silicone para uso intravaginal, que deve ser inserido no fundo de saco vaginal posterior. Este pessário, contendo 10 mg de Dinoproston, libera o fármaco no tecido cervical continuamente a uma taxa de 0,3 mg/hora, por até 12 horas, o que permite que a maturação cervical progrida até seu estágio completo. O mesmo apresenta facilidade de remoção em caso de maturação cervical completa ou início do trabalho de parto, quando a Dinoproston não mais é necessária. Também deve ser retirado em casos de hiperestimulação uterina (MORAES FILHO et al., 2005b; RAYBURN et al., 1992). No entanto, há limitações referentes ao elevado custo e à termolabilidade, o que dificulta a estocagem, além da necessidade frequente do uso de ocitocina após o amadurecimento do colo uterino (BUSER et al., 1997).



**Figura 11 – Estrutura química da prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) (NARUMIYA et al., 1999).**

Estudos mostram que o uso da PGE<sub>2</sub> por via vaginal ocasionou melhora significativa na maturação cervical num período compreendido entre 24-48 horas, refletindo assim uma taxa de natalidade maior dentro das 24 horas, sem a necessidade de parto cesáreo (KELLY et al., 2003). O reservatório de 10 mg no pessário de Dinoprostona mantém a liberação constante de aproximadamente 0,3 mg por hora, durante 24 horas em mulheres com membranas íntegras. Em caso de ruptura de membranas a liberação é maior e mais variável (YOUNT e LASSITER, 2013). Em mulheres nulíparas, com colo despreparado e membranas íntegras, a utilização de pessário vaginal se mostrou melhor do que repetidas doses vaginais, uma vez que está associada a maiores taxas de partos vaginais e menores taxas de cesariana. Entretanto, o pessário vaginal está associado à ocorrência de hiperestimulação uterina, que pode ser corrigida com a retirada do mesmo (FACCHINETTI et al., 2012).

A Prostaglandina E<sub>2</sub> tem um papel importante nas alterações dos complexos bioquímicos e estruturais envolvidos na maturação cervical. Este processo envolve a ativação da enzima colagenase, que é responsável pela quebra do colágeno, e relaxamento marcante das fibras musculares lisas do colo uterino. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a Dinoprostona é uma substância de ação local que é rapidamente inativada e, portanto, não há evidências de toxicidade sistêmica significativa. Os efeitos farmacológicos da PGE<sub>2</sub> têm sido amplamente investigados e, devido ao risco de hiperestimulação e consequente ruptura uterina, este medicamento não é indicado para mulheres com parto cesariano ou cirurgia uterina prévia (MORAES FILHO et al., 2005a; YOUNT e LASSITER, 2013).

## 1.8 Genômica farmacológica e a indução do parto

Apesar de existir uma conduta bem estabelecida quanto à indução de trabalho de parto por via farmacológica, muitas mulheres não são responsivas a esta terapêutica necessitando a realização de parto cesáreo. Segundo a revisão recente (PRUCKA, S.K. et al, 2015) variações na resposta ao tratamento podem ser decorrentes de vários fatores tais como doenças, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos. Como fatores genéticos podem contribuir para a eficácia e a segurança de um medicamento. Esta diferença observada entre os indivíduos de uma dada população na resposta a um determinado fármaco é estudada em uma área florescente da ciência denominada Farmacogenética/Farmacogenômica. No caso, a Farmacogenômica estuda o efeito simultâneo de fármacos sobre um conjunto de genes relacionados a uma determinada função, enquanto a Farmacogenética avalia efeitos de um determinado fármaco sobre genes isolados. No conjunto, a farmacogenética e a farmacogenômica podem ser identificadas na área da pesquisa denominada “genômica farmacológica”. Estudos sobre genômica farmacológica e indução de parto ainda são muito incipientes. Entretanto, já existem algumas investigações farmacogenéticas relacionadas à segurança no uso de indutores do parto, como é o caso do Misoprostol. ALFIREVIC et al. (2015b) descreveram recentemente uma associação entre a febre induzida pelo uso do Misoprostol e polimorfismos dos transportadores ABCC4 de fármacos em mulheres com ancestralidade Latino-Americana e Europeia. Entretanto, até a presente data, não está claro o perfil de receptores EPs em mulheres com parto espontâneo e não-espontâneo, e o papel farmacogenômico dos receptores EPs no parto espontâneo ou induzido com PGs.

## 1.9 Justificativa

Investigações sugerem que os fatores determinantes da função miometrial no processo de parturição parecem estar associados à população de receptores expressa nas diferentes fases da gestação (ASTLE et al., 2005). Porém, os achados são bastante divergentes sobre a

expressão dos diferentes EPs nos tecidos uterinos durante o parto (ARULKUMARAN et al., 2012; ASTLE et al., 2005; ROOS et al., 2014). Esta divergência pode indicar a ocorrência de diferentes mecanismos regulatórios destes receptores no tecido uterino e cervical (GRIGSBY et al., 2006a). Além disto, não está claro se fármacos indutores, como é o caso do Misoprostol, poderiam ter um potencial efeito farmacogenético por modular diferencialmente a expressão dos genes EPs em células miométriais oriundas de mulheres com e sem parto espontâneo.

Para atender a estas questões, o presente estudo se propôs a estudar a modulação da expressão gênica os receptores de PGE<sub>2</sub> no tecido uterino de mulheres parturientes, a partir de protocolos *in vivo e in vitro*. Uma vez que investigações prévias sugeriram que o Misoprostol poderia atuar na rota oxidativa, atenuando os efeitos oxidantes contra neurotoxinas (CHOI et al., 2008) e a nefrotoxicidade induzida pela administração do quimioterápico cisplatina (OZER et al., 2011), e que não foi observado na literatura potencial efeito deste fármaco no metabolismo oxidativo do miométrio, estudos complementares de tal efeito também foram aqui conduzidos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar, *in vivo*, a modulação da expressão gênica dos receptores da PGE<sub>2</sub> (EP1, EP2, EP3 e EP4) em amostras de miométrio e de colo uterino, obtidas de gestantes a termo em partos induzidos com Dinoprostona e, *in vitro*, a modulação dos respectivos receptores em células miometriais expostas ao Misoprostol, avaliando, adicionalmente, se tal exposição tem efeito sobre o metabolismo oxidativo destas células.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar, *in vivo*, a modulação da expressão gênica dos receptores da PGE<sub>2</sub> (EP1, EP2, EP3 e EP4) em amostras de miométrio e de colo uterino obtidas de gestantes a termo em partos induzidos com Dinoprostona;

Analisar o efeito, *in vitro*, de diferentes concentrações de Misoprostol em cultura de células de miométrio obtidas a partir de mulheres com e sem parto espontâneo na:

- viabilidade celular;
- modulação da expressão gênica dos receptores da PGE<sub>2</sub> (EP1, EP2, EP3 e EP4);
- modulação do metabolismo oxidativo através da análise dos níveis ânion superóxido, ON, RLs, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados obtidos neste estudo estão organizados sob a forma de dois artigos científicos. O primeiro contempla a análise da expressão *in vivo* dos genes dos receptores de EPs em miométrio e cérvix uterina, em partos a termo induzidos com Dinoprostona (análogo da PGE<sub>2</sub>). O segundo artigo aborda o efeito *in vitro* do Misoprostol (PGE<sub>1</sub>) em células miometriais de gestantes a termo, com partos espontâneos (SL) e não espontâneos (NSL), em relação à expressão miometrial dos genes dos receptores EPs e a marcadores de estresse oxidativo, com e sem exposição ao Misoprostol.

#### **Artigo 1**

Responsivity to PGE<sub>2</sub> labor induction involves concomitant differential prostaglandin E receptor gene expression in cervix and myometrium.

Autores - Cristine Kolling Konopka, Wenner Giehl Glanzner, Melânia Lazzari Rigo, Monique Tomazele Rovani, Fábio Vasconcellos Comim, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Edson Nunes de Moraes, Antônio Quites Antoniazzi, Carlos Fernando Mello e Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Revista: Genetics and Molecular Research (publicado).

#### **Artigo 2**

Misoprostol differentially modulates prostaglandin E2 receptor type 1 (EP1) gene and oxidative stress markers of myometrium cells obtained from spontaneous and nonspontaneous labor.

Autores - Cristine Kolling Konopka, Verônica Farina Azzolin, Francine Carla Cadoná, Alencar Kolinski Machado, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Revista: Journal of Cellular and Molecular Medicine Research (submetido para publicação).



### 3.1 ARTIGO 1

#### **Responsivity to PGE<sub>2</sub> labor induction involves concomitant differential prostaglandin E receptor gene expression in cervix and myometrium**

**Running Title:** *PTGER* gene in labor induction in response to PGE<sub>2</sub>

C.K. Konopka<sup>1\*</sup>, W.G. Glanzner<sup>2</sup>, M.L. Rigo<sup>2</sup>, M.T. Rovani<sup>2</sup>, F.V. Comim<sup>2,3</sup>, P.B.D. Gonçalves<sup>2</sup>, E.N. Morais<sup>1</sup>, A.Q. Antoniazzi<sup>2</sup>, C.F. Mello<sup>4</sup> and I.B.M. Cruz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BIOREP), Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

\*Corresponding author: KONOPKA Cristine Kolling,

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 26, sala 1333, Santa Maria, RS, Brasil, 97105900

Tel.: 55-55-32208574

Fax: 55-55-32208018

E-mail: cristine.ufsm@gmail.com

## ABSTRACT

Prostaglandin E2 (dinoprostone) is largely used for labor induction. However, one-third of patients do not respond to treatment. One cause of this poor response may be associated with changes in regulation of prostaglandin E receptors (EP1–4). In this study, we investigated EP mRNA expression in the uterine cervix and lower uterine segment myometrium from term births. Biopsies were obtained from women with successful (responders) and failed (non-responders) dinoprostone labor induction, while women that underwent spontaneous labor were included as controls. EP1 mRNA was upregulated in the cervical tissue of women who did not respond to dinoprostone induction. In addition, in the myometrium, significantly higher levels of EP3 mRNA were observed in women treated with dinoprostone, independent of their responsiveness. Dinoprostone-responders presented 3.6-fold higher levels of EP3 mRNA expression than the spontaneous labor group. Significantly higher levels of EP3 mRNA in the myometrium of the dinoprostone-treated group indicated that dinoprostone may regulate EP3 gene on the transcriptional level. These results highlight the relationship between EP gene expression and delivery and indicate that understanding the regulation of prostaglandin E receptors may lead to improved labor induction.

**Key words:** Dinoprostone; mRNA; Prostaglandin receptors; Term pregnancy; Uterus

## INTRODUCTION

Human birth is a physiological event triggered by inflammatory molecules, mainly prostaglandins (PGs) and cytokines (Olson, 2003; Mittal et al., 2010; Hua et al., 2012). Among these, PGE<sub>2</sub> plays a central role in parturition, contributing to uterine contractility, membrane rupture, and cervical ripening (Olson, 2003). PGE<sub>2</sub> acts by signal transduction through the 7-transmembrane domain G-protein coupled EP receptors, which are classified into 4 subtypes: EP1, EP2, EP3, and EP4 (Coleman et al., 1994; NARUMIYA et al., 1999; Woodward et al., 2011; Sugimoto et al., 2015); the gene symbols for these receptors are *PTGER1–PTGER4* (Gu et al., 2012).

The 4 PGE<sub>2</sub> receptor subtypes are found in the human uterine myometrium and cervix (Astle et al., 2005), as well as in the amnion, choriodecidua, and placenta (Grigsby et al., 2006a; Unlugedik et al., 2010). PGs released from these tissues stimulate uterine contractility (Hertelendy and Zakar, 2004) and cervical ripening (Schmitz et al., 2003; Roos et al., 2014), suggesting paracrine and autocrine roles for PGE<sub>2</sub> in the signaling pathways associated with human parturition (Schmitz et al., 2003; Grigsby et al., 2006a). Previous studies have

suggested that myometrial activation (from quiescence during pregnancy to contractile activity at time of labor) may be directly modulated by combination or balance of EP receptor expression between maternal and fetal tissues, both over the course of pregnancy and during parturition (Grigsby et al., 2006a).

Because of the important role of dinoprostone (PGE<sub>2</sub>) at birth in cervical ripening and myometrial contractile activity (Chioss et al., 2012), it is used pharmacologically for labor induction in women presenting an unfavorable cervix. A recent meta-analysis performed by Austin et al. (2010) suggested that dinoprostone showed satisfactory efficacy and safety in labor induction. However, approximately 1/3 patients fail to respond to dinoprostone labor induction (Tenore, 2003). The main factors involved with unresponsiveness to dinoprostone are not fully understood. We hypothesized that failure of dinoprostone labor induction is related to differential gene regulation of EP receptors in the cervical and myometrial tissues between responsive and nonresponsive women.

We performed this case-control study to evaluate the mRNA expression of the EP1, EP2, EP3, and EP4 genes in the uterine tissue of term pregnant women responsive/nonresponsive to dinoprostone treatment.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

The study included 30 term pregnant women, who were divided into 3 groups: spontaneous labor (SL), which was the positive control group and included women presenting natural labor initiation followed by vaginal delivery or cesarean after spontaneous labor; dinoprostone responder group (DR), which included women treated with dinoprostone, presenting effective uterine contractions, cervical effacement, and dilatation, who progressed to vaginal delivery or cesarean after the dinoprostone response; dinoprostone nonresponder group (DNR), which included women without uterine contraction or cervical effacement and failure in labor induction after dinoprostone administration.

Term was considered as pregnancy between 37 and 41 + 6 weeks of gestational age and spontaneous labor as natural labor initiation. Patients with indication for labor induction and with an unripe cervix, defined as a Bishop's score of  $\leq 5$  points (for Bishop score see table 1 in Tenore, 2003), were assigned to receive 10 mg vaginally administered dinoprostone (Propess<sup>®</sup>, Ferring Pharmaceuticals, São Paulo, Brazil) placed in the posterior vaginal fornix as described previously (Tan et al., 2009). Bishop 1 was considered the Bishop score upon

admission to labor and Bishop 2 was immediately before birth. Labor induction failure was considered to be the absence of uterine contractions and no cervical ripening over 24 h (Pevzner et al., 2009).

Pregnant women with the following characteristics were excluded from the study: smokers and those with other drug abuse; women with a disease or undergoing chronic use of drugs that may influence prostaglandin metabolism, and preterm or post-term pregnancies. Women with infections and premature rupture of membranes were also excluded from the study.

### **Tissue collection**

Cervical and myometrial tissue biopsies were obtained according previously described protocols (STJERNHOLM-VLADIC et al., 2004; Astle et al., 2005) from women with term pregnancies after vaginal delivery (cervix) or during/after cesarean section (myometrium and cervix). Myometrium biopsies were taken from the lower edge of the upper part of the incision in the lower uterine segment during cesarean, after placenta removal. Cervix biopsies were taken from the anterior labia after placenta removal in vaginal labors or immediately after cesarean. After excision, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA isolation.

### **EP receptor mRNA expression analysis, RNA extraction, reverse transcription, and real-time polymerase chain reaction**

To analyze the differential gene expression of EP receptors among groups, RNA was extracted from uterine cervical and myometrial cells using Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer instructions. Quantitation and estimation of total RNA purity was performed using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; absorbance ratio of 260/280 nm) spectrophotometer. Ratios above 1.8 were considered pure, and samples below this threshold were discarded. Complementary DNA was synthesized from 1 µg total RNA, which was first treated with 0.1 U amplification-grade DNase (Life Technologies) for 5 min at 37°C. After DNase inactivation at 65°C for 10 min, samples were incubated in a final volume of 20 µL with 1 mM oligo-dT primer, 4 U omniscryptRTase (Omniscrypt RT Kit, Qiagen, Hilden, Germany), 0.5 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 10 U RNase inhibitor (Invitrogen).

