



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUCIANA VASCONCELOS DE JESUS SOUZA

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO MATERNO E RESULTADOS
OBSTÉTRICOS DE GESTAÇÕES DE ALTO RISCO**

LUCIANA VASCONCELOS DE JESUS SOUZA

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO MATERNO E RESULTADOS
OBSTÉTRICOS DE GESTAÇÕES DE ALTO RISCO**

**LUCIANA VASCONCELOS DE JESUS
SOUZA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Glilciane Morceli

Co-orientação: Profa. Dra. Jossimara Poletini

618.2
S729c

Souza, Luciana Vasconcelos de Jesus
Citocinas inflamatórias no soro materno e resultados
obstétricos de gestações de alto risco \ Luciana Vasconcelos
de Jesus Souza. – Presidente Prudente, 2019.
44 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientadora: Glilciane Morceli

1. Gestação. 2. Complicações gestacionais. 3. Morbidade
materna. I. Título.

LUCIANA VASCONCELOS DE JESUS SOUZA

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO MATERNO E RESULTADOS
OBSTÉTRICOS DE GESTAÇÕES DE ALTO RISCO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 15 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Prof^a. Dr^a. Gilciane Morceli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Eliana Peresi Lordelo
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Jusciele Brogin Moreli
Universidade Federal de São Paulo - Unifesp
Ribeirão Preto - SP

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por ser essencial em minha vida.
Dedico também a minha família: meu esposo Jucelino, meus filhos Bruno e Maria
Eduarda, meu pai Benvindo, minha mãe Divanir e minha irmã Denise, que com
muito carinho e apoio incondicional não mediram esforços para que eu chegasse até
esta etapa de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas orientadoras, Dra. Gilciane Morceli e Dra. Jossimara Poletini por toda dedicação, paciência, compreensão, amizade, determinação, confiança e respeito em todo este tempo que caminhamos juntos. Seus comprometimentos, competências, postura ética e um perfil de pesquisadoras exemplar, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a aluna de Graduação Camila Cauana Melluzzi de Araujo, que colaborou com as pesquisas, levantamento de dados, com muita disponibilidade e atenção.

Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas do Mestrado em Ciências da Saúde da Unoeste, Hospital Regional de Presidente Prudente, Secretárias de Saúde dos municípios de Alvares Machado e Presidente Prudente e Laboratório de Imunologia da Relação Materno Fetal UNESP - Botucatu por todo o conhecimento compartilhado.

O sentimento de gratidão se estende a todos que direta e indiretamente participaram desta vitória.

Muito Obrigada!

*“Confie no Senhor de todo
o seu coração e não se
apoie em seu próprio
entendimento; reconheça
o Senhor em todos os
seus caminhos, e ele
endireitará as suas veredas”.*

- Provérbios 3:5-6

RESUMO

Citocinas inflamatórias no soro materno e resultados obstétricos de gestações de alto risco

INTRODUÇÃO: As gestações de Alto Risco são aquelas nas quais condições maternas prévias e ou adquiridas na gestação podem aumentar os riscos de adversidades gestacionais com consequentes morbidades maternas e perinatais, e o processo inflamatório parece influenciar tais desfechos, no entanto, marcadores específicos para prevenir as intercorrências gestacionais decorrentes não estão completamente descritos.

OBJETIVOS: Caracterizar as gestações de Alto Risco em relação a gestações sem intercorrências aos aspectos sociodemográficos e obstétricos e relacionar o desfecho gestacional com mediadores inflamatórios no soro materno. **MATERIAL E MÉTODOS:**

Foram incluídas 63 gestantes atendidas no Ambulatório de Alto Risco e 65 gestantes de Baixo Risco, atendidas em Estratégias de Saúde da Família, incluídas como grupo controle, pareadas à idade gestacional de cada amostra de Alto Risco. Os dados pessoais, sociodemográficos e obstétricos foram comparados. O sangue periférico materno foi coletado durante consulta obstétrica, e analisado quanto à presença de citocinas inflamatórias, interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- α pela técnica de ELISA. **RESULTADOS:** A mediana da idade materna foi estatisticamente superior nas gestantes de Alto Risco, assim como o número de mulheres declaradas não brancas (pardas e negras), com maior convívio com fumantes, com presença de doenças prévias, múltiparas e com abortos anteriores foi estatisticamente maior nesse grupo, a idade gestacional no parto das gestações de Alto Risco foi inferior em relação ao grupo de Baixo Risco, as variáveis tipo de parto, sexo, peso ao nascer e apgar do recém-nascido não diferiram entre os grupos, a concentração de todas as citocinas avaliadas foi estatisticamente inferior no grupo de gestantes de Alto Risco, em relação ao grupo Baixo Risco ($p < 0,05$). Na análise por faixa de idade gestacional, gestantes a termo não apresentaram diferença na concentração de citocinas independente do grupo estudado.

CONCLUSÃO: O estudo demonstrou características sociodemográficas e gestacionais importantes da população estudada, e não demonstrou aumento de citocinas nas gestações de Alto Risco, provavelmente devido à heterogeneidade dos desfechos que caracterizam esse grupo de estudo, e, a termo, as citocinas inflamatórias participam do processo gestacional independente do grupo estudado.

Palavras-chave: Gestação, complicações gestacionais, morbidade materna

ABSTRACT

Inflammatory cytokines in maternal serum and obstetrics outcomes in high-risk gestations

INTRODUCTION: High Risk pregnancies are those in which maternal conditions and / or acquired during pregnancy may increase the risks of gestational adversities with consequent maternal and perinatal morbidity, and inflammatory process seems to influence such outcomes, however, specific markers to prevent the resulting gestational complications are not fully described. **OBJECTIVES:** The objective of the present study was to characterize High Risk pregnancies in relation to uninterrupted pregnancies to the sociodemographic and gestational outcome with the presence of inflammatory mediators in maternal serum. **MATERIAL AND METHODS:** Were included 63 pregnant women in the High Risk Clinic and 65 low-risk pregnant women, attended at Family Health Strategies, included as a control group, gestational age matched of each High Risk sample. Personal, sociodemographic and obstetric data were compared. Maternal peripheral blood was collected during obstetric consultation, and analyzed for the presence of inflammatory cytokines, interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF) - α by the ELISA technique. **RESULTS:** The median maternal age was statistically higher in High Risk pregnant women, as well as the number of women declared non-white (brown and black), with higher socializing with smokers, with the presence of previous diseases, multiparous and with abortions was statistically higher in this group, the gestational age at childbirth of High Risk pregnancies was lower in relation to the Low Risk group, the type of birth, sex, birth weight and newborn apgar variables did not differ between groups the concentration of all cytokines evaluated was statistically lower in the High Risk pregnant group, in relation to the Low Risk group ($p < 0,05$). In a following analysis, considering the gestational period, term pregnancies did not show differences in cytokines concentration independently of studied group. **CONCLUSION:** This study has demonstrated important sociodemographic and gestational characteristics of the studied population, and has not shown increase of inflammatory cytokines in high-risk pregnancies, probably due to the heterogeneity of this study group, and, at term, inflammatory cytokines participate on gestational process independently of studied group.

Keywords: Gestation, gestational complications, maternal morbidity

LISTA DE SIGLAS

AR	- Alto Risco
BR	- Baixo Risco
DM	- Diabetes Mellitus
DMG	- Diabetes Mellitus Gestacional
ESF	- Estratégia de Saúde da Família
HRPP	- Hospital Regional Presidente Prudente
IL	- Interleucina
IL-1 β	- Interleucina 1beta
PE	- Pré - Eclâmpsia
RPM-PT	- Ruptura Prematura de Membranas Pré-termo
TPP	- Trabalho de Parto Pré-termo
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral – Alfa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Scatter plot* referente à concentração de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco). A mediana está representada pelo traço horizontal e as barras de erro superiores e inferiores correspondem aos valores mínimos e máximos, respectivamente (*Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$)..... 32
- Figura 2 - *Scatter plot* referente à concentração de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco (AR) e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde ou Baixo Risco (BR) de acordo com as faixas de idade gestacional (IG): ≤ 20 semanas, 21 – 30 semanas, 31 – 36 semanas e ≥ 37 semanas. A mediana está representada pelo traço horizontal e as barras de erro superiores e inferiores correspondem aos valores mínimos e máximos, respectivamente (*Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$)..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características sociodemográficas das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco) incluídas no estudo.....	29
Tabela 2 -	Características obstétricas e neonatais das gestantes e de seus recém-nascidos nos grupos de gestações de Alto Risco de Baixo Risco.....	30
Tabela 3 -	Coeficientes de variação intra-ensaio, limites de detecção mínimos e máximos, e concentração, em pg/mL, das citocinas avaliadas no soro materno no grupo de gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e no grupo atendido na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco).	31

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO - Citocinas inflamatórias no soro materno e resultados obstétricos de gestações de alto risco	13
INTRODUÇÃO	14
CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
RESULTADOS.....	19
COMENTÁRIOS	20
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXOS	34
ANEXO A – PROTOCOLO DE ATENDIMENTO PARA COLETA DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	35
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA - AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY	38

ARTIGO CIENTÍFICO

CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO MATERNO E RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE GESTAÇÕES DE ALTO RISCO

Luciana Vasconcelos de Jesus SOUZA¹, Ms.; Camila Cauana Melluzzi de ARAUJO¹, Gr.; Márcia Guimarães da SILVA², PhD.; Jossimara POLETTINI³, PhD.; Glilciane MORCELI¹, PhD.

1. Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil
2. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil
3. Universidade Federal da Fronteira Sul, UFFS, Passo Fundo, RS, Brasil

“Os autores declaram não haver conflito (s) de interesse (s)”

Autor correspondente:

Dr^a Glilciane Morceli

R. José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária, Pres. Prudente - SP, 19050-920

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (PRINT), ISSN: 0002-9378, Qualis A1 na área de Medicina II da Capes - Anexo.

INTRODUÇÃO

O período gestacional ocorre sem complicações na maioria dos casos, no entanto, existem situações consideradas gestações de Alto Risco, nas quais vida ou a saúde da mãe e/ou do feto e/ou do recém-nascido tem maiores chances de serem atingidas que as da média da população considerada^{1,2}. Dentre as condições clínicas características, destacam-se agravos como desvio quanto ao crescimento uterino, alteração do volume de líquido amniótico, desenvolvimento de diabetes gestacional, índice ponderal inadequado, hemorragias da gestação, insuficiência istmo-cervical, trabalho de parto prematuro, gravidez prolongada, amniorrexe prematura, pré-eclâmpsia e eclâmpsia, além de óbito fetal^{1,3}.

Tais contextos aumentam o risco de morbidade e mortalidade neonatal, bem como o aumento do tempo de hospitalização neonatal em unidade de terapia intensiva⁴. Epidemiologicamente, as gestações de Alto Risco são associadas a condições sociodemográficas desfavoráveis, baixa escolaridade, exposição e consumo de agentes tóxicos e teratogênicos, hábitos tabagista, etilismo, e também com idade materna menor que 15 e maior que 35 anos^{1,5}. Ainda, antecedentes obstétricos como aborto, cirurgia uterina, esterilidade, infertilidade, restrição de crescimento fetal, pré-eclâmpsia/eclâmpsia, prematuridade e síndromes hemorrágicas aumentam os riscos de complicações na gestação atual⁶.

Além de gestações múltiplas e de gestações com alteração no volume do líquido amniótico, o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) ou DM prévio à gestação (DM1 e DM2) são complicações frequentes, com importantes repercussões materno-fetais a curto e longo prazo, incluindo o aumento do número de cesáreas, maior número de episódios de hipoglicemia neonatal e maior ocorrência de macrossomia, além de síndrome do desconforto respiratório e/ou prematuridade, aumentando o risco de morte perinatal^{7,8}. As doenças hipertensivas representam aproximadamente 30% das gestações de Alto Risco⁹, sendo a pré-eclâmpsia o tipo mais comum, que afeta cerca de 2 a 8% das mulheres grávidas¹⁰. Pré-eclâmpsia (PE) é definida como início de hipertensão e proteinúria após 20 semanas de gestação em uma mulher previamente normotensa¹⁰. Entre os fatores de risco

associados estão idade materna avançada ¹¹, gestação múltipla, nuliparidade e obesidade ¹⁰.

Adicionalmente às condições expostas, o trabalho de parto pré-termo (TPP) é considerado um dos principais problemas da Clínica Obstétrica, acompanhado ou não de rotura prematura de membranas corioamnióticas pré-termo (RPM-PT) – rompimento da “bolsa das águas” antes do início do trabalho de parto. A RPM-PT é o antecedente direto de TPP em cerca de 40% a 50% de todas as gestações pré-termo, e ocorre mesmo na ausência de fatores de risco conhecidos ^{12,13}.

As condições clínicas que constituem as gestações de Alto Risco estão, em sua maioria, relacionados ao desbalanço do sistema imune, com resultante resposta inflamatória na interface materno-fetal e/ou sistêmica, e os mediadores envolvidos contribuem para disfunções placentárias e indução de contratilidade uterina ^{14,15}. Sabe-se que o perfil de mediadores imunes, especialmente as citocinas, apresenta-se de uma forma balanceada ao longo da gestação normal ¹⁶, sendo que no primeiro trimestre gestacional ocorre predomínio de resposta imune de perfil Th1, importante para permitir o correto reparo do endométrio, que sofre danos consequentes da implantação do feto, quanto para remoção de debris celulares. O Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , a Interleucina (IL)- 1 β e a IL-6 são algumas das citocinas fundamentais no início da gestação, atuando no fenômeno de implantação do blastocisto e, de maneira adversa, nas perdas de primeiro trimestre ^{17,18}. Com a evolução da gestação, elevadas concentrações de TNF- α foram relacionadas ao desenvolvimento de PE e DMG e, a redução de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, ao parto pré-termo ^{19,20}. Já o segundo trimestre é caracterizado pela resposta imune de perfil Th2 ^{18,21}, com aumento de citocinas com atividade anti-inflamatória, importantes para a manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o predomínio volta a ser de perfil Th1, tanto sistemicamente, quanto no tecido placentário e no líquido amniótico ^{17,22}, o que foi observado também por Bowen et al. ²³ e Erez et al. ¹⁵ ao descreverem níveis crescentes de mediadores inflamatórios secretados pelos tecidos gestacionais. Assim, os mediadores inflamatórios são considerados importantes indicadores

das adversidades gestacionais. Por exemplo, aumento de IL-1 β no soro materno no primeiro e segundo trimestre gestacionais foi associado à ocorrência de pré-eclâmpsia²⁴, enquanto níveis aumentados de IL-8 foram relacionados à severidade desta doença²⁵. Ainda, abortos recorrentes apresentam níveis séricos elevados de TNF- α ²⁶. Por outro lado, os dados ainda são conflitantes, e, nesse contexto, em revisões sistemáticas recentes, foi demonstrado que ainda não existe um único marcador ou uma combinação dos mesmos para prever o parto pré-termo²⁷⁻²⁹.

Apesar da descrição de fatores de risco associados, assim como de possíveis marcadores inflamatórios, ainda não existem métodos totalmente preditivos para prevenir as intercorrências gestacionais decorrentes. Uma das dificuldades em estabelecer tais parâmetros decorre da escassez de dados que caracterizem tais populações vulneráveis, especialmente em serviços de referência regional. Decisões clínicas implicam equilibrar os potenciais benefícios do prolongamento da gravidez em situações adversas, e, portanto, testes de diagnóstico de valor preditivo através da amniocentese seria ideal, porém este é um procedimento invasivo. Portanto, o entendimento da fisiopatologia envolvendo marcadores obtidos de forma não invasiva, como soro materno, é uma busca intensa na comunidade científica. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi comparar gestações de Alto Risco em relação a gestações com evolução sem intercorrências quanto aos aspectos sociodemográficos e obstétricos bem como relacionar o desfecho gestacional com a presença e níveis de mediadores inflamatórios no soro materno.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo de corte transversal e prospectivo, no qual foram incluídas gestantes atendidas no Ambulatório de Alto Risco do Hospital Regional (HR) de Presidente Prudente SP, referência para gestações de Alto Risco. O tamanho amostral foi constituído por gestantes atendidas no período de agosto de 2017 a julho de 2018 com idade igual ou maior que 18 anos. Como grupo controle, foram incluídas gestantes que não apresentaram fatores associados ao Alto Risco, atendidas em Estratégias de Saúde da

Família de Presidente Prudente e Álvares Machado-SP, pareadas à idade gestacional de cada amostra de Alto Risco, durante a primeira consulta da gestante no referido ambulatório em qualquer idade gestacional, a qual foi avaliada pela data da última menstruação e/ou o exame ultrassonográfico precoce (até 20 semanas).

Foram incluídas gestações caracterizadas como Alto Risco: desvio quanto ao crescimento uterino, e volume de líquido amniótico, diabetes mellitus, ganho ponderal inadequado, hemorragias da gestação, insuficiência istmo-cervical, trabalho de parto prematuro e gravidez prolongada, amniorrexe prematura, pré-eclâmpsia e eclâmpsia e aloimunização. Não foram selecionadas no estudo pacientes que apresentaram gemelaridade, malformação ou óbito fetais ao longo da gestação, ou soropositividade para hepatite, HIV ou sífilis, pois estas condições estão diretamente relacionadas com mudanças na resposta imune.

As variáveis de estudo e os desfechos gestacionais e neonatais foram coletados no momento da consulta obstétrica e a partir do levantamento de dados descritos nos prontuários médicos, respectivamente. Os dados pessoais, comportamentais, de antecedentes obstétricos, familiares e da gestação atual de interesse foram coletados seguindo protocolo estabelecido para o presente estudo. As gestantes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresse consentimento em formulário específico Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (CAAE: 72525317.4.0000.5515).

