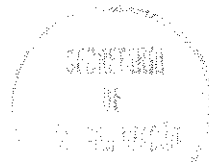


ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA CANDIDATA RITA
CRISTINA MARINO E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA.



18.03.91

RITA CRISTINA MARINO

**DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA DA OCITOCINASE EM
PLASMA DE GESTANTES**

TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NA ÁREA
DE FISILOGIA.

Orientador: Prof. Dr. GUIDO MENEGATTO.

CAMPINAS

1991

32/9105493

A meus pais
e irmãos
Dedico

AGRADECIMENTOS

A meus pais, por tudo.

Ao Prof. Dr. Guido Menegatto pela orientação.

Ao Dr. Ernesto José Dottaviano, Dr. Norair Salviano dos Reis e Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes pelas ótimas críticas e sugestões.

A todos os professores que participaram de minha formação.

À Prof. Dra Cicilia Yuko Wada, pela análise estatística.

Aos colegas de pós-graduação pelo apoio e amizade.

À professora Ornella Rita Ferrari Sacilotto, pela correção do texto.

Aos professores Miguel Arcanjo Areas e Maria Cristina
Cintra Gomes pelo imenso carinho, tão
importante nesta caminhada.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram
para a realização desse trabalho, e que foram,
involuntariamente omitidos aqui.

CONTÉÚDO

INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	50
RESUMO	70
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

INTRODUÇÃO

O lobo posterior da hipófise, também denominado neurohipófise, é formado por células do tipo gliais denominadas pituícitos, que se assemelham em aparência à neurógliã do sistema nervoso. Estas células não secretam hormônios e sim, servem como estruturas de sustentação para as numerosas fibras terminais e ramificações nervosas terminais de feixes nervosos que se originam nos núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo. Estes feixes chegam à neurohipófise pelo pedúnculo hipofisário. As terminações nervosas são saliências bulbosas situadas sobre as superfícies dos capilares, nos quais liberam os hormônios ocitocina e vasopressina (TORTORA e ANAGNOSTAKOS, 1984).

Neurônios neuroendócrinos magnocelulares (largos), capazes de sintetizar ocitocina e vasopressina ou hormônio anti-diurético, estão presentes em ambos os núcleos paraventriculares e supra-ópticos hipotalâmicos, com uma tendência para as células que contém ocitocina estarem agrupadas nas regiões mais rostrais desses núcleos. (POULAIN e WAKERLEY, 1982)

Neurônios neurosecretores parvicelulares (pequenos), estão localizados em várias regiões hipotalâmicas: região média basal, no núcleo arcuado e tuberal, nas regiões periventriculares e também nos núcleos pré-ópticos, paraventriculares e supraquiasmáticos. Os neurônios parvicelulares liberam suas secreções para a vascularização porta, para estimular ou inibir secreções da hipófise anterior. Os capilares da neurohipófise e eminência média são altamente fenestrados, apresentam perfurações ou aberturas, facilitando a liberação de hormônios para a circulação geral, via neurohipófise ou hormônios para o plexo porta, através da eminência média. (KUPFERMANN, 1985)

A principal atividade biológica das substâncias do lobo neural são classificadas como antidiurética - vasopressina - (conservação do teor de água) e ocitócica (contração do útero e ejeção de leite) (REICHLIN, 1985).

A vasopressina (VP) aumenta a pressão sanguínea, promovendo vasoconstrição, quando aplicada em doses relativamente elevadas e é também referida como hormônio antidiurético (ADH), uma vez que altera a permeabilidade dos

ductos coletores e túbulos contornados do rim promovendo uma maior permeabilidade à água. A ocitocina é a principal substância que promove a contração do útero e aumenta a pressão intra mamária durante a sucção dos mamilos. É liberada durante a amamentação, no trabalho de parto e distensão vaginal (REICHLIN, 1985).

A vasopressina e ocitocina são polipeptídeos, apresentando uma sequência de nove aminoácidos cada, como mostra a Figura 1. Muitos hormônios peptídeos, são clivados de um grande precursor denominado pró-hormônio (REICHLIN, 1985); assim como os pró-hormônios proressofisina (Vasopressina) e proocifisina (ocitocina) são sintetizados nos corpos celulares dos neurônios magnocelulares e a clivagem ocorre dentro de vesículas ao longo do transporte axoplasmático (KUPFERMANN, 1985).

Figura 1: Sequência de aminoácidos que compõem os hormônios neurohipofisários (ocitocina e vasopressina) (REICHLIN, 1985).

VASOPRESSINA:

Cys - Try - Phe - Gln - Asn - Cys - Pro - Arg - GlyNH₂

OCITOCINA:

Cys - Try - Ile - Gln - Asn - Cys - Pro - Leu - GlyNH₂

Ao longo do trajeto hipofisário, estes hormônios encontram-se associados a distintos peptídeos denominados neurofisinas. Estas neurofisinas são proteínas carreadoras e fazem parte dos respectivos pró-hormônios, proocifisina e proressofisina, sendo liberadas simultaneamente com seus peptídeos hipofisários. Os fatores que regulam a secreção desses hormônios, regulam também a secreção das respectivas neurofisinas (REICHLIN, 1985).

A vasopressina encontra-se ligada à neurofisina tipo II, enquanto que a ocitocina encontra-se ligada à neurofisina

tipo I. Os pró-hormônios são transportados, ao longo do axônio, para o lobo neural, ligados às membranas dessas vesículas, onde são estocados. Mais tarde, quando o hipotálamo é estimulado apropriadamente, estes impulsos são enviados para as células secretoras, promovendo a liberação dos hormônios e neurofisinas do axônio terminal para a circulação (TORTORA e ANAGNOSTAKOS, 1984; KUPFERMANN, 1985; REICHLIN, 1985).

O sistema hipotálamo hipofisário apresenta uma acentuada flexibilidade aos fatores que regulam a secreção de vasopressina e ocitocina (KASTING, 1988); além desse sistema a presença de ocitocina foi observada em ovários primeiramente em carneiros (WHATES e SWANN, 1982) e subseqüentemente em outras espécies, incluindo vacas (FIELDS; ELDRIDGE; FUCHS; ROBERTS e FIELDS, 1983), - coelhos (MILLER; KAN-DAWOOD e DAWOOD, 1983) - macacos (KAN-DAWOOD; MARUT e DAWOOD, 1984) e humanos (WHATES; SWANN; PICKERING; PORTER; HULL e DRIFE, 1982; KAN-DAWOOD e DAWOOD, 1983). Nos ovários a ocitocina parece ser sintetizada localmente, havendo uma tendência dos pesquisadores em localizar a síntese no corpo lúteo, uma vez que sua concentração, neste local, é elevada em comparação ao parênquima ovariano. Estes dados sugerem uma função luteínica à ocitocina (WATHES et alii, 1982; KAN-DAWOOD e DAWOOD, 1983;

KAN DAWOOD et alii, 1984).

Dosando-se a ocitocina em pares de ovários removidos de "cynomolgus monkey" (*Macaca fascicularis*) ao longo da fase luteínica do ciclo (dias 12-14 da fase lútea ou dias 26-28 do ciclo menstrual), observou-se uma maior concentração de ocitocina e neurofisina em ovários que não apresentavam corpo lúteo, em comparação a ovários que o apresentavam. Estes resultados sugerem que a ocitocina ovariana não está confinada especificamente a uma função luteínica em primatas (AMICO e ZELEZNIK, 1990).

Embora a ocitocina apresente a propriedade de contrair o útero, sendo utilizada também para induzir o trabalho de parto e controlar hemorragias obstétricas, a sua função na iniciação e manutenção do trabalho de parto normal em humanos ainda não está bem estabelecida (FUCHS, 1986; KUWABARA; TAKEDA; MIZUNO e SAKAMOTO, 1987).

Acredita-se que a ocitocina desempenhe uma função fisiológica no início e manutenção do trabalho de parto em humanos. O hormônio foi determinado em plasma e líquido amniótico durante a gestação. Sua concentração aumenta

gradualmente com o período de gestação e durante o primeiro estágio do trabalho de parto, alcançando um pico máximo de secreção durante o período expulsivo do parto (KUMARESAN; ANANDARANGAM; DIANZON e VASICKA, 1974; DAWOOD; YLIKORKALA; TRIVEDI e FUCHS, 1979).

Uma vez já iniciado o trabalho de parto em mulheres normais, a secreção da ocitocina materna aumenta e alcança níveis máximos no momento do nascimento. A contração do útero origina um reflexo que desencadeia uma liberação adicional de ocitocina, promovendo dessa maneira uma amplificação deste mecanismo (CHARD, 1977).

KUWABARA et alii (1987) observaram um aumento nos níveis plasmáticos de ocitocina ao longo do período de gestação não apresentando mudanças significativas de concentração no plasma venoso materno próximo ao início do parto, concluindo que este hormônio pode não estar relacionado com o início do parto, podendo atuar na manutenção e reforço no mecanismo do mesmo.

LEAKE; WEITZMAN; GLATZ e FISCHER (1981) não encontraram mudanças significativas na concentração de

ocitocina no plasma materno durante o trabalho de parto até o momento do nascimento da cabeça fetal, quando os níveis aumentam significativamente

A neurohipófise de fetos de cobaias parece ser muito ativa no período do nascimento (BURTON e FORSLING, 1972) e o alto nível de ocitocina do cordão umbilical sugere que a mesma seja produzida pela criança no trabalho de parto, podendo ser este um mecanismo pelo qual o feto contribui para sua própria expulsão (CHARD; BOYD e HUDSON, 1972).

A ocitocina pode atravessar a placenta de primatas em ambas as direções sem ser degradada (DAWOOD; LAURENSEN; TRIVEDI; YLIKORKALA e FUCHS, 1979).

O desencadeamento do trabalho de parto em todas as espécies, está associado a um pico de sensibilidade uterina ao hormônio (FUCHS; GOESCHEN; HUSSLEIN; RASMUSSEN e FUCHS, 1983 e CHAN; BEZERIN e DANIEL, 1988).

Os receptores específicos para a ocitocina no miométrio, encontram-se sobre a membrana das células musculares lisas (CRANSHAW; BRANDA; MATLEB e DANIEL, 1978). Em ratas

prenhes, o número de receptores miométriais e a sensibilidade à ocitocina aumentam pouco antes do parto (FUCHS; PERIYASAMI; ALEXANDROVA e SOLOFF, 1983; FUCHS, PERIYASAMI e SOLOFF, 1983; CHAN et alii, 1988);

Em humanos a densidade dos receptores é muito baixa em úteros de não gestantes. Durante a 13^ª e 17^ª semanas de gestação, a concentração destes receptores tanto no miométrio humano, como no de ratas, está correlacionada com mudanças na sensibilidade do útero à ocitocina (FUCHS; FUCHS; HUSSLEIN; FERNSTRÖM e SOLOFF, 1984).

Os receptores para a ocitocina também foram encontrados na decídua parietal removida de úteros grávidos humanos (FUCHS; FUCHS; HUSSLEIN; SOLOFF e FERNSTRÖM, 1982; FUCHS et alii, 1984). As células da decídua não são contráteis, sendo as funções desses receptores obscuras. Pode ser que esses receptores mediem uma interrelação entre ocitocina e prostaglandinas nestas células (FUCHS, 1987).

Quando se injeta ocitocina (³H) em ratas, 35% de sua radioatividade é eliminada pelos rins, além de se distribuir no fígado, concluindo que os principais órgãos envolvidos na

depuração de ocitocina são os rins e fígado (AROSKAR; CHAN; STOUFFER; SCNEIDER; MURTI e VIEGNEAUD, 1964).

A injeção do hormônio de maneira descontínua em mulheres grávidas ocasiona uma queda rápida de sua concentração no sangue dessas pacientes (GONZÁLES-PANIZZA; SICA-BLANCO e MÉNDEZ-BAUER, 1961). Sua vida média é de um a três minutos, uma vez que o mesmo é excretado pelos rins ou inativado no sangue (MULLER, 1961).

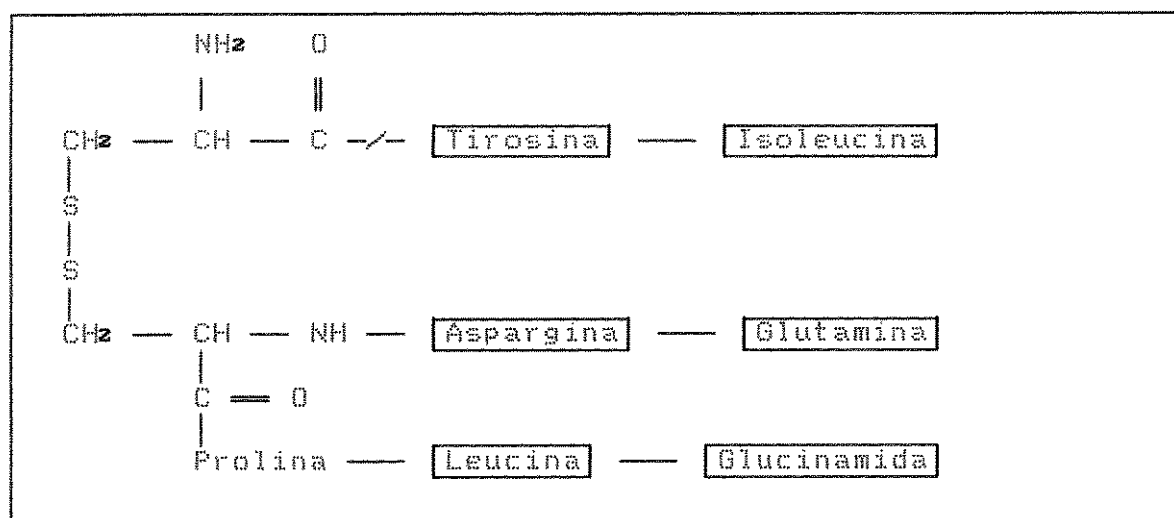
Muitos pesquisadores observaram que a ocitocina era degradada por substâncias enzimáticas. KUSTNER (1927), foi o primeiro a verificar que o soro de parturientes anulava a ação da "hipofisina" e que o soro de não gestantes não apresentava tal ação. FEKETE (1930) confirma tal observação, descrevendo que o soro de mulheres grávidas era capaz de modificar a estrutura química da ocitocina, perdendo esta sua ação sobre o útero e que tal processo ocorria mais rapidamente "in vivo" que "in vitro", sendo acentuada nos últimos meses de gestação.