**Table 1.** List of primers used during prostaglandin receptor gene expression experiments.

Gene	Forward primer	Reverse primer	GenBank or Ensembl accession number
<i>PTGER1</i>	ATGGTGGGCCAGCTTGTC	GCCACCAACACCAGCATTG	NM_000955.2
<i>PTGER2</i>	GAAACCTCTCCCGAAAGGAA	AATCCGACAACAGAGGACTGAAC	NM_000956.3
<i>PTGER3</i>	AGCTTATGGGGATCATGTGC	TTTCTGCTTCTCCGTGTGTG	NM_198715.2
<i>PTGER4</i>	GAAAGCTGGCAACTCTGACC	GCTTTCACCTTGTCCTGCTC	NM_000958.2
GAPDH	GTCGGAGTCAACGGATT	GTCGGAGTCAACGGATT	NM_002046.4
$\beta$ -actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	NM_001101.3

Quantitative polymerase chain reactions were conducted in a CFX384 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and human-specific primers (Table 1) designed using Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Melting-curve analyses were performed to verify product identity. To optimize the quantitative polymerase chain reaction assay, serial dilutions of cDNA templates were used to generate a standard curve. A standard curve was constructed by plotting the log of the starting quantity of the dilution factor against the Ct value obtained during

amplification of each dilution. Reactions with a coefficient of determination ( $r^2$ ) higher than 0.98 and efficiency from 95–105% were considered to be optimized. The relative standard curve method was used to assess the amount of transcript in each sample (Cikos et al., 2007). Samples were run in duplicate and the results were expressed relative to the average Ct values for  $\beta$ -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal controls. Internal control genes were selected based on Ct variance (as reflected by the standard deviation) among the groups in each experiment.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using SPSS statistical software version 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and the results were expressed as the mean  $\pm$  SD or median conforming analysis. Baseline data were compared among groups by one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post-hoc* test. mRNA expression was compared among groups using non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney *post-hoc* test or the median test. To evaluate potential intervenient variables on mRNA expression, the Spearman correlation test was also performed. All tests were 2-tail analyzed and P values  $\leq$  0.05 were considered significant.

### **Ethical approval**

The present study, involving human cervical and myometrial tissue biopsies at the time of parturition, was approved by the Federal University of Santa Maria Ethical Committee (CAAE 0268.0.243.000-08), and informed consent was obtained from all participants before enrollment.

## **RESULTS**

### **Clinical baselines**

A total of 30 term pregnant women were included in the present study. More than half (18) of the patients (60%) had indication for labor induction due to gestational age greater than 41 weeks (41 weeks to 41 + 6 weeks) or uncomplicated hypertension. Twelve of these (66.7%) responded to dinoprostone induction and underwent vaginal labor or cesarean (due to dystocia, fetal distress, or hypertonia) and 6 (33.3%) failed in induction (delivered by cesarean). Twelve patients of the total (40%), considered to be the control group, entered the study with spontaneous labor and underwent vaginal labor or cesarean (due to dystocia or fetal distress). Baseline characteristics of subjects studied are described in Table 2. Mean

maternal age, gestational age, and parity were similar among groups. Time for dinoprostone-induction labors was longer than for spontaneous labors, regardless of the delivery route. Bishop scores showed a significant difference between groups over time. Patients beginning labor spontaneously showed higher initial Bishop scores than patients with labor induction indication. Bishop scores increased significantly in all groups over time. Interestingly, although patients considered to be non-responders to dinoprostone induction showed increased Bishop scores over time, their final Bishop scores still represented immature cervixes (Bishop  $\leq$  5). The significant differences between the duration of labor and Bishop scores were inherent to the clinical characteristics of each group.

**Table 2.** Baseline subject characteristics.

Variable	Groups			P
	SL (N = 12)	DR (N = 12)	DNR (N = 6)	
Age (years)	23.7 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	23.7 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	24.8 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	0.8447
Gestational age (weeks)	39.4 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	40.0 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	0.7861
Time of labor (hours)	8.42 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>	18.1 $\pm$ 1.91 <sup>b</sup>	23.3 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>	<0.0001
Bishop 1	5.83 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	3.5 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	2.17 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	<0.0001
Bishop 2	8.42 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	9.83 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	3.83 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	<0.0001

SL = spontaneous labor (positive control); DR = dinoprostone responder; DNR = dinoprostone non-responder. Bishop 1 = Bishop score at admission to labor. Bishop 2 = Bishop score immediately before birth. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant differences by parametric one-way analysis of variance followed by Bonferroni *post-hoc* test. Variables with P < 0.05 were considered significant.

### EP receptor mRNA expression (cervix and myometrium)

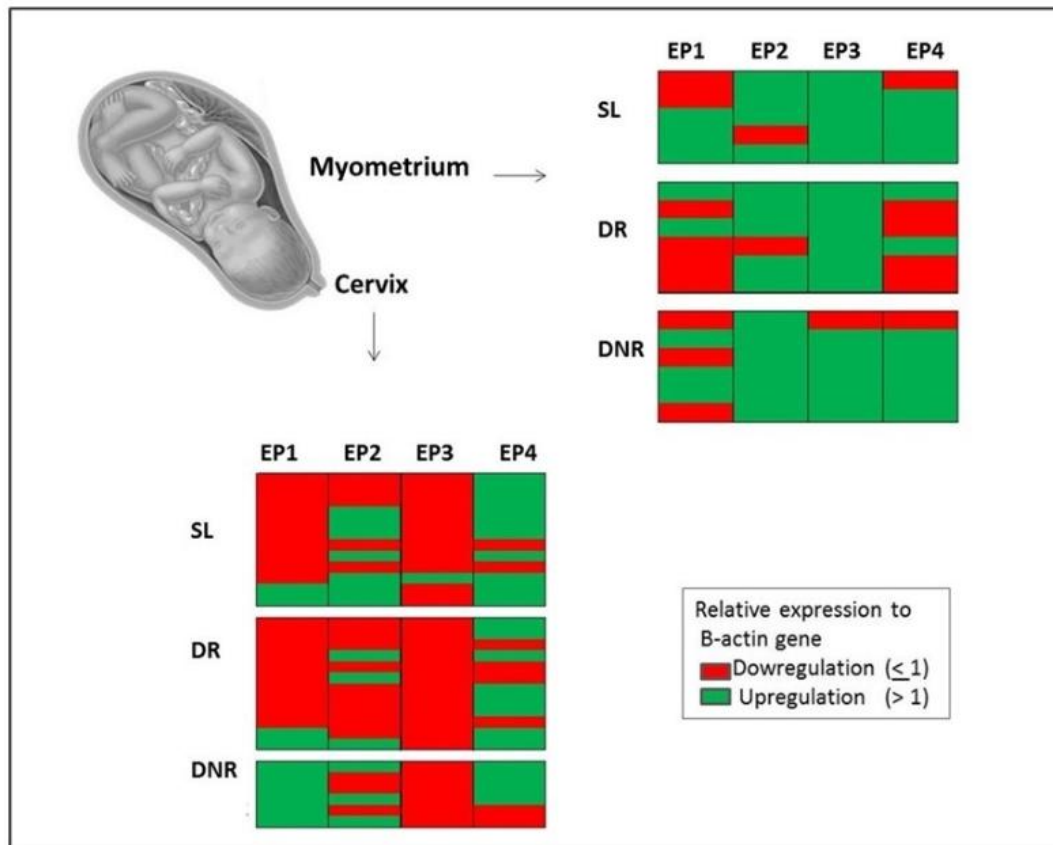
The differential mRNA expression of EP receptors (*PTGER1*, *PTGER2*, *PTGER3*, and *PTGER4*) in relation to  $\beta$ -actin and GAPDH mRNA was investigated in uterine tissues. These results are presented as relative EP mRNA expression relative to  $\beta$ -actin and GAPDH. The association among differential EP mRNA expression in the cervical and myometrial tissues and spontaneous or dinoprostone-induced labor were evaluated. Because the EP mRNA expression did not show a normal distribution, data were analyzed using non-parametric statistical tests and described as the median (Table 3). EP gene expression was described as downregulated or upregulated compared to  $\beta$ -actin and GAPDH gene expression (Figure 1).

**Table 3.** Relative mRNA expression of prostaglandin receptors in uterine tissues of women with spontaneous and dinoprostone-induced labors.

Gene	Uterine tissues	Groups			P
		SL	DR	DNR	
EP1	Cervix	0.01	1.06	1.53	0.024
	Myometrium	4.38	0.01	2.35	0.749
EP2	Cervix	1.88	0.16	2.96	0.092
	Myometrium	1.51	2.68	1.55	0.476
EP3	Cervix	0.01	0.05	0.08	0.792
	Myometrium	4.44	16.19	6.25	0.034
EP4	Cervix	22.09	0.63	3.17	0.236
	Myometrium	16.92	0.01	7.27	0.167

SL = spontaneous labor (positive control); DR = dinoprostone responder; DNR = dinoprostone non-responder. Values represent median value of relative mRNA expression of prostaglandin receptors (EPs) in relation to  $\beta$ -actin and GAPDH mRNA. P-values correspond to statistical comparison among groups by Kruskal-Wallis test followed by Man-Whitney *post-hoc* test.





**Figure 1 – Schematic representation of prostaglandin receptors (EP1, EP2, EP3, and EP4) gene expression in myometrial and cervical tissues of term women with spontaneous labor (SL), dinoprostone-induction responders (DR), and dinoprostone-induction non-responders (DNR). EP mRNA was quantificated relative to the expression of the  $\beta$ -actin and GAPDH constitutive genes and grouped into the following categories: downregulation ( $\leq 1$  times of  $\beta$ -actin and GAPDH expression) and upregulation ( $> 1$  times of  $\beta$ -actin and GAPDH expression). Line represents the expression of genes from each patient examined.**

In the cervical tissue, women in the SL group showed EP1 downregulation in most cases; similar results were observed in DR women. However, 100% (N = 6) of DNR women showed EP1 mRNA upregulated in relation to  $\beta$ -actin and GAPDH mRNA expression (P = 0.024). The chance of DNR group to present gene upregulated was 2.5-fold higher (95% confidence interval = 1.170–4.341) than in the SL and DR groups.

Based on the significant association between EP1 relative mRNA expression in the cervical tissue and dinoprostone responsiveness, the correlation between EP1 mRNA expression and variables related to delivery was evaluated. As shown in Table 4, EP1 mRNA expression in SL women was not associated with any delivery variable investigated. However, DR women presented a significant inverse correlation between EP1 mRNA

expression and gestational age, and also Bishop 2 score. A greater gestational age ( $P = 0.037$ ) and greater Bishop 2 score ( $P = 0.010$ ) were associated with a higher dinoprostone response and EP1 downregulation in the cervix. The EP3 gene in cervical tissue was downregulated in the SL group and in women treated with dinoprostone, independently of the labor induction response (Table 3). Therefore, this gene did not show differential expression among groups ( $P = 0.792$ ). EP2 and EP4 gene expression was highly variable, but there was no significant difference among groups (EP2  $P = 0.092$ ; EP4  $P = 0.792$ ).

**Table 4.** Correlation among EP1 gene expression compared to  $\beta$ -actin and GAPDH gene in cervix tissue and variables related to delivery.

Variables	SL		DR		DNR	
	EP1 gene		EP1 gene		EP1 gene	
	R	P	R	P	r	P
Maternal age	0.340	0.306	0.271	0.393	0.174	0.742
Gestation age	-0.049	0.901	-0.065	0.037	0.429	0.397
Time induction	0.459	0.156	0.381	0.247	-0.116	0.827
Bishop 1	0.166	0.626	0.010	0.999	-0.655	0.158
Bishop 2	0.130	0.970	-0.705	0.010	-0.309	0.552

SL = spontaneous labor; DR = dinoprostone responder; DNR = dinoprostone non-responder; r = Spearman correlation coefficient; P = significant value.

In the analysis of EP mRNA in the myometrium, as shown in Table 3, we observed similar mRNA expression patterns among all groups compared to EP1 ( $P = 0.749$ ), EP2 ( $P = 0.476$ ), and EP4 ( $P = 0.167$ ). Although most samples showed upregulation of the EP3 gene independently of the group, significantly higher expression levels of EP3 mRNA were observed in women treated with dinoprostone, independently of responsiveness, when compared to the SL group ( $P = 0.034$ ). In the myometrial tissue, the DR group showed 3.6-fold higher levels of EP3 mRNA expression than did the SL group, indicating that dinoprostone regulates the EP3 gene at the transcriptional level.

## DISCUSSION

The present study described the potential association between differential EPs gene expression in the cervix and myometrium and dinoprostone response in term women. In this study, we examined the gene regulation of physiological EPs in myometrial and cervical tissues in spontaneous labor and with respect to pharmacological dinoprostone action on these genes.

Prostaglandins play a central role in human labor, leading to cervical ripening and myometrial contractility (Schmitz et al., 2003; Hertelendy and Zakar, 2004; Roos et al., 2014). Classically, myometrium tissue analyses have found that PGE<sub>2</sub> stimulates contractions via EP1 and EP3 receptors, whereas EP2 and EP4 maintain quiescence (BRODT-EPPLEY e MYATT, 1999). However, few studies have been examined these concepts in detail (Astle et al., 2005; Grigsby et al., 2006a; Arulkumaran et al., 2012; Kandola et al., 2014), and results are inconsistent. This is the first study to observe concomitant and antagonistic EP1 and EP3 mRNA expression regulation in the cervical and myometrial tissues in term women with spontaneous labor, indicating differential uterine tissue-regulation during physiological parturition.

EP1 and EP3 are contractile receptors, but act in different manners. EP1 mediates the elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, while EP3, which is considered to be an inhibitory receptor, inhibits adenylate cyclase via inhibitory G protein, mediates decreased cyclic adenosine monophosphate levels, and inhibits smooth muscle relaxation. However, EP2 and EP4 are classified as relaxant receptors, which couple to G proteins to stimulate adenylate cyclase and induce smooth muscle relaxation by elevating cyclic adenosine monophosphate production (NARUMIYA et al., 1999; SUGIMOTO and NARUMIYA, 2007). Myometrium upregulation of EP3 gene expression described here agree with the results of previous studies reporting that EP3 is likely the primary receptor subtype mediating PGE<sub>2</sub>-stimulated myometrial contractions (Arulkumaran et al., 2012). These authors concluded that EP3 is likely mainly contractile in its action, remaining on the cell surface and can bind to extracellular exogenous PGE<sub>2</sub>.

In functional terms, because parturition involves a shift from uterine quiescence to progressive myometrium contractility, labor is expected to be accompanied by an increase in contractile PGE<sub>2</sub> receptors and a decrease in relaxatory PGE<sub>2</sub> receptors in myometrium tissues. Because myometrial quiescence is promoted by increased cyclic adenosine monophosphate (Yuan and López-Bernal, 2007), an increase in the expression of genes such as EP3 in the myometrium is expected during physiological parturition, as was observed in

our results. This finding has been corroborated by other studies (Arulkumaran et al., 2012), which mainly correlate EP3 with myometrial contractile function.

However, why EP3 is downregulated in the cervix during spontaneous labor (Table 3) is not well understood. The cervix is a rigid structure during most times in a woman's life, except near parturition and during labor, when this region loses competence to permit delivery. Cervix competence loss involves coordinated and complex biochemical and physiological mechanisms, in which the extracellular matrix, consisting of collagen, hyaluronan, proteoglycans, and immune components, is transformed. This cervical remodeling consists of 4 phases, including softening, ripening, dilation, and postpartum repair (TIMMONS et al., 2010).

Additionally, a recent investigation using rats as an experimental model described that the cervix is also composed of smooth muscle cells (Ferland et al., 2015). This also appears in humans, and smooth muscle contractility was described in human tissues 30 years ago (Norstrom et al., 1984). Thus, as described by Ferland et al. (2015) using electromyography and pharmacology evidence, cervix and uterus can be considered as separate organs in functional terms. Therefore, smooth muscle cells in the cervix may play an active role in cervical remodeling during pregnancy and parturition, which would explain the occurrence of differential EP3 gene regulation in this tissue compared to in the myometrium.