Amostras de sangue materno foram coletadas no momento da inclusão do estudo. Para isto foram seguidas as orientações protocolares das boas práticas clínicas na gestação, portanto a quantidade máxima de sangue colhido foi de 10mL. O sangue coletado foi transportado ao laboratório de Bioquímica da Unoeste e centrifugado por 15 minutos a 160g. O soro foi separado e armazenado a -80°C para posterior dosagens dos mediadores de interesse.

A determinação de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Para tais experimentos, placas de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc. Maryland, EUA) foram sensibilizadas por 14 horas a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo de captura: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , R&D Systems, DuoSet, (Minneapolis, MN, EUA) diluído em tampão PBS, pH 7,2. Após cada incubação, foram realizadas três lavagens da placa com solução de PBS pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). Após bloqueio dos sítios livres da placa, foram citocinas recombinantes humanas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , em concentrações indicadas pelo fabricante para obtenção da curva padrão. Para dosagem das amostras, foram distribuídos 100uL de soro das pacientes estudadas, em duplicata, com posterior incubação por três horas à temperatura ambiente. Após esse período e lavagem, foram adicionados 100uL de anticorpo de detecção: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α e as placas foram mantidas por duas horas à temperatura ambiente. Após incubação com estreptoavidina, foram adicionados 100uL de ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão apropriado (*SigmaFast OPD*, Sigma, Life Science, EUA) como substrato da peroxidase e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida por adição de 50uL de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA), em comprimento de onda de 492 nm. As concentrações das citocinas no soro foram calculadas sobre a curva padrão, obtida com diferentes concentrações das citocinas recombinantes humanas de interesse.

Os dados referentes às variáveis sociodemográficas e gestacionais foram submetidos ao teste de X^2 ou Exato de Fisher, ou ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos de estudo, após análise da normalidade dos dados pelo Kolmogorov – Smirnov test. A concentração das citocinas no soro foi analisada pelo teste de Mann-Whitney, seguido do teste de Dunn para comparação entre

os grupos. A análise estatística foi realizada utilizando-se software GraphPad Prism, versão 6.0 e o nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%.

RESULTADOS

No período considerado para o estudo, foram incluídas 63 mulheres com gestação de Alto Risco e 65 mulheres sem fatores associados ao Alto Risco, consideradas, portanto, como grupo controle. As variáveis sociodemográficas e gestacionais das gestantes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. A mediana da idade materna foi estatisticamente superior nas gestantes de Alto Risco, assim como o número de mulheres declaradas não brancas (pardas e negras), com maior convívio com fumantes e com presença de doenças prévias foi maior nesse grupo. Em análise posterior, observou-se OR de 4,125 (1,78-9,54) para o convívio com fumantes e gestações de Alto Risco. As variáveis estado civil, profissão remunerada ou não, hábito tabagista e etilista (até 7 doses semanais), prática de exercícios físicos e o contato com substâncias tóxicas durante a gestação, principalmente tintura de cabelo, não diferiram entre os grupos ($p>0,05$). Nenhuma gestante de ambos os grupos fazia uso de substâncias ilícitas durante a gestação.

Observou-se que 47,6% das gestantes do grupo Alto Risco apresentavam doença concomitante à gestação, dentre elas se destacam hipertensão arterial sistêmica (7 casos) e diabetes mellitus (6 casos), e alterações na tireóide, epilepsia, trombofilia e anemia (demais casos). Das 28 gestantes sem doença associada, 11 (39,3%) desenvolveram alguma doença gestacional, também com predomínio de hipertensão ($n=6$; 2,1%) e diabetes melitus ($n=4$; 14,3%).

Em relação às características obstétricas, observou-se que o grupo Alto Risco apresentou maior número de multíparas e, em relação à ocorrência de aborto anterior em mulheres não primíparas, observou-se que 24/59 (47,7%) tiveram aborto em gestações

anteriores, valores estatisticamente superiores às gestantes do grupo Baixo Risco, das quais 35 (53,9%) eram multíparas e dessas, 9 (25,7%) tiveram aborto anterior.

A idade gestacional no parto das gestações de Alto Risco foi inferior em relação ao grupo de Baixo Risco, ($p=0,001$). As variáveis tipo de parto, sexo, peso ao nascer e apgar do recém-nascido não diferiram entre os grupos (Tabela 2). Destaca-se que 2 recém-nascidos do grupo Baixo Risco foram Grande para Idade Gestacional (GIG) e 4 necessitaram de internação neonatal em Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Em relação à concentração de citocinas no soro materno, o coeficiente de variação intra-ensaio, os limites de detecção mínimos e máximos, em pg/mL, estão representadas na Tabela 3. Os casos abaixo de tal limite foram considerados como dosagem igual a zero.

Considerando todas as amostras, a concentração de todas as citocinas avaliadas foi estatisticamente inferior no grupo de gestantes de Alto Risco, em relação ao grupo Baixo Risco (Tabela 3 e Figura 1). Na Tabela 3 apresenta-se ainda a diferença de valores da mediana que dimensiona o comportamento biológico das Gestações de Alto Risco em relação às Gestações de Baixo Risco.

Uma análise posterior considerou faixas de idades gestacionais pareadas entre os grupos de estudo para avaliar se os momentos da gestação interferem na dosagem das citocinas estudadas. Para gestantes com ≤ 20 semanas de gestação e de 31-36 semanas de gestação a dosagem de todas as citocinas avaliadas foi estatisticamente superior no grupo Baixo Risco, ao passo que no período de 21-30 semanas, apenas IL-1 β e IL-8 mantiveram a diferença estatística entre os grupos. Acima de 37 semanas, não houve diferença na dosagem de nenhuma citocina avaliada (Figura 2).

COMENTÁRIOS

O sistema imunológico desempenha um papel fundamental no desenvolvimento durante a gravidez e primeiros anos de vida, e alterações nos mediadores na circulação maternos e neonatais têm sido associadas com complicações da gravidez, bem como a

susceptibilidade à doenças auto-imune e prejuízo no desenvolvimento neurológico. Dessa forma, a relação das características maternas e níveis de citocinas tornam-se importantes para o entendimento da fisiopatologia das gestações consideradas de Alto Risco. O presente estudo avaliou o perfil sociodemográfico e obstétrico de tais gestações, e demonstrou que as gestantes desse grupo apresentam maior idade materna, maior número de mulheres não brancas e, como esperado, presença de doença na gestação em comparação a gestações de baixo risco. Além disso, a análise de citocinas no soro materno demonstrou níveis mais baixos desses mediadores nessas gestantes de Alto Risco.

Com relação à idade materna, observou-se que esta foi superior nas gestantes de Alto Risco, e o envelhecimento já tem sido relacionado a maiores riscos de desenvolvimento de condições patológicas na gestação incluindo hipertensão arterial e diabetes melitus, entre outras ^{30,31}. Em revisão sistemática recente, Leader et al. ³² demonstraram que mulheres em idade avançada apresentam risco aumentado de 3,3 vezes de desenvolver alguma complicação gestacional. Nesse estudo ainda, os autores ressaltam os desfechos neonatais desfavoráveis nesse grupo de mulheres, incluindo parto pré-termo, óbito fetal e baixo apgar de 5 minutos, o que indica condições clínicas desfavoráveis ao nascimento. Esses dados reforçam a necessidade de acompanhamento das gestantes em idade avançada, uma vez que gestações tardias são cada vez mais frequentes na sociedade atual

31

As disparidades raciais são uma constante no Brasil, e as mulheres gestantes de raça/cor preta e parda, quando comparadas às brancas, apresentam, de maneira geral, piores indicadores de atenção pré-natal e atenção ao parto³³. Em concordância, no presente estudo, maior número de gestantes de Alto Risco declararam-se não brancas. Além do atendimento ao parto ser mais precário, co-fatores como obesidade, deficiências nutricionais e polimorfismos genéticos aumentam o risco de adversidades como parto pré-termo em mulheres de etnia negra ^{34,35}. Essas observações sugerem que essa população, que representa parte expressiva da nossa população, deve ser acompanhada quanto aos fatores de risco associadas às adversidades gestacionais.

O hábito tabagista é sabidamente prejudicial ao organismo, e na gestação já foi associado ao risco de complicações como parto pré-termo³⁶. Tal variável não foi significativamente diferente entre nossos grupos de estudo, porém o contato com pessoas fumantes foi maior no grupo das gestantes de Alto Risco, com risco de 4,125 vezes aumentado nesse grupo. Os efeitos das substâncias contidas no cigarro incluem disfunções placentárias morfológicas e, conseqüentemente, de produção de mediadores³⁷. Dessa forma, este pode ser um fator relacionado aos desfechos desse grupo de estudo.

Fatores pregressos como complicações gestacionais anteriores influenciam os desfechos da gestação atual e, nesse contexto, o risco de ter novo abortamento é maior entre as mulheres que já sofreram um aborto anterior, e o risco aumenta se o número de abortos anteriores for maior que dois³⁸. No presente estudo, a paridade foi estatisticamente significativa em relação às múltiparas no grupo de Alto Risco, e, dessas, quase 50% das gestantes relataram terem sofrido abortamento em gestações anteriores, o que reforça a necessidade de investigar a incidência pregressa de casos de abortamento.