A reação bioquímica que se desenvolvia no soro de gestantes permaneceu inexplicada até que Werle e EFFKEMENN (1941) observaram que esta era atribuída a um processo

enzímico. Esta enzima foi então denominada ocitocinase, porque apresentava a habilidade de hidrolisar o substrato fisiológico ocitocina estudaram o mecanismo de inativação da ocitocina através de uma técnica simples. Quando o ácido perfórmico atua sobre a ponte dissulfeto da ocitocina no componente cistina, ocorre uma oxidação e um único produto inativo é recuperado. Quando entretanto é inativada pelo soro de gestantes antes do ácido perfórmico ser adicionado, a análise cromatográfica revelou que, em adição a uma complexa cadeia polipeptídica aberta (contendo cisteína, ácidos aspártico e glutâmico, glicina, tirosina, prolina, leucina e isoleucina), uma considerável amostra de ácido cisteico foi recuperado. Concluíram então que a ocitocinase no soro de gestantes era uma aminopeptidase que atua na ligação peptídica entre as frações cistina e tirosina do hormônio - Figura 2 (TUPPY e NESVADBA, 1957; TUPPY, 1961; TOVEY, 1969). Ocitocinase e cistina aminopeptidase (CAP) são consideradas como sendo a mesma enzima (TUPPY e NESVADBA, 1957).

A ocitocinase ou cistina aminopeptidase pertence ao grupo das amino-acilpeptídeos hidrolases ou aminopeptidases que são classificadas dentro de um grande grupo de exopeptidases (LAMPELO e VANHA-PERTTULA, 1979).

Figura 2: Sequência de aminoácidos da ocitocina, ilustrando os sítios de clivagem entre a cistina e a tirosina pelo soro de gestantes (TITUS, REYNOLDS, GLENDENING e PAGE, 1960).



A ocitocinase ou cistina aminopeptidase pertence ao grupo das amino-acilpeptídeos hidrolases ou aminopeptidases que são classificadas dentro de um grande grupo de exopeptidases (LAMPELO e VANHA-PERTTULA, 1979).

Usando métodos biológicos (MÉNDEZ-BAUER e CALDEYRO-BARCIA, 1957; TUPPY e NESVADBA, 1957; FITIZPATRICK,

RIAD, 1962; RIAD e SCANDRETT, 1962; MILLER; NAOR; MILKOVICH e SCHMITH, 1964; BABUNA e YENEN, 1966; LAMPELO e VANHA-PERTTULA, 1979), demonstrou-se que a ocitocinase do soro ou do plasma de gestantes é produzida pelo sinciciotrofoblasto placentário e sua concentração aumenta com o decorrer da gestação, alcançando valores máximos próximo ao termo e desaparecendo rapidamente após o parto (TUPPY, 1961; BABUNA e YENEN, 1966).

Outros estudos sugerem que a atividade da ocitocinase aumenta até a 38ª semana de gestação decaindo após este período (GOLUMB, 1976). Os níveis de tal enzima são usados como índice da função placentária (USUKI, 1987).

Várias aminopeptidases foram observadas em homogenatos placentários (LAMPELO e VANHA-PERTTULA, 1979; MIZUTANI; AKIYAMA; KURAUCHI; TAIRA; NARITA e TOMODA, 1986) bem como em soro de gestantes (ROY, YEANG e KOTTEGODA, 1984). A enzima usualmente conhecida, que quebra peptídeos leucina, é a leucina aminopeptidase (ROY e KARIM, 1963).

Uma série de substratos cromogênicos foram sintetizados a fim de se determinar bioquimicamente a ocitocinase e também a leucina aminopeptidase (LAP). O primeiro

Uma série de substratos cromogênicos foram sintetizados a fim de se determinar bioquimicamente a ocitocinase e também a leucina aminopeptidase (LAP). O primeiro substrato a ser sintetizado foi o glicil-alfa e beta-naftilamida e logo a seguir a alanil-alfa e beta-naftilamida (GOMORI, 1954; FOLK; BURSTONE, 1955). Mais tarde foi sintetizada a L-cistina -di-beta naftilamida, que é cindida pela ocitocinase, dando como produto da reação a beta naftilamida, que pode ser convertida em um componente de leitura colorimétrica (TUPPY e NESVADBA, 1957). Outros substratos foram ainda sintetizados como a L-cistina-p-nitroanilida (TUPPY; WISBAUER e WINTERSBERGER, 1962), s-benzil-cistina-beta-naftilamida (WINTERSBERGER; MULLER-HARTBURG e TUPPY, 1966; OUDHEUSDEN, 1972) e s-benzil-l-cistina-4-nitroalanida (TOVEY; DAWSON e FELLOWES, 1973).

Em gestações múltiplas (gemelares) o nível de ocitocinase plasmática é mais elevado quando comparado com gestações simples (MILLER et alii, 1964; RYDEN, 1972; CHRISTENSEN e HAGELID, 1975). Altos níveis de ocitocinase também foram observados em gestações prolongadas (LAMBRINOPOULOS, 1964) e em trabalho de parto prolongado

(MATHUR e WALKER, 1968), isto pode estar relacionado com a gênese da atividade uterina.

Gestantes com mola hidatiforme ou coriocarcinoma apresentam níveis de atividade ocitocinásica significativamente menores em relação a gestantes normais (BABUNA; YENEN; ERÖDZEN e ÜNER, 1970); sendo que mulheres não gestantes e homens apresentam uma concentração muito baixa de ocitocinase na circulação sanguínea (ROY e KARIM, 1983).

Mulheres portadoras de diabetes insípido podem apresentar trabalho de parto relativamente normais, inclusive aquelas que apresentam uma deficiência de ocitocina (CHARD, 1977).

Evidencia-se a importância da atividade ocitocinásica em gestantes, uma vez que sua falta pode levar ao aborto (BABUNA e YENEN, 1966).

O objetivo do presente trabalho foi dosar a ocitocinase no plasma de gestantes normais ao longo do período de gestação, com o intuito de comparar como a mesma se comportava em gestantes nulíparas e múltíparas. Para a dosagem

da enzima foi utilizado o método de BABUNA e YENEN (1966) como uma pequena modificação introduzida. Tal modificação consistiu na não adição da mistura HCl 0.36N + acetona e não utilização de uma câmara escura.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para a realização do presente trabalho foi sangue venoso, coletado de uma das veias do antebraço, com seringa e agulha descartáveis e previamente heparinizadas (Heparina "Cristália"), de pacientes em vários períodos de gestação, que compareciam ao setor pré-natal do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas do Hospital das Clínicas da Unicamp, a fim de serem submetidas à exames periódicos. Não se levou em consideração a cor, raça, nacionalidade, se nulíparas ou multíparas e suas idades estavam compreendidas entre dezoito e trinta e nove anos.

Em todos os casos, as gestantes não apresentavam qualquer processo patológico, uma vez que foram rigorosamente selecionadas pelo exame de suas fichas clínicas.

Colheu-se aproximadamente 5 ml de sangue, tomando-se todo o cuidado possível para evitar hemólise, uma vez que o hemolisado contém substâncias que interferem no resultado (PAGE, 1946; WERLE; SEMM e ENZENBACH, 1950; KANAZAWA, 1954; SEMM, 1955). O mesmo cuidado foi mantido com o material em

análise, nas manipulações subseqüentes.

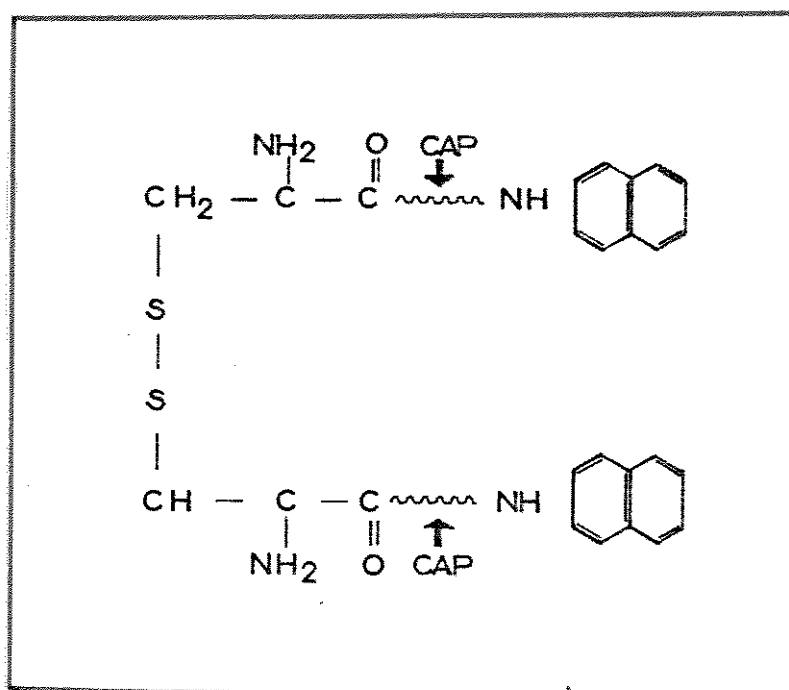
Após a coleta de sangue, este foi colocado em frascos refrigerados (0 a 4°C), prevenindo-se desta maneira a destruição da enzima.

Este material foi transportado para o laboratório e imediatamente submetido a centrifugação, em uma centrífuga clínica, modelo K da International Equipment Co (Needham, HTS Mass), a uma velocidade de 3000 rpm por um período de 15 minutos, com a finalidade de separar o plasma dos elementos figurados. A seguir, este foi estocado em freezer (-10°C) até o dia seguinte, quando procedeu-se a determinação da ocitocinase segundo BABUNA e YENEN (1966), introduzindo-se uma pequena modificação, baseando-se na determinação da leucina aminopeptidase (LAP) (ARST; MANNING e DELP, 1959). Tal modificação consistiu na eliminação do item relacionado à adição da mistura HCL 0.36N e acetona (2/1 volumes) e a não utilização da câmara escura.

O método colorimétrico para a determinação da ocitocinase depende da hidrólise do substrato (L-cistina-di-B-naftilamida) pela enzima presente no plasma,

liberando a B-naftilamina, produto que é colorido no final da reação. (Figura 3)

Figura 3 - Estrutura do substrato sintético L-cistina-di-B-naftilamida, mostrando os sítios de ação da cistina aminopeptidase. (RIAD, 1962)



Inicialmente, o experimento foi desenvolvido utilizando-se plasma de quarenta e três gestantes que se encontravam entre o terceiro e oitavo mês de gestação, distribuídas da seguinte maneira: Oito gestantes se encontravam no terceiro mês de gestação, sete gestantes no quarto mês, seis gestantes no quinto mês, nove gestantes no sexto mês, oito gestantes no sétimo mês e cinco gestantes no oitavo mês. Para a determinação do tempo de gestação, tomou-se por base a data da última menstruação.

Para observar como o método modificado se comportava, as dosagens das amostras foram submetidas a quatro situações diferentes, descritas abaixo:

Primeira: Sem utilização da mistura HCL 0.36N + acetona e sem utilização da câmara escura. (Situação - S1 método modificado)

Segunda: Sem utilização da mistura HCL 0.36N + acetona e com utilização da câmara escura. (Situação - S2)

Terceira: Com a utilização da mistura HCL 0.36N + acetona e sem utilização da câmara escura. (Situação - S3)

Quarta: Com utilização da mistura HCL 0.36N + acetona e com utilização da câmara escura. (Situação - S4 método original).

Verificamos que o método modificado no estudo preliminar não diferia do descrito por BABUNA e YENEN. Dosamos então a ocitocinase em duzentas e trinta amostras de plasma distribuídas da seguinte maneira: dezesseis amostras controles (nove de mulheres não gestantes e sete do sexo masculino). Oitenta e seis amostras plasmáticas de gestantes nulíparas distribuídas da seguinte maneira: Onze no segundo mês, nove no terceiro mês, nove no quarto mês, doze no quinto mês, dez no sexto mês, onze no sétimo mês, treze no oitavo mês e onze no nono mês. Cento e vinte e oito amostras plasmáticas de gestantes múltiparas distribuídas da seguinte maneira: Quatorze no segundo mês, doze no terceiro mês, dezesseis no quarto mês, treze no quinto mês, vinte e um no sexto mês, vinte e sete no sétimo mês, quatorze no oitavo mês e onze no nono mês.

A técnica desenvolvida foi a seguinte: 0.4 ml de plasma de gestantes isento de hemólise, foram diluídos em 0.6

ml de água bi-destilada e 2.0 ml de tampão veronal pH 7.9 (20.67 ml de barbital sódico 0.1N em água isenta de CO₂ + 9.33 ml de HCL 0.1N + 15 ml de água bi-destilada). Desta mistura tomamos 0.75 ml para dois tubos de centrifuga, aos quais foram adicionados 0.25 ml de substrato (0.027 gramas de L-cistina-di-B-naftilamida + 10 ml de HCL 0.012N com leve aquecimento + 10 ml de água bi-destilada). Em um dos tubos, adicionamos imediatamente 1 ml de ácido tri-cloro-acético, agitando-se intensamente, a fim de se impedir o desenvolvimento da reação enzimica e promover a precipitação de proteínas. Este foi o chamado controle "zero". O outro tubo, denominado "teste", foi colocado juntamente com o tubo "zero" em banho maria à $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, por um período de duas horas, após o que a reação foi suspensa com adição do ácido tri-cloro-acético, agitando-se intensamente da mesma maneira que o controle "zero". Ambos os tubos, "zero" e "teste", foram submetidos a centrifugação a uma velocidade de 3000 rpm durante quinze minutos. Os procedimentos subsequentes foram os mesmos para ambos os tubos. Transferimos 1 ml de sobrenadante para outro tubo de ensaio, adicionando-se em cada um deles: 1 ml de nitrito de sódio 0.1% misturando-se por inversão e esperando-se dois minutos; o nitrito de sódio dissocia a B-naftilamida em B-naftilamina. Adicionamos 1 ml de ácido amido sulfônico 0.5%,

misturando-se também por inversão e esperando-se igualmente dois minutos; este ácido destrói o excesso de nitrito de sódio. Finalmente, foram adicionados 2.0 ml de N-1-(Naftil)-etileno-diamino-di-hidroclorato 0.05% em álcool etílico PA à 96% misturados por inversão, deixando-se em repouso por vinte minutos à temperatura ambiente, tempo suficiente para o desenvolvimento da cor azul violeta. Após esse período, ambos os tubos foram levados à leitura de intensidade de coloração para um aparelho espectrofotômetro (Spectronic 20) da Bausch & Lomb, a um comprimento de onda de 565 m μ em transmitância. O resultado foi transformado em densidade óptica (D. O.) com auxílio de tabela e a seguir os cálculos foram feitos da seguinte maneira:

$$D.O.teste - D.O.zero = D.O. da ocitocinase$$

Dos reagentes citados acima, com exceção do nitrito de sódio, que deve ser preparado diariamente, os demais podem ser estocados em frasco âmbar, por um período de duas semanas em refrigerador à 4°C.

