



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

CRISTIANE DE CASTRO PERNET HARA

**MARCADORES DA IMUNOMODULAÇÃO
NO SANGUE MATERNO E FETAL E NAS PLACENTAS
DE MÃES DIABÉTICAS OU COM
HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área
de concentração: Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Coorientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Botucatu
2016

CRISTIANE DE CASTRO PERNET HARA

MARCADORES DA IMUNOMODULAÇÃO
NO SANGUE MATERNO E FETAL E NAS PLACENTAS
DE MÃES DIABÉTICAS OU COM
HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutora em
Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia,
Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Coorientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Hara, Cristiane de Castro Pernet.

Marcadores da imunomodulação no sangue materno e fetal e nas placentas de mães diabéticas ou com hiperglicemia gestacional leve / Cristiane de Castro Pernet Hara. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Iracema de Mattos Paranhos Calderon

Coorientador: Adenilda Cristina Honório França

Capes: 40101150

1. Diabetes gestacional. 2. Fatores imunológicos. 3. Hiperglicemia. 4. Mulheres grávidas. 5. Imunoglobulina G.

Palavras-chave: Citocinas; Hiperglicemia; IgG; Receptor FcRn; Transferência placentária.

CRISTIANE DE CASTRO PERNET HARA

**MARCADORES DA IMUNOMODULAÇÃO NO SANGUE MATERNO E FETAL
E NAS PLACENTAS DE MÃES DIABÉTICAS OU COM
HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon

Coorientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Comissão examinadora

Prof(a). Dr(a). Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Universidade Estadual Paulista/FMB

Prof(a). Dr(a). Yuri Karen Sinzato
Universidade Estadual Paulista/FMB

Prof(a). Dr(a). Debora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos
Universidade Estadual Paulista/FMB

Prof(a). Dr(a). Mahmi Fujimori
Universidade Federal de Mato Grosso

Prof(a). Dr(a) Mara Sandra Hoshida
Universidade de São Paulo

Botucatu, 01 de dezembro de 2016.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou
o que era antes”.*

Martin Luther King

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família em especial ao meu esposo Rogério Hara e ao meu filho Heitor Pernet Hara, que me trouxeram alegria nos momentos difíceis, que torceram pelo meu sucesso e pelo amor incondicional.

Filho, hoje tenho a infinita certeza que não existe nada maior, melhor e mais verdadeiro que o meu amor por você! Amo você.

Aos meus pais Orlando Rodrigues Pernet (in memoriam) e Rogéria Maria de Castro Pernet, às minhas irmãs Carla e Tatiane, obrigada por acreditarem em mim, por torcerem e me incentivarem!

Agradecimientos

Agradeço a Deus: pela vida, por renovar minhas forças diariamente e por me inspirar nos momentos de aflições.

À minha orientadora Profa. Dra. **Iracema de Mattos Paranhos Calderon** sou imensamente grata pela oportunidade e atenção a mim cedida, pelo incentivo e generosidade durante todos os anos de orientação. Obrigada pelo apoio em eventos nacionais e internacionais. Obrigada pela oportunidade de participar deste universo de pesquisa e conhecimento que foi um espaço de formação intelectual, um local em que encontrei interlocutores e amizades. Sou grata pela dedicação genuína na orientação da tese, pelas discussões e críticas em todas as fases do trabalho que corroboraram para o meu enriquecimento pessoal e profissional.