Studies of cervical biopsies obtained from post-term women showed that failure of labor induction may be caused by increased expression of EP3 and a concomitant decrease in EP4 expression compared with spontaneous labor (Roos et al., 2014). Although it is not possible to compare our results with this study because the subjects were different, regarding the gestational age at labor induction moment (post-term *vs* term), both studies found lower EP3 expression in the cervical tissue in spontaneous labor, indicating the relevance receptor gene regulation in human parturition.

Interestingly, EP1 mRNA was also downregulated in the cervix of women presenting spontaneous labor. Modulation of the EP1 gene in cervical tissues during labor has not been thoroughly examined. Our findings show clearly that this gene was downregulated in the cervix and upregulated in the myometrium of women with spontaneous labor (Table 3). In addition, EP1 played an important role related to the dinoprostone response in labor induction.

Moreover, a recent study in mice suggested that prostaglandins do not control all aspects of parturition (TIMMONS et al., 2014). The study provided evidence for 2 distinct pathways of cervical ripening: one dependent on PGs derived from paracrine or endocrine

sources, and another independent of PG actions. Therefore, complementary and independent studies should be performed to confirm whether differential EP gene expression in the cervical and myometrial tissues represents a universal physiological response related to human parturition.

We also examined the association between EP gene expression and dinoprostone responsiveness. Up to 30–40% of obstetrical patients require labor induction using pharmacological drugs including oxytocin and analogs of prostaglandins E1 and E2. These drugs are particularly useful when labor induction necessitates cervical ripening, as when labor induction occurs in an unfavorable cervix (Hawkins and Wing, 2012). However, not all women respond to induction, and factors leading to labor failure must be further examined. We hypothesized that altered EP gene expression in the myometrium and cervix were related to dinoprostone responsiveness.

Our results suggest that dinoprostone acts on the transcriptional level, affecting the EP1 and EP3 genes. EP3 mRNA was downregulated in the cervical tissue of most patients, independently of the case-control groups (Figure 1). In the myometrium of women treated with dinoprostone, increased expression of EP3 mRNA was observed compared to in the SL group. Because EP3 upregulation occurred in both the responsive and nonresponsive dinoprostone groups, we hypothesized that the effect on this gene was not the main causal factor triggering labor induction success, despite the higher EP3 levels observed in the DR group. Because EP3 expression is associated with myometrium contractility, increased EP3 mRNA expression in the DNR group indicated that failure in labor probably likely resulted from post-transcriptional regulation of EP3 genes or other biochemical factors not analyzed in this study.

In contrast, EP1 mRNA gene expression differed between the DR and DNR groups in the cervical tissue. In the SL and DR groups, we observed that EP1 mRNA was downregulated, whereas in the DNR group, this gene was upregulated. Similar results were not observed in previous studies. The difference in EP1 gene regulation in the cervix in dinoprostone responsive and nonresponsive women indicates its relevance in spontaneous and pharmacologically induced parturition.

The strength of this study is the concomitant analysis in cervical and myometrial tissues of the effect of prostaglandin receptors on gene expression (*PTGER1–PTGER4*) during the labor induction response. Most studies conducted isolated analyses of uterine tissues, limiting the visualization of integrated response effects.

There were some limitations to our study. The number of subjects was low. Despite the high number of deliveries in our hospital, it is difficult to select patients to participate in such studies for several reasons, including high diversity of physiological and pathological conditions and the clinical and pharmacological indication of use of drugs such as dinoprostone.

Another potential limitation is related to the fact that we only investigated the EP mRNA expression and not the EP protein expression. Protein expression of these receptors may be relevant. However, because EP transcriptional modulation precedes protein expression, we investigated differential EP transcriptional modulation in dinoprostone-induced labor. There may be differences in the uterine tissues of pregnant women regarding the physiological aspects of late pregnancy and it would be more difficult to determine whether protein expression was related to a pharmacological response.

It would be ideal to biopsy the same patient before, during, and after labor to determine the differences in EP gene and protein regulation in response to dinoprostone. However, this practice is not ethically acceptable. Thus, an alternative strategy for confirming the dinoprostone effect on the EP1 and EP3 genes may include complementary *in vitro* studies using myometrial and cervical cellular culture.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients who provided informed consent to participate in the research and to the staff of the labor ward at University Hospital of Santa Maria. We gratefully acknowledge the support and assistance of Professor Dr. João Francisco Oliveira (*in memoriam*). This research was supported by the Brazilian research support agencies CNPq (300969/2009-0 and 476551/2009-9) and FAPERGS (1006741).

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Arulkumaran S, Kandola MK, Hoffman B, Hanyaloglu AC, et al. (2012). The roles of prostaglandin EP 1 and 3 receptors in the control of human myometrial contractility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 489-498.

2. Astle S, Thornton S and Slater DM (2005). Identification and localization of prostaglandin E2 receptors in upper and lower segment human myometrium during pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* 11: 279-287.
3. Austin SC, Sanchez-Ramos L and Adair CD (2010). Labor induction with intravaginal Misoprostol compared with the dinoprostone vaginal insert: a systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202: 624.e1-9.
4. Brodt-Eppley J and Myatt L (1999). Prostaglandin receptors in lower segment myometrium during gestation and labor. *Obstet. Gynecol.* 93: 89-93.
5. Chioss G, Costantine MM, Bytautiene E, Betancourt A, et al. (2012). In vitro myometrial contractility profiles of different pharmacological agents used for induction of labor. *Am. J. Perinatol.* 29: 699-704.
6. Cikos S, Bukovska A and Koppel J (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol. Biol.* 8: 113.
7. Coleman RA, Smith WL and Narumiya S (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46: 205-229.
8. Ferland DJ, Darios ES and Watts SW (2015). The persistence of active smooth muscle in the female rat cervix through pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212: 244.e1-8.
9. Grigsby PL, Sooranna SR, Brockman DE, Johnson MR, et al. (2006a). Localization and expression of prostaglandin E2 receptors in human placenta and corresponding fetal membranes with labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195: 260-269.
10. Grigsby PL, Sooranna SR, Adu-Amankwa B, Pitzer B, et al. (2006b). Regional expression of prostaglandin E2 and F2alpha receptors in human myometrium, amnion, and choriondecidua with advancing gestation and labor. *Biol. Reprod.* 75: 297-305.
11. Gu G, Gao Q, Yuan X, Huang L, et al. (2012). Immunolocalization of adipocytes and prostaglandin E2 and its four receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in the caprine cervix during spontaneous term labor. *Biol. Reprod.* 86: 159, 1-10.
12. Hertelendy F and Zakar T (2004). Regulation of myometrial smooth muscle functions. *Curr. Pharm. Des.* 10: 2499-2517.

13. Hawkins JS and Wing DA (2012). Current pharmacotherapy options for labor induction. *Expert Opin. Pharmacother.* 13: 2005-2014.
14. Hua R, Pease JE, Sooranna SR, Viney JM, et al. (2012). Stretch and inflammatory cytokines drive myometrial chemokine expression via NF-kappaB activation. *Endocrinology* 153: 481-491.
15. Kandola MK, Sykes L, Lee YS, Johnson MR, et al. (2014). EP2 receptor activates dual G protein signaling pathways that mediate contrasting proinflammatory and relaxatory responses in term pregnant human myometrium. *Endocrinology* 155: 605-617.
16. Mittal P, Romero R, Tarca AL, Gonzalez J, et al. (2010). Characterization of the myometrial transcriptome and biological pathways of spontaneous human labor at term. *J. Perinat. Med.* 38: 617-643.
17. Myatt L and Lye SJ (2004). Expression, localization and function of prostaglandin receptors in myometrium. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70: 137-148.
18. Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79: 1193-1226.
19. Norstrom A, Bryman I, Wiqvist N, Sahni S, et al. (1984). Inhibitory action of relaxin on human cervical smooth muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59: 379-382.
20. Olson DM (2003). The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 17: 717-730.
21. Pevzner L, Rayburn WF, Rumney P and Wing DA (2009). Factors predicting successful labor induction with dinoprostone and Misoprostol vaginal inserts. *Obstet. Gynecol.* 114: 261-267.
22. Roos N, Blesson CS, Stephansson O, Masironi B, et al. (2014). The expression of prostaglandin receptors EP3 and EP4 in human cervix in post-term pregnancy differs between failed and successful labor induction. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 93: 159-167.
23. Schmitz T, Leroy MJ, Dallot E, Breuiller-Fouche M, et al. (2003). Interleukin-1beta induces glycosaminoglycan synthesis via the prostaglandin E2 pathway in cultured human cervical fibroblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 9: 1-8.



24. Smith GC, Baguma-Nibasheka M, Wu WX and Nathanielsz PW (1998). Regional variations in contractile responses to prostaglandins and prostanoid receptor messenger ribonucleic acid in pregnant baboon uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179: 1545-1552.
25. Smith GC, Wu WX and Nathanielsz PW (2001). Expression of prostanoid receptor genes in baboon chorion and decidua during pregnancy and parturition. *J. Endocrinol.* 168: 263-272.
26. Stjernholm-Vladic Y, Stygar D, Mansson C, Masironi B, et al. (2004). Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 74.
27. Sugimoto Y and Narumiya S (2007). Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282: 11613-11617.
28. Sugimoto Y, Inazumi T and Tsuchiya S (2015). Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *J. Biochem.* 157: 73-80.
29. Tan PC, Daud SA and Omar SZ (2009). Concurrent dinoprostone and oxytocin for labor induction in term premature rupture of membranes: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 113: 1059-1065.
30. Tenore JL (2003). Methods for cervical ripening and induction of labor. *Am. Fam. Physician* 67: 2123-2128.
31. Timmons B, Akins M and Mahendroo M (2010). Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol. Metab.* 21: 353-361.
32. Timmons BC, Reese J, Socrate S, Ehinger N, et al. (2014). Prostaglandins are essential for cervical ripening in LPS-mediated preterm birth but not term or antiprogestin-driven preterm ripening. *Endocrinology* 155: 287-298.
33. Unlugedik E, Alfaidy N, Holloway A, Lye S, et al. (2010). Expression and regulation of prostaglandin receptors in the human placenta and fetal membranes at term and preterm. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 796-807.
34. Woodward DF, Jones RL and Narumiya S (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol. Rev.* 63: 471-538.

35. Yuan W and López Bernal A (2007). Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth* 7 Suppl 1: S10.

## 3.2 ARTIGO 2

### **Misoprostol differentially modulates prostaglandin E2 receptor type 1 (EP1) gene and oxidative stress markers of myometrium cells obtained from spontaneous and nonspontaneous labor.**

Cristine Kolling Konopka\*<sup>1,2</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>1,3</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>1,3</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>1,3</sup>, Eduardo Bortoluzzi Dornelles<sup>3,4</sup>, Fernanda Barbisan<sup>1,3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

\* Corresponding author: Cristine Kolling Konopka E-mail: cristine.ufsm@gmail.com

Phone: +55 55 3220 8574 / FAX: +55 55 3221 5084

**ABSTRACT**

Misoprostol, a prostaglandin E1 analog, is largely used for labor induction. However, about one-third of patients who induce labor with prostaglandins do not reach vaginal delivery, and the reasons for labor induction failure are still unknown. The differential expression of prostaglandin receptors in myometrial cells could account to this differential response. Since delivery physiology also involves modulation of oxidative metabolism that can be potentially affected by pharmacological drugs, in the present investigation the role of Misoprostol on expression of prostaglandin receptors, as well as on oxidative markers of myometrial cells was evaluated. Samples of myometrial tissues derived from women with spontaneous (SL, n=05) and nonspontaneous labors (NSL, n=06) were biopsied and cultured *in vitro* conditions and exposed to different concentrations of Misoprostol. The gene expression was evaluated by qRT-PCR and oxidative biomarkers by spectrophotometric and fluorimetric analysis. Cells from SL women presented greater responsiveness to Misoprostol, since an upregulation of genes related to increased muscle contraction (EP1, EP3) was observed. Otherwise, cells from NSL women had low responsiveness to Misoprostol exposure or even suppressive effect on the expression of these genes. Two oxidative biomarkers that have been previously related to labor physiology were affected by Misoprostol treatment: lipoperoxidation and protein carbonylation (PC). However, a decrease in lipoperoxidation was observed just in SL cells treated to low concentrations of Misoprostol (0.1 uM) whereas decrease of PC occurred in all samples treated with different Misoprostol concentrations. The results suggest a pharmacogenetic effect of Misoprostol in labor induction involving differential regulation of EP receptor genes, as well as some minor differential modulation in the oxidative metabolism of myometrial cell. The potential influence of EP receptor gene polymorphism in the differential response to Misoprostol remains to be determined.

**Key words:** Misoprostol; mRNA; Prostaglandin receptors; Term pregnancy; Myometrium; Uterus; Pharmacogenomic.

**List of topics:**

Some women were not responsive to Misoprostol labor induction;

No-responsiveness involves myometrial cells prostaglandin receptors;

Minor regulation of oxidative metabolism is also Misoprostol non-responsiveness.

## INTRODUCTION

The labor induction is indicated in situations where the risks, either to the mother or fetus outweigh the possible benefits of maintaining pregnancy (WHO, 2011). Different methods have been used for cervical ripening and induction of labor, including prostaglandins (PGs) (Tang et al., 2013). Among PGs, Misoprostol, a prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) analog, has been widely used for cervical ripening, and, when administered vaginally, is the prostaglandin that has the highest probability of achieving a vaginal delivery within 24 hours (Alfirevic et al., 2015a).

Misoprostol acts by signal transduction through EP receptors, which are classified into 4 subtypes: EP1, EP2, EP3, and EP4 (Narumiya et al., 1999; Sugimoto et al., 2015), whose genes are respectively *PTGER1–PTGER4* (Gu et al., 2012). These receptors are present in the human uterine tissues (Astle et al., 2005), and act in different ways. EP1 receptor couples to a Gq protein and calcium channels, increasing calcium influx. EP2 and EP4 receptors couple to a stimulatory G protein (Gs), stimulate adenylate cyclase and increase cAMP generation. EP3 couples to a Gi protein, inhibits the adenylate cyclase, decrease cAMP and increase intracellular calcium (Sugimoto and Narumiya, 2007). Consequently, in uterine tissues, the activation of EP1 and EP3 is related to smooth muscle contraction, while the EP2 and EP4 receptor activation is related to the uterine relaxation.

During pregnancy, in an environment rich in progesterone, the myometrium remains in a relaxation state. This hormone acts as an immunomodulator, controlling many immune actions during pregnancy (Vrachnis et al., 2012), likely through its constitutive inhibition of the transcription factor NF- $\kappa$ B. Suppression of NF- $\kappa$ B decreases COX-2 expression and, by this means, decreases prostaglandin synthesis (Allport et al., 2001). As labor approaches, biochemical and morphological changes occur in the uterine tissue, which allow the process of parturition. Such changes include increased myometrial gap junction formation (Snegovskikh et al., 2006), up-regulation of myometrial progesterone A (Pieber et al., 2001), estrogen  $\alpha$  (Smith et al., 2002), prostaglandin and oxytocin receptors (Snegovskikh et al., 2006). Concomitant with these myometrial changes, inflammatory events occur in the cervix, such as increased production of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 (Sennstrom et al., 2000) and PGE<sub>2</sub> (Osman et al., 2003), triggering cervical ripening.

As suggested by previous studies, myometrial activation, from quiescence during pregnancy to contractile activity at time of labor, involves the balance of EP receptor expression between maternal and fetal tissues during pregnancy and parturition (Grigsby et al., 2006). This differential regulation of EP receptors in myometrium indicates that they play

an important role in the initiation and maintenance of labor in humans (Astle et al., 2005), but the exact mechanism through which this occurs is not fully elucidated.