A idade gestacional no momento do parto foi inferior no grupo AR, que apresentou também maior número de casos pré-termo, o que corrobora os achados de Melo et al.³⁹ que descreveram 59,7% de pacientes com PE grave com idade gestacional menor que 37 semanas, sendo 27,3% com idade gestacional menor que 32 semanas. Os desfechos neonatais no presente estudo não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, porém observamos casos de recém-nascidos grandes para a idade gestacional no grupo AR. Contrariamente, Majella et al.⁴⁰ descreveram que o baixo peso ao nascer foi associado à gravidez de alto risco quando comparado à gestação normal (18,4% vs. 8,6%), o que revela as particularidades de diferentes populações estudadas.

As gestações de Alto Risco estão associadas especialmente a doenças prévias e/ou desenvolvidas durante a gravidez, das quais as mais frequentes são a pré-eclâmpsia e diabetes melitus⁹. Em concordância, aproximadamente 50% das pacientes do nosso grupo de estudo apresentou doenças gestacionais, sendo que as referidas adversidades somaram 43,3% dos casos. Nesse contexto, muitos autores relatam níveis elevados dos mediadores

estudados no grupo de gestantes de Alto Risco, uma vez que o processo inflamatório é evidente nas condições associadas como pré-eclâmpsia, diabetes melitus e obesidade ⁴¹⁻⁴³. Li et al. ²⁹ descreveram maiores valores de IL-6 e TNF- α em casos de pré-eclâmpsia em comparação às gestantes normotensas, além dos níveis aumentarem com a severidade da doença. Além disso, esses resultados foram confirmados experimentalmente em camundongos induzidos com pré-eclâmpsia. Dessa forma, os autores sugerem que TNF- α e IL-6 possam ser potenciais preditores do prognóstico da pré-eclâmpsia ²⁹. Em concordância, Tangeras et al. ⁴⁴ sugerem que aumento sérico de IL-1 β e IL-8 no primeiro trimestre são indicativos de desenvolvimento de hipertensão gestacional. Nos casos de diabetes associado, aumento sérico de citocinas também são evidenciados⁴⁵.

Por outro lado, os dados de dosagens de citocinas no soro materno ainda são conflitantes. Mosiman et al. ⁴⁶ não encontraram diferenças significativas entre citocinas analisadas em pacientes com pré-eclâmpsia e controles. Da mesma forma, Olzer et al.⁴⁷ não observaram diferença significativa entre dosagem de TNF- α e IL-6 no soro de gestantes com vários graus de pré-eclâmpsia. Considerando que expressiva porcentagem dos nossos casos estudados são associados à pré-eclâmpsia e ao diabetes, nossos resultados diferiram da literatura e revelaram menores níveis de citocinas séricas em gestantes do grupo Alto risco em relação ao grupo controle. Alguns fatores podem ter influenciado nossos resultados, destacando o caráter residual das citocinas que são detectadas no soro. A cinética desses mediadores é rápida, uma vez que as enzimas que os degradam são abundantes no soro e eles podem ser modulados por medicamentos⁴⁸, portanto, tais fatores podem influenciar os resultados e sua inferência da realidade do micro ambiente materno-fetal. Além disso, uma porcentagem expressiva das nossas amostras apresentou concentrações abaixo dos limites de detecção dos ensaios imunoenzimáticos. Nesse contexto, Mosiman et al.⁴⁶ descreveram que a proporção de amostras sanguíneas de gestantes com pré-eclâmpsia com níveis detectáveis de citocinas foram menores que os controles, o que pode indicar que outros fatores podem influenciar na cinética e degradação das citocinas nos casos de complicações gestacionais. A análise desses possíveis

interferentes está fora do alcance desse estudo, porém deve ser considerada para interpretação dos resultados.

Para melhor entendimento, foram realizadas análises considerando a idade gestacional das gestantes, pareadas com o grupo controle. Nessa análise, as amostras de 21 a 30 semanas de gestação não apresentaram diferença nos níveis de IL-6 e TNF- α . Nesse período, a gestação é caracterizada por um perfil de resposta Th2, com caráter anti-inflamatório¹⁸, e a variabilidade de condições clínicas presentes no grupo de Alto Risco pode refletir esse perfil esperado para esse período gestacional. Nesse contexto, alterações nesse perfil podem refletir complicações, como baixos níveis séricos de IL-10, a qual controla os níveis de citocinas pró-inflamatórias, entre 22 e 25 semanas de gestação, foram associados com trabalho de parto pré-termo⁴⁹. Ainda, ao final do terceiro trimestre, não houve diferença significativa nas citocinas estudadas, o que reforça os conceitos de que o momento do parto é um momento de resposta pró-inflamatória intensa independente da condição clínica^{50,51}. Em concordância, Reyes-Lagos et al.⁵² reportaram recentemente que no terceiro trimestre da gestação não há diferenças significativas entre dosagens séricas de citocinas em gestações saudáveis. Adicionalmente, estudos recentes tem ressaltado que o sucesso gestacional depende não só na relação Th1/Th2, mas também nas células de ação reguladoras (Treg)⁵³. Tais células ativadas promovem produção de IL-10 e fator de crescimento tumoral β (TGF- β), que atuam inibindo a resposta pró-inflamatória, e os autores sugerem que tal balanço pode promover um equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias.

Dessa forma, evidencia-se que as pesquisas na área de imunologia da gestação tem crescido, especialmente porque o fenômeno imunológico da sobrevivência fetal ainda não esteja completamente elucidado e complicações gestacionais, características populacionais e variações genética materna e fetal podem influenciar o desenvolvimento fetal⁵⁴. Assim, apesar da limitação do estudo em analisar citocinas séricas em um grupo heterogêneo de amostra, o estudo mostrou características importantes da população estudada, assim como levantou questões sobre a amostragem e métodos de dosagem de mediadores

relacionadas à gestação. Tal entendimento é importante para o desenvolvimento de métodos diagnóstico e preditivos não invasivos, e a associação de co-fatores são recomendadas visto às divergências encontradas na literatura.

REFERÊNCIAS

1. Coco L, Giannone T, Zarbo G. Management of high-risk pregnancy. *Minerva Ginecol*. 2014;66(4):383-9.
2. Riboni F, Garofalo G, Pascoli I, et al. Labour induction at term: clinical, biophysical and molecular predictive factors. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012;286(5):1123-9.
3. Ministério da Saúde. *Gestação de alto risco manual técnico*. 5a.ed. Brasília, DF: MS; 2010.
4. Afrasiabi N, Mohagheghi P, Kalani M, Mohades G, Farahani Z. The effect of high risk pregnancy on duration of neonatal stay in neonatal intensive care unit. *Iran J Pediatr*. 2014;24(4):423-8.
5. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. *Manual técnico do pré-natal e puerpério*. São Paulo: SESP; 2010:234p.
6. Tandu-Umba B, Mbangama MA, Kamongola KMB, et al. Pre-pregnancy high-risk factors at first antenatal visit : how predictive are these of pregnancy outcomes ? *International Journal of Women's Health*. 2014;6:1011-8.
7. Morceli G, França EL, Magalhães VB, Damasceno DC, Calderon IMP, Honorio-frança AC. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. *Acta Pediatrica*. 2011;100:550-6.
8. Riskin A, Garcia-Prats J. Parenteral nutrition in very low birth weight preterm infants. *Isr Med Assoc J*. 2015;17:310-5.
9. Shapla N, Islam M, Shahida S, Parveen Z, Lipe Y. Maternal and foetal outcome of 206 high risk pregnancy cases in border guard hospital, Dhaka. *Mymensingh Med J*. 2015;24(2):366-72.
10. English FA, Kenny LC, McCarthy FP. Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integrated Blood Pressure Control*. 2015;8:7-12.
11. Santos GHN, Martins MDG, Sousa MDS, Batalha SDJC. Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2009;31(7):326-34.
12. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes: diagnosis and management. *Clinics in perinatology*. 2004;31(4):765-82, vi.
13. Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri a, Erez O, Mazor M. Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2000;92(2):209-16.
14. Vrachnis N, Vitoratos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Deligeoroglou E, Creatsas G. Intrauterine inflammation and preterm delivery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1205:118-22.
15. Erez O, Romero R, Tarca AL, et al. Differential expression pattern of genes encoding for anti-microbial peptides in the fetal membranes of patients with spontaneous preterm labor and intact membranes and those with preterm prelabor rupture of the membranes.