Agradeço em especial aos meus coorientadores, à Profa. Dra. **Adenilda Cristina Honório França** e ao Prof. Dr. **Eduardo Luzia França**, por terem aberto portas para que eu buscasse o conhecimento científico, por sempre me incentivarem e corroborarem em minha formação acadêmica e pessoal, por me darem suporte quando eu já não tinha mais forças, por fazerem por mim o que ninguém jamais fez, trago comigo muita gratidão, admiração e respeito por todos esses anos de convivência. Obrigada por se dedicarem e doarem todo tempo e por suas contribuições para a qualificação do projeto, suas aulas e gentis palavras de apoio. Obrigada por me permitir todo tempo de trabalho em conjunto e pelas publicações no decorrer desses anos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de pesquisa experimental em ginecologia e obstetrícia (LAPGO), aos que passaram e aos que estão presente, pelas trocas intelectuais e estímulos. Agradeço especialmente à profa. Dra. **Débora Cristina Damasceno** por me acolher com carinho e compreensão, obrigada pelos ensinamentos e pela convivência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa e coleta do LAPGO, os meus amigos: Mariana, Ana Paula, Rafael, Maruen, Renato, Fernanda, Edlaine, Joice, Lessandra, Danny Laura, Bianca, nos quais trabalharam com muita dedicação, e em especial à Glilciane, que muito me ajudou na elaboração do pedido de bolsa e auxílio para o desenvolvimento do projeto, além de auxiliar na captação das gestantes e nas técnicas de coleta. Obrigada por tudo que fizeste por mim durante a minha estadia em Botucatu.

Agradeço aos meus queridos amigos, Débora Damasceno, Gliciane Morceli, Aline Bueno, Ana Paula Martins de Campos, Bruna Dallaqua Jaquie, Fernanda Piculo, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Giovana Vesentini, Isabela Lovizutto Jessi, Mariana Alvarez Arantes, Nathália Cristine Dias de Macedo, Rafael Bottaro Gelaleti, Silvana Barroso Corvino, Aline de Oliveira Netto e Yuri Karen Sinzato por se esforçarem para que minha estadia em Botucatu fosse a mais produtiva e agradável possível. Por me aceitarem e acolherem no LAPGO.

À técnica do LAPGO Talísia Moreto pela ajuda e auxílio no laboratório de pesquisa experimental em ginecologia e obstetrícia.

À Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e aos docentes do programa de pós-graduação que transmitiram os conhecimentos e contribuíram para minha formação e para a realização da tese.

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp de Botucatu pela atenção durante o período do doutorado, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Às gestantes que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Mato Grosso-UFMT, em especial ao laboratório de Saúde Materno infantil e imunomodulação, pela infraestrutura física que permitiu o desenvolvimento dos experimentos e realização da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão do auxílio pesquisa (processo número 2013/13017-9) e bolsa de doutorado (processo número 2012/24212-4) nos quais possibilitaram o desenvolvimento e conclusão desta tese.

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento e concretização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

HARA, C. C. P. **Marcadores da imunomodulação no sangue materno e fetal e nas placentas de mães diabéticas ou com Hiperglicemia Gestacional Leve.** 2016. 90 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

INTRODUÇÃO - Durante a gravidez, a hiperglicemia materna altera a expressão e a transferência de células imunorregulatórias e de imunoglobulinas e o perfil de citocinas na interface materno-fetal. **OBJETIVO** – Avaliar, em gestações complicadas por hiperglicemia, a expressão de células NK e o perfil de citocinas no sangue, materno e do cordão umbilical, e na placenta (artigo 1); quantificar a produção de anticorpos e a passagem de IgG total, e respectivas subclasses, via receptor FcRn (artigo 2). **MÉTODO** - Foram avaliadas 120 gestantes, distribuídas nos grupos: não-diabético (ND; N = 30), hiperglicemia gestacional leve (HGL; N = 30), diabetes mellitus gestacional (DMG; N = 30) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2; N = 30). Técnicas de citometria de fluxo foram utilizadas para análise de células e citocinas e, de ELISA, para avaliação das concentrações de IgG total e subclasses. A transferência placentária de anticorpos totais, e respectivas subclasses, foi definida pela relação [(concentrações no sangue de cordão umbilical/sangue materno) x 100]. Na análise estatística foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, e de correlação de Pearson, com $p < 0,05$. **RESULTADOS** - No sangue materno dos grupos hiperglicêmicos, as células NK $CD16^+CD56^-$ aumentaram, enquanto que $CD16^+CD56^+$ foi menor no grupo DMG. No sangue do cordão do grupo DM2 mostrou uma maior proporção de células $CD16^+CD56^-$ e $CD16^-CD56^+$. As camadas extravilosas da placenta dos grupos DMG e DM2 mostraram maior expressão de $CD16^+CD56^-$ e independente da camada, a proporção de $CD16^-CD56^+$ foi maior em HGL e DMG e menor em DM2. Em relação às citocinas, IL-2 foi menor no sangue materno e IFN- γ mais elevados no sangue materno e do cordão do grupo DMG. IL-17 foi mais elevada no sangue materno e do cordão do grupo DM2. A camada extravilosa placentária da HGL mostrou níveis elevados de IL-4, IL-6, IL-