As etapas do processo de determinação da cistina aminopeptidase estão ilustradas na Figura 4.

Para a análise dos resultados obtidos, foram empregadas as análises descritiva, multivariada na determinação da metodologia de dosagens e análises descritiva e de regressão para estudar o efeito das múltiplas e nulíparas nas concentrações enzimáticas. As análises foram realizadas utilizando "Statistical Analysis System" (SAS) e "Software" Científico (SOC) do Embrapa, NTIA.

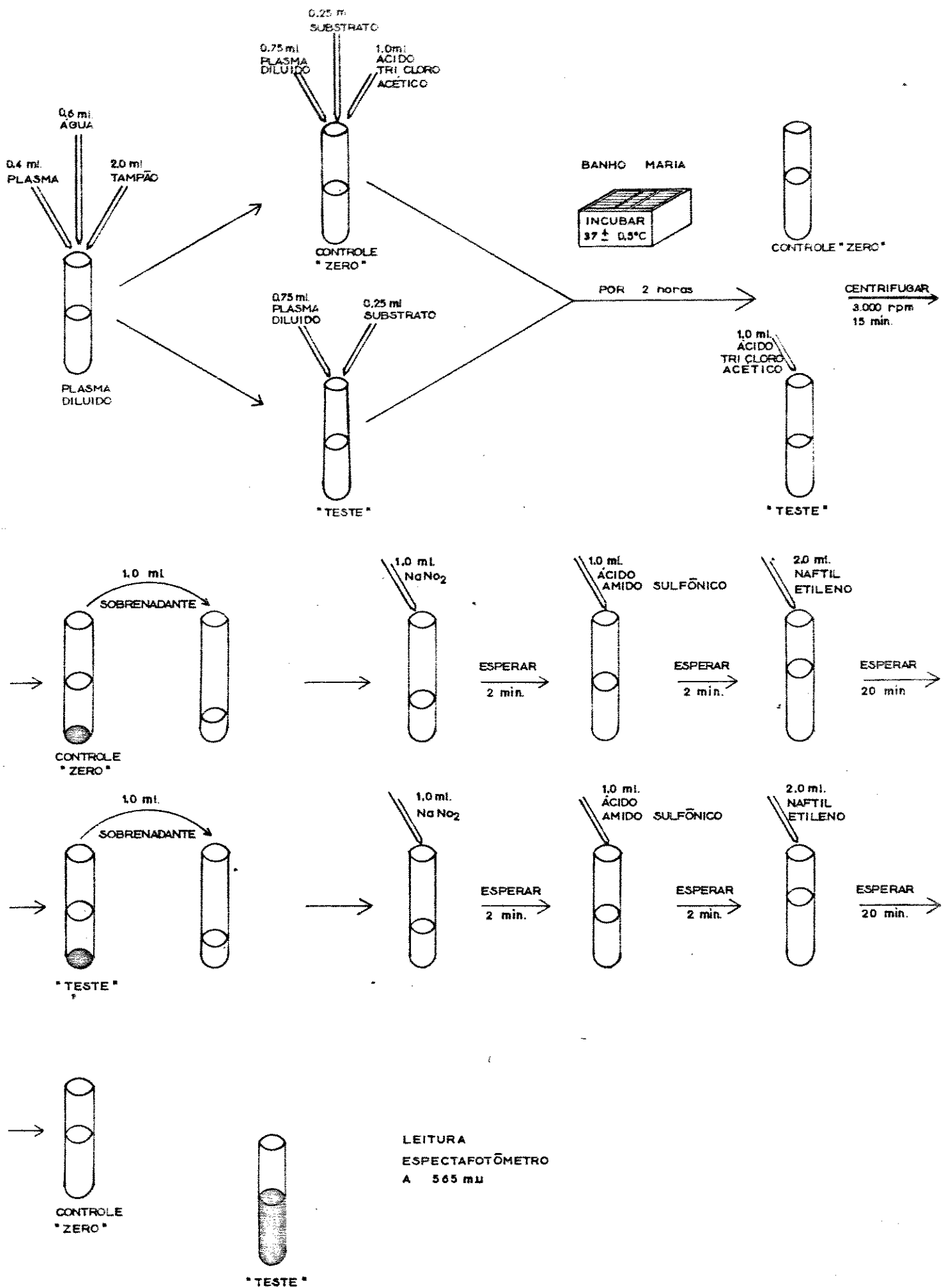


FIG. 4 PROCESSO DE DETERMINAÇÃO DA CISTINA AMINOPEPTIDASE

RESULTADOS

Na primeira etapa do trabalho observamos como o método de BABUNA e YENEN (1966) modificado se comportava na determinação colorimétrica da ocitocinase plasmática. Foram utilizadas amostras de sangue de quarenta e três gestantes que se encontravam entre o terceiro e oitavo mês de gestação, como mencionado anteriormente.

Primeiramente realizamos uma análise descritiva dos dados, utilizando o pacote "Statistical Analysis System" (SAS) para microcomputadores. A tabela 1 apresenta alguns resultados como média, desvio padrão, mínimo, máximo e erro padrão das dosagens da enzima em cada uma das quatro situações experimentais que denotamos por: S1, S2, S3 e S4 (já descritas na página 20).

Tabela 1: Alguns resultados das dosagens nas quatro situações.

Variável	N	Média	D. Padrão	Mínimo	Máximo
S ₁	43	0.1880	0.1464	0.0260	0.5090
S ₂	43	0.1896	0.1473	0.0210	0.5070
S ₃	43	0.1890	0.1465	0.0230	0.5050
S ₄	43	0.1889	0.1469	0.0270	0.5100

As médias das dosagens são muito semelhantes (aproximadamente 0.189) os desvios padrões são também semelhantes (aproximadamente 0.146).

A seguir apresentamos a tabela 2 com cálculos estatísticos descritivos calculados por grupos de gestantes classificadas segundo o mês de gestação.

Tabela 2: Cálculos estatísticos descritivos das dosagens de ocitocinase nas quatro situações por mês de gestação

MESG	Variáv.	N	Mínimo	Máximo	Média	D.Padr.	E padr.
3	S ₁	8	0.026	0.042	0.0336	0.0057	0.0020
	S ₂	8	0.021	0.041	0.0340	0.0069	0.0024
	S ₃	8	0.023	0.041	0.0342	0.0059	0.0021
	S ₄	8	0.027	0.040	0.0346	0.0048	0.0017
4	S ₁	7	0.071	0.088	0.0774	0.0064	0.0024
	S ₂	7	0.070	0.100	0.0796	0.0098	0.0037
	S ₃	7	0.070	0.093	0.0781	0.0082	0.0031
	S ₄	7	0.068	0.087	0.0766	0.0068	0.0026
5	S ₁	6	0.090	0.161	0.1143	0.0291	0.0119
	S ₂	6	0.088	0.157	0.1125	0.0272	0.0111
	S ₃	6	0.090	0.160	0.1148	0.0276	0.0113
	S ₄	6	0.089	0.165	0.1112	0.0297	0.0121
6	S ₁	9	0.158	0.250	0.1854	0.0301	0.0100
	S ₂	9	0.157	0.253	0.1873	0.0321	0.0107
	S ₃	9	0.158	0.240	0.1861	0.0285	0.0095
	S ₄	9	0.160	0.255	0.1901	0.0337	0.0112

Tabela 2: Cálculos estatísticos descritivos das dosagens de ocitocinase nas quatro situações por mês de gestação

MESG	Variáv.	N	Mínimo	Máximo	Média	D.Padr.	Erro Padr.
7	S ₁	8	0.260	0.445	0.3199	0.0704	0.0249
	S ₂	8	0.257	0.430	0.3235	0.0668	0.0236
	S ₃	8	0.267	0.433	0.3207	0.0656	0.0232
	S ₄	8	0.270	0.440	0.3205	0.0651	0.0230
8	S ₁	5	0.447	0.509	0.4720	0.0253	0.0113
	S ₂	5	0.450	0.507	0.4752	0.0226	0.0101
	S ₃	5	0.453	0.505	0.4752	0.0210	0.0094
	S ₄	5	0.449	0.510	0.4740	0.0243	0.0108

MESG = Mês de gestação

Notamos que dentro de cada grupo a média das doses de ocitocinase nas quatro situações experimentais não diferem, mas essas médias diferem de um grupo para outro, crescendo à medida que cresce o mês de gestação, o que seria de se esperar.

For se tratar de medidas tomadas nas mesmas pacientes nas quatro situações experimentais, estudamos a estrutura de correlação das doses nas quatro situações experimentais. A tabela 3 nos fornece os coeficientes de correlação de Pearson

(GOMES, 1963) e os correspondentes níveis descritivos dos testes de significância, calculados para as doses de ocitocinase nas situações (S1, S2, S3, S4) duas a duas.

Tabela 3: Coeficiente de Correlação de Pearson/Prob > |R| sob $H_0: \rho = 0$.

	S1	S2	S3	S4
S1	1.00000 0.0000	0.99935 0.0001	0.99959 0.0001	0.99908 0.0001
S2	0.99935 0.0001	1.00000 0.0000	0.99954 0.0001	0.99899 0.0001
S3	0.99959 0.0001	0.99954 0.0001	1.00000 0.0000	0.99916 0.0001
S4	0.99908 0.0001	0.99899 0.0001	0.99916 0.0001	1.00000 0.0000

Observou-se na tabela acima que as doses de ocitocinase estão correlacionadas significativamente nas quatro situações experimentais, tomadas duas a duas.

Para investigarmos ainda mais as variáveis em estudo

foram calculadas as diferenças entre as dosagens nas situações usuais (S2, S3 e S4) e da dosagem na situação comum. Essas diferenças foram denotadas por D_1 , D_2 e D_3 respectivamente. A tabela 4 apresenta cálculos simples dessas diferenças.

Tabela 4: Cálculos das diferenças das dosagens.

Variáv.	N	Mínimo	Máximo	Média	Desv. Padr.	Erro Padr.
D1	43	-0.012	0.015	-0.0016	0.0054	0.0008
D2	43	-0.010	0.012	-0.0010	0.0042	0.0006
D3	43	-0.020	0.024	-0.0009	0.0063	0.0010

O teste t para testar significância das diferenças de observações pareadas D_1 , D_2 e D_3 , resultou não significante: a) para diferença das doses na situação 1 e 2: $t=-1.95$, $p=0.057$; b) para diferença das doses na situação 1 e 3: $t=-1.529$, $p=0.1338$; c) para diferença das doses na situação 1 e 4: $t=-0.968$, $p=0.3384$.

A tabela 5 nos fornece os cálculos das diferenças das doses D_1 , D_2 e D_3 por mês de gestação.

Tabela 5: Cálculos das diferenças das dosagens por mês de gestação.

MESG	Variáv.	N	Mínimo	Máximo	Média	D.Padr.	E.padr.
3	D1	8	-0.005	0.005	-0.0004	0.0032	0.0011
	D2	8	-0.003	0.003	-0.0006	0.0026	0.0009
	D3	8	-0.005	0.002	-0.0010	0.0021	0.0007
4	D1	7	-0.012	0.003	-0.0021	0.0052	0.0019
	D2	7	-0.005	0.002	-0.0007	0.0026	0.0010
	D3	7	-0.002	0.003	0.0008	0.0014	0.0007
5	D1	6	-0.002	0.006	0.0018	0.0032	0.0013
	D2	6	-0.004	0.004	-0.0005	0.0031	0.0013
	D3	6	-0.004	0.024	0.0031	0.0106	0.0043
6	D1	9	-0.010	0.003	-0.0019	0.0036	0.0012
	D2	9	-0.010	0.010	-0.0007	0.0052	0.0017
	D3	9	-0.020	0.007	-0.0047	0.0075	0.0025
7	D1	8	-0.011	0.015	-0.0036	0.0088	0.0031
	D2	8	-0.007	0.012	-0.0009	0.0060	0.0021
	D3	8	-0.010	0.009	-0.0006	0.0068	0.0024
8	D1	5	-0.012	0.003	-0.0032	0.0061	0.0027
	D2	5	-0.009	0.004	-0.0032	0.0049	0.0022
	D3	5	-0.008	0.001	-0.0020	0.0025	0.0011

Desde que as doses nas quatro situações experimentais são correlacionadas, optamos por analisar os dados através de métodos de análise multivariada.

Na primeira análise consideramos as doses nas quatro situações como variáveis de análise e grupos de gestantes correspondentes a mulheres que se encontravam entre o terceiro ao oitavo mês de gestação para verificar:

- 1) se as diferenças das dosagens entre os grupos se mantinham constantes nas quatro situações experimentais (hipótese de interação entre o grupo e situação experimental);
- 2) se existem diferenças entre os grupos de gestantes;
- 3) se existem diferenças entre situações experimentais. Este tipo de análise é denominado análise de perfis, isto é, quer se estudar o perfil de cada grupo nas quatro situações experimentais.

Verificamos os seguintes resultados na análise dos perfis:

- 1) não significativa interação entre grupos de gestantes e situação experimental.
- 2) significantes diferenças entre grupos:
 $F=139.28$, $gl\ num=5$, $gl\ den=37$, $p=0.0001$

3) não significantes diferenças entre situações:

$F=1.22$, gl num=3, gl den=35, $p=0.317$

Uma vez observado que a metodologia descrita em materiais e métodos não diferia da descrita por BABUNA e YENEN (1966), prosseguimos o estudo para verificar o efeito de múltiparas e nulíparas na ocitocinase, utilizando o método proposto como método de dosagem. Dosamos então a ocitocinase plasmática em dezesseis amostras controles (sete masculinas e nove femininas), em oitenta e seis amostras sanguíneas de gestantes nulíparas e em cento e vinte e oito amostras de gestantes múltiparas.