- The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2009;22(12):1103-15.
16. Wilczyński JR. Th1/Th2 cytokines balance - Yin and yang of reproductive immunology. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2005;122(2):136-43.
 17. Hua R, Pease JE, Cheng W, et al. Human labour is associated with a decline in myometrial chemokine receptor expression: the role of prostaglandins, oxytocin and cytokines. *American journal of reproductive immunology (New York, NY: 1989)*. 2013;69(1):21-32.
 18. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008;20(4):462-9.
 19. Moreli JB, Morceli G, De Luca AKC, et al. Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF- α production: The relationship with perinatal outcomes. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;32(3):604-10.
 20. Peraçoli MTS, Bannwart CF, Cristofalo R, et al. Increased Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Monocytes are Associated with Elevated Levels of Uric Acid in Pre-Eclamptic Women. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;66(6):460-7.
 21. Curry A, Vogel I, Skogstrand K, et al. Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. *Journal of reproductive immunology*. 2008;77(2):152-60.
 22. Kamel RM. The onset of human parturition. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281(6):975-982. doi:10.1007/s00404-010-1365-9.
 23. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta*. 2002;23(4):257-73.
 24. Taylor BD, Ness RB, Klebanoff MA, et al. First and second trimester immune biomarkers in preeclamptic and normotensive women. *Pregnancy Hypertension*. 2016;6(4):388-93.
 25. Sun L, Mao D, Cai Y, et al. Association between higher expression of interleukin-8 (IL-8) and haplotype -353A/-251A/+678T of IL-8 gene with preeclampsia. *Medicine (United States)*. 2016;95(52):e5537.
 26. Zhang C, Deng X, Zhang X, et al. Association between Serum TNF- α Levels and Recurrent Spontaneous Miscarriage: A Meta-analysis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016;75:86-93.
 27. Menon R, Torloni MR, Voltolini C, et al. Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades. *Reproductive Sciences*. 2011;18(11):1046-70.
 28. Kacerovsky M, Lenco J, Musilova I, et al. Proteomic biomarkers for spontaneous preterm birth: a systematic review of the literature. *Reproductive sciences*. 2014;21(3):283-95.
 29. Li Y, Wang Y, Ding X, Duan B, Li L, Wang X. Serum Levels of TNF- α and IL-6 Are Associated with Pregnancy-Induced Hypertension. *Reproductive Sciences*. 2016; 23(10):1402-8.
 30. Luke B, Brown M. Elevated risks of pregnancy complications and adverse outcomes with increasing maternal age. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1264-72.
 31. Schimmel M, Bromiker R, Hammerman C, et al. The effects of maternal age and parity on maternal and neonatal outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291:793-8.
 32. Leader J, Bajwa A, Lanes A, et al. The effect of very advanced maternal age on

- maternal and neonatal outcomes: Systematic Review. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*. 2018;40(9):1208-18.
33. Leal M do C, Gama SGN da, Pereira APE, Pacheco VE, Carmo CN do, Santos RV. The color of pain: racial iniquities in prenatal care and childbirth in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2017;33(suppl 1):1-17.
 34. Dunlop AL, Kramer MR, Hogue CJR, Menon R. Racial disparities in preterm birth : an overview of the potential role of nutrient deficiencies. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 2011;90(8):1332-41.
 35. Torloni MR, Fortunato SJ, Betr  n AP, et al. Ethnic disparity in spontaneous preterm birth and maternal pre-pregnancy body mass index. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285:959-66.
 36. Kolas T, Nakling J, Salvesen K. Smoking during pregnancy increases the risk of preterm births among parous women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79:644-8.
 37. Jauniaux E, Burton GJ. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit. *Early human development*. 2007;83(11):699-706.
 38. Gunnarsdottir J, Stephansson O, Cnattingius S,   kerud H, Wikstr  m A. Risk of placental dysfunction disorders after prior miscarriages: a population-based study. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2014;211(1):e1-8.
 39. Melo BCP, Amorim MMM, Katz L, Coutinho I, Verissimo G. Perfil epidemiol  gico e evolu  o cl  nica p  s-parto na pr  -ecl  mpsia grave. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2009; 55(2):175-80.
 40. Majella MG, Sarveswaran G, Krishnamoorthy Y, Sivaranjini K, Arikrishnan K, Kumar SG. A longitudinal study on high risk pregnancy and its outcome among antenatal women attending rural primary health centre in Puducherry, South India. *J Educ Health Promot*. 2019; 8:1-6.
 41. Zhang L, Zhang Z, Gao Y, et al. Alterations of IL-6, IL-6R and gp130 in early and late onset severe preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2013;32(3):270-80.
 42. Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MPH, et al. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. *Prenatal Diagnosis*. 2013;33:1183-8.
 43. Christian LM, Porter K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. *Cytokine*. 2014;70(2):134-40.
 44. Tanger  s LH, Austdal M, Skr  stad RB, et al. Distinct first trimester cytokine profiles for gestational hypertension and preeclampsia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35(11):2478-85.
 45. Du M, Basu A, Fu D, et al. Serum inflammatory markers and preeclampsia in type 1 diabetes: A prospective study. *Diabetes Care*. 2013;36:2054-61.
 46. Mosimann B, Wagner M, Poon LCY, Bansal AS, Nicolaides KH. Maternal serum cytokines at 30-33weeks in the prediction of preeclampsia. *Prenatal Diagnosis*. 2013; 33(9):823-30.
 47. Ozler A, Turgut A, Sak ME, et al. Serum levels of neopterin, tumor necrosis factor-alpha and Interleukin-6 in preeclampsia: relationship with disease severity. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2012;16:1707-12.
 48. Unver N, McAllister F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2018;41:10-17.
 49. Pereira TBDB, Thomaz EBAF, Do Nascimento FRF, et al. Regulatory cytokine expression and preterm Birth: Case-control study nested in a cohort. *PLoS ONE*.

2016;11(8):e0158380.

50. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003;1:122.
51. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta*. 2006; 27(11-12):1037-51.
52. Reyes-Lagos JJ, Peña-Castillo MÁ, Echeverría JC, et al. Women serum concentrations of the IL-10 family of cytokines and IFN- γ decrease from the third trimester of pregnancy to active labor. *NeuroImmunoModulation*. 2017;24:162-70.
53. Moreno-Eutimio MA, Tovar-Rodríguez JM, Vargas-Avila K, et al. Increased serum levels of inflammatory mediators and low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of Preeclamptic Mexican Women. *BioMed Research International*. 2014;2014:413249.
54. Traglia M, Croen LA, Jones KL, et al. Cross-genetic determination of maternal and neonatal immune mediators during pregnancy. *Genome Medicine*. 2018; 10(1):67.

Tabela 1. Características sociodemográficas das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco) incluídas no estudo.

Características	Gestações Alto Risco (n = 63)	Gestações Baixo Risco (n = 65)	p
<i>Características maternas</i>			
Idade (anos)[#]	29 (18-43)	25 (19-40)	0,0003*
Etnia^Y			
Branca	25 (39,7)	44 (67,7)	0,0015*
Não Branca	38 (60,3)	21 (32,3)	
Estado civil^Y			
Solteira	14 (22,2)	19 (29,2)	0,36
União estável	49 (77,8)	46 (70,8)	
Profissão^Y			
Remunerada	24 (38,1)	32 (39,3)	0,20
Não remunerada	39 (61,9)	33 (60,7)	
Hábito tabagista^Y			
Sim	7 (11,1)	4 (6,1)	0,37
ex-tabagista	10 (15,9)	7 (10,7)	
Mãe em Convívio com Fumantes^Y			
Sim	27 (42,8)	10 (15,4)	0,0008*
Etilista^Y			
Sim	2 (3,2)	4 (6,2)	0,42
Prática de atividade física^Y			
Sim	0 (0)	1 (1,5)	1,00
Algum tipo de doença prévia^Y			
Sim	35 (55,6)	4 (6,2)	< 0,0001*
<i>Características Gestacionais</i>			
Contato com substâncias tóxicas na gestação^Y	8 (12,9)	2 (3,1)	0,06
Doença Gestacional^{Y €}			
Sim	30 (47,6)	5 (7,7)	< 0,0001*
Paridade^Y			
Primigesta	4 (6,4)	28 (40,1)	< 0,0001*
Secundigesta	21 (33,3)	22 (33,9)	
Múltipara	38 (60,3)	13 (20,0)	

[#] Teste Mann-Whitney: mediana (mínimo – máximo); ^Y Teste X² ou Teste exato de Fisher, n (%);

* estatisticamente significativo (p < 0,05).

€ Descrição das porcentagens das doenças associadas encontra-se no texto.

Tabela 2. Características obstétricas e neonatais das gestantes e de seus recém-nascidos nos grupos de gestações de Alto Risco e Baixo Risco.

Características	Gestações Alto Risco (n = 36)	Gestações Baixo Risco (n = 24)	p
<i>Características Obstétricas</i>			
Idade gestacional no parto (semanas, dias) [#]	38s3d (34s6d – 39s4d)	39s (36s – 41s)	0,001*
Tipo de parto [‡]			
Vaginal	11 (30,6%)	11 (45,8%)	0,27
Cesárea	25 (69,4%)	13 (54,2%)	
Sexo recém-nascido [‡]			
Feminino	19 (52,8%)	11 (45,8%)	0,59
Masculino	17 (47,2%)	13 (54,2%)	
Peso recém-nascido (g) ^δ	3176 ± 570	3311 ± 558	0,37
Apgar de 1º minuto [‡]			
≥7	33	22	1,00
<7	3	2	
Apgar de 5º minuto [‡]			
≥7	36	24	1,00
<7	0	0	

[#] Teste Mann-Whitney: mediana (mínimo – máximo);

[‡] Teste X² ou Teste exato de Fisher, n (%);

^δ Teste t: média ± DP

* estatisticamente significativo (p < 0,05).