10, IL-17, e IFN- γ e baixos níveis de IL-1 β e IL-8, enquanto que a camada vilosa placentária continha alta níveis de IL-17 e IFN- γ . O grupo HGL, independentemente da região, apresentaram maiores níveis de IL-8. O grupo DM-2, independentemente da região da placenta mostrou níveis elevados de TNF- α , IL-17, e IFN- γ . O sangue materno de DM-2 e o sangue do cordão umbilical de HGL exibiram uma proporção mais elevada de CD19⁺ expressas por células B. DM2 mostrou a menor proporção de células CD19⁺ na placenta. A expressão de FcRn aumentou nas células do cordão e placenta de HGL. As células do sangue materno, do sangue do cordão e da placenta de DM2 mostraram menor expressão de FcRn. A maior expressão de FcRn, independente do estado hiperglicêmico foi observada nas células da placenta. Houve menores níveis de IgG no sangue materno em DM2 e maiores no sangue do cordão umbilical de HGL. Os níveis mais elevados de IgG4 foi detectado no sangue de mães hiperglicêmicas. Os níveis mais elevados de IgG3 e IgG4 no sangue do cordão foram detectados em HGL, e os menores de IgG2 e IgG3 níveis em DM2.

CONCLUSÃO - A hiperglicemia produz ambiente inflamatório com elevada produção de citocinas, apresentando alterações na expressão de células NK, de FcRn na placenta, na produção e taxa de transferência de IgG. Os níveis celulares que expressam CD16⁺ e de citocinas no sangue materno, sangue do cordão umbilical e tecido placentário são modificados em gestações complicadas pelo diabetes. A hiperglicemia materna compromete a transferência placentária de IgG1, IgG3 e IgG4. Os resultados sugerem que a hiperglicemia materna, diminui a expressão FcRn em células da placenta e sangue e compromete a produção e transferência de anticorpos maternos para os recém-nascidos.

PALAVRAS-CHAVE: Hiperglicemia, Imunorreguladoras, IgG, receptor FcRn, NK, Citocinas, transferência placentária, Sangue Materno e Sangue Cordão.

Abstract

HARA, C. C. P. **Markers of immunomodulation in maternal and fetal blood and placenta from Diabetic or with Mild Gestational Hyperglycemia Mothers.** 2016, 90 p. Thesys Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

INTRODUCTION - During pregnancy, the immune response associated with diabetes alters the expression and the transfer of immune cells, including regulatory, immunoglobulins and the profile of cytokines in the maternal-fetal interface. OBJECTIVE - To evaluate the expression of NK cells, and the profile of cytokines in maternal blood, umbilical cord and placenta, quantify the production of antibodies, as well as, the passage of IgG and subclasses, via receptors FcRn in pregnancies complicated by diabetes or hyperglycemia. METHOD - were assessed 120 pregnant women, distributed as non-diabetic (ND; n=30), Mild Gestational Hyperglycemia (MGH; n=30), Gestational Diabetes Mellitus (GDM; n=30) and type 2 Diabetes Mellitus (DM2; N=30). The cells and cytokines were evaluated by flow cytometry. The concentrations of total IgG and subclasses were analyzed by ELISA. Placental transfer of the total and subclasses antibodies were defined in each assay by the ratio [(cord concentrations/maternal concentrations) x 100]. In the statistical analysis we used analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test, and Pearson's linear correlation, with $p < 0.05$. RESULTS - In the maternal blood from the hyperglycemic groups, the CD16+CD56- NK cells increased, whereas that of CD16+CD56+ decreased in GDM group. Cord blood from DM2 showed a higher proportion of CD16+CD56- and CD16-CD56+. The placental extravillous layer of GDM and DM2 showed an increase of CD16+CD56- cells and, irrespective of region, the proportion of CD16-CD56+ cells was higher in MGH and GDM and lower in DM-2. IL-2 was lower in maternal blood and IFN- γ higher in maternal and cord blood from the GDM group. IL-17 was higher in maternal and cord blood from the DM-2 group. The placental extravillous layer of the MGH showed high levels of IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, and IFN- γ and low levels of IL-1 β and IL-8, whereas the placental villous layer contained high levels of IL-17 and