Another important aspect to be considered is the utero-placental perfusion related to the parturition process. Some human pregnancy complications that are accompanied by malperfusion of the placenta have been implicated as a cause of oxidative stress, leading to release of proinflammatory cytokines (Myatt and Cui, 2004). Besides, uterine contractions during labor cause compression of the uterine vasculature and, hence, transient reductions in uteroplacental blood flow, associated with intermittent utero-placental poor perfusion. *In vitro* experiments involving hypoxia-reoxygenation of villous induced placental oxidative stress, that is associated with cellular events, including the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway (Cindrova-Davies et al., 2007a). Even if the specific cause of the oxidative stress is not certain, literature evidences show that labor is a powerful inducer of placental oxidative stress, inflammatory cytokines, and angiogenic regulators, and that the initial intermittent perfusion may be concerned (Cindrova-Davies et al., 2007b).

However, if the effect of Misoprostol includes differential modulation of the PG genes, and if this modulation could be differential in women with spontaneous and nonspontaneous labors, is an open question. Therefore, *in vitro* assays were carried out in myometrial cells obtained from spontaneous and nonspontaneous deliveries, to analyze the effect of exposure to different doses of Misoprostol on *PTGER1-4* expression. On the other hand, due to hypoxia and reoxygenation of the uteroplacental unit as a result of uterine contractions during labor, oxygen levels can vary considerably during labor. As in some cases hypoxia could compromise the progress of labor, additional markers of oxidative analyzes were conducted.

## **MATERIALS AND METHODS**

The present study, involving human cervical and myometrial tissue biopsies at the time of parturition, was approved by the Federal University of Santa Maria Ethical Committee (CAAE 0268.0.243.000-08), and informed consent was obtained from all participants before enrollment. The study included 11 term pregnant women who sought care for childbirth in the Obstetrics Service of the University Hospital of Santa Maria during the period from July 20 to August 20, 2014. Women were categorized in two groups: spontaneous labor (SL), which was the positive control group and included women presenting natural labor initiation followed by cesarean after spontaneous labor (due to nonreassuring fetal heart rate or cephalopelvic disproportion); and nonspontaneous labor (NSL), which included women with prolonged

latent phase of labor (longer than 20 hours) or women with Misoprostol labor induction, presenting effective uterine contractions (three or more contractions in 10 minutes) and cervical dilatation, who progressed to cesarean (due to nonreassuring fetal heart rate or cephalopelvic disproportion), despite of Misoprostol response.

Term was considered as pregnancy between 37 and 41 + 6 weeks of gestational age and spontaneous labor as natural labor initiation. Patients with indication for labor induction and with an unripe cervix, defined as a Bishop's score of  $\leq 5$  points (for Bishop score see Table 1 in Tenore, 2003), were assigned to receive 25  $\mu\text{g}$  vaginally administered Misoprostol placed in the posterior vaginal fornix each four hours until initiation of labor. Oxytocin in order to correct the uterine activity was used whenever necessary. Bishop 1 was considered the Bishop score upon admission to labor and Bishop 2 was immediately before birth.

Pregnant women with the following characteristics were excluded from the study: smokers and those with other drug abuse; women with a disease or undergoing chronic use of drugs that may influence prostaglandin metabolism, and preterm or post-term pregnancies. Women with infections and premature rupture of membranes were also excluded from the study.

### **Tissue collection**

Myometrial tissue biopsies were obtained according previously described protocols (Astle et al., 2005; Stjernholm-Vladic et al., 2004) from women with term pregnancies during cesarean section. Biopsies were taken from the lower edge of the upper part of the incision in the lower uterine segment during cesarean, after placenta removal. After excision, tissues were stored in sterile culture medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) supplemented with 1% of penicillin/streptomycin and 1% antifungal amphotericin B, and transported at 37°C from the University Hospital to the Biogenômica Laboratory in Federal University of Santa Maria-RS.

### **Cell culture**

The collected biopsy of myometrium was isolated and macerated mechanically with the aid of razor in Petri dishes containing cell culture DMEM with 10% FBS, supplemented with 1% of penicillin/streptomycin and 1% antifungal amphotericin B. Then, the material was filtered and centrifuged, with subsequent resuspension in cell culture medium and proceeded to count the viable cells by Trypan blue method (Mischell et al., 1980). The cells were placed in six sterile plates, at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL. Due to stabilization of the material, cells were cultured for 24 hours under optimal conditions for cell culture (37°C and 5% CO<sub>2</sub> saturation) before appropriate treatments.

Afterward, the samples were treated with Misoprostol (Prostokos<sup>®</sup>, Hebron) at different concentrations (0.1, 0.5 and 1  $\mu$ M) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> saturation for 6 and 24 hours, to evaluate respectively the basal levels of cell and the in vitro response to the drug.

### **Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) analysis**

Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The RNA extracted was measured by a Thermo Scientific NanoDrop<sup>™</sup> 1000 Spectrophotometer. To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1000ng/ $\mu$ L) with 0.2  $\mu$ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C during 5 minutes, followed by heating at 65°C by 10 minutes. The cDNA was generated with 1  $\mu$ L of Iscript cDNA and 4  $\mu$ L of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The next steps of the reaction were 5°C for 10 minutes, 25°C for 5 minutes and 85°C for 5 minutes and finally with an incubation of 5°C for 60 minutes. The qRT-PCR was realized in the Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN biotechnology, Germany) with 2 $\times$  QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany) 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 60°C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s. The reactions of each sample were made in triplicate, using 1  $\mu$ M of each primer, 1000 ng/ $\mu$ L of cDNA, RNAase-free water and with 2 $\times$  QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (QIAGEN biotechnology, Germany), the final volume in 20 $\mu$ L. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene (Barbisan et al, 2014). The expression level of beta-actin was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs used are shown in table 1.



**Table 1.** List of primers used during prostaglandin receptor gene expression experiments

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>PTGER1</i>	ATGGTGGGCCAGCTTGTC	GCCACCAACACCAGCATTG
<i>PTGER2</i>	GAAACCTCTCCCGAAAGGAA	AATCCGACAACAGAGGACTGAAC
<i>PTGER3</i>	AGCTTATGGGGATCATGTGC	TTTCTGCTTCTCCGTGTGTG
<i>PTGER4</i>	CCTCGGTGTCCAAAAATCGA	CTCCAACCTGCTTTCACCTTGT
Beta-actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA

### Citotoxicity and oxidative metabolism analysis

All fluorimetric and spectrophotometric analyses were performed by using a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Misoprostol effects on myometrial cells viability was evaluated by quantification of cell-free double-strand (ds) DNA levels in a black, 96-well plate using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA kit purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA) and following manufactures instructions.

The intracellular ROS production was determined by dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA). In this assay, DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent DFF by cellular oxidants. To perform this measure the sample cells were treated with DCFH-DA (10 µM) for 60 min at 37 °C and the fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm (LeBel et al., 1992). Effect on cell lipoperoxidation was determined by quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa et al., 1979).

The oxidative damage to proteins was measured by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. The carbonyl content was spectrophotometrically determined (370nm) by using a coefficient of 22,000 Molar-1and

expressed in nmol/mg of protein (Levine et al., 1990). Superoxide levels were quantified by analysis of formazan levels generated between Chloride Nitrobluetetrazolium (NBT) and the superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) (Morabito et al., 2010). The nitric oxide was quantified by nitrate levels according to Choi et al., 2012, using Griess reagent.

### STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using Graph Pad Prism Software and the data were expressed as mean  $\pm$  SD. The Misoprostol effect on myometrial cells from SL and NSL women was compared by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. The basal EPs gene expression between SL and NSL women was compared by Student T test. All tests were 2-tail analyzed and P values  $\leq$  0.05 were considered significant.

### RESULTS

A total of 11 myometrium cell cultures were performed with samples obtained in six pregnant women with SL and five with NSL. The two groups (SL and NSL) were similar with respect to gestational age ( $38.3 \pm 1.5$  and  $40.0 \pm 1.4$  weeks), Bishop score immediately before birth ( $8.2 \pm 1.7$  and  $6.0 \pm 3.0$ ), labor time ( $10.7 \pm 5.3$  and  $13.2 \pm 4.4$  hours), weight of the newborn ( $3148 \pm 726.6$  and  $3410 \pm 454.3$ g) and were different with respect to maternal age ( $19.2 \pm 2.1$  and  $24.2 \pm 4.7$  years,  $p = 0.035$ ) and Bishop score upon admission ( $5.8 \pm 2.1$  and  $2.6 \pm 1.5$ ,  $p = 0.020$ ). Detailed information of women whose myometrial cells were obtained and *in vitro* studied are presented in Table 2.

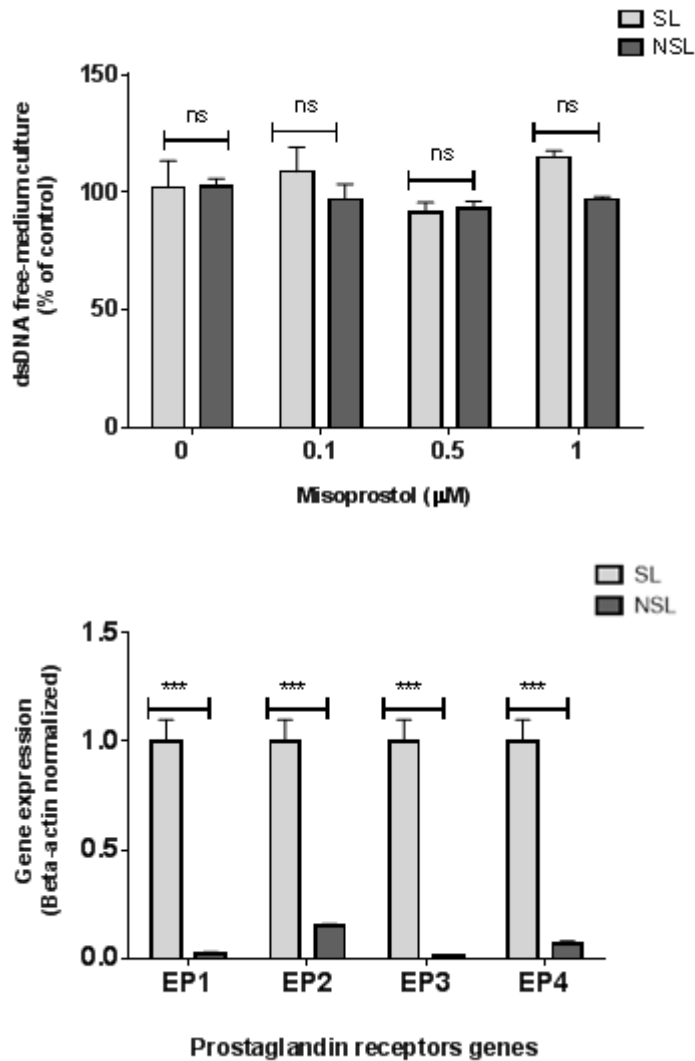
**Table 1.** Baseline subjects characteristics.

Case	Maternal age (years)	GA at labor (weeks)	Parity (previous labor)	Type of labor (induction indication)	Caesarean indication	Bishop 1	Bishop 2	Length of labor after admission	Oxytocin 1=yes 2=no	Associated maternal pathology	Birth weight (g)
1	21	38	Primigravida	Spontaneous	CPD	5	6	12	2	Gestational hypertension	4146
2	21	38	Secundigravida (1 caesarean)	Prolonged latent period	Cervical dystocia	5	5	12	2	None	3390
3	20	41	Secundigravida (1 caesarean)	Spontaneous	CPD	9	9	5	2	None	3970
4	17	37	Secundigravida (1 vaginal labor)	Spontaneous	CPD	8	8	7	1	None	2950
5	20	39	Primigravida	Induced (GDM)	CPD	3	9	10	2	GDM	3120
6	22	38	Secundigravida (1 vaginal labor)	Spontaneous	CPD	4	9	20	1	Gestational hypertension	2705
7	18	37	Primigravida	Spontaneous	CPD	4	8	12	1	Gestational hypertension	2690
8	17	39	Primigravida	Spontaneous	CPD	5	9	8	2	None	2425
9	23	41	Primigravida	Induced (41 weeks GA)	Nonreassuring FHR	1	5	20	2	Epilepsy	2955
10	32	41	Secundigravida (1 caesarean)	Prolonged latent period	Cervical dystocia	2	2	9	2	None	3445
11	25	41	Secundigravida (1 vaginal labor)	Induced (41 weeks GA)	Nonreassuring FHR	2	9	15	1	None	4140

GA: gestacional age; GDM: Gestational *Diabetes mellitus*; FHR: fetal heart rate; CPD: cephalopelvic disproportion. Bishop 1 = Bishop score at admission to labor. Bishop 2 = Bishop score immediately before cesarean.

The potential cytotoxic effect of Misoprostol doses tested here was initially evaluated. As can be seen in Figure 1, no cytotoxicity was observed in myometrial cell cultures exposed to Misoprostol, both those originating from women with SL and NSL. From these results, the basal levels of EPs genes expression were compared between SL and NSL groups after six

hour cultures. The results showed a strong downregulation in the expression of the four EP genes in NSL cells when compared SL cells ( $p = 0.001$ ) (Figure 1).



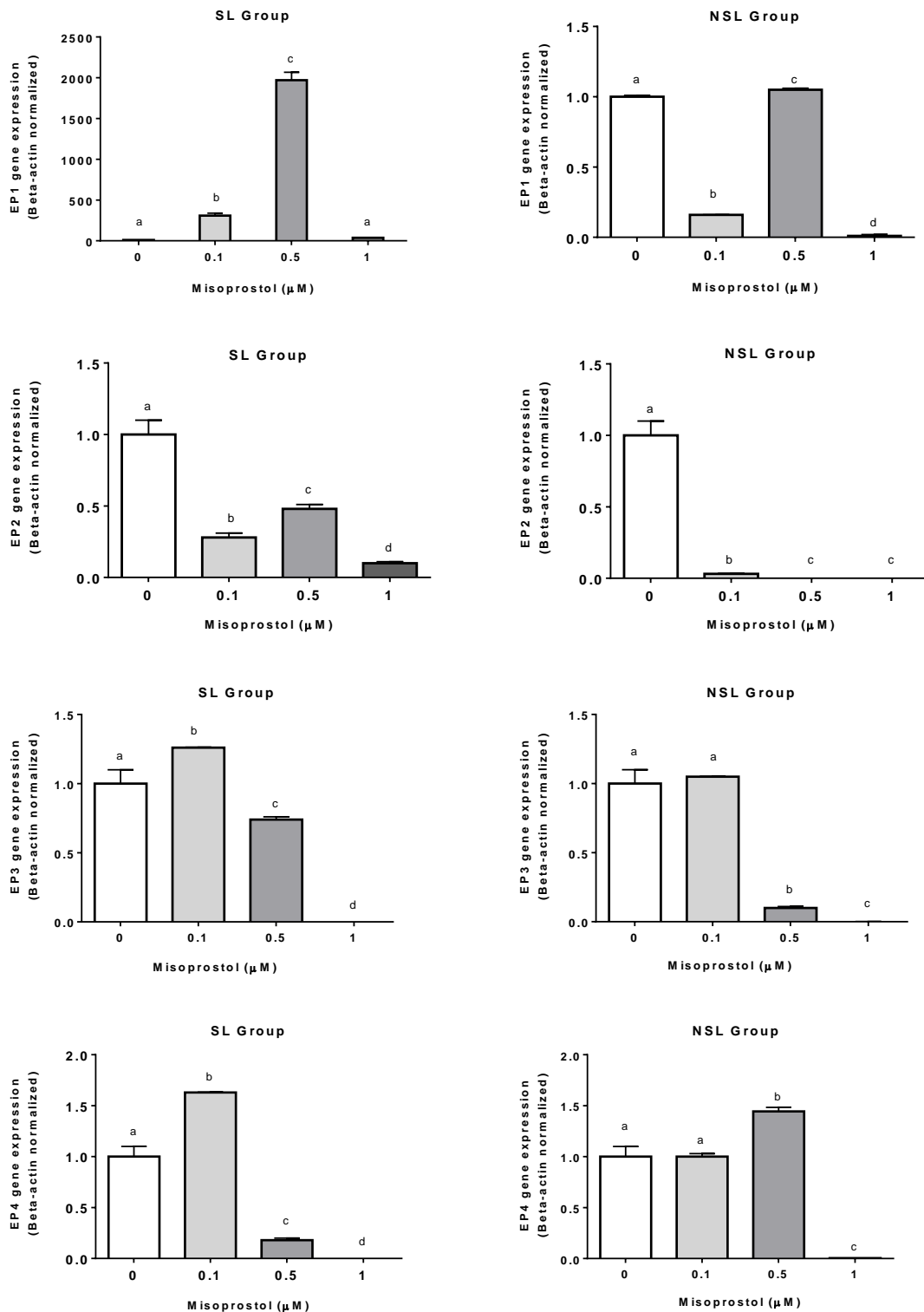
**Figure 1** – Myometrial cells obtained from biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL): (A) the *in vitro* effect of Misoprostol at different concentrations on cell viability determined by dsDNA quantification using DNA Picogreen dye. (B) Comparison between basal prostaglandin receptors (EPs) genes expression between SL and NSL cells before Misoprostol treatment. The SL and NSL groups were statistically compared by Student T test; (B). ns= non-significance; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Following, the effect of the cell culture exposure to Misoprostol in SL and NSL groups was assessed (Figure 2). In general, the results showed that Misoprostol modulated EP1, EP2, EP3 and EP4 gene expression regulation, although this was not dose-dependent. The Misoprostol effect on EPs gene expression also did not present similarly in the two investigated groups (SP and NSL). As can be seen in Figure 2, the highest concentration of Misoprostol was able to strongly down regulate the expression of all four genes evaluated, independently of the of cell group (SL and IL).