Tabela 3. Coeficientes de variação intra-ensaio, limites de detecção mínimos e máximos, e concentração, em pg/mL, das citocinas avaliadas no soro materno no grupo de gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e no grupo atendido na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco).

Citocina	Coeficiente de variação intra-ensaio	Limite de detecção mínimo e máximo (pg/mL)	Gestações Alto Risco (n = 63)	Gestações Baixo Risco (n = 65)	Δ mediana Alto Risco x Baixo Risco	p
IL-1 β	0,06	0,295 - 262,31	2,23 (0 – 17,68)	5,86 (0 – 262,3)	- 3,63	< 0,0001*
IL-6	0,06	3,59 - 629,53	0 (0 – 0)	0 (0 – 629,5)	0	< 0,0001*
IL-8	0,11	291,64 - 1951,62	0 (0 – 0)	737,8 (0 – 1952,0)	- 737,8	< 0,0001*
TNF- α	0,08	0,08 - 1364,5	4,59 (0 – 675,3)	35,56 (0 – 1365,0)	- 30,97	0,0002*

* Teste de Mann-Whitney: mediana (mínimo – máximo);

Δ : Diferença de valores da mediana: comportamento biológico das Gestações de Alto Risco em relação às Gestações de Baixo Risco.

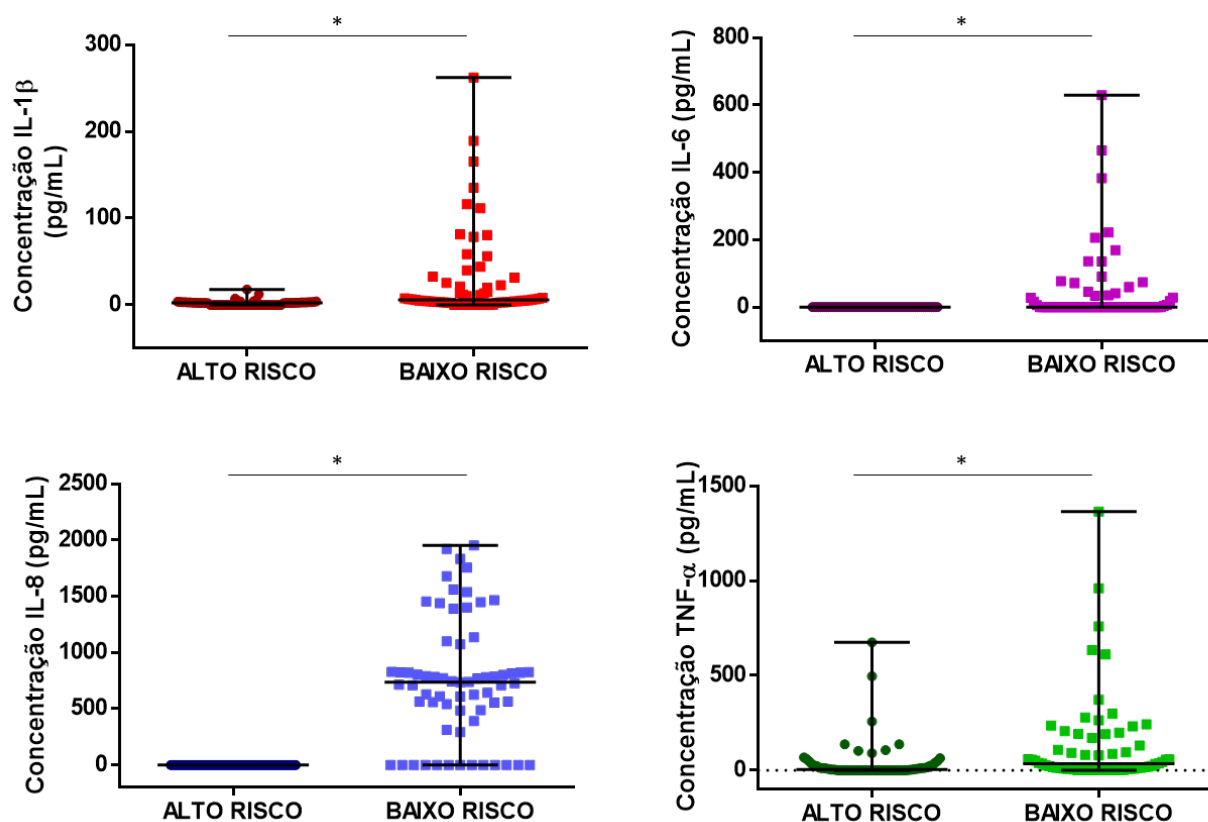


Figura 1. *Scatter plot* referente à concentração de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde (Baixo Risco). A mediana está representada pelo traço horizontal e as barras de erro superiores e inferiores correspondem aos valores mínimos e máximos, respectivamente (*Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

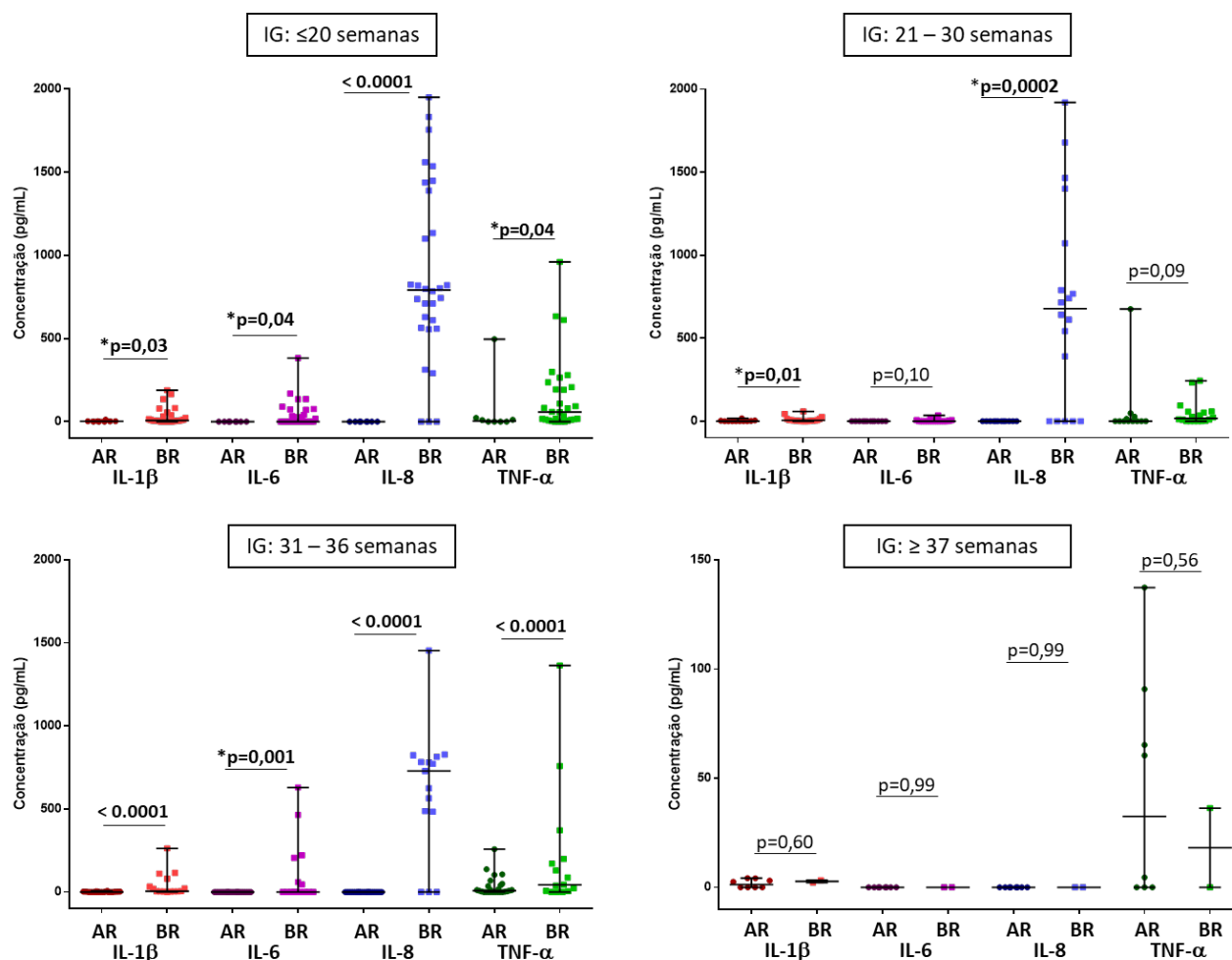


Figura 2. Scatter plot referente à concentração de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro das gestantes atendidas em Ambulatório de Alto Risco (AR) e das gestantes atendidas na Rede Básica de Saúde ou Baixo Risco (BR) de acordo com as faixas de idade gestacional (IG): ≤ 20 semanas, 21 – 30 semanas, 31 – 36 semanas e ≥ 37 semanas. A mediana está representada pelo traço horizontal e as barras de erro superiores e inferiores correspondem aos valores mínimos e máximos, respectivamente (*Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

ANEXOS

ANEXO A

Questionário – Protocolo de atendimentoProjeto: **“Citocinas Inflamatórias no Soro Materno em Gestações de Alto Risco”**

Responsável: Profa. Dra. Jossimara Poletini

DADOS DA PACIENTE**Nome:**.....Paciente nº**Data:**...../...../.....**Registro HR**.....**Data de nascimento:**...../...../.....**RG:**.....