Em primeiro lugar, calculamos as dosagens (DO) nos dois grupos controles masculino e de mulheres não gestantes. Os resultados estão ilustrados na tabela 6.

Tabela 6: Cálculos das dosagens de ocitocinase nos grupos controles masculinos e femininos.

Sexo	N	Média	Desv.Padr.	Er.Padr.	Mínimo	Máximo
masc	7	0.0005	0.0005	0.0005	0.0000	0.0013
fem	9	0.0005	0.0002	0.0001	0.0000	0.0013

A seguir, apresentamos cálculos das dosagens de ocitocinase (DO) em gestantes múltiparas (ml) e nulíparas (nl), por mês de gestação. Tabela nº 7.

Tabela 7: Cálculos das dosagens de ocitocinase por mês de gestação e por grupo.

Mês	GR	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
2	ml	14	0.0401	0.0013	0.0004	0.0381	0.0419
2	nl	11	0.0559	0.0023	0.0007	0.0511	0.0585
3	ml	12	0.0550	0.0164	0.0047	0.0265	0.0773
3	nl	9	0.0936	0.0196	0.0065	0.0551	0.1266
4	ml	16	0.0950	0.0376	0.0094	0.0573	0.1944
4	nl	9	0.1605	0.0201	0.0067	0.1163	0.1820
5	ml	13	0.1432	0.0359	0.0100	0.0683	0.2196
5	nl	12	0.2302	0.0035	0.0010	0.2247	0.2347
6	ml	21	0.1862	0.0485	0.0106	0.0854	0.2560
6	nl	10	0.2978	0.0180	0.0057	0.2618	0.3180
7	ml	27	0.3007	0.0701	0.0135	0.1347	0.4141
7	nl	11	0.4607	0.0528	0.0159	0.3382	0.5323
8	ml	14	0.6470	0.0902	0.0241	0.4619	0.7510
8	nl	13	0.6439	0.0931	0.0258	0.4619	0.7510
9	ml	11	0.8369	0.0674	0.0203	0.7564	0.9354
9	nl	11	0.8369	0.0674	0.0203	0.7564	0.9354

GR = Grupo

ml = múltiparas

nl = nulíparas

O gráfico das médias das dosagens de ocitocinase (DO) por mês de gestação (Gráfico 1), nos fornece uma indicação

da tendência das mesmas, bem como das diferenças entre as gestantes nulíparas e múltíparas. Verificamos uma tendência de crescimento quadrática nas nulíparas como nas múltíparas e também tendências paralelas, indicando possíveis diferenças entre nulíparas e múltíparas, com nulíparas apresentando níveis enzimáticos superiores a das múltíparas.

Para finalizar a análise descritiva dos dados, estudamos as diferenças entre as dosagens nas gestantes múltíparas e nulíparas em cada mês da gestação. Para isso, verificamos primeiro a homogeneidade das variâncias das dosagens de ocitocinase (DO) entre nulíparas e múltíparas, em cada mês, através do teste de Bartlett (BONINI e BONINI, 1972) e em seguida verificamos as diferenças das médias dos níveis de ocitocinase entre nulíparas e múltíparas, para cada mês de gestação através do teste t de Student (GOMES, 1963). Comparamos também o controle feminino (cfem) com nulíparas (nl(2)) e múltíparas (ml(2)) no segundo mês de gestação, utilizando os testes acima. Os resultados estão sumarizados na tabela 8.

Tabela 8: Resultados dos testes de Bartlett e t de Student.

Mês de Gest.	Teste de Bartlett			Teste t de Student		
	F	GL	P	T	GL	P
c fem x ml (2)	7.65	(13.8)	0.0072	-104.8	17.6	0.0001
c fem x nl (2)	24.62	(10.8)	0.0001	- 77.6	11.0	0.0001
2	3.22	(10.13)	0.0519	-21.72	23.0	0.0000
3	1.43	(8.11)	0.5720	- 4.91	19.0	0.0001
4	3.49	(15.8)	0.0799	-4.824	23.0	0.0001
5	103.9	(12.11)	0.0000	-8.689	12.3	0.0001
6	7.27	(20.9)	0.0044	-9.29	28.0	0.0001
7	1.77	(26.10)	0.3484	-6.798	36.0	0.0000
8	1.07	(12.13)	0.9065	0.088	25.0	0.9307
9	1.00	(10.10)	1.0000	0.000	20.0	1.0000

F=teste F

P=nível descritivo do teste

GL=grau de liberdade

Conforme os resultados da tabela acima as diferenças entre as médias das gestantes nulíparas e múltíparas foram significativas até o sétimo mês de gestação (valor de $P < 0.05$, última coluna da tabela 8).

A seguir, ajustamos um modelo de regressão (GOMES, 1963) considerando dose como variável dependente e semanas de gestação como variável independente tanto para nulíparas como

para múltíparas. O modelo considerado foi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1.X_{i1} + \beta_2.X_{i2} + \beta_3.X_{i2}^2 + \beta_4.X_{i1}.X_{i2} + \beta_5.X_{i1}.X_{i2}^2$$

(Mod 1)

onde,

β_j , $j = 1, 2, \dots, 5$ são os parâmetros desconhecidos

X_{i1} indica grupo (Nulíparas = 1, Múltíparas = 0)

X_{i2} indica semana de gestação

e_i é o erro, independentes, e $e_i \sim N(0, \sigma^2)$, $i = 1, 2, \dots, n$

A função resposta para este modelo, para o grupo das múltíparas ($X_1 = 0$) pode ser escrita por:

$$E(Y) = \beta_0 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_2^2 \quad (\text{Mod 2})$$

E para o grupo das nulíparas por:

$$E(Y) = (\beta_0 + \beta_1) + (\beta_2 + \beta_4).X_2 + (\beta_3 + \beta_5).X_2^2 \quad (\text{Mod 3})$$

A etapa seguinte teve por finalidade verificar se o modelo quadrático se ajustava aos dados e se existiam diferenças significativas entre o modelo ajustado para as

nulíparas e múltiparas. Em termos estatísticos necessitamos estimar os parâmetros e verificar se estes são diferentes de zero (ajuste do modelo) e testar $\beta_1 = \beta_4 = \beta_5 = 0$ para verificar as diferenças entre nulíparas e múltiparas.

Apresentamos a seguir a análise de variância (GOMES, 1963) para o mod 1.

Análise de Variância para o modelo 1:

1. NULÍPARAS E MULTÍPARAS:

Análise de Variância					
fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob > F
Modelo	5	13.80182	2.76036	732.003	0.0001
Erro	208	0.78436	0.00377		
Total	213	14.58618			
Raiz EQM		0.06141		R ²	0.9462
Média		0.30927		R ² Aj.	0.9449
C. V.		19.85574			

EQM = erro quadrático médio

CV = coef. de variação

R² = coef. de determinação

GL = grau de liberdade

AJ = ajustado

Parâmetros Estimados

Variável	GL	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0 Parâmetro=0	Prob> T
β_0	1	0.459521	0.04181322	10.990	0.0001
β_1	1	-0.205099	0.06663787	-3.078	0.0024
β_2	1	-0.051664	0.00367572	-14.055	0.0001
β_3	1	0.001531	0.00007381	20.746	0.0001
β_4	1	0.023545	0.00580732	4.054	0.0001
β_5	1	-0.000442	0.00011500	-3.847	0.0002

GL = grau de liberdade

A análise de variância acima indica que o modelo de regressão (Mod. 1) se ajusta aos dados uma vez que apresenta alto valor do coeficiente de determinação R-square (R-square(R^2)=0.9462) e teste do ajuste do modelo (todos os β iguais a zero simultaneamente) revelou-se significante, com $F=732.00$ ($F=0.0001$). Os parâmetros também foram testados um a um e foram significativamente diferentes de zero ao nível de significância de 5%. O teste para verificar se os grupos são significativamente diferentes formulado por $H_0: \beta_1 = \beta_4 = \beta_5 = 0$ resultou em $F=28.1964$ com $GL(\text{num})=3$, $GL(\text{den})=208$ e $F=0.0001$, portanto significativamente diferentes ao nível de 5%. O ajuste do modelo foi também analisado pelo gráfico dos valores estimados através do modelo 1 (Gráfico 2), que revela que os

valores preditos pelo modelo de regressão 1 se aproxima bastante do gráfico que apresenta as médias das doses em cada mês pelas gestantes nulíparas e múltíparas (Gráfico 1).

As análises de variâncias e os estimadores dos parâmetros para cada grupo estão representadas a seguir:

2. MULTÍPARAS:

Análise de Variância

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob>F
Modelo	2	7.39046	3.69523	693.197	0.0001
Erro	125	0.66634	0.00533		
Total	127	8.05680			
Raiz EQM		0.07301	R^2	0.9173	
Média		0.27264	R^2 Aj.	0.9160	
C. V.		26.77999			

EQM = erro quadrático médio

AJ = ajustado

CV = coeficiente de variação

GL = grau de liberdade

R^2 = coeficiente de determinação

AJ = ajustado

Parâmetros Estimados

Variável	GL	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H0 Parâmetro=0	Prob> T
β_0	1	0.459521	0.04971406	9.243	0.0001
β_1	1	-0.051664	0.00437027	-11.682	0.0001
β_2	1	0.001531	0.00008776	17.449	0.0001

GL = grau de liberdade

Pelas razões apresentadas acima (alto valor de R-square (R^2 = coeficiente de determinação), teste do ajuste do modelo significativo) e gráfico dos valores preditos pelo modelo quadrático e valores observados (Gráfico 3), podemos concluir que o modelo quadrático se ajusta aos dados dos grupos de gestantes múltiplas. A função de regressão pode ser estimada por: $E(Y) = 0.46 - 0.05X_2 + 0.0015X_2^2$, com X_2 = semana de gestação, para o grupo das múltiplas.

3. NULÍPARAS:

Análise de Variância

Fonte	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	Prob>F
Modelo	2	5.98383	2.99192	2104.052	0.0001
Erro	83	0.11802	0.00142		
Total	85	6.10185			
Raiz EQM		0.03771	R^2	0.9607	
Média		0.36380	R^2 Aj.	0.9802	
C. V.		10.36531			

EQM = erro quadrático médio

GL = grau de liberdade

CV = coeficiente de variação

AJ = ajustado

 R^2 = coeficiente de determinação

Parâmetros Estimados

Variável	GL	Parâmetro Estimado	Erro Padrão	T para H_0 Parâmetro=0	Prob> T
$\beta_0 + \beta_1$	1	0.254423	0.03186239	7.985	0.0001
$\beta_2 + \beta_4$	1	-0.028119	0.00276088	-10.185	0.0001
$\beta_3 + \beta_5$	1	0.001089	0.00005415	20.107	0.0001

GL = grau de liberdade

As mesmas conclusões realizadas para o ajuste do modelo quadrático para o grupo das múltiplas vale para o grupo

das nulíparas. O gráfico dos valores preditos e observados para o grupo das nulíparas (Gráfico 4) também revela o adequado ajuste do modelo quadrático. A função de regressão pode ser estimada por $E(Y) = 0.25 - 0.028X_2 + 0.0011X_2^2$ com $X_2 =$ semana de gestação para o grupo das gestantes nulíparas.

As doses da enzima nos controles (masculino e feminino) não diferem; entretanto a média das doses da enzima do grupo controle feminino difere significativamente da média apresentada pelo grupo das gestantes nulíparas e múltiparas no segundo mês de gravidez. As gestantes nulíparas apresentam uma concentração maior de ocitocinase plasmática do que as gestantes múltiparas e estudada, mês a mês, as diferenças entre elas são significantes em todos os meses estudados, exceto no oitavo e nono meses da gestação.

Existe um aumento na concentração plasmática da enzima nas gestantes ao longo do período de gestação. Essa tendência de aumento na concentração de ocitocinase plasmática em cada mês pode ser traduzida por um modelo de regressão quadrático, tanto para gestantes nulíparas quanto para múltiparas (Mod. 1).