When exposed to 0.1 and 0.5 uM Misoprostol, SL cells strongly upregulated expression of the EP1 gene when compared to the control cells. This result was not observed in NSL cells, which unlike showed downregulation in expression of EP1 when exposed to a dose of 0.1 uM and maintenance in the expression of this gene relative to control, when cells were exposed to concentrations of 0.5 uM.

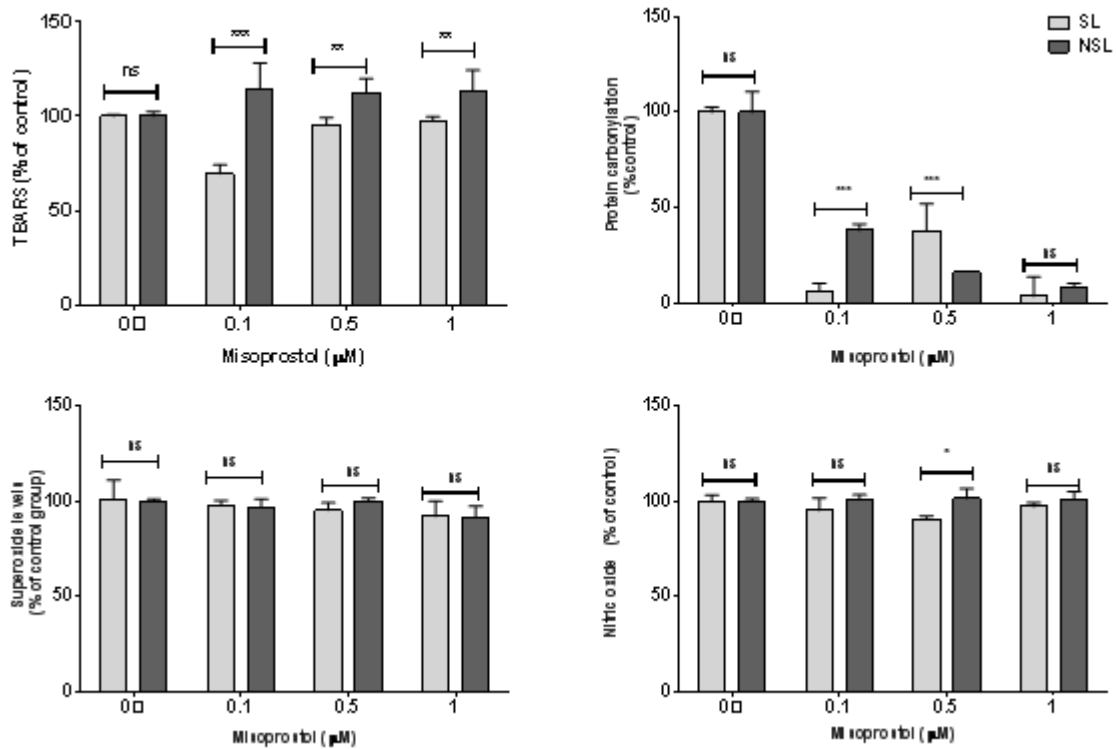
Misoprostol caused a significant EP2 gene downregulation in all tested concentrations in both cell types (SL and NSL). In the EP3 gene, at a concentration of 0.1 uM Misoprostol slightly increased the gene expression in SL cells, whereas in NSL cells there was no change in the expression. At a concentration of 0.5 uM, Misoprostol downregulated the expression of EP3 gene in both cell types (SL and NSL). However, downregulation of EP3 gene at this concentration was more intense in NSL than in SL cells.

A slight upregulation in the EP4 gene expression was observed when SL cells were exposed to 0.1 uM of Misoprostol and NSL cells were exposed to 0.5 uM of the drug. The concentration of 0.5 uM led to a downregulation in the EP4 gene expression in SL cells, while NSL cells showed an opposite response, in other words, exposition to 0.5 uM upregulated this gene.



**Figure 2** – Misoprostol effect on prostaglandin receptors gene expression in myometrial cells obtained from biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL). Statistical comparison was performed using Two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Different letters in each graphic indicate statistical differences among treatments at  $p < 0.05$ .

Following, an additional oxidative status analysis was done in myometrial cells with and without treatment with Misoprostol (Figure 3). Both nitric oxide and superoxide levels remained similar between SL and NSL myometrial cells, with and without exposure to Misoprostol. The concentration of ROS was also similar between treated and untreated cells (data not shown).



**Figure 3** – Misoprostol effect on oxidative metabolism biomarkers of cells obtained from myometrium biopsies of women with spontaneous labor (SL) and non-spontaneous labor (NSL). The SL and NSL groups were statistically compared by Student T test; (B). ns= non-significance; \*\*\*  $p < 0.001$ .

However, when the cell lipoperoxidation was evaluated, the SL cells exposed to lower concentrations of Misoprostol (0.1 μM) showed a significant decrease in TBARS levels ( $p = 0.001$ ) when compared to the control group. With the larger doses of Misoprostol, the lipoperoxidation levels did not change in the same cells. Moreover, exposure to all concentrations of Misoprostol increased significantly, in a moderate manner, the levels of TBARS in NSL cells ( $p = 0.01$ ). The effect of Misoprostol on protein carbonylation levels

was also evaluated and the results showed a significant decrease of the oxidative marker in both cell types (SL and NSL) exposed to different concentrations of Misoprostol. However, protein carbonylation levels were significantly smaller in SL cells exposed to 0.1  $\mu\text{M}$  when compared to NSL cells, while the opposite effect was observed when such cells were exposed to concentrations of 0.5  $\mu\text{M}$  Misoprostol.

## DISCUSSION

In the present investigation, the effect of Misoprostol on myometrial EPs gene expression was confirmed, although this effect was differential according to the origin of myometrial cells (from SL or NSL women). In addition, the results showed that Misoprostol was able to modulate differentially two important oxidative markers: lipoperoxidation and protein carbonylation.

From these results, firstly we will comment the potential effects of Misoprostol on myometrial EPs gene expression. We consider that the results are relevant, since the effect of Misoprostol, a prostaglandin  $E_1$  analog used for labor induction (Alfirevic et al., 2015a), on the expression of EPs gene modulation has not yet been elucidated.

To evaluate this issue, myometrial cells derived from women with spontaneous and nonspontaneous labors were cultured *in vitro* conditions and latter exposed to different concentrations of Misoprostol. In general, the results showed that the presence of Misoprostol was able to differentially regulate gene expression of the EPs. However, this regulation was strongly influenced by the origin of the cells (myometrium of spontaneous or nonspontaneous labors) and also by the concentration of the drug. These results indicate that myometrial cells tend to adjust the effect of the prostaglandin through greater or lower availability of its receptors. This statement was indirectly evidenced by analyzing the modulation of PGE receptors gene expression.

The results also suggested that in SL women a greater responsiveness to Misoprostol occurred, since an upregulation of genes related to increased muscle contraction (EP1, EP3) was observed. Besides, a downregulation or even just a slight increase in the expression of EP2 and EP4 gene, that are related to muscle relaxation (Sugimoto and Narumiya, 2007). Otherwise, cells obtained from women with NSL had low responsiveness to Misoprostol exposure or even suppressive effect on the expression of these genes.

Differential response of myometrial cells, obtained from SL and NSL women, to Misoprostol exposure indicate the potential presence of genetic variants on EPs genes that could explain these results, since the *in vitro* conditions were similar among all samples.



Bigler et al. (2007) described the occurrence of polymorphism in prostaglandin E2 receptors that alter the function of these receptors. These authors postulated that genetic variants could be relevant for inflammatory conditions, carcinogenesis, and also pharmacogenetic response. In fact, our results indicated the occurrence of some pharmacogenetic effect that involves differential EPs receptor gene expression in the SL and NSL women. Unfortunately, we were not able to find previous investigations describing some type of influence of EPs receptors gene polymorphism in the parturition process.

An investigation that can be cited, since it involves gene polymorphism influence on time interval between labor induction and delivery, is the performed by Skupski et al. (2008). The authors described the association between cyclooxygenase 2 and interleukin 1 receptor agonist gene polymorphisms and reduction of time interval from labor induction to delivery.

At contrary, there are many gene polymorphism investigations involving preterm delivery related to several metabolic pathways. For example, the study performed by Grisaru-Granovsky et al. (2010) described association between prostanoid DP receptor (PTGDR) variants in women with preterm births who admitted to coital activity (CA) within 24 h of labor. Investigations of genetic contributions to labor analgesia also showed influence of variants of the  $\mu$ -opioid receptor gene (OPRM1) on the response to neuraxial opioids (Landau, 2013). Other authors described that homozygous beta-2 adrenoceptor genotype encoding for Arg/Arg16 was associated with slower progress in active term and late preterm labor (Miller et al., 2011). In addition, investigations as the performed by Jones et al (2012) also described the influence of gene polymorphism of cytokines participating of innate immune system response on risk of preterm delivery.

We also reviewed the existence of studies about Misoprostol pharmacogenetics effects. In the review, we found just one recent investigation (Alfirevic et al., 2015b), that described association between genetic polymorphisms of drug transporters (SLCO1B1 and ABCC4 genes) and Misoprostol-induced fever. This association was found in both, Latin American and European ancestry pregnant women.

Taking into account these considerations, the results here described indicate a potential pharmacogenetic Misoprostol effect on labor induction, which involves EPs receptor pathway. Therefore, complementary investigation analyzing the association between EPs receptor gene polymorphism and induction response to Misoprostol need to be performed.

In the present investigation we also evaluated if Misoprostol treatment could have some influence on oxidative metabolism of myometrial cells. This additional analysis was based on the hypothesis that oxygen levels are considerably variable during human labor, due

to hypoxia and reoxygenation of the uteroplacental unit during myometrial contractions (Khan et al., 2010). If this physiological aspect is not clinically controlled, alterations in the oxygen concentrations can compromise the progress of labor. Therefore, oxygen fluctuation in cells can generate higher levels of oxidant and antioxidant molecules, and alteration in these patterns could affect the parturition process. In fact, previous investigations have described differential modulation of oxidant molecules during labor, including increase in lipoperoxidation, demonstrated by TBARS quantification in umbilical cord artery (Yaacobi et al., 1999). Vakilian et al. (2009) observed that mothers after vaginal delivery are in more oxidative stress, with higher levels of TBARS, when compared with mothers after elective cesarean. Other study performed by *in vitro* investigation (Khan et al., 2010) also described higher levels of lipoperoxidation and, in addition, higher protein carbonylation in myometrial samples obtained during term or preterm labor.

We did not observe differences among basal oxidative markers investigated here in myometrial cells obtained from SL and NSL women. However, the non-differences can be an effect of *in vitro* conditions, since we did not analyze these variables at the moment of tissue sample collection. When we exposed cells to Misoprostol, our results showed differential response on oxidative metabolism variables. A significant decrease in lipoperoxidation levels was observed in SL cells exposed to low concentrations of Misoprostol (0.1  $\mu$ M). However, in larger doses of Misoprostol, the lipoperoxidation levels did not change in the same cells. At contrary, the exposure to all concentrations of Misoprostol increased, in a moderate manner, the levels of TBARS in NSL cells. The higher TBARS levels in NSL cells exposed to Misoprostol could be considered an effect of this drug, taking into account the results of the investigation performed by Khan et al (2010), that described higher levels of lipoperoxidation in term or preterm labor. However, this effect appears to be dependent on cell physiology, since in SL cells the Misoprostol did not present similar effect found in NSL cells.

Protein carbonylation levels were also influenced by Misoprostol exposition, occurring an important decrease in the concentration of this oxidative marker in both, SL and NSL cells. Misoprostol effect on oxidative metabolism was previously investigated in other experimental conditions that not labor induction. A study performed by Ozer et al (2011) showed that Misoprostol was able to protect renal damage in rats induced by cisplatin exposition, a potent anticancer drug. Choi et al (2008) also described protective effect of Misoprostol against neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium, that induces mitochondria-mediated cell death process and oxidative stress in PC12, a commercial adrenal cell line. Salam et al (2009) also described that Misoprostol treatment presented hepatoprotective effects in rats exposed to

silymarin, a hepatotoxic molecule. The authors postulated some antioxidant effects of Misoprostol that confer hepatoprotective properties. Misoprostol also decreased enterocyte apoptosis in an experimental model that intestinal cells were injured by ischemia-reperfusion induction (Topcu et al., 2007) involving differential oxidative metabolism modulation.

For our best knowledge, this is the first investigation that showed the effect of Misoprostol on myometrial cells oxidative metabolism, despite the effect was dependent of origin of cells, if SL or NSL women.

Finally, is important to comment some methodological constrains related to the investigation here described. The first factor relates to the reduced number of myometrial cells samples investigated here. In statistical terms, the increase in the sample number is desirable. However, in ethical and logistic terms it is hard to include a high number of samples. Though, as we found important and significant differences between SL and NSL groups, we believe that despite the few number of samples used to perform the *in vitro* analysis, our results are new and relevant. Other important limitation relates to Misoprostol curve concentration. We point out that the number of cell cultures treated with Misoprostol was minimal (three concentrations), but in view of the difficulty of obtaining a volume of cells needed to increase the treatments, no more concentrations could be tested. It is important to remember that analysis were replicated and used to evaluate gene expression as well as oxidative metabolism parameters. We also considered that in NSL patients that received Misoprostol for labor induction some influence of this drug on the subsequent *in vitro* analysis could have occurred. However, this view loses strength since studies with respect to pharmacokinetic Misoprostol analysis showed that after vaginal Misoprostol administration the maximum level of the drug in maternal plasma is observed after 70-80 minutes and that levels can be detected for up to 6 hours following administration (Bygdeman, 2003; Ziemann et al., 1997). Once all myometrial tissue samples were obtained at least 10 hours after administration of the last dose of Misoprostol and that the effect on the gene expression regulation was evaluated 24 h after biopsy, it seems unlikely that its *in vivo* effect still could have some influence on gene regulation.

In conclusion, our results showed effects of Misoprostol on EPs gene expression as well as in oxidative metabolism markers in *in vitro* myometrial cells. However, some effects were influenced by myometrial cells origin (SL or NSL women) indicating pharmacogenetic effect of Misoprostol. Complementary investigations could help us to elucidate the relevance of these findings in clinical terms.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients who provided informed consent to participate in the research and to the staff of the labor ward at University Hospital of Santa Maria. We are grateful to the Biogenomic Lab research team to help us to perform the experimental protocols.