Qual o seu endereço (rua, nº, cidade, CEP):

Telefone para contato

Qual é sua nacionalidade?

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()**Estado civil**

(1) casada

(2) divorciada

(3) solteira

(4) amasiada

(5) viúva

Escolaridade: Escolaridade (anos de aprovação escolar)**Exerce atividade remunerada** () Sim () Não**Profissão:**..... Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()**HÁBITOS****Hábito de fumar:** Fuma () Nº de cigarros/dia.....

Nunca fumou () Parou de fumar () há quanto tempo?.....

Por quanto tempo fumou?.....

Tipo: () cachimbo () charuto () palha () papel com filtro () outros

Convive com fumante? Sim () Não ()

Local: () casa () trabalho () outros

No. de pessoas?..... Quantas horas/dias?.....

Consume bebida alcoólica? Sim () Não ()

Até 7 doses/sem. ()

Mais de 7 doses/sem ()

Usa drogas? Sim () Não ()

Tipo: () maconha () cocaína () craque () outros

Vias de administração: () inalatória () endovenosa () outras

Durante quanto tempo?.....

Já usou? Sim () Não () Quanto tempo?.....

Parou há quanto tempo?.....

Contato com substâncias tóxicas? Sim () Não ()

Quais?.....

Por quanto tempo (meses)?.....

Período sem contato com a (s) substância (s) (meses):.....

Possui algum tipo de doença? Sim () Não () Qual(is)?

Diabetes mellitus ()

Já teve infarto? Sim () Não () Há quanto tempo?.....

É hipertensa? Sim () Não ()

É obeso? Sim () Não ()

Peso (Kg)..... Altura (cm)..... IMC:.....

Toma medicamento? Sim () Não ()

Qual(is)? Em que dosagem?.....

Pratica exercício físico? Sim () Não () Com que frequência?.....

Frequência de relações sexuais (no relações/semana).....

No parceiros sexuais (no ultimo ano): () 1 () 2 () > 2

Faz uso de ducha vaginal () Sim () Não

Faz uso de sabonete íntimo () Sim () Não

Antecedentes ginecológicos

História de VB: () Sim () Não História de DST: () Sim () Não

Qual(is)?.....

Uso de métodos contraceptivos (4 meses anteriores): () Sim () Não

Tipo.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente com:

Diabetes Mellitus () Obesidade () Hipertensão ()

Doença cardiovascular () Hipercolesterolemia () () outros

Quem?.....

Não tem () Não sabe ()

HISTÓRIA GESTACIONAL

G:.....P:.....A:.....C:.....

DUM:.....

Pré-natal: Sim () Não () No. de consultas?.....

Intercorrências durante a gravidez: (..)náuseas () vômitos () dor abdominal

() dor para urinar () corrimentos () sangramento () outros

Doenças durante a gestação: Sim () Não () Tipo?.....

Tratamento: Sim () Não () Qual?.....

Fatores de risco para HIV? Sim () Não ()

AVALIAÇÕES

	Inicial	Final
Peso (kg)		
Pressão Arterial (mmHg)		

DADOS DO PARTO E RECÉM-NASCIDO (RN)

Tipo de parto: () normal () cesária () fórceps () outros

Sinais de sofrimento fetal? Sim () Não ()

Qual?.....

Mecônio: Sim () Não ()

Tipo: () fluido () moderado () espesso

Apgar: 1'5'10'

New Ballard (NB):.....Sexo:.....Peso:.....Estatura:.....

PC:.....PT:.....PA:.....

Classificação do RN: () PIG () AIG () GIG

Necessidade de reanimação: () máscara () ventilação sob pressão () intubação

() drogas Quais drogas?.....

Óbito RN: Sim () Não ()

Vasos do cordão: () 2 artérias e 1 veia () 1 artéria e 1 veia () outros

Anomalias ou malformações: Sim () Não ()

Quais?.....

Tipo de placenta: () normal () calcificada () outra

ANEXO B



Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ajog>.



Preparation

Requirements for the preparation of manuscripts

The author(s) accept(s) responsibility that the electronic file is complete and accurate upon submission, revision, and acceptance.

Editing services

AJOG publishes manuscripts only in American English. This includes using US spelling, punctuation, quotation marks, and decimal points. AJOG editors strongly encourage contributors whose English is not excellent to have their manuscripts edited by a professional translator or native English speaker before submission. Elsevier offers authors two services to help prepare their manuscripts for submission to an English-language journal.

The first service edits your manuscript already written in English to ensure it is in correct scientific English. This process does not change the content of your manuscript but improves understanding and readability for an English-speaking reader. This process takes less than six business days and the cost of an average manuscript is less than \$400. Please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting/pages/howdoesitwork.html> for more details and to upload your manuscript.

The second service translates your manuscript from your language (Chinese, Portuguese or Spanish) into either British or American English. This process is carried out by Language experts within your field, and takes less than 11 business days. The average cost is \$1,000.

Please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices/translationservices/pages/howdoesitwork.html> for more details and to upload your manuscript.

Please note that these services are not mandatory for publication in an Elsevier journal. Using these services does not guarantee selection for peer review or acceptance, and you are not obligated to submit your edited manuscript to an Elsevier journal. Visit our [customer support site](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

Basic Format

Requirements for manuscripts submitted to the Journal generally conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals from the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

Manuscripts must be submitted in American English, double spaced, with a font size no smaller than 12. Number

pages consecutively in the upper right corner in the following order: title page, condensation and short version of title, abstract, main text, acknowledgments, references, tables, and figure legends.

IMPORTANT: Figures are to be uploaded individually and in separate files (one figure per file). **DO NOT embed the figure into the manuscript text file**, as this compromises the image quality, creating an unpublishable image (see artwork).

Use of Statistics and Math Formulae

In describing the statistical analyses performed, state which tests were used to evaluate a specific data set. In tables, indicate which statistical test(s) were used to evaluate the data.

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, eg, X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Abbreviations, units, proprietary (brand) names, and symbols

Use only standard abbreviations. Do not use abbreviations in the title or in the abstract. In the text they should be kept to a practical minimum. The full word or phrase for which an abbreviation stands should precede its first use in the text, with the abbreviation following in parentheses, unless it is a conventional standard unit of measurement.

The use of conventional units of measure is recommended, followed by Système International d'Unités (SI) units in parentheses. For this and other issues of style, authors are advised to consult the current AMA style manual: Iverson C, Christiansen S, Flanagan A, et al. *AMA manual of style: a guide for authors and editors*. 10th ed. New York, NY: Oxford University Press; 2007.

Generic, chemical, and/or proprietary names of drugs may be used. When a generic or chemical name is used, authors may insert the proprietary name in parentheses after the drug's first mention in the text (optional). When a proprietary drug name is used, it should be followed parenthetically (at first mention only) by the full name of the manufacturer and the city and state (US) or the city, province (if appropriate), and non-US country in which its main headquarters are located. Proprietary (brand names) are not permitted in the manuscript title.

Do not insert in any part of the paper the symbol for copyright (©), registered trademark (®), or trademark (TM); if included, they will be removed before publication.

Permissions

Direct quotations, tables, figures, and any other material that has previously appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author(s) along with complete reference information. Photographs of identifiable persons either must be accompanied by signed releases or all recognizable features must be masked.

Article structure

Essential title page information

Title page (starting on page 1) – required for ALL article types, including: letters, replies, and online-only content – includes the following sequence:

1) Title (as concise as possible, approximately 12 words, without abbreviations or parenthetical abbreviations for terms used in the title, and suitable for indexing purposes) Proprietary (brand names) and conclusion statements are NOT permitted in the manuscript title

2) List of authors to be credited (byline), including each author's first name, middle initial, and LAST NAME (surname in all capital letters), with highest academic degrees (honorary degrees are not permitted); city or cities, state(s), province (Canada and Australia), and country or countries other than the United States in which the study was conducted; divisional and/or departmental and institutional affiliations of each author at the time the study was performed; **for authors not called "Doctor," indicate Ms. or Mr.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

3) Disclosure statement of any potential of interest for each author; if no conflict exists; include the statement "The author(s) report(s) no conflict of interest."