GRÁFICO 1 : MÉDIA DE OCITOCINASE POR MÊS

+ = NULÍPARAS X = MULTÍPARAS

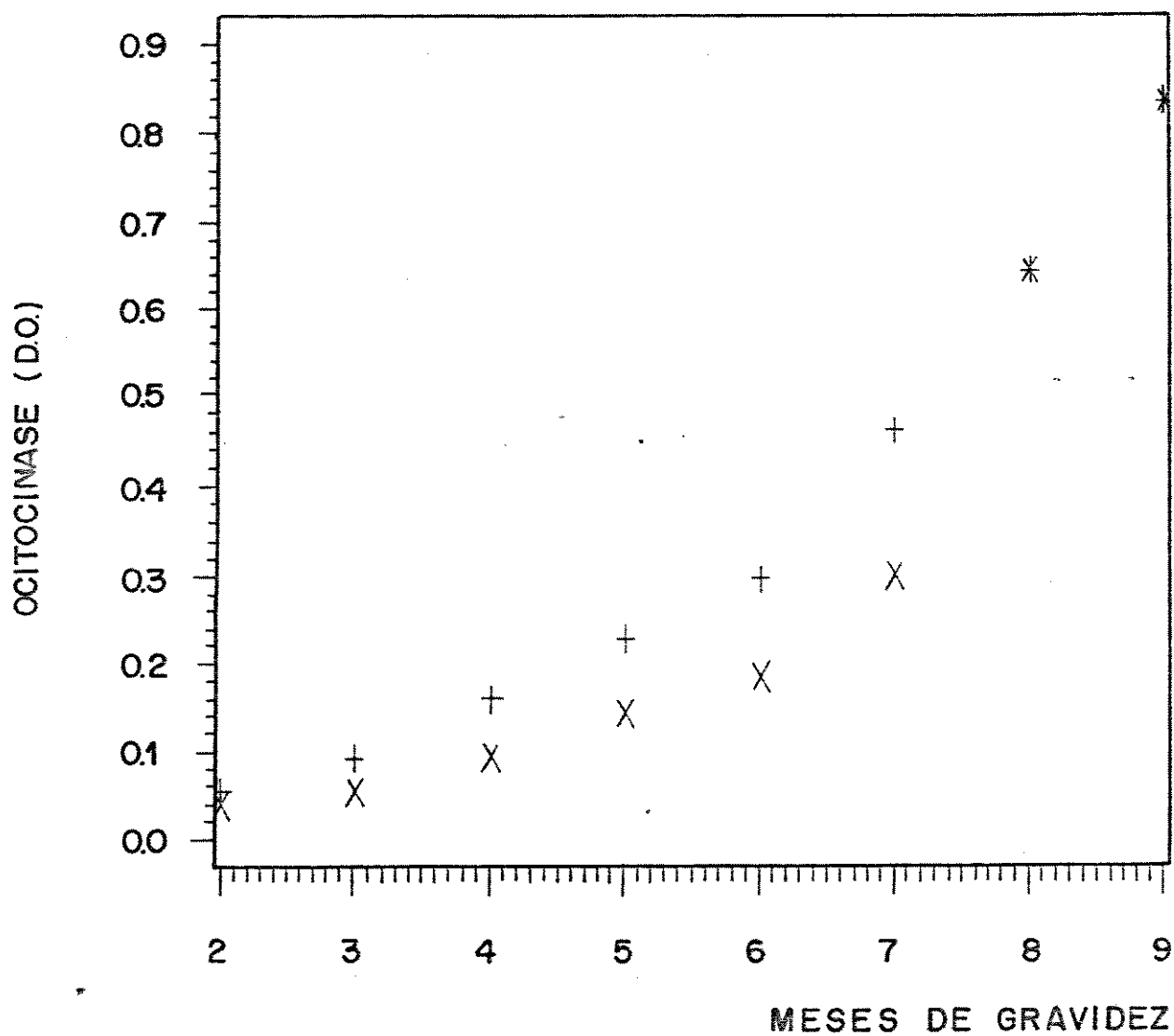


GRÁFICO 2: VALORES PREDITOS DE OCITOCINASE POR SEMANA

+ = NULÍPARAS

X = MULTÍPARAS

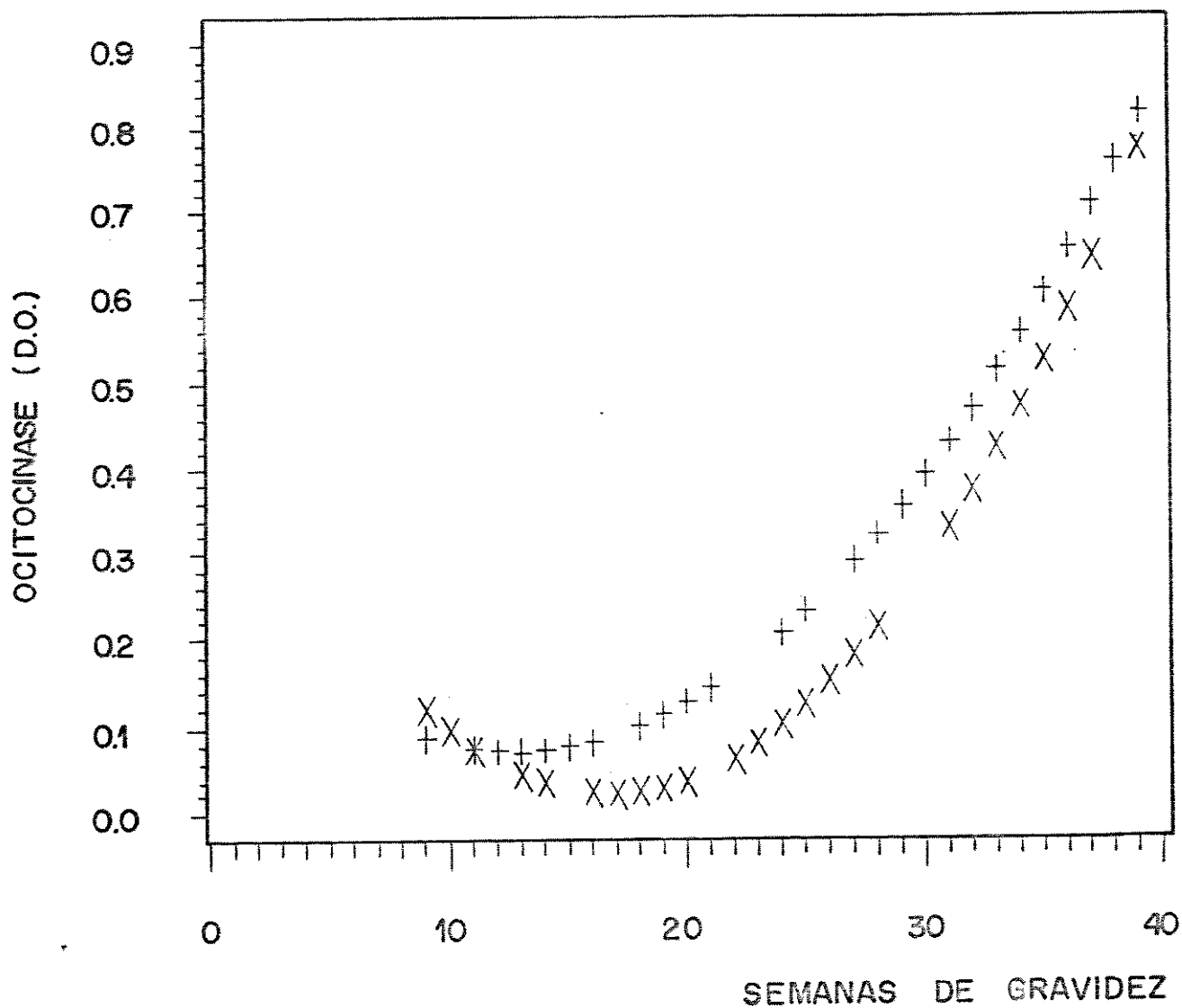
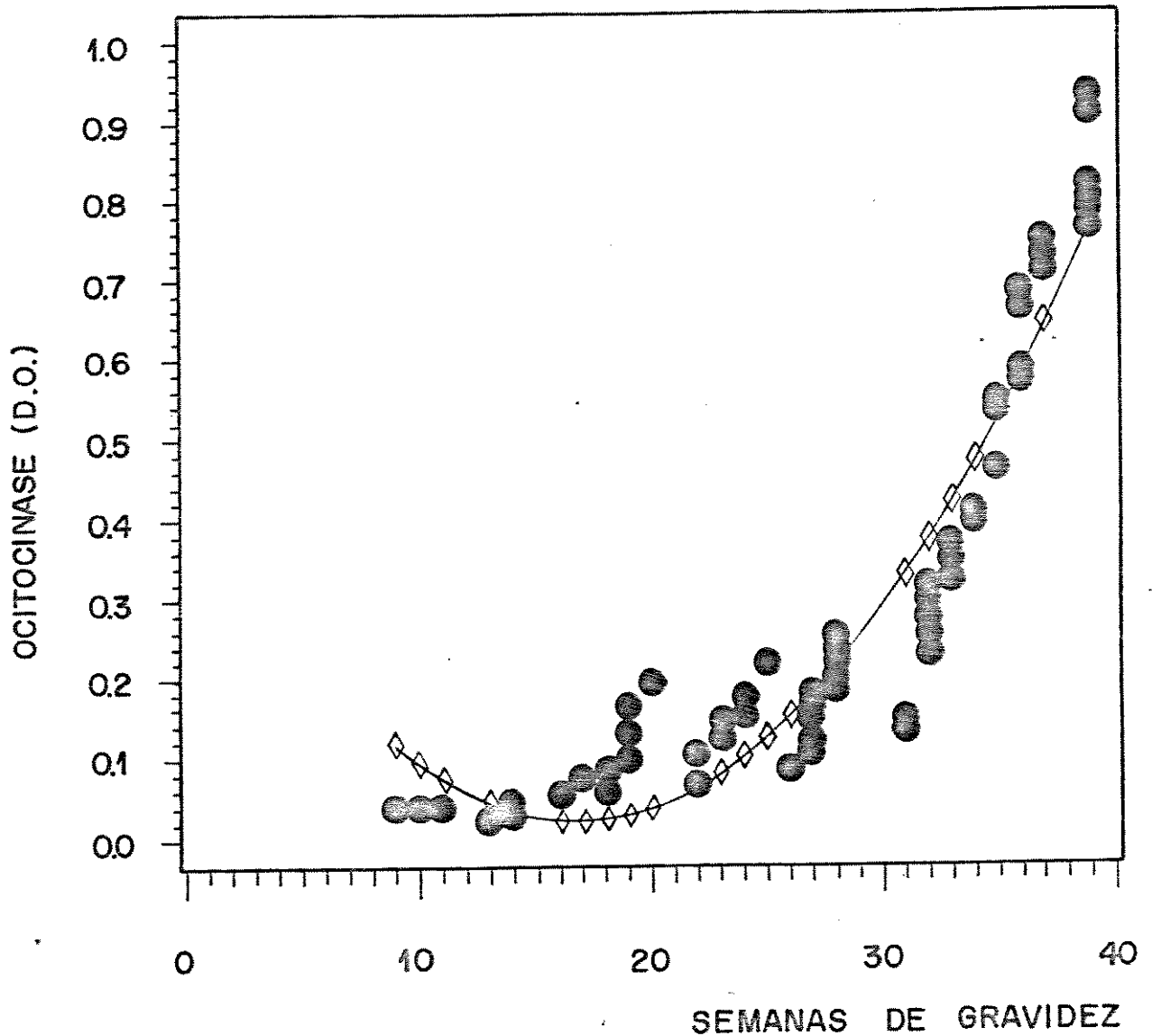
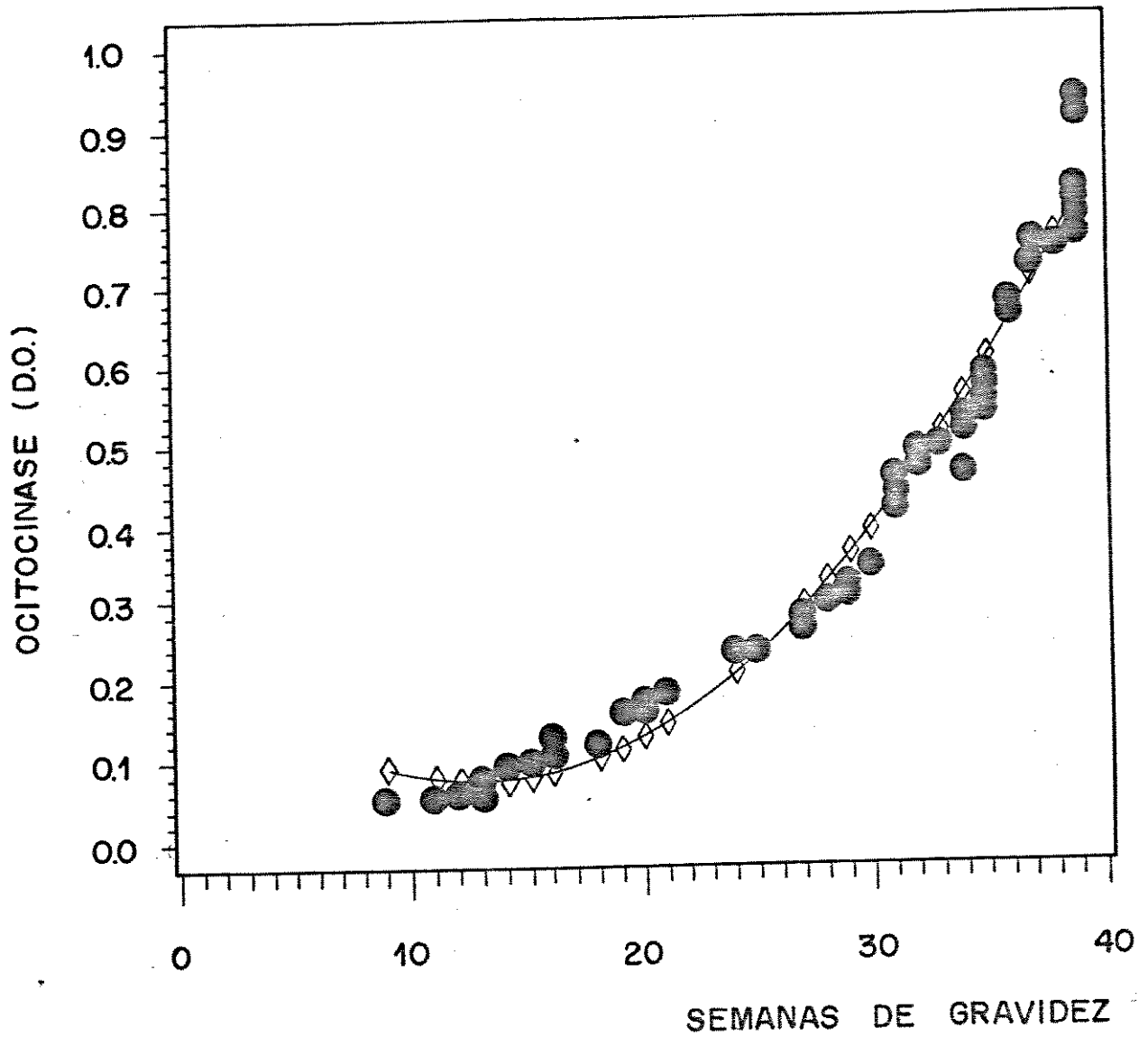


GRÁFICO 3 : VALORES PREDITOS E OBSERVADOS DE OCITOCINASE POR SEMANA EM MULTÍPARAS



◇ = VALORES PREDITOS
● = VALORES OBSERVADOS

GRÁFICO 4 : VALORES PREDITOS E OBSERVADOS DE OCITOCINASE POR SEMANA EM NULÍPARAS



◇ = VALORES PREDITOS

● = VALORES OBSERVADOS

DISCUSSÃO

Quanto à metodologia utilizada na presente investigação, frisamos inicialmente que tomamos a máxima cautela, para que pudéssemos trabalhar com a maior precisão possível a fim de excluirmos quaisquer artefatos de técnica os quais poderiam nos levar a falsas interpretações.

Como descrito na metodologia deste trabalho, primeiramente observamos como o método descrito por BABUNA e YENEN (1966) modificados, se comportava na determinação colorimétrica da ocitocinase no plasma de gestantes.

Para chegarmos a tal conclusão, submetemos a análise das amostras plasmáticas em quatro situações diferentes, como demonstradas anteriormente (página 20), para observarmos como as mesmas se comportavam.