## FUNDING

This research was supported by the Brazilian research support agencies CNPq (402325/2013-3; 311446/2012-4; 490760/2013-9).

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. **WHO Recommendations for Augmentation of Labour.** World Health Organization, Geneva, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK258875/>.
2. **Tang J, Kapp N, Dragoman M, de Souza JP.** WHO recommendations for Misoprostol use for obstetric and gynecologic indications. *Int J Gynaecol Obstet* . 2013; 121: 186-9.
3. **Alfirevic Z, Keeney E, Dowswell T, Welton NJ, Dias S, Jones LV, Navaratnam K, Caldwell DM.** Labour induction with prostaglandins: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2015a; 350: h217.
4. **Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F.** Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev*. 1999; 79: 1193-226.
5. **Sugimoto Y, Inazumi T, Tsuchiya S.** Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *J Biochem*. 2015; 157: 73-80.
6. **Gu G, Gao Q, Yuan X, Huang L, Ge L.** Immunolocalization of adipocytes and prostaglandin E2 and its four receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in the caprine cervix during spontaneous term labor. *Biol Reprod*. 2012; 86: 159, 1-10.
7. **Astle S, Thornton S, Slater DM.** Identification and localization of prostaglandin E2 receptors in upper and lower segment human myometrium during pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11: 279-87.
8. **Sugimoto Y, Narumiya S.** Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007; 282: 11613-7.

9. **Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, Tsikouras P, Iliodromiti Z.** Immune aspects and myometrial actions of progesterone and CRH in labor. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 937618.
10. **Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR.** Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 581-6.
11. **Snegovskikh V, Park JS, Norwitz ER.** Endocrinology of parturition. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006; 35:173-191
12. **Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR.** Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:875-879.
13. **Smith R, Mesiano S, McGrath S.** Hormone trajectories leading to human birth. *Regul Pept.* 2002; 108:159-164.
14. **Sennstrom MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A, Bystrom B, Endresen U, Mlambo N, Norman M, Stabi B, Brauner.** Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:375-381.
15. **Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE.** Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:41-45.
16. **Grigsby PL, Sooranna SR, Adu-Amankwa B, Pitzer B, Brockman DE, Johnson MR, Myatt L.** Regional expression of prostaglandin E2 and F2 alpha receptors in human myometrium, amnion, and choriodecidua with advancing gestation and labor. *Biol Reprod.* 2006; 75: 297-305.
17. **Myatt L, Cui X.** Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122: 369–82.
18. **Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ.** Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol.* 2007a; 170: 1511-20.
19. **Cindrova-Davies T, Yung HW, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, Burton GJ, Charnock-Jones DS.** Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol.* 2007b; 171: 1168-79.

20. **Tenore JL.** Methods for cervical ripening and induction of labor. *Am Fam Physician.* 2003; 67: 2123-8.
21. **Stjernholm-Vladic Y, Stygar D, Mansson C, Masironi B, Akerberg S, Wang H, Ekman-Ordeberg G, Sahlin L.** Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 74.
22. **Mischell BB, Shiingi SM.** Selected Methods in Cellular Immunology. New York: WH Freeman Company; 1980.
23. **Barbisan F, Motta JR, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IBM.** Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *PLoS ONE.* 2014; 9.
24. **LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC.** Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5: 227-31.
25. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.
26. **Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-78.
27. **Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fano G, Mariggio MA.** Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48: 579-89.
28. **Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD.** The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol.* 2012; 280: 164-70.
29. **Bigler J, Sibert JG, Poole EM, Carlson CS, Potter JD, Ulrich CM.** Polymorphisms predicted to alter function in prostaglandin E2 synthase and prostaglandin E2 receptors. *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17: 221-7.
30. **Skupski DW, Normand N, Eglinton GS, Witkin SS.** Association of cyclooxygenase-2 and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with the time interval between labor induction and delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 296 e1-5.

31. **Grisaru-Granovsky S, Altarescu G, Finci S, Weintraub A, Tevet A, Samueloff A, Schimmel MS.** Prostanoid DP receptor (PTGDR) variants in mothers with post-coital associated preterm births: preliminary observations. *J Perinatol.* 2010; 30: 33-7.
32. **Landau R.** Genetic contributions to labor pain and progress. *Clin Perinatol.* 2013; 40: 575-87.
33. **Miller RS, Smiley RM, Daniel D, Weng C, Emala CW, Blouin J-L, Flood PD.** Beta-2 adrenoceptor genotype and progress in term and late preterm active labor. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205: 137.e1-e7.
34. **Jones NM, Holzman C, Tian Y, Witkin SS, Genc M, Friderici K, Fisher R, Sezen D, Babula O, Jernigan KA, Chung H, Wirth J.** Innate immune system gene polymorphisms in maternal and child genotype and risk of preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25: 240-7.
35. **Alfirevic A, Durocher J, Elati A, Leon W, Dickens D, Radisch S, Box H, Siccardi M, Curley P, Xinarianos G, Ardeshana A, Owen A, Zhang JE, Pirmohamed M, Alfirevic Z, Weeks A, Winikoff B.** Misoprostol-induced fever and genetic polymorphisms in drug transporters SLCO1B1 and ABCC4 in women of Latin American and European ancestry. *Pharmacogenomics.* 2015b; 16: 919-28.
36. **Khan RN, Matharoo-Ball B, Shaw RW.** Antioxidant enzyme expression, lipid peroxidation, and protein oxidation in human myometrium with parturition. *Reprod Sci.* 2010; 17: 78-84.
37. **Yaacobi N, Ohel G, Hochman A.** Reactive oxygen species in the process of labor. *Arch Gynecol Obstet.* 1999; 263: 23-4.
38. **Vakilian K, Ranjbar A, Zarganjfard A, Mortazavi M, Vosough-Ghanbari S, Mashaiee S, Abdollahi M.** On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicol Mech Methods.* 2009; 19: 94-9.
39. **Ozer MK, Asci H, Oncu M, Calapoglu M, Savran M, Yesilot S, Candan IA, Cicek E.** Effects of Misoprostol on cisplatin-induced renal damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49: 1556-9.
40. **Choi EJ, Han JH, Lee CS.** Prostaglandin analogue Misoprostol attenuates neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death in differentiated PC12 cells. *Brain Res Bull.* 2008; 77: 293-300.
41. **Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS.** Hepatoprotective effects of Misoprostol and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009; 23: 179-88.

42. **Topcu I, Vatansever S, Var A, Cavus Z, Cilaker S, Sakarya M.** The effect of Misoprostol, a prostaglandin E1 analog, on apoptosis in ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. *Acta histochem.* 2007; 109: 322-9.
43. **Bygdeman M.** Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17: 707-16.
44. **Zieman M, Fong SK, Benowitz NL, Banskter D, Darney PD.** Absorption kinetics of Misoprostol with oral or vaginal administration. *Obstet Gynecol.* 1997; 90: 88-92.



## 4. DISCUSSÃO

A fisiologia do tecido uterino durante o parto muda substancialmente, a fim de propiciar a expulsão do feto. Porém, algumas vezes não é possível aguardar o parto espontâneo, sendo necessária a indução do mesmo com fármacos, como as prostaglandinas. Entretanto, apesar do uso destes fármacos, a resposta à indução do parto é variável de paciente a paciente, e os motivos pelos quais isto ocorre é desconhecido. Um dos fatores potencialmente envolvidos na resposta individual à indução do parto é a expressão gênica diferencial dos receptores miometriais e cervicais da PGE<sub>2</sub>, porém esta ainda é uma questão em aberto. Por este motivo, o primeiro trabalho conduzido neste estudo avaliou a expressão *in vivo* dos genes dos receptores de EPs em miométrio e cérvix uterina em partos a termo induzidos com Dinoproston, um análogo da PGE<sub>2</sub>. Uma vez que a expressão diferencial dos receptores poderia ser substancialmente afetada pelos fármacos análogos da prostaglandina, o segundo estudo buscou avaliar o efeito *in vitro* do Misoprostol (PGE<sub>1</sub>) em células miometriais obtidas de gestantes a termo, com partos espontâneos (SL) e não espontâneos (NSL), em relação à expressão miometrial dos genes EPs e aos marcadores de estresse oxidativo.

No primeiro estudo, a expressão gênica dos receptores EPs foi avaliada em amostras da cérvix uterina e do segmento inferior do miométrio, obtidas em gestantes a termo, nas quais o parto foi farmacologicamente induzido por Dinoproston. As mulheres, que foram classificadas em parto espontâneo, responsivas ou não responsivas à indução com Dinoproston, mostraram regulação gênica diferencial dos receptores EPs. No caso, foi observada upregulation da expressão gênica do receptor EP1 no tecido cervical de mulheres não-responsivas, quando comparada às responsivas. Por outro lado, mulheres responsivas apresentaram uma alta expressão gênica do receptor EP3 no miométrio. No segundo estudo, a expressão gênica dos receptores EPs também foi modulada pelo tratamento *in vitro* com Misoprostol em células miometriais oriundas de mulheres com e sem parto espontâneo. Neste estudo também foi verificado que o Misoprostol tem ação sobre o metabolismo oxidativo uterino, diminuindo os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas.

A partir da revisão da literatura sobre o tema, até o presente momento estes resultados não foram descritos em artigos prévios e podem contribuir para o entendimento do papel da modulação dos genes EPs no sucesso ou insucesso do parto farmacologicamente induzido.

Com base nestas considerações iniciais, os principais aspectos relevantes relacionados com os resultados obtidos, bem como as limitações metodológicas serão comentados a seguir.

Como está bem estabelecido, as PGs desempenham um papel central no trabalho de parto em humanos, levando ao amadurecimento cervical e a contratilidade miometrial (HERTELENDY e ZAKAR, 2004; ROOS et al., 2013; SCHMITZ et al., 2003). Classicamente, análises em tecido miometrial evidenciaram que a PGE<sub>2</sub> estimula as contrações via receptores EP1 e EP3. Por outro lado, o relaxamento uterino é mantido através da sua ação nos receptores EP2 e EP4 (BRODT-EPPLEY e MYATT, 1999). No entanto, poucos estudos têm avaliado este processo fisiológico em detalhe (ARULKUMARAN et al., 2012; ASTLE et al., 2005; GRIGSBY et al., 2006b; KANDOLA et al., 2014), sendo os resultados bastante inconsistentes. Por este motivo, o presente estudo investigou de modo concomitante o tecido miometrial e cervical uterino, observando-se uma regulação concomitante e antagônica da expressão do RNA mensageiro (mRNA) de EP1 e EP3 nestes tecidos. Deste modo, o principal resultado obtido no primeiro artigo foi a indicação de uma regulação diferencial da expressão gênica dos EPs nos tecidos uterinos durante o parto fisiológico.

Uma vez que o parto envolve uma mudança da latência uterina à contratilidade miometrial progressiva, em termos funcionais o trabalho de parto deve ser acompanhado por uma diminuição nos receptores relaxantes e por aumento nos receptores contráteis da PGE<sub>2</sub> nos tecidos miometriais. Como esperado, nos resultados aqui descritos foi observado um aumento na expressão miometrial de EP3 durante o trabalho de parto fisiológico. A expressão de genes inibitórios, tal como EP3, provavelmente leva à inibição da adenilciclase, diminuição do AMPc e inibição do relaxamento da fibra muscular, que associada ao aumento do Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, que está associado à contração muscular. Este achado aqui descrito é corroborado por um estudo prévio conduzido por ARULKUMARAN et al. (2012), que atribuiu principalmente ao EP3 a função contrátil miometrial.

No entanto, o motivo pelo qual o mRNA do EP1 e do EP3 foram regulados negativamente (*downregulated*) no colo uterino durante o parto espontâneo não está bem esclarecido. A cérvix é uma estrutura rígida durante a maior parte da vida de uma mulher, exceto perto de parto e durante o trabalho de parto, quando esta região perde competência para permitir a dilatação e o nascimento. A perda da competência cervical envolve mecanismos bioquímicos e fisiológicos coordenados e complexos, nos quais a matriz extracelular (composta de colagénio, ácido hialurónico, proteoglicanos e componentes imunológicos) é transformada. Esta remodelação tecidual é composta por quatro fases,

incluindo o amolecimento, amadurecimento, dilatação e reparação pós-parto (TIMMONS et al., 2010).

Além disso, um estudo recente utilizando ratos como um modelo experimental descreveu que o colo do útero é também composto por células do músculo liso (FERLAND et al., 2015). Isto também ocorre nos seres humanos, nos quais a contratilidade do músculo liso cervical foi descrita já há 30 anos (NORSTROM et al., 1984). Conforme descrito por FERLAND et al. (2015), evidências eletromiográficas e farmacológicas sugerem que, em termos funcionais, o colo e o corpo uterino podem ser considerados como dois órgãos diferenciados ainda que anatomo-histologicamente unidos. Desta forma, as células do músculo liso cervical podem desempenhar um papel ativo na remodelação cervical durante a gravidez e o parto, o que explicaria a ocorrência de regulação diferencial dos genes EP1 e EP3 neste tecido em comparação com o miométrio nos partos espontâneos, onde estes genes se encontraram superexpressos.

Outro estudo em ratos sugeriu que as prostaglandinas não controlam todos os aspectos da parturição (TIMMONS et al., 2014). Este estudo forneceu evidências para dois caminhos distintos para o amadurecimento cervical: um dependente de PGs derivadas de fontes parácrinas ou endócrinas, e outro independente de ações de PGs. Portanto, estudos complementares e independentes deveriam ser realizados para confirmar se a expressão diferencial de genes EP nos tecidos cervicais e miométriais representa uma resposta fisiológica universal relacionada ao parto em humanos.

Aqui também foi evidenciada a associação entre a expressão dos genes EPs e responsividade à Dinoprostona. As PGs são particularmente úteis quando a indução do parto exige amadurecimento cervical, nos casos de colo uterino desfavorável (HAWKINS e WING, 2012). No entanto, nem todas as mulheres responderam à indução do parto com PGE<sub>2</sub>, ocorrendo falha de indução em até 33% dos casos (TENORE, 2003). Esta falta de responsividade pode indicar algum nível de efeito farmacogenético, que pode envolver os genes EPs. Essa hipótese, que subsidiou o presente estudo, atribui, pelo menos em parte, a expressão diferencial dos genes EPs no colo e no miométrio à capacidade de resposta à Dinoprostona.

Tal hipótese é corroborada pelos resultados aqui descritos, que sugerem que a Dinoprostona atua em nível transcricional, afetando principalmente os genes EP1 e EP3. No caso, o mRNA do EP3 foi *downregulated* no tecido cervical da maioria dos pacientes, independentemente dos grupos de caso-controle. Porém, no miométrio de mulheres tratadas com Dinoprostona, foi observado um aumento da expressão do mRNA do EP3 em

comparação com a amostra de tecidos obtidas do grupo de parto espontâneo (tabela 3 do artigo 1). Uma vez que a regulação positiva do EP3 ocorreu em ambos os grupos, responsivos e não responsivos à Dinoprostona, os resultados sugerem que o efeito sobre esse gene não é o principal fator causal que provoca o sucesso da indução do parto, apesar de os níveis de EP3 serem mais elevados no grupo responsivo à Dinoprostona.

Uma vez que a expressão de EP3 está associada com a contratilidade miometrial, o aumento da expressão de mRNA de EP3 no grupo não responsivo à Dinoprostona indica que a falha na indução do trabalho provavelmente resultou da regulação pós-transcricional de genes EP3 ou outros fatores bioquímicos não analisadas neste estudo *in vivo*.