4) Any source(s) of financial support for the research

Role of the funding source. You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

5) Required for clinical trials – include the clinical trial identification number and the URL of the registration site

6) Paper presentation information: if the findings were presented at a meeting, include the name of the meeting and its number (eg, "the 24th Annual Scientific Meeting" or "the 12th annual meeting"), the organization presenting the meeting, the city and state or city and non-US country (for Canada and Australia, include the province) in which the meeting was held, and the month, **inclusive dates** (not only the date on which the specific presentation was made), and year of the meeting

7) Disclaimer, if appropriate, such as for authors employed by the Federal Government or Armed Forces

8) The corresponding author's contact information (who will handle correspondence at all stages of submission, publication, and post-publication). Contact details must be kept up to date by the corresponding author. Include the full name, address, work and home and/or cell phone numbers (indicating which is which), fax number, and email address.

Word count

The word count of the abstract and the main text (not counting the title page, condensation, acknowledgements, references, tables, figure legends, and figures) must be included at the bottom of the title page.

Condensation, Implications and Contributions, and short version of title

On the next page of the manuscript, supply:

☐ 1) Condensation: a 1-sentence condensation of the paper, consisting of no more than 25 words, stating its essential point(s); this sentence, which is subject to copy editing in conformance with Journal style, will appear in the Table of Contents.

☐ 2) Short Title: a short version of the article title, for the identification line inserted at the bottom of each published table and figure.

☐ 3) AJOG at a Glance: Applies to Original Research and Systematic Review submissions. This section is limited to no more than 130 words, 1-3 short sentences or phrases in bullet form, briefly describing your study, its significance, and its contribution to the literature. Responses should be listed in bullet form with A., B., and C., headings (not in paragraph form). All responses are subject to minor editorial alterations and/or shortened without the authors' approval, and published both in print and on the Journal website.

☐ A. Why was this study conducted?

☐ B. What are the key findings?

☐ C. What does this study add to what is already known?

Abstract page, including key words/phrases

On the next page of the manuscript, provide an abstract and as many **alphabetized** key words or short phrases as needed for indexing.

Abbreviations and references are NOT permitted in the abstract (structured nor unstructured). Required abstract formats are described under the Article Types section of this document.

Text

The editors require that original research articles be organized into sections and identified with the following headings: (not applicable to review articles, clinical opinion, or other article types.)

The type(s) of non-human animals or other species used in an investigation must be named in the Title, Abstract, and Materials and Methods sections of the manuscript.

Introduction

State concisely the study's purpose and rationale. Present only the background, supported by a limited number of pertinent references necessary for the reader to understand why the study was conducted. Do not include study data or conclusions.

Materials and Methods

Describe briefly, but in sufficient detail to permit others to replicate the study, its plan, patients, experimental animals or other species, materials, and controls; methods and procedures; and statistical method(s) employed. Institutional Review Board (IRB) issues are to be addressed here as stated under "Human and nonhuman experimentation" in the Editorial Policies section above. If the study was exempt from IRB approval, provide an explanation in the Materials and Methods section of the paper.

Results

This section includes detailed findings and must cite, in numerical order, all tables and/or figures, which should supplement, not reiterate, the text. Emphasize only the most important observations. Reserve any comparisons with others' observations for the Comment section (see below).

Comment

Do not repeat the details of data presented under Results or present any new data here. The editors strongly advise the following structure:

- A brief statement of the principal findings, limiting claims to those strictly supported by the data, avoiding speculation and overgeneralization. Give equal emphasis to positive and negative findings of equal scientific merit.
- Strengths and weaknesses of the study, both intrinsically and in relation to other studies, particularly any differences in results.
- The meaning of the study; eg, hypothesized mechanisms that might explain the outcomes observed and/or the implications for clinicians or policy makers. Indicate whether additional research is required before the information can be confidently used in clinical settings.
- Unanswered questions; proposals for future research.

Acknowledgment(s)

This section thanks those other than the authors who have made substantive contributions to the manuscript, including participants in collaborative trials and persons providing only data collection or assistance with preparing the paper for submission or publication. Name only those who have made substantive contributions to the study (see "Editorial Policies").

For each person named under Acknowledgments, including science writers, the following information must be provided: name, place of employment, funding source(s), and disclosure of source of compensation, whether financial or in the form of services or complimentary products. All individuals named in this section must consent to such acknowledgment.

References

Follow the format in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals from the International Committee of Medical Journal Editors. <http://www.icmje.org> Standard journal title abbreviations are available in the List of Serials Indexed for Online Users from the National Library of Medicine. http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html

Numbering and order

All references are to be numbered sequentially as they fall in the text. For references that are not cited in the main text but only within table(s) or figure(s), begin such numbering *after* the numbers in the main reference list.

Insert citations in Arabic numerals as superscripts, not in parentheses. If the reference follows a comma or falls at the end of a sentence, the superscript should follow the comma or the period.

Do not include the first author of the cited reference in the text, in parentheses or otherwise, except as part of the text itself (Smith et al found.... or In a study by Smith et al,).

If any reference is repeated or out of order, the author is responsible for renumbering references as needed prior to submission or resubmission. If any reference(s) are added or deleted during editing, the author is responsible for renumbering all subsequent references, both in citations within the text (and tables and figures) and, correspondingly, in the reference list. For any citations used in tables or figure legends, renumbering should similarly be done there.

Reference style

In general references follow AMA style.

For up to 6 authors, list all; for 7 or more authors, list the first 3 + et al.

•Journal article

Nageotte MP, Vander Wal B. Achievement of the 30-minute standard in obstetrics—can it be done? *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:104-7.

•Book chapter or section

Kim M. Amenorrhea: primary and secondary. In: Zuspan FP, Quilligan ED, eds. *Handbook of obstetrics, gynecology, and primary care*. St Louis, MO: Mosby; 1998:3-10.

•Personal communications; unpublished data

If essential, these may be cited, within parentheses, at an appropriate location in the text, but not as numbered references. Written, signed permission from individual(s) quoted *must accompany the manuscript upon submission*.

for additional examples see any recent issue of the Journal.

Abstracts

Abstracts of scientific meetings can be cited; however, once the complete work is published, the article citation is preferred.

Journal abbreviations

source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Provisional patent applications

Provisional patent applications may not be cited as a reference.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and add any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Web references

Websites may or may not be appropriate sources for citation; e.g., websites that serve as repositories of genetic information maintained by NIH, NCI, and the National Library of Medicine are acceptable.

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Tables

Submit tables in the manuscript file at the conclusion of the reference list and before the figure legends. Create all tables as double-spaced text in Microsoft Word. Any table submitted as a *.jpg or *.tif file will be returned for replacement.

Identify each table with a *brief* title (as few words as possible; reserve abbreviations for the key) and with an Arabic number (Table 1, Table 2, etc.) in the order in which it is cited in the text. Each column, including the first, must have a heading. Put all explanatory matter in footnotes, including the spelling out of any nonstandard abbreviations used in the table.

For footnote symbols within tables, follow the style and order noted on pages 90-95 of the AMA style guide, 10th edition. For placement, start in the upper left corner and work across, left to right, and down, line by line.

If a table, in whole or in part, was derived from copyrighted material, a footnote at the bottom of the table must credit the original source, cited fully. Any copyrighted material must be accompanied by a **letter or completed permission form** at the time of manuscript submission.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Figure legends

On the final page of the manuscript supply the following for each figure: The figure number, figure title, and a 1- or 2-sentence description (legend, caption). Explain any arrowhead, letter, or other symbol used to identify parts of a photograph, drawing, or other illustration. Spell out any abbreviations used. In photomicrographs, explain the internal scale and identify the method of staining, if appropriate. If a figure was previously published by any of the bylined authors or others, insert a statement that permission has been granted and by whom, as well as a full citation of the original publication.

Figures

There is no charge for the use of color figures.

1. Submit each figure individually (one figure per file).
2. DO NOT copy and paste or embed images into the manuscript text file or in a slide presentation. This compromises image quality making it unpublishable.
3. Preferred image formats are: EPS, TIFF, or JPEG.
4. Number figures sequentially in order as they appear in the text, with Arabic numbers (Figure 1, Figure 2, Figure 3A, etc).
5. Assign to each figure a brief title (containing as few words as possible and reserving abbreviations for the legend).

For further explanation and examples of artwork preparation, see artwork instructions to authors from AJOG's publisher at <http://www.elsevier.com/artwork> (click on "Artwork and Multimedia Instructions Interactive PDF").

Videos and computer graphics

Authors are encouraged to submit videos and computer-generated graphics; eg, a slide presentation with or without animation and sound. Although the publisher will not edit any video or computer graphic, the editors and reviewers may suggest changes. Any patient identification must be removed or masked. If music is utilized, appropriate permission is required.

Videos must be compatible with Windows Media Player and submitted in MPEG-1 or MPEG-2 (*.mpg) or QuickTime (*.mov) format. The maximum length of a video or computer graphic is 50 MBs or less per clip. Longer submissions may be divided into smaller clips, each of which should be identified at the beginning of that section; eg, Video Clip 1, Graphic 1. A concise legend for each video clip or computer graphic presentation must be included with the manuscript.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data.

For more detailed instructions please visit our video instruction pages

at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Videos and computer graphics accompanying a manuscript that is declined for publication will not be accepted separately. If the manuscript is accepted for publication, the presentation will be in the electronic version of your article, and in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.