No método original, BABUNA e YENEN (1966) adicionavam em cada tubo de ensaio HCl 0.36N + acetona, após estes já terem sido incubados com o substrato por duas horas em banho maria e

centrifugados. Uma vez adicionada esta mistura, os tubos foram então levados a uma sala semi escura, iluminada por uma pequena lâmpada vermelha, onde então o processo para coloração da β -naftilamina foi iniciado.

De acordo com os resultados obtidos, pudemos observar que estes itens não interferiram no resultado final, uma vez que os reagentes que estavam relacionados com o processo de determinação colorimétrica se comportavam da mesma maneira tanto em ambiente de semi escuridão, quanto naquele que apresentava iluminação natural. A vantagem de se utilizar o método modificado é que além de mais prático é também mais rápido que o anterior.

Para o desenvolvimento da presente metodologia, tomamos também por base o método para a determinação da atividade da leucina aminopeptidase no soro de gestantes (ARST et alii, 1959). Leucina aminopeptidase é uma enzima proteolítica necessária para a digestão terminal de peptídeos L-leucil, que ocorre principalmente na mucosa intestinal e em extratos de pâncreas. Os níveis desta enzima encontram-se elevados ao longo do período de gestação (LEWIS, 1962) e a

leucina aminopeptidase foi também demonstrada no líquido céfalo-raquidiano, suco gástrico, bile, secreções duodenais e fluídos pleurais e peritoniais (ARST et alii, 1959). As reações que se desenvolviam para a determinação da atividade enzimica da leucina aminopeptidase no soro de gestantes ou em outros fluídos corporais, baseava-se na hidrólise enzimática do substrato L-leucil- β -naftilamida e na determinação colorimétrica de um dos produtos, a β -naftilamina. O trabalho em questão não utilizava uma sala semi escura para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

A ocitocinase cuja ação resulta na perda do efeito biológico da ocitocina, também hidrolisa vários substratos sintéticos como a L-cistina-di- β -naftilamida (TUPPY e NESVADBA, 1957), L-cistina-bis-p-nitroanilida (TOVEY, 1969) e S-benzil-l-cistina-p-nitroanilida (SMALL e WATKINS, 1974).

A ocitocinase é também denominada vasopressinase, uma vez que a mesma apresenta a capacidade de degradar o hormônio vasopressina (KLIMEK, 1967).

A coloração máxima desenvolvida em cada tubo ocorre

durante o período de 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Esta coloração se mantém por vários dias, se as amostras forem estocadas no refrigerador (BABUNA e YENEN, 1966).

Na fase final do experimento, a densidade óptica determinada no tubo controle "zero" é então subtraída da densidade óptica encontrada nos respectivos tubos "testes". Os valores de ocitocinase presentes no soro são expressos numericamente de acordo com a densidade óptica encontrada. BABUNA e YENEN (1966) encontraram uma proporção direta das amostras de β -naftilamina liberadas pela reação enzimática. Com finalidade de deixar o método mais prático, os autores citados acima não viram a necessidade de um cálculo adicional nas amostras de β -naftilamina. Além disso, os resultados quando expressos em densidade óptica ilustram melhor as pequenas variações na atividade de ocitocinase do que quando estas são expressas em mg de β -naftilamina. Este método proporciona uma fácil observação de pequenas mudanças da atividade ocitocinásica.

A ocitocinase no soro de gestantes pode ser separada em duas isoenzimas por eletroforese sobre gel de amido ou

acrilamida gel (KLEINER e BROUET-YAGER, 1972).

KLEINER e BROUET-YAGER (1972) descreveram um método de coloração para isoenzimas da ocitocinase em policramida gel, usando como substrato a L-cistina-di- β -naftilamida e não observaram coloração para esta enzima em soro de pessoas do sexo masculino ou em mulheres não gestantes.

OYA ;WAKABAYASHI; YOSHINO e MIZUTANI (1976) em um estudo sobre o comportamento eletroforético de aminopeptidases da placenta humana, utilizando para a técnica de coloração Fast Blue BB como sal diazônio também observaram uma ausência de coloração no soro de pessoas não gestantes

LAMPELO e VANHA-PERTTULA (1979) caracterizaram a cistina aminopeptidase e arilamidase presentes na placenta humana. A separação das aminopeptidases placentárias foi realizada através de uma gel filtração e para análise de suas características bioquímicas e atividades hidrolíticas foram utilizados como substratos, respectivamente, a L-cistina-di- β -naftilamida e L-leucina- β -naftilamida. Os resultados finais desta pesquisa revelaram a presença de duas

cistinas aminopeptidases (CAP₁ e CAP₂) e duas arilamidases Ia e Ib, onde CAP₁ e CAP₂ são enzimas separadas com diferenças aparentemente nos sítios de reação. Os autores ainda em 1980 fracionaram e caracterizaram a cistina aminopeptidase e arilamidase no soro de gestantes humanas. A atividade de ambas as enzimas aumenta ao longo da gestação, sendo que a cistina aminopeptidase ou ocitocinase apresenta um aumento de 12.5 vezes e a arilamidase de 8.5 vezes. O soro de mulheres não gestantes apresentava uma arilamidase I que hidrolisava a L-leucina- β -naftilamida e a L-cistina-di- β -naftilamida e uma CAP II que hidrolisava apenas a L-cistina-di- β -naftilamida.

De acordo com essas observações sugere-se que a CAP I do soro materno é de origem placentária e que talvez seja a ocitocinase que é liberada para a circulação materna ao longo da gestação. Já a CAP II do soro materno apresenta propriedades semelhantes àsquelas da CAP II placentária e essa enzima parece ser distinta daquelas aminopeptidases previamente caracterizadas no soro. Uma vez que os soros controle e materno contêm essa cistina aminopeptidase que hidrolisa a L-cistina-di- β -naftilamida, um substrato sintético para ocitocinase. Outros estudos serão necessários para explorar

esse tecido de origem e sua função fisiológica no soro (LAMPELO e VANHA-PERTTULA, 1980).

Os níveis de ocitocinase na circulação são extremamente baixos em mulheres não gestantes e pessoas do sexo masculino, mas seus níveis aumentam ao longo do período de gestação alcançando níveis mais elevados próximo ao termo e desaparecendo rapidamente após o parto. Uma vez que esta enzima é sintetizada pela placenta, seus níveis no sangue materno são interpretados como valores para predizer uma insuficiência placentária (BABUNA e YENEN, 1966; PETRUCCO, CELLIER e FISHTALL, 1973 e HENSLEIGHT; CHATEAUM e SPELLACY, 1977).

O presente estudo confirma os dados apresentados acima, ilustrando um aumento nos níveis de ocitocinase plasmática ao longo do período de gestação onde os níveis máximos observados encontram-se no final do mesmo.

Quanto aos níveis da presente enzima em mulheres não gestantes ou pessoas do sexo masculino, observamos que estes se mantinham a níveis mínimos, demonstrando mais uma vez ser esta enzima característica da gestação. Para a presente análise das

amostras utilizadas como controle, estas foram obtidas de pessoas que não apresentavam qualquer tipo de patologia, sendo todas normotensas e no caso das mulheres não gestantes, estas apresentavam ciclo menstrual normal.

As concentrações quase nulas no plasma controle, pode ser devido ao pH utilizado na presente metodologia. De acordo com LAMPELO e VANHA-PERTTULA (1980), o soro de mulheres não gestantes apresentava uma cistina aminopeptidase II (CAP II) que hidrolisava o substrato L-cistina-di- β -naftilamida em pH 6.0. Na presente investigação, usamos pH 7.9 o que pode ter influenciado a determinação da enzima no plasma controle. Os autores acima observaram que a cistina aminopeptidase I (CAP I) encontrada no soro materno apresentava um pH ótimo igual a 6.5 para a hidrólise da L-cistina-di- β -naftilamida e pH 7.5 para a hidrólise da L-leucina- β -naftilamida.

Durante a gestação normal, o antagonismo entre ocitocina e ocitocinase está em favor da ocitocinase, enquanto que no início do trabalho de parto um excesso desse hormônio tem sido encontrado (LAMBRINOPOULOS, 1964).

Os níveis de ocitocinase no plasma materno encontram-se mais elevados em gestações múltiplas, quando comparados com gestações únicas. Acredita-se que esta enzima contribua para a quiescência da musculatura uterina ao longo da gestação e os altos valores enzimáticos encontrados em gestações gemelares suportam esta idéia. A grande distensão da parede uterina é um estímulo que produz um aumento na atividade desse órgão. Os altos níveis de ocitocinase podem ser interpretados como um mecanismo compensatório. A insuficiência desse mecanismo próximo ao final do período de gestação pode explicar a incidência de um trabalho de parto prematuro. Nestes casos a distensão do útero é um fator que excede os fatores inibitórios (ICHALIOTIS e LAMBRINOPOULOS, 1965).

Altos níveis de ocitocinase plasmática também foram encontradas em gestações prolongadas quando comparadas com gestações a termo (LAMBRINOPOULOS, 1964).

Gestantes portadoras de mola hidatiforme apresentam níveis menores de ocitocinase plasmática, quando comparadas a gestantes normais em idades de gestação correspondentes. A atividade de ocitocinase em pacientes com coriocarcinoma é

também muito pequena, podendo ser comparada à desprezível atividade observada em não gestantes e pessoas do sexo masculino. Os níveis de ocitocinase no soro não encontram-se relacionados ao peso placentário (ICHALIOTIS e LAMBRINOPOULOS, 1965).

Como descrito anteriormente, acredita-se que o hormônio ocitocina desempenha uma função fisiológica no início e manutenção do trabalho de parto. Uma vez que o útero aumenta sua sensibilidade a esse hormônio durante a gestação, alcançando um valor máximo pouco antes do nascimento. A ocitocina tem sido determinada em plasma e líquido amniótico de gestantes e sua concentração aumenta gradualmente com o período de gestação e o primeiro estágio do trabalho de parto, alcançando níveis máximos durante o período expulsivo do parto (DAWOOD et alii, 1979 b).

A ocitocina fetal também desempenha uma função significativa no trabalho de parto em humanos. A concentração de ocitocina circulante no feto aumenta marcadamente no início do trabalho de parto, alcançando níveis máximos no segundo estágio do mesmo (FUCHS, 1986).

Foram demonstradas evidências para passagem da ocitocina através da placenta de primatas sem degradação (DAWOOD et alii, 1979 a). O hormônio fetal pode alcançar a decídua por difusão através da membrana e iniciar a seqüência de eventos que desencadeiam o parto. O líquido amniótico a termo contém altos níveis de ocitocina e estudos morfológicos de membranas fetais a termo suportam a idéia de que o líquido amniótico circulante, após atravessar o âmnio, continua através dos canalículos intracelulares do citotrofoblasto, alcançando a decídua parietal (FUCHS, 1986).

Trabalhos de partos prematuros estão associados com um aumento significativo a sensibilidade uterina à ocitocina, enquanto trabalhos de partos pós-termo estão associados a uma diminuição na sensibilidade a este hormônio (ROY e KARIM, 1983). Seria interessante correlacionar esses índices de sensibilidade uterina com concentrações de ocitocina circulante, para observar uma possível interrelação entre esses fatores e analisar também até que ponto o nível de ocitocinase plasmática influencia tal sensibilidade.

O aumento na concentração de receptores à ocitocina na decídua e no miométrio de gestantes acontece durante o período de gestação alcançando níveis máximos pouco antes do início do trabalho de parto (FUCHS, 1986).

Uma insuficiência desses receptores antes do termo pode ser uma explicação para a insuficiência relativa dos efeitos da ocitocina sobre a contratilidade uterina nos estágios iniciais da gestação. Entretanto, pouco antes do termo, o útero gravídico começa a apresentar atividade e responder à ocitocina. A abrupta alteração no estado contrátil do miométrio está associada com um aumento na concentração de receptores miometriais (ALEXANDROVA e SOLOFF, 1980) e com o desenvolvimento de "gap-junctions" entre as células miometriais. Acredita-se que esses dois eventos sejam regulados pelo estrogênio e progesterona ovarianos (VERHOEFF e GARFIELD, 1986).

As "gap-junctions" são contatos entre as células, situadas nos lados de baixa resistência ao fluxo de corrente elétrica. A presença de "gap-junctions" entre as células musculares lisas desempenha uma função efetiva no término da

gravidez, permitindo que eventos elétricos se propaguem ao longo do miométrio. A magnitude e a frequência dessas junções aumentam no final da gestação e durante o trabalho de parto, estando correlacionadas com o aumento da atividade da musculatura uterina e a abertura cervical (ROY e KARIM, 1983 e CHAN et alii, 1988). As "gap-junctions" são estruturas necessárias para a sequência dos eventos fisiológicos para a expulsão do feto (GARFIELD; SIMS; KANNAN e DANIEL, 1978; COLE; GARFIELD e KIRKALDY, 1985).

No terceiro trimestre da gestação, o balanço entre os níveis de ocitocina e a atividade ocitocinásica pode mudar em favor do hormônio, uma vez que está aumentada sua liberação, a sensibilização da musculatura uterina e a concentração dos receptores para ocitocina. Uma variação em qualquer desses parâmetros pode afetar este equilíbrio (ROY e KARIM, 1983).

As prostaglandinas (PGs) também estão relacionadas com o desencadeamento do parto humano. As prostaglandinas encontram-se amplamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais de mamíferos e algumas delas como PGE₁, PGE₂ e PGF_{2α} possuem uma potente atividade uterotônica. Apesar desses

componentes e alguns de seus análogos sintéticos apresentarem uma função terapêutica na indução do trabalho de parto e aborto. Sua função na gestação e sua relação com a ocitocina ainda é pouco conhecida (ROY e KARIM, 1983).

Receptores para prostaglandinas foram observados em tecidos uterinos de muitas espécies animais, incluindo seres humanos. Esses receptores são funcionalmente separados e distintos dos receptores uterinos para a ocitocina e a ação uterotônica da ocitocina é independente da participação das prostaglandinas (CHAN, 1977).

Níveis de prostaglandinas e seus metabólitos na circulação periférica, líquido amniótico e urina apresentam-se elevados nas últimas semanas de gestação e sua concentração encontra-se ainda mais elevada imediatamente antes ou durante as contrações uterinas (ROY e KARIM, 1983). Decídua, endométrio, miométrio e membranas fetais têm sido mencionadas como constituindo a origem dessas prostaglandinas (CHAN, 1977 e KELLY, 1981).