Baseado nestes resultados, o segundo estudo desenvolvido buscou avaliar o comportamento de células miometriais à exposição *in vitro* ao Misoprostol. Antes de se discutir com mais profundidade os resultados obtidos, é importante comentar que, por questões de ordem técnica (descontinuação da comercialização da Dinoprostona durante o período do estudo), os fármacos utilizados nos dois experimentos diferiram (Dinoprostona e Misoprostol). No entanto, ambos têm efeitos clínicos semelhantes (ALFIREVIC et al., 2015a), ocupam os mesmos receptores e desencadeiam as mesmas respostas celulares (NARUMIYA et al., 1999; SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007). A Dinoprostona é a PG aprovada pelo FDA para indução do parto e o Misoprostol é a PG preconizado pelo Sistema Único de Saúde como fármaco indutor do parto (MORAES FILHO et al., 2005b). Portanto, ambos os fármacos são amplamente utilizados com os mesmos propósitos e com resultados semelhantes.

Portanto, no segundo estudo, desenvolvido *in vitro*, foi utilizado o Misoprostol para avaliar o efeito da PGE1 na modulação da expressão de genes dos receptores EPs e também no metabolismo oxidativo. Na avaliação *in vitro*, o efeito do Misoprostol na expressão miometrial dos genes EP foi confirmada, ainda que este efeito tenha sido diferenciado de acordo com a origem das células do miométrio, ou seja, de mulheres que tiveram parto espontâneo (SL) ou não-espontâneo (NSL) e a concentração do fármaco. Estes resultados indicam que as células miometriais tendem a ajustar o efeito da PG através de uma maior ou menor disponibilidade dos seus receptores. Esta sugestão foi indiretamente evidenciada a partir dos resultados aqui obtidos, e, portanto, precisa ser confirmada com estudos complementares. Tais estudos poderiam incluir a análise da expressão de proteínas, que não foi possível de ser conduzida no protocolo realizado por conta da quantidade limitada de tecido biopsiado.

Os resultados também sugerem que mulheres com parto espontâneo têm uma maior capacidade de resposta ao Misoprostol, uma vez que uma *upregulation* dos genes relacionados com a contração muscular (EP1 e EP3) foi observada neste grupo. Além disto, ocorreu *downregulation*, ou mesmo apenas um pequeno aumento na expressão dos genes EP2 e EP4, que estão relacionados com o relaxamento muscular (Sugimoto and Narumiya, 2007). Ao contrário, as células miometriais obtidas de mulheres com NSL tiveram baixa resposta à exposição ao Misoprostol, ou mesmo um efeito supressor sobre a expressão desses genes.

No presente estudo, também foi avaliado se o tratamento com Misoprostol poderia ter alguma influência sobre o metabolismo oxidativo das células miometriais. Esta análise adicional foi baseada na hipótese de que os níveis de oxigênio são consideravelmente variáveis durante o trabalho de parto, devido à hipóxia e reoxigenação da unidade útero-placentária durante as contrações uterinas (KHAN et al., 2010). Se este aspecto fisiológico não fosse altamente controlado, alterações nas concentrações de oxigênio poderiam comprometer o progresso do trabalho de parto. Estudos prévios descreveram modulação diferenciada de moléculas oxidantes e antioxidantes, incluindo aumento da lipoperoxidação, demonstrada pela quantificação de TBARS na artéria umbilical (YAACOBI et al., 1999). VAKILIAN et al. (2009) observaram que as mães após o PV apresentaram um maior estresse oxidativo, com níveis mais altos de TBARS, quando comparado com as mães nas quais foi realizada cesariana eletiva, ou seja, sem trabalho de parto (VAKILIAN et al., 2009). Outro estudo realizado através de investigação *in vitro*, também descreveu níveis mais elevados de peroxidação lipídica e, além disso, maior carbonilação de proteínas em amostras de miométrio obtidas durante o parto a termo ou pré-termo, quando comparado com amostras obtidas em mulheres não grávidas (KHAN et al., 2010).

No estudo realizado não foram observadas diferenças entre os marcadores de oxidação basal em células de miométrio obtidas de mulheres com parto espontâneo e não espontâneo. No entanto, o fato de não haver diferenças pode ser um efeito das condições *in vitro*, uma vez que essas variáveis não foram analisadas no momento da coleta das amostras teciduais. A opção por não se realizar as análises em diferentes tempos também está subsidiada pela limitação na quantidade de tecido para se realizar os testes.

Apesar desta limitação, os resultados mostraram que quando as células foram expostas ao Misoprostol *in vitro*, ocorreu diminuição dos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Entretanto, a diminuição na lipoperoxidação ocorreu somente em células de parto espontâneo expostas a concentrações baixas de Misoprostol (0,1 uM). Com doses maiores de Misoprostol, os níveis de lipoperoxidação não se alteraram nas mesmas células. Por outro

lado, a exposição de células de partos não espontâneos a todas as concentrações de Misoprostol aumentou, de forma moderada, os níveis de lipoperoxidação medidos pela quantificação do TBARS. Os níveis mais altos de lipoperoxidação em células de partos não espontâneos expostas ao Misoprostol pode ser considerado um efeito antioxidante deste fármaco. Essa inferência é corroborada pelos resultados da investigação realizada por KHAN et al (2010), que descreveram níveis mais elevados da lipoperoxidação no trabalho de parto a termo ou pré-termo. No entanto, este efeito parece ser dependente da fisiologia da célula, uma vez que em células de partos espontâneos o Misoprostol não apresentou efeito semelhante ao encontrado em células de partos não espontâneos.

Níveis de carbonilação proteica também foram influenciados pela exposição ao Misoprostol, ocorrendo uma diminuição importante na concentração deste marcador oxidativo em ambas as células, de partos espontâneos e não espontâneos. O efeito do Misoprostol sobre o metabolismo oxidativo foi previamente investigado em outras condições experimentais que não a indução do parto. Um estudo realizado por Ozer et al (2011) em ratos mostrou que o Misoprostol foi capaz de proteger de dano renal induzido por exposição à cisplatina, um fármaco anticâncer potente (Ozer et al., 2011). CHOI et al (2008) mostraram o efeito protetor do Misoprostol contra a neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridina, que induz processo de morte celular mediada por mitocôndrias e o stress oxidativo em células PC12, uma linha comercial de células suprarrenais (CHOI et al., 2008). Salam et al (2009) também descreveram que o tratamento com Misoprostol apresentou efeitos hepatoprotetores em ratos expostos ao silimarina, uma molécula hepatotóxica. Os autores postularam efeitos antioxidantes do Misoprostol, que confere propriedades hepatoprotetoras. O Misoprostol também diminuiu a apoptose de enterócitos em um modelo experimental de células intestinais que foram lesadas por indução de isquemia-reperfusão, envolvendo modulação diferencial do metabolismo oxidativo (TOPCU et al., 2007).

Com base no segundo artigo, o estudo indica, portanto: efeito genômico do Misoprostol em células miometriais, uma vez que o mesmo regula transcricionalmente a expressão dos genes EPs; potencial efeito farmacogenético, uma vez que a regulação da expressão dos genes EPs não foi similar entre as mulheres com e sem parto espontâneo; efeito antioxidante, já que diminuiu os níveis de carbonilação de proteínas, embora seu efeito na lipoperoxidação não tenha sido universal.

Além destas considerações, é importante também comentar as principais limitações metodológicas associadas aos estudos que foram aqui conduzidos: (a) número relativamente reduzido de amostras teciduais obtidas por biópsia. Em termos estatísticos, o aumento da

amostra é desejável. No entanto, em termos logísticos e éticos, é difícil incluir um elevado número de amostras tecidas, por se tratar de material biológico obtido de gestantes; (b) a curva de concentração do Misoprostol foi limitada a três doses. Em termos farmacológicos, uma curva de concentração apropriada é aquela que possui cinco doses mais o controle. Entretanto, novamente a limitação no volume da amostra tecidual fez com que o estudo pudesse ser conduzido apenas com a exposição das células a três concentrações do Misoprostol, mais a amostra controle. É importante lembrar que as análises foram replicadas e utilizadas tanto para avaliar a expressão dos genes EPs quanto para a análise dos parâmetros do metabolismo oxidativo; (c) o uso *in vivo* do Misoprostol nas pacientes de parto não espontâneo que tiveram seus partos induzidos poderia ter causado alguma influência deste fármaco na posterior análise *in vitro* da expressão gênica. Apesar desta hipótese não poder ser de todo descartada, acredita-se que tal influência foi mínima ou mesmo nula. Isto porque, a análise farmacocinética do Misoprostol mostrou que, após a administração do Misoprostol via vaginal, o nível máximo do fármaco que é encontrado no plasma materno ocorre após 70-80 minutos do seu uso e o mesmo ainda pode ser detectado até seis horas após a administração (BYGDEMAN, 2003; ZIEMAN et al., 1997). Porém, nesse estudo todas as amostras de tecido do miométrio foram obtidas e tratadas, pelo menos, 10 horas após a administração da última dose de Misoprostol. Além disto, o efeito do Misoprostol sobre a regulação da expressão dos genes foi analisado em cultura de células miometriais após 24 horas da exposição ao fármaco. Desta forma, parece improvável que o efeito *in vivo* da medicação ainda pudesse ter alguma influência na regulação gênica e no metabolismo oxidativo avaliados *in vitro*.

De qualquer modo, acredita-se que as limitações supracitadas não diminuem a relevância dos resultados obtidos, mas sim indicam a necessidade de investigações adicionais. Nestes termos, o presente estudo destaca a relevância da modulação dos genes EPs no sucesso do parto, a partir de um efeito regulatório antagônico no tecido miometrial e cervical e o efeito genômico do Misoprostol na modulação destes receptores, além da potencial ação antioxidante deste fármaco em células miometriais.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados acima descritos e discutidos permitem concluir que:

- Ocorreu modulação diferencial dos genes dos receptores da PGs (EP1, EP2, EP3 e EP4) em amostras de miométrio e de colo uterino obtidas de gestantes a termo em partos induzidos com Dinopostona ou Misoprostol;
- Existiu regulação concomitante e antagonista da expressão do mRNA de EP1 e EP3 nos tecidos do colo do útero e do miométrio em gestantes a termo com trabalho de parto espontâneo;
- O Misoprostol não apresentou efeito citotóxico *in vitro* nas células miometriais;
- O Misoprostol apresentou efeito sobre a expressão miometrial dos genes EPs na avaliação *in vitro*;
- A análise da modulação da expressão dos genes dos receptores da PGE indicou que as células miometriais tendem a ajustar o efeito da prostaglandina através de uma maior ou menor disponibilidade dos seus receptores;
- O Misoprostol regulou a expressão dos genes dos receptores da PGE<sub>2</sub> de forma diferencial. Esta regulação foi fortemente influenciada pela origem das células (miométrio de partos espontâneos ou não espontâneos) e também pela concentração do fármaco;
- As células miometriais oriundas de mulheres com parto espontâneo apresentaram maior capacidade de resposta genômica ao Misoprostol, uma vez que uma *upregulation* dos genes relacionados com a contração muscular (EP1 e EP3) foi observada;
- O Misoprostol foi capaz de modular diferencialmente dois importantes marcadores do metabolismo oxidativo (lipoperoxidação e carbonilação de proteínas), indicando ação antioxidante. Porém, este efeito foi dependente da origem das células (se obtida de partos espontâneos ou não espontâneos) e da concentração do fármaco;
- Os resultados obtidos sugerem que existe regulação gênica diferencial dos receptores da PGE<sub>2</sub> no miométrio e no colo uterino e que os EPs possuem um papel relevante no sucesso do parto espontâneo e na resposta farmacológica a indução do parto com prostaglandinas.



## 6. REFERÊNCIAS

ADACHI, S.; OKU, M. The regulation of oxytocin receptor expression in human myometrial monolayer culture. **J Smooth Muscle Res**, v. 31, n. 4, p. 175-187, 1995.

AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Hum Reprod Update**, v.16, n. 6, p. 725-744, 2010.

ALFIREVIC, Z. et al. Labour induction with prostaglandins: a systematic review and network meta-analysis. **BMJ**, v. 350, p. h217, 2015a.

ALFIREVIC, A. et al. Misoprostol-induced fever and genetic polymorphisms in drug transporters SLCO1B1 and ABCC4 in women of Latin American and European ancestry. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 9, p. 919-928, 2015b.

ALFIREVIC, Z.; KELLY, A. J.; DOWSWELL, T. Intravenous oxytocin alone for cervical ripening and induction of labour. **Cochrane Database Syst Rev**, (4): CD003246, 2009.

ALLPORT, V. C. et al. Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 6, p. 581-586, 2001.

ARIAS, F. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins. **Clin Obstet Gynecol**. v. 43, n. 3, p. 455-468, 2000.

ARONSSON, A. et al. Pharmacokinetic profiles up to 12 h after administration of vaginal, sublingual and slow-release oral Misoprostol. **Hum Reprod**, v. 22, n. 7, p. 1912-1918, 2007.

ARULKUMARAN, S. et al. The roles of prostaglandin EP 1 and 3 receptors in the control of human myometrial contractility. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 2, p. 489-498, 2012.

ASTLE, S. et al. Expression and regulation of prostaglandin E synthase isoforms in human myometrium with labour. **Mol Hum Reprod**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 2006.

ASTLE, S.; THORNTON, S.; SLATER, D. M. Identification and localization of prostaglandin E2 receptors in upper and lower segment human myometrium during pregnancy. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 4, p. 279-287, 2005.

BARBISAN, F. et al. Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e107299, 2014.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8/9, p. 1109-1115, 2004.

BISHOP, E. H. Pelvic Scoring for Elective Induction. **Obstet Gynecol**, v. 24, p. 266-268, 1964.

BRIDGES, T. M.; LINDSLEY, C. W. G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. **ACS Chem Biol**, v.3, n. 9, p. 530-541, 2008.

BRODT-EPPLEY, J.; MYATT, L. Changes in expression of contractile FP and relaxatory EP2 receptors in pregnant rat myometrium during late gestation, at labor, and postpartum. **Biol Reprod**, v. 59, n. 4, p. 878-883, 1998.

BRODT-EPPLEY, J.; MYATT, L. Prostaglandin receptors in lower segment myometrium during gestation and labor. **Obstet Gynecol**, v. 93, n. 1, p. 89-93, 1999.

BROWN, A. G.; LEITE, R. S.; STRAUSS, J. F. Mechanisms underlying "functional" progesterone withdrawal at parturition. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1034, p. 36-49, 2004.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: Artmed, p. 942-946, 2012.

BUHIMSCHI, I. A. et al. Beneficial impact of term labor: Nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 189, n. 1, p. 181-188, 2003.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.25, n. 3, p. 287-299, 2011.

BUSER, D.; MORA, G.; ARIAS, F. A randomized comparison between Misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and labor induction in patients with unfavorable cervixes. **Obstet Gynecol**, v. 89, n. 4, p. 581-585, 1997.

BYGDEMAN, M. Pharmacokinetics of prostaglandins. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 5, p. 707-716, 2003.

CHALLIS, J. et al. Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. **Endocr Res**, v. 26, n. 4, p. 489-504, 2000a.

CHALLIS, J. R. G. et al. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. **Endocr Rev**, v. 1, n. 5, p. 514-550, 2000b.

CHIEN, E. K. et al. Expression of matrix metalloproteinase-3 in the rat cervix during pregnancy and in response to prostaglandin E2. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, n. 1, p. 309-317, 2005.

CHOI, E. J., HAN, J. H.; LEE, C. S. Prostaglandin analogue Misoprostol attenuates neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death in differentiated PC12 cells. **Brain Res Bull**, v. 77, n. 5, p. 293-300, 2008.

CHOI, W. S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cell Immunol**, v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012.

CHOW, L; LYE, S. J. Expression of the gap junction protein connexin-43 is increased in the human myometrium toward term and with the onset of labor. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, n. 3, p. 788-795, 1994.

CHWALISZ, K. The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. **Hum Reprod**, v. 9, n. 1, p. 131-161, 1994.

CINDROVA-DAVIES, T. et al. Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1511-1520, 2007a.

CINDROVA-DAVIES, T. et al. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. **Am J Pathol**, v. 171, n. 4, p. 1168-1179, 2007b.

CINDROVA-DAVIES, T. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. **Placenta**, v. 30, suppl. A, p. S55-65, 2009.