Existem evidências que sugerem que o aumento nos

níveis de prostaglandinas contribuem para aumentar a sensibilidade do útero à ocitocina. É plausível que as prostaglandinas mediem os efeitos dos hormônios ovarianos sobre a formação dos receptores para a ocitocina e "gap-junctions" (ALEXANDROVA e SOLOFF, 1980). É também demonstrado que as prostaglandinas estimulam o desenvolvimento de "gap-junctions" em células miométriais "in vitro" (GARFIELD; KANNAN e DANIEL, 1980).

O estudo de CHAN (1983, 1987) demonstrou que a inibição da síntese de prostaglandinas endógenas prevenia o desenvolvimento da sensibilidade à ocitocina a termo.

Sobre a interação entre prostaglandinas e ocitocinase foi observado que PGF $_{2\alpha}$ administrada intra ou extra amnioticamente resulta em um significativo decréscimo na atividade ocitocinásica do soro antes do aborto (ROY e KARIM, 1983). Em outro, estudo no segundo trimestre de gestação, a infusão de PGF $_{2\alpha}$ intra amniótica é acompanhada de uma significativa falha na atividade desta enzima plasmática quatro horas após a administração da mesma (JAYARAMAN; SINHA; RAGHAVAN; MATHUR; RASTOGI e DEVI, 1975).

De um modo contrário, SZONTAGH; MORVAY e FALKAY (1974) verificaram um aumento transitório na atividade ocitocinásica no soro de gestantes em paralelo ao efeito uterotônico, quando o aborto era induzido pelo PGF 2α .

ROY e KARIM (1983) demonstraram que PGE 1 , PGE 2 e PGF 2α "in vitro" inibem potencialmente a atividade ocitocinásica no soro e placenta de gestantes humanas. Esse resultado suporta os dados encontrados "in vivo", nos quais a atividade ocitocinásica plasmática encontrava-se marcadamente reduzida pela PGF 2α exógena (JAYARAMAN et alii, 1975).

As amostras de prostaglandinas para efeito ocitócico "in vivo" e para a inibição enzimica "in vitro" são semelhantes. Esses e outros estudos sugerem que a ação ocitócica das prostaglandinas podem estar mediadas em última parte, por suas habilidades em manter ou elevar os níveis de ocitocina no útero, inibindo a atividade ocitocinásica. Entretanto, foi demonstrado que a atividade ocitocinásica no soro não está significativamente correlacionada com as contrações uterinas nas mulheres durante o trabalho de parto a

termo (HULL e ELLIS, 1979).

Alta atividade ocitocínásica tem sido observada em úteros de gestantes e não gestantes. Esse fato pode apresentar um grande significado fisiológico na gestação e trabalho de parto (ROY; YEANG e HO, 1985).

Na presente investigação, observamos como o nível plasmático de ocitocinase se comportava ao longo do período de gestação em gestantes nulíparas e múltíparas.

Para uma melhor análise, os níveis da presente enzima foram enquadrados de acordo com o mês de gestação (Gráfico 1), pois, uma vez ilustrados em semanas de gestação, a visualização do mesmo ficaria prejudicada.

De acordo com nossos resultados, observamos que os níveis enzimáticos alcançam valores máximos no nono mês (Gráfico 1) ou na quadragésima semana de gestação (Gráficos 3 e 4) tanto em gestantes nulíparas e múltíparas. Mas dentro desses dois grupos, os níveis plasmáticos de ocitocinase apresentam um comportamento diferente.

Dentro do grupo de gestantes nulíparas, observamos que os níveis de ocitocinase apresentam valores mais elevados até o sétimo mês de gestação (Gráfico 1), quando comparados com os níveis enzimicos de gestantes múltiparas, ocorrendo uma equivalência no oitavo e nono mês da gestação. Talvez essa diferença possa ser um fator que contribua para uma maior quiescência do útero gravídico durante esse período na primeira gestação, dificultando dessa maneira que a ocitocina materna e ou fetal desencadeie contrações uterinas.

Os níveis equivalentes de ocitocinase nos dois grupos de gestantes no final da gestação, ilustra que, neste período, a ocitocinase desempenha a mesma função até o início do trabalho de parto.

Devemos ressaltar que todas as gestantes aqui estudadas não apresentavam gestações gemelares, o que poderia interferir nos dados obtidos, uma vez que este tipo de gestante apresenta altos níveis de ocitocinase. Além disso, nenhuma dessas pacientes apresentou parto pré-termo o que também poderia interferir em nossas interpretações.

De acordo com o que foi exposto anteriormente, o desencadeamento do trabalho de parto está intimamente relacionado ao desenvolvimento da sensibilidade uterina (aumento na concentração de receptores no miométrio e desenvolvimento de "gap-junctions") bem como nos níveis de ocitocina, ocitocinase e prostaglandinas circulantes.

Pode ser que estes altos níveis enzimicos desempenhem uma função a mais para proteger o útero da ocitocina, uma vez que este hormônio é degradado nos rins e fígado.

TAKEDA, KUWABARA e MIZUNO (1989) estudando o "clearance" metabólico da ocitocina em gestantes que se encontravam entre a trigésima oitava e quadragésima semanas de gestação em mulheres que se encontravam no puerpério e em mulheres não gestantes, observaram que estes se mantinham equivalentes, apesar dos níveis de ocitocinase no plasma de mulheres gestantes encontrarem-se elevados. Esses autores observaram também a degradação "in vitro" da ocitocinase pelo plasma dessas mulheres e observaram que, nestas condições, o plasma das gestantes destruíram 85% da ocitocina marcada, enquanto que apenas 10% da ocitocina era inativada pelo plasma

das não gestantes. Esses autores sugerem que a ocitocinase plasmática não atua inativando a ocitocina "in vivo".

Não foi demonstrado se esta enzima pode influenciar no desenvolvimento de receptores uterinos e ou "gap-junctions". Uma vez que partos pós-termo estão associados a uma diminuição na sensibilidade uterina e também a um aumento de ocitocinase plasmática.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar os níveis de ocitocinase no plasma de gestantes normais ao longo do período de gestação.

Primeiramente observamos como o método descrito por BABUNA e YENEN (1966) modificado, se comportava na determinação colorimétrica da ocitocinase no plasma de gestantes. Esta modificação consistiu na não adição da mistura HCl 0.36N + acetona e não utilização de uma câmara escura.

Uma vez observado que o método modificado apresentava resultados compatíveis com o método descrito pelos autores acima, dosamos então a ocitocinase em duzentos e trinta amostras plasmáticas distribuídas da seguinte maneira: Dezesseis amostras controles (nove de mulheres não gestantes e sete do sexo masculino); oitenta e seis amostras plasmáticas de gestantes nulíparas e em cento e vinte e oito amostras plasmáticas de gestantes multíparas.

O material utilizado para a presente investigação, foi sangue venoso coletado de uma das veias do antebraço, com seringas e agulhas descartáveis e previamente heparinizadas, de gestantes que se encontravam ao longo do período de gestação e

que compareciam ao setor de pré-natal do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas do Hospital das Clínicas da Unicamp, a fim de serem submetidas a exames periódicos. As idades das gestantes estavam compreendidas entre dezoito e trinta e nove anos, sendo que as mesmas não apresentavam qualquer processo patológico.

A ocitocinase é uma enzima de origem placentária capaz de hidrolisar a ligação peptídica entre a cistina N-terminal e a tirosina adjacente, resultando na perda do efeito biológico da ocitocina (TUPPY e NESVADBA, 1957).

O método colorimétrico para a determinação da ocitocinase depende da hidrólise do substrato (L-cistina-di- β -naftilamida) pela enzima presente no plasma liberando a β -naftilamina, produto que é colorido no final da reação (Figura 3).

CONCLUSÕES

1 O método modificado de BABUNA e YENEN (1966) apresenta resultados compatíveis com o método colorimétrico original.

2 De acordo com nossos resultados, pudemos confirmar que os níveis de ocitocinase plasmática aumentam com o decorrer do período de gestação, sendo quase nulos em mulheres não gestantes e em pessoas do sexo masculino.

3 Os níveis da enzima apresentam valores mais elevados em gestantes nulíparas quando comparados a gestantes múltíparas até o sétimo mês de gestação, igualando-se no oitavo e no nono mês.

4 Uma vez que analisamos apenas os níveis da enzima, sugerimos que a ocitocinase possa estar relacionada com o desenvolvimento da sensibilidade uterina ao longo da gravidez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDROVA, M.J. & SOLOFF, M.S. Oxytocin receptors and parturition. I. Control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. Endocrinology, 100:730-5, 1980.
2. AMICO, J.A. & ZELEZNIK, A.J. Ovarian oxytocin and neurophysin concentrations in the cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*). Endocrine Research, 16:17-30, 1990.
3. AROSKAR, J.P.; CHAN, W.Y.; STOUFFER, J.E.; SCNEIDER, C. H.; MURTI, V.V.S. & VIEGNEAUD, V. Renal excretion and tissue distribution of radioactivity after administration of tritium labeled oxytocin to rats. Endocrinology, 74:226-32, 1964.
4. ARST, H.E.; MANNING, R.T. & DELP, M. Serum leucine aminopeptidase activity: findings in carcinoma of the pancreas, pregnancy and other disorders. Am. J. Med. Sci., 238:598-609, 1959.
5. BABUNA, C. & YENEN, E. Enzymatic determination of placental function. Am. J. Obstet. Gynecol. 95:925-34, 1966.

6. _____; _____; ERÖZDEN, O. & ÜNER, A.: An enzymatic Method for diagnosis of Hidatiform Mole. Obstet. Gynecol. 35: 852-6, 1970.
7. BONINI, E.E. & BONINI, S.E. Teoria e Exercícios. São Paulo, LPM, 1972. 439p.
8. BURTON, A.M. & FORSLING, M.L. Hormone content of the neurohypophysis in foetal, new born and adult guinea-pig. J. Physiol. (Lond), 221:6-7, 1972.
9. CHAN, W.Y. Relationship between the uterotonic action of oxytocin and prostaglandins: oxytocin action and release of PG activity in isolated non-pregnant rat uteri. Biol. Reprod., 17: 541-8, 1977.
10. _____. Uterine and placental prostaglandins and their modulations of oxytocin sensitivity and contractility in the parturient uterus. Biol. Reprod., 22:680-8, 1983.
11. _____. Enhanced prostaglandin synthesis in the parturient rat uterus and its effects on myometrial oxytocin receptor concentrations. Prostaglandins, 24: 889-902, 1987.

12. _____; BEZERIN, I. & DANIEL, E.E. Effects of inhibition of prostaglandin synthesis on uterine oxytocin receptor concentration and myometrial gap junction density in parturients rats. Biol. Reprod., 32:1117 - 28, 1988.
13. CHARD, T. Oxytocin In: Martini L. & Besser, G.M.. Clinical Neuroendocrinology, New York, Academic Press, 1977, p. 569 -583.
14. _____; BOYD, N.R.H. & HUDSON, C.N. Immunoassay of oxytocin in maternal and foetal blood. In: SHEARMAN, R.F. Human Reproductive Physiology, Oxford, The Arman Blackwell Scientific Publications, 1972, p. 337.
15. CRANKSHAW, D.J.; BRANDA, L.A.; MATLEB, M.D. & DANIEL, E. E. Localization of oxytocin receptor in the plasma membrane of rat myometria. Eur. J. Biochem. 86:481-6, 1978.
16. CHRISTENSEN, A. & HAGELID, P.E. Hormone and enzyme assays in pregnancy. A rapid method for measuring the placental cystine-aminopeptidase using l-cystine-bis-p-nitroanilide as substrate. Acta. Endocrinol., 78:364-72, 1975.

17. COLE, W.C.; GARFIELD, R.E. & KIRKALDY, J.S. Gap-junctions and direct intercellular communication between rat uterus smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 249: C20-31, 1985.
18. DAWOOD, M.Y.; LAURENSEN, N.H.; TRIVEDI, D.; YLIKORKALA, O. & FUCHS, F. Studies on oxytocin in the baboon during pregnancy and delivery. Acta Endocrinol. (Copenh), 91:704-18, 1979.
19. _____; YLIKORKALA O.; TRIVEDI, D. & FUCHS, F. Oxytocin in maternal circulation and amniotic fluid during pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab. 49:429 - 34, 1979.
20. FEKETE, K. Beiträge zur physiologie des gravität. Endokrinologie, Z:364-9, 1930.
21. FIELDS, P.A.; ELDRIDGE, R.K.; FUCHS, A.R.; ROBERTS, R.F. & FIELDS, M. J. Human placental and bovine corpora luteal oxytocin. Endocrinology, 112:1544-6, 1983.
22. FITZPATRICK, R.J. The estimation of small amounts of oxytocin in blood. In: CALDEIRO-BARCIA, R. & HELLER, H. Oxytocin, Oxford, Pergamon Press, 1961, p. 358-379.

23. FOLK, J.E . & BURSTONE, M.S. Chromogenic leucil substrates for aminopeptidases and papain. Proc Soc Exp Biol Med (New York) 82:473-6, 1955.
24. FUCHS, A.R. The role of oxytocin in parturition. In: Huszar, Gabor. The Physiology and Biochemistry of the Uterus in Pregnancy and Labour. CRC, 1986, p. 164-178.
25. _____. Prostaglandin F₂ alfa oxytocin interactions in ovarian and uterine function. J Steroid Biochem 27: 1073-80, 1987.
26. _____; FUCHS, F.; HUSSLEIN, P.; SOLOFF, M.S. & FERNSTRÖM, M.J. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labour. Science 215:1396-8, 1982.
27. _____; _____; _____; FERNSTRÖM, M.J. & SOLOFF, M.S. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. Am J Obstet Gynecol, 150:734-41, 1984.

28. _____; GOESCHEN, K.; HUSSLEIN, P.; RASMUSSEN, A.B.; FUCHS, F. Oxytocin and the initiation of human parturition III. Plasma concentrations of oxytocin and 13,14 dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α} in spontaneous and oxytocin induced labor at term. Am. J. Obstet. Gynaecol., 142:497-502, 1983 a.
29. _____; PERIYASAMI, S.; ALEXANDROVA, M.; SOLOFF, M. S. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnancy rat myometrium: effect of ovarian steroids. Endocrinology, 113:742-9, 1983 b.
30. _____; _____ & SOLOFF, M.S. Systemic and local regulation of oxytocin receptor concentrations in the rat uterus and their functional significance. Can. J. Biochem. Biol., 61:615-24, 1983 c.
31. GARFIELD, R.E.; KANNAN, M.S. & DANIEL, E.E. Gap-junction formation in myometrium: control by estrogen, progesterone and prostaglandins. Am. J. Physiol 238:CB1-9, 1980.

32. _____; SIMS, S.M.; KANNAN, M.S. & DANIEL, E.E.
The possible role of gap-junctions in activation of myometrium during parturition. Am. J. Physiol. 235:C168-79, 1978.
33. GOLUMB, S.B. Activity of oxytocinase in the blood during normal pregnancy and labour. Vopr. Okhr. Materin. Det. 21:70, 1976. Apud: ROY, A.C.; KARIM, S.M.M. Review: Significance of the inhibition by prostaglandins and cyclic GMP of oxytocinase activity in human pregnancy and labour. Prostaglandins 25:55-70, 1983.
34. GOMORI, G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (New York), 82: 559 - 61, 1954.
35. GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 2 ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1963. 384p.
36. GONZÁLEZ-PANIZZA, V.H.; SICA-BLANCO, Y. & MÉNDEZ-BAUER, C. The fate of injected oxytocin in the pregnant woman near term. In: CALDEIRO-BARCIA, R. & HELLER, H. Oxytocin. Oxford, Pergamon Press, 1961, p. 347-357.

37. HENSLEIGHT, P.A.; CHATEAUM, S.G. & SPELLACY, W. N.
Oxytocin and human placental lactogen for prediction of
intrauterine growth retardation. Am. J. Obstet.
Gynecol., 122:675-8, 1977.
38. HULL, M.G.R. & ELLIS, B.W. The relation between plasma
unconjugated oestriol and cystine aminopeptidase
concentrations and uterine contractions. Br. J.
Obstet. Gynecol., 86:180-5, 1979.
39. ICHALIOTIS, S.D. & LAMBRINOPOULOS, T.C. Serum oxytocinase in
twin pregnancy. Obstet. Gynecol. 25:270-2, 1965.
40. JAYARAMAN, S.; SINHA, M.K.; RAGHAVAN, K.S.; MATHUR, V.
S.; RASTOGI, G.K. & DEVI, P. K. Effect of prostaglandin
F_{2α} and hypertonic saline on the placental function
during midtrimester abortion. Am. J. Obstet. Gynecol.,
121:528-30, 1975.
41. KANAZAWA, T. Supplementary studies on blood pitocinase. J.
Jap. Obstet. Gynecol. Soc. 1: 42-72, 1954.
42. KASTING, N.W. Simultaneous and independent release of
vasopressin and oxytocin in the rat. Can. J.
Physiol. Pharmacol., 66:22-6, 1988.

43. KELLY, R.W. Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. J. Reprod. Fertil. 62: 293 - 304, 1981.
44. KHAN-DAWOOD, F.S.; DAWOOD, M.Y. Human ovaries contain immunoreactive oxytocin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 57:1129-32, 1983.
45. _____; MARUT, E.L. & DAWOOD, M.Y. Oxytocin in the corpus luteum of the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis). Endocrinology, 115: 570-4, 1984.
46. KLIMEK, R. Relative duration of human pregnancy and oxytocin therapy. Gynaecology, 163: 48-60, 1967.
47. KLEINER, H.; BROUET-YAGER, M. Separation of L-cystinil-di- β -Naftilamide hidrolase ("oxytocinase") isoenzymes by acrylamide gel eletrophoresis of human pregnancy sera. Clin. Chim. Acta., 40:177-80, 1972.
48. KUMARESAN, P.B.; ANANDARANGAM, P.N.; DIANZON, W.; VASICKA, A. Plasma oxytocin levels during human pregnancy and labour as determined by radioimmunoassay. Am. J. Obstet. Gynecol. 112:215-23, 1974.

49. KUPFERMANN, I. Hypothalamus and limbic system I: Peptidergic neurons, homeostasis and emotional behavior. In: KANDEL, E.R. & SCHWARTZ, J.H.. Principles of Neural Science. 2.ed. New York, Elsevier, 1985, p. 611-625.
50. KURAUCHI, O.; MIZUTANI, S.; OKANO, K.; NARITA, O.; TOMODA, Y. Purification and characterization of human placental microsomal aminopeptidase: Immunological difference between placental microsomal aminopeptidase and pregnancy serum cystil-aminopeptidase. *Enzyme*, 35: 197-205, 1986.
51. KÜSTNER, H. Eigenartige Wirkung des schwangerenserums besonders bei eklampsie. *Arch Gynäk*, 132:202-3, 1927.
52. KUWABARA, U.; TAKEDA, S.; MIZUNO, M. & SAKAMOTO, S. Oxytocin levels in maternal and fetal plasma, amniotic fluid, and neonatal plasma and urine. *Arch Gynecol Obstet*, 241:13-23, 1987.
53. LAMBRINOPOULOS, T.C. Prolonged pregnancy associated with increase in serum oxytocinase. *Obstet Gynecol* 23: 780-2, 1964.

54. LAMPELO, S. & VANHA-PERTTULA, T. Fractionation and characterization of cystine aminopeptidase (oxytocinase) and arylamidase of the human placenta. J. Reprod. Fert. 56:285-96, 1979.
55. _____ & _____. Fractionation and characterization of cystine aminopeptidase (oxytocinase) and arylamidase of human serum during pregnancy. J. Reprod. Fert. 58: 225-35, 1980.
56. LEAKE, R.D.; WEITZMAN, R.E.; GLATZ, T.H. & FISHER, D.A. Plasma oxytocin concentrations in men, nonpregnant women, and pregnant women before and during spontaneous labor. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63: 730 -3, 1981.
57. LEWIS Jr, J. Serum leucine aminopeptidase value in patients with trophoblastic tumors and in normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 84 1407-11, 1962.
58. MATHUR, V.S. & WALKER, J.M. Oxytocinase in plasma and placenta in normal and prolonged labour. Brit. Med. J., 3:96-7, 1968.
59. _____ & _____. The origin of human placental oxytocinase. J. Physiol. (London), 208:291-8, 1970.

60. MENDÍZ-BAUER, C. & CALDEYRO-BARCIA, R. Inactivación de la ocitocina (natural y sintética) por el plasma de la mujer grávida. I Reunión Científica de la ALACE, Uruguay, 1957, p.124..
61. MENEGATTO, G. Modificação do método de Mathur e Walker para a determinação da ocitocinase no plasma de gestantes. Ciênc. Cult., S. Paulo, 35:1670-2, 1983.
62. _____. Inativação da ocitocina sintética pelo plasma total de gestantes normais a termo. Ciênc. Cult., S. Paulo, 32:605-8, 1985.
63. MILLER, J.B.; KAN-DAWOOD, F.S.; DAWOOD, M.Y. Identification of oxytocin in rabbit ovarian tissue. Annual Meeting of the Endocrine Society, 65, 1983. Abstract, p. 142.
64. _____; NAOR, E.; MILKOVICH, L. & SCHMIDT, W.M. Serum levels of cystine aminopeptidase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase in single and twin pregnancies. Obstet. Gynecol., 24:707-15, 1964.

65. MIZUTANI, S.; AKIYAMA, H.; KURAUCHI, D.; TAIRA H.; NARITA, O. & TOMODA, Y. In vitro degradation of angiotensin II (A-II) by human placental subcellular fractions, pregnancy sera and purified placental aminopeptidases. Acta Endocrinol., 110:135-9, 1985.
66. MÜLLER, H.A. Qualitative and quantitative studies of the effect of oxytocin on uterine contractility. In: CALDEYRO-BARCIA, R. & HELLER, H. Oxytocin, Oxford, Pergamon Press, 1961, p. 137-157.
67. OUDHEUSDEN, A. P. M. Kinetic determination of serum oxytocinase using a new substrate. Z. klin. Chem. Klin. Biochem. 10:345-6, 1972.
68. OYA, M.; WAKABAYASHI, T.; YOSHINO, M. & MIZUTANI, S. Subcellular distribution and electrophoretic behavior of aminopeptidase in human placenta. Physiol. Chem. Phys. 8:327-35, 1976.
69. PAGE, E.W. The value of plasma pitocinase determinations in obstetrics. Am. J. Obstet. Gynecol., 52: 1014 - 22, 1946.

70. PETRUCCO, O.M.; CELLIER, K. & FISHTALL, A. Diagnosis of intrauterine growth retardation by serial serum oxytocinase, urinary oestrogen and serum heat-steable alkaline phosphatase (HSAP) estimations in uncomplicated and hypertensive pregnancies. *BJO*:499-507, 1973.
71. FOULAIN, D.A.; WAKERLEY, J.B. Electrophysiology of hipotalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience*, 7:773-808, 1982.
72. REICHLIN, S. Neuroendocrinology. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W.. *Williams Textbook of Endocrinology*, 7. ed., Philadelphia, Igaku-Shoin/Saunders International, 1985, p. 492-567.
73. RIAD, A.M. Studies on pregnancy serum cystine aminopeptidase activity "oxytocinase". *J. Obstet. Gynaec. Brit Comm.*, 62:409-16, 1962.
74. _____ & SCANDRETT, F.J. Distribution of cystine aminopeptidase activity (oxytocinase) in human pregnancy sera. *Nature (Lond.)*, 193:372-3, 1962.

75. ROY, A.C. & KARIM, S.M.M. Review: Significance of the inhibition by prostaglandins and cyclic GMP of oxytocinase activity in human pregnancy and labour. Prostaglandins, 25:55-70, 1983.
76. _____; YEANG, M. & KOTTEGODA, S. R. Selective inhibition of multimolecular forms of human serum and placental oxytocinase activity by prostaglandins and cyclic GMP. Prostaglandins Leukotrienes Med. 14: 105 - 11, 1984. Apud: ROY, A.C. & KARIM, S.M.M. Review: Significance of the inhibition by prostaglandins and cyclic GMP of oxytocinase activity in human pregnancy and labour. Prostaglandins 25:55-70, 1983.
77. _____; _____ & HO, L. M. Multimolecular forms of oxytocinase activity in the human uterus and their inhibition by prostaglandins and cyclic GMP. Prostaglandins Leukotrienes Med., 18:133-41, 1985. Apud: ROY, A.C. & KARIM, S.M.M. Review: Significance of the inhibition by prostaglandins and cyclic GMP of oxytocinase activity in human pregnancy and labour. Prostaglandins 25:55-70, 1983.

78. RYDÉN, G. Cystine aminopeptidase activity in pregnancy II. Its clinical application as an index of placental function. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 51: 329 - 34, 1972.
79. SEEM, K. Die klinische bedeutung der oxytocinase bestimmung. *Klin. Wochenschr.* 33:817-8, 1955.
80. SMALL, C. W. & WATKINS, W. B. S-benzil-L-cysteine-p-nitroanilide. A new substrate for the determination of oxytocinase with improved specificity. *Biochem. Med.*, 2: 103 - 12, 1974.
81. SZONTAGH, F.E.; MORVAY, J. & FALKAY, G. Changes in the blood level cystine aminopeptidase in abortions induced by prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Ann. Chir. Gynaecol. Fenn.* 63:198, 1974. Apud: ROY, A.C. & KARIM, S.M.M. Review: Significance of the inhibition by prostaglandins and cyclic GMP of oxytocinase activity in human pregnancy and labour. *Prostaglandins* 25:55-70, 1983.
82. TAKEDA, S.; KUWABARA, Y.; MIZUMO, M. Metabolic clearance rate of oxytocin in human subjects. *Nippon Naibunji Gakkai Zasshi*, 65:182-9, 1989.

83. TITUS, M.A.; REYNOLDS, D.R.; GLENDENING, M.B.; PAGE, E.W.
Plasma aminopeptidase activity (oxytocinase) in
pregnancy and labour. Am. J. Obstet. Gynecol., 80: 1124
-8, 1960.
84. TORTORA, G.J. & ANAGNOSTAKOS, N.P. Principles of Anatomy
and Physiology. 4.ed. New York, Harper International
Edition, 1984. p.410.
85. TOVEY, J.E. Serum oxytocinase. Clin. Biochem. 2:289-310,
1969.
86. _____; DAWSON, P.J.G. & FELLOWES, K.P. Evaluation of
s-benzil-L-cystine-4'-nitroanilide as substrate for serum
cystine aminopeptidase. Clin. Chem., 19:756-61, 1973.
87. TUPPY, H. Biochemical studies on oxytocinase. In:
CALDEIRO-BARCIA, R. & HELLER, H. Oxytocin. Oxford,
Pergamon Press, 1961, p.315-324.
88. _____ & NESVADBA, H. Über die aminopeptidase-aktivität
des schwangerengerensers und ihre beziehung zu dessen
vermögen oxytocin zu inaktivieren. Monatsh. Chem.,
88:977-88, 1957.

89. _____; WISBAUER, V. & WINTERSBERGER, E. Aminosäure-p-nitroanilide als substrate für aminopeptidasen und andere proteolytische fermente. *Z. Physiol. Chem.*, 329: 278-88, 1962.
90. USUKI, S. Dynamics and kinetics of various steroid and protein hormones, Somatomedin A, cystine-aminopeptidase and carcinoembryonic antigen in maternal blood during pregnancy and their mutual relationship. *Jap. J. Fert. Ster.*, 32:404-15, 1987.
91. VERHOEFF, A. & GARFIELD, R.E. Ultrastructure of the myometrium and the role of gap-junctions in the myometrial function. In: HUSZAR, G. *The Physiology and Biochemistry of the Uterus in Pregnancy and Labour*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1986, p.74-91.
92. WATHES, D.C. & SWANN, R.W. Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature*, 292:225-7, 1982.
93. _____; _____; PICKERING, B.T.; PORTER, D.G.; HULL, M.G.R. & DRIFE, J.O. Neurohypophysial hormones in the human ovary. *Lancet* II:410-2, 1982.

94. WERLE, E. & EFFKMENN, G. Über die oxytocinabbauend
fähigkeit des schwangerenblutes. Arch. Gynäk.
171:286-90, 1941.
95. _____, SEMM, K. & ENZENBACH, R. Über die oxytocinase
des Schwangerenblutes und der Erythrocyten. Arch.
Gynäk. 177: 211-7, 1950.
96. WINTERSBERGER, E.; MÜLLER-HARTBURG, W. & TUPPY, H. Eine
einfache method chemischen bestimmung der oxytocinase
aktivitat shwangerensen. Clin. Chim. Acta., 14:786-92,
1966.