- CONNELLY, O. M.; LYDON, J. P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. **Steroids**, v. 65, n. 10-11, p. 571-577, 2000.
- CSAPO, A. Progesterone block. **Am J Anat**, v. 98, n. 2, p. 273-291, 1956.
- DESPOPOULOS, A.; SILBERNAGL, S. Hormones and Reproduction. **Color Atlas of Physiology**. A. Despopoulos and S. Silbernagl. Stuttgart -New York, p. 266-309, 2003.
- DI, W.L. et al. Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n.7, p. 671-679, 2001.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- EDWARDS, A.S.; SCOTT, J.D. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 217-221, 2000.
- ELLIS, E.M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutical intervention. **Pharmacol Ther**, v. 115, n. 1, p. 13-24, 2007.
- FACCHINETTI, F.; FONTANESI, F.; DEL GIOVANE, C. Pre-induction of labour: comparing dinoprostone vaginal insert to repeated prostaglandin administration: a systematic review and meta-analysis. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. 10, p. 1965-1969, 2012.
- FAINARU, O. et al. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. **BJOG**, v. 109, n. 8, p. 938-941, 2002.
- FANG, X.; WONG, S.; MITCHELL, B.F. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2763-2768, 1997.
- FERLAND, D.J.; DARIOS, E.S.; WATTS, S.W. The persistence of active smooth muscle in the female rat cervix through pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 244, p. e241-248, 2015.
- FOGEL, I. et al. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n. 1, p. 241-246, 2005.
- FOLKERTS, G. et al. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n 1-3, p. 251-262, 2001.

FORTIER, M.A. et al. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 65-89, 2008.

GIANGRANDE, P.H., MCDONNELL, D.P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. **Recent Prog Horm Res**, v. 54, p. 291-313, 1999.

GIANGRANDE, P.H. et al. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 9, 3102-3115, 2000.

GRANSTRÖM, L. et al. Changes in the connective tissue of corpus and cervix uteri during ripening and labour in term pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 96, n. 10, p. 1198-1202, 1989.

GRIGSBY, P.L. et al. Localization and expression of prostaglandin E2 receptors in human placenta and corresponding fetal membranes with labor. **Am J Obstet Gynecol**, v. 195, n. 260-269, 2006a.

GRIGSBY, P.L. et al. Regional expression of prostaglandin E2 and F2alpha receptors in human myometrium, amnion, and choriodecidua with advancing gestation and labor. **Biol Reprod**, v. 75, n. 2, p. 297-305, 2006b.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Contração e excitação do músculo liso. Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 1. Ed., Philadelphia : Elsevier Saunders, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, 2007.

HAWKINS, J.S.; WING, D.A. Current pharmacotherapy options for labor induction. **Expert Opin Pharmacother**, v. 13, n. 14, p. 2005-2014, 2012.

HAYASHI, R.H. Spontaneous and induced cervical ripening. Natural dilation and effacement process and current cervical ripening techniques. **J Reprod Med**, v. 38, suppl. 1, p. 66-72, 1993.

HERTELENDY, F.; ZAKAR, T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 20, p. 2499-2517, 2004.

HOFMEYR, G.J.; GULMEZOGLU, A.M. Vaginal misoprostol for cervical ripening and induction of labour. **Cochrane Database Syst Rev**, CD000941, 2003.

HOFMEYR, G.J.; GULMEZOGLU, A.M.; PILEGGI, C. Vaginal misoprostol for cervical ripening and induction of labour. **Cochrane Database Syst Rev**, CD000941, 2010.

HOOL, L.C.; CORRY, B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 4, p. 409-435, 2007.

HUSSLEIN, P.; EGARTER, C. [Control of labor onset in the human]. **Z Geburtshilfe Perinatol**, v. 198, n. 5/6, p. 163-169, 1994.

JI, H. et al. Prostaglandin E2-regulated cervical ripening: analysis of proteoglycan expression in the rat cervix. **Am J Obstet Gynecol**, v.198, n. 536, p. e531-537, 2008.

KANDOLA, M.K. et al. EP2 receptor activates dual G protein signaling pathways that mediate contrasting proinflammatory and relaxatory responses in term pregnant human myometrium. **Endocrinology**, v. 155, n. 2, p. 605-617, 2014.

KARTERIS, E. et al. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 7, p. 1519-1534, 2006.

KELLY, A.J.; KAVANAGH, J.; THOMAS, J. Vaginal prostaglandin (PGE2 and PGF2a) for induction of labour at term. **Cochrane Database Syst Rev**, CD003101, 2003.

KHAN, R.N.; MATHAROO-BALL, B.; SHAW, R.W. Antioxidant enzyme expression, lipid peroxidation, and protein oxidation in human myometrium with parturition. **Reproductive sciences**, v. 17, n. 1, p. 78-84, 2010.

KONOPKA, C.K. et al. Maternal serum progesterone, estradiol and estriol levels in successful dinoprostone-induced labor. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 1, p. 91-97, 2013.

KOTANI, M. et al. Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing:

multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 5, p. 869-879, 1995.

KOWALTOWSKI, A.J.; Mitochondrial permeability transition and oxidative stress  
CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS letters**, v. 495, p. 12-15, 2001.

LARSEN, B.; HWANG, J. Progesterone interactions with the cervix: translational implications for term and preterm birth. **Infect Dis Obstet Gynecol**, 2011:353297, 2011.

LEONHARDT, A. et al. Expression of prostanoid receptors in human lower segment pregnant myometrium. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 69, n. 5, p. 307-313, 2003.

LEPPERT, P.C. Anatomy and physiology of cervical ripening. **Clin Obstet Gynecol**, v. 38, n. 2, p. 267-279, 1995.

LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reprod Toxicol**, v. 13, n. 5, p. 347-352, 1999.

LOPEZ BERNAL, A. Mechanisms of labour--biochemical aspects. **BJOG**, v. 110, n. 20, p. 39-45, 2003.

LUDMIR, J.; SEHDEV, H.M. Anatomy and physiology of the uterine cervix. **Clin Obstet Gynecol**, v. 43, n. 3, p. 433-439, 2000.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clin Chim Acta**, v. 380, n. 1/2, p 50-58, 2007.

MAHMOUD, H. et al. System-level biomechanical approach for the evaluation of term and preterm pregnancy maintenance. **J Biomech Eng**, v. 135, n. 2, p. 0210091–02100911, 2013.

MATSUMOTO, T. et al. The prostaglandin E2 and F2 alpha receptor genes are expressed in human myometrium and are down-regulated during pregnancy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 238, n. 3, p. 838-841, 1997.

MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **Scientific World Journal**, v. 7, p. 1329-1347, 2007.

MENDELSON, C.R. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. **Mol Endocrinol**, v. 23, n. 7, p. 947-954, 2009.

MESIANO, S.; WANG, Y.; NORWITZ, E.R. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? **Reprod Sci**, v. 18, n. 1, p. 6-19, 2011.

MOCATTA, T.J. et al. The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. **Free Radic Res**, v. 38, n. 2, 185-191, 2004.

MORAES FILHO, O.B. et al. Misoprostol sublingual versus vaginal para indução do parto a termo. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 1, p. 24-31, 2005a.

MORAES FILHO, O.B.; CECATTI, J.G.; FEITOSA, F.E.L. Métodos para indução do parto. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 8, p. 493-500, 2005b.

MORRIS, J.M. et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and preeclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 105, n. 11, p. 1195–1199 1998.

MUELLER, A. et al. Placental defence is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy. **Med Hypotheses**, v. 64, n. 3, p. 553-557, 2005.

MURTAS, D. et al. Nuclear 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as survival biomarker in patients with cutaneous melanoma. **Oncol Rep**, v. 23, n. 2, p. 329-335, 2010.

MUTLU-TÜRKOGLU, U. et al. Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. **Gynecol Obstet Invest**, v. 46, n. 1, 37-40, 1998.

MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 369–382, 2004.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1193-1226, 1999.

NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; NORMAN, D.P. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 1, p. 27-41, 2004.

NORSTROM, A. et al. Inhibitory action of relaxin on human cervical smooth muscle. **The J Clin Endocrinol Metab**, v. 59, n. 3, p. 379-382, 1984.



OSMAN, I. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. **Mol Hum Reprod**, v. 9, n. 1, p. 41-45, 2003.

OZER, M.K. et al. Effects of misoprostol on cisplatin-induced renal damage in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 7, p. 1556-1559, 2011.

PARMAR, M.; AHERWAR, R.; JAHAN, I. Comparative study of 25 µg vaginal misoprostol v/s cerviprime gel for induction of labour at term. **Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol**, v. 3, p. 887-892, 2014.

PATEL, F.A.; FUNDER, J.W.; CHALLIS, J.R. Mechanism of cortisol/progesterone antagonism in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and messenger ribonucleic acid levels in human chorion and placental trophoblast cells at term. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 6, p. 2922-2933, 2003.

PATIL, S.B.; KODLIWADMATH, M.V.; KODLIWADMATH, S.M. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. **Indian J Clin Biochem**, v. 22, n. 1, p. 135-137, 2007.

PROTOCOLO MISOPROSTOL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas.** Área Técnica de Saúde da Mulher. 2012.

PRUCKA, S.K. et al. An update to returning genetic research results to individuals: perspectives of the industry pharmacogenomics working group. **Bioethics**, v. 29, n. 2, p. 82-90, 2015.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 10, p. 502-508, 2000.

RANG, H.P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 28-42, 2008.

RATH, W. et al. Changes in collagen content of the first trimester cervix uteri after treatment with prostaglandin F2 alpha gel. **Arch Gynecol**, v. 231, n. 107-110, 1982.

RAYBURN, W.F. et al. An intravaginal controlled-release prostaglandin E2 pessary for cervical ripening and initiation of labor at term. **Obstet Gynecol**, v. 79, n. 3, p. 374-379, 1992.

ROOS, N. et al. The expression of prostaglandin receptors EP3 and EP4 in human cervix in post-term pregnancy differs between failed and successful labor induction. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 93, n. 2, p. 159-67, 2014.

ROUSE, D.J.; OWEN, J.; HAUTH, J.C. Criteria for failed labor induction: prospective evaluation of a standardized protocol. **Obstet Gynecol**, v. 96, n. 5 Pt 1, p. 671-677, 2000.

SALAM, O.M. et al. Hepatoprotective effects of misoprostol and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 23, n. 2, p. 179-188, 2009.

SANBORN, B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. **Semin Cell Dev Biol**, v. 18, n. 3, p. 305-314, 2007.

SCHMITZ, T. et al. Interleukin-1beta induces glycosaminoglycan synthesis via the prostaglandin E2 pathway in cultured human cervical fibroblasts. **Mol Hum Reprod**, v. 9, n.1, p. 1-8, 2003.

SCISCIONE, A.C. et al. A randomized comparison of transcervical Foley catheter to intravaginal misoprostol for preinduction cervical ripening. **Obstet Gynecol**, v. 97, n. 4, p. 603-607, 2001.

SENNSTRÖM, M.B. et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 4, p. 375-381, 2000.

SIEGEL, G.J. et al. **Basic Neurochemistry Molecular Cellular and Medical Aspects**, 7. ed., Burlington, Massachusetts: Elsevier, 2006.

SMITH, R. Parturition. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 271-283, 2007.

SMITH, R. et al. Patterns of plasma corticotropin-releasing hormone, progesterone, estradiol, and estriol change and the onset of human labor. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 6, p. 2066-2074, 2009.

SOUZA, A et al.. Farmacocinética e farmacodinâmica do misoprostol em Obstetrícia. **Femina**, v. 37, n. 12, p. 679-684, 2009.

SPEROFF, L.F.; FRITZ, M.A. The Endocrinology of Pregnancy, in: SPEROFF, L.F., M.A (Ed.), **Clinical Gynecologic Endocrinology & Infertility**, 7. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 259-315, 2005.

STJERNHOLM-VLADIC, Y. et al. Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 74, 2004.

STYGAR, D. et al. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. **Biol Reprod**, v. 67, n. 3, p. 889-894, 2002.

SUGIMOTO, Y.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S. Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. **Journal of biochemistry**, v. 157, n. 2, 73-80, 2015.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J Biol Chem**, v. 282, p. 11613-11617, 2007.

TAN, H. et al. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 5, p. E719-730, 2012.

TANG, O.S. et al. Pharmacokinetics of different routes of administration of misoprostol. **Human reproduction**, v. 17, n. 2, p. 332-336, 2002.

TANG, O.S.; Gemzell-Danielsson, K.; Ho, P.C. Misoprostol: pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. **Int J Gynaecol Obstetrics**, v. 99, suppl. 2, p. S160-167, 2007.

TANG, O.S. et al. Pharmacokinetics of repeated doses of misoprostol. **Human reproduction**, v. 24, n. 8, p. 1862-1869, 2009.

TANG, J et al. WHO recommendations for misoprostol use for obstetric and gynecologic indications. **Int J Gynaecol Obstetrics**, v. 121, n. 2, p.186-189, 2013.

TENORE, J.L. Methods for cervical ripening and induction of labor. **Am Fam Physician**, v. 67, n. 10, p. 2123-2128, 2003.

THOMAS, P.; PANG, Y. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 2, 162-171, 2012.

TIMMONS, B.; AKINS, M.; MAHENDROO, M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 6, p. 353-361, 2010.

TIMMONS, B.C. et al. Prostaglandins are essential for cervical ripening in LPS-mediated preterm birth but not term or antiprogestin-driven preterm ripening. **Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 287-298, 2014.

TOPCU, I. et al. The effect of Misoprostol, a prostaglandin E1 analog, on apoptosis in ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. **Acta histochemical**, v. 109, n. 4, p. 322-329, 2007.

TUCKEY, R.C. Progesterone synthesis by the human placenta. **Placenta**, v. 26, n. 4, p. 273-281, 2005.

VÄISÄNEN-TOMMISKA, M. et al. Nitric oxide metabolites in cervical fluid during pregnancy: further evidence for the role of cervical nitric oxide in cervical ripening. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 3, p. 779-785, 2003

VAKILIAN, K., et al. On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 19, n. 94-99, 2009.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Bioch Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VRACHNIS, N. et al. Immune aspects and myometrial actions of progesterone and CRH in labor. **Clin Dev Immunol**, v. 2012:937618, 2012.

VROUENRAETS, F.P. et al. Bishop score and risk of cesarean delivery after induction of labor in nulliparous women. **Obstet Gynecol**, v. 105, n. 4, p. 690-697, 2005.

WEEKS, A.; FAUNDES, A. Misoprostol in obstetrics and gynecology. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 99, supl. 2, p. S156-159, 2007.

WHO Recommendations for Augmentation of Labour. **World Health Organization**, Geneva, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK258875/>. Acesso em 01.09.2015.

WORD, R.A. et al. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. **Semin Reprod Med**, v. 25, n. 1, p. 69-79, 2007.

YAACOBI, N.; OHEL, G.; HOCHMAN, A. Reactive oxygen species in the process of labor. **Arch Gynecol Obstet**, v. 263, n. 1/2, p. 23-24, 1999.

YOUNT, S.M.; LASSITER, N. The pharmacology of prostaglandins for induction of labor. **J Midwifery Womens Health**, v. 58, n. 2, p. 133-144, 2013.

YUAN, W.; LOPEZ BERNAL, A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 7, supl. 1, p. S10, 2007.

ZAKAR, T.; MESIANO, S. How does progesterone relax the uterus in pregnancy? **N Engl J Med**, v. 364, n. 10, p. 972-973, 2011.

ZHAO, K. et al. Progestin represses human connexin43 gene expression similarly in primary cultures of myometrial and uterine leiomyoma cells. **Biol Reprod**, v.54, n. 3, p. 607-615, 1996.

ZIEMAN, M. et al. Absorption kinetics of misoprostol with oral or vaginal administration. **Obstet Gynecol**, v. 90, n. 1, p. 88-92, 1997.

ZUGAIB, M. **Zugaib Obstetrícia**, 1ª edição ed. Barueri: Editora Manole Ltda., 2008.