IFN- γ . The GDM group, irrespective of region, showed higher levels of IL-8. The DM-2 group, irrespective of region, placenta showed high levels of TNF- α , IL-17, and IFN- γ . Maternal blood from DM-2 and cord blood from MGH exhibited a higher proportion of CD19⁺ expression by B cells. DM-2 showed a lower proportion of CD19⁺ cells in placenta. FcRn expression increased in cells from cord blood and placenta from MGH. Maternal blood, cord blood and placenta cells from DM-2 showed lower FcRn expression. The highest FcRn expression, irrespective of glycemic status, was observed in placenta cells. Maternal blood IgG levels were lower in DM-2, and cord blood IgG levels were higher in MGH. The highest levels of IgG4 were detected in the blood of hyperglycemic mothers. The highest IgG3 and IgG4 levels in cord blood were detected in MGH, and the lowest IgG2 and IgG3 levels in DM-2. **CONCLUSIONS** - Hyperglycemia produces inflammatory environment with high production of cytokines, presenting changes in expression of NK cells, FcRn in the placenta, in production and rate of transfer of IgG. The levels of cells expressing CD16⁺ and cytokines in maternal blood, cord blood, and placental tissue are modified in pregnancies complicated by diabetes. Maternal hyperglycemia compromised placental transfer of IgG1, IgG3 and IgG4. The results suggest that regardless of hyperglycemia degree, it decreases FcRn expression in placenta and blood cells and compromises the production and transfer of antibodies from maternal blood to newborns.

KEYWORDS: Hyperglycemia, Immunoregulator, IgG, FcRn receptor, NK, cytokines, placental transfer, maternal blood and cord blood.

Lista de Abreviações e Siglas

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADA - *American Diabetes Association*

BSA- Albumina de Soro Bovino

CBA - *Cytometric Bead Array*

CD - *Cluster of differentiation*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CNS - Conselho Nacional de Saúde

CO₂ – Dióxido de Carbono

DM1 - Diabetes Mellitus Tipo 1

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2

DMG – Diabetes Mellitus Gestacional

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilendiamino tetra-acético

FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FcRn - Receptor Fc (*Fragment, crystallizable*) neonatal

HGL - Hiperglicemia gestacional leve

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

IFN - γ - Interferon-Gama

IgG – Imunoglobulinas

IL - Interleucina

LIF - (*leukemia inhibitory factor*) - fator inibidor de leucemia

M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*)- fator estimulador de colônia de macrófagos

MG - Média Glicêmica

ND - Não diabéticas

NK – Células *Natural Killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS- Tampão fosfato-salino / *phosphate buffered saline*

PG - Perfil Glicêmico

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β - *Transforming growth factor-beta*.

Th – Células T “helper”

TNF- α - Fator de necrose tumoral - *alfa*

Treg – Células T reguladoras

TTG - Teste de Tolerância à Glicose

uNK - Células *Natural Killer* uterinas

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	2
Hiperglicemia associada à gestação	2
Interface materno-fetal no processo de tolerância fetal.....	4
Papel das células NK no processo de tolerância fetal	5
Papel das citocinas no processo de tolerância fetal	7
Transferência placentária de IgG e subclasses	11
Justificativa do estudo	13
OBJETIVO GERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MÉTODO	17
RESULTADOS.....	28
ARTIGO 1 – PUBLICADO.....	30
ARTIGO 2 – PUBLICADO.....	39
SÍNTESE DOS RESULTADOS DOS ARTIGOS	49
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO 1	67
ANEXO 2	69

Introdução

INTRODUÇÃO

Hiperglicemia associada à gestação

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (ADA, 2015).

As Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD - 2015-2016), seguindo os conceitos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Associação Americana de Diabetes (ADA), classificam o DM em quatro classes clínicas: pré-gestacionais – o **DM tipo 1 (DM1)**, caracterizado pela destruição de células beta, e o **DM tipo 2 (DM2)**, caracterizado por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose, **outros tipos específicos de DM**, caracterizado por defeitos genéticos na função das células beta ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outras condições, e **DM gestacional (DMG)**, qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. A fisiopatologia é explicada pela elevação de hormônios contrarreguladores da insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais). Reconhecendo ainda, como pré-diabetes, outras categorias que não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM – a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída.

A associação do teste oral de tolerância à glicose de sobrecarga de 100g (TTG-100g) ao perfil glicêmico (PG) foi utilizada para identificar quatro grupos de gestantes com respostas diferenciadas aos dois testes, constituindo a classificação diagnóstica de Rudge, e definindo o grupo de gestantes com resposta normal ao TTG-100g e alterada ao PG, como portadoras de **hiperglicemia gestacional leve (HGL)**. Essas gestantes

apresentam níveis glicêmicos inferiores aos limites diagnósticos para o DMG, entretanto, mais elevados que o valor de referência normal, com repercussões maternas e perinatais comparáveis às associadas ao DMG (RUDGE et al., 2000; RUDGE et al., 2005).

Independentemente do tipo, diabetes ou hiperglicemia, a deficiência na produção ou ação da insulina, leva a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, com impacto significativo na gravidez e no ambiente intrauterino, apontados como risco de aborto precoce, defeitos congênitos graves, risco de infecções e macrosomia fetal, sobretudo nos casos tratados de maneira inadequada (NIEMEIJER-KANTERS et al., 2001; GOLBERT; CAMPOS 2008).

A gestação associada ao diabetes ou à hiperglicemia gera um ambiente inflamatório, despertando o interesse da comunidade científica nos estudos de proteínas pró e anti-inflamatórias, como biomarcadores para auxiliar na rotina laboratorial e em paralelo tornar-se promissores indicativos na identificação e no acompanhamento de gestantes ao diagnóstico da DM (RIBAS et al., 2015).

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram alterações na produção de citocinas, com desequilíbrio na relação IL-10/TNF- α (MORELI et al., 2012) e modulação da atividade funcional dos fagócitos, no sangue e colostro maternos e no sangue do cordão umbilical, de gestações associadas à hiperglicemia. Ações das citocinas IFN- γ , TGF- β , IL4 e IL17 foram observadas na atividade fagocítica e na liberação de espécies reativas do metabolismo de oxigênio e de cálcio intracelular, no colostro e no sangue maternos (FAGUNDES et al., 2015).

Interface materno-fetal no processo de tolerância fetal

O feto representa um organismo estranho ao sistema imunológico materno, mas apesar de apresentar aloantígenos, normalmente não são rejeitados. A placenta é um órgão transitório responsável pela proteção, nutrição, respiração, controle endócrino e está envolvida na imunorregulação na interface materno-fetal (BURTON; FOWDEN, 2015). Ela possui células tanto de origem materna como fetal que expressam moléculas com papel fundamental na tolerância materno-fetal (GULERIA; SAYEGH, 2007). A placenta é um órgão essencial altamente especializado, que incluem as vilosidades coriônicas e a decídua contribuem para a estrutura da placenta (BORBELY et al., 2014).

As vilosidades do córion são de origem fetal e se projetam no espaço intervilloso, onde são banhadas pelo sangue materno (BENIRSCHKE, 2004). A decídua tem sido conhecida como o tecido uterino materno, que reveste o espaço intervilloso. Ela desempenha um papel essencial na proteção do embrião frente às células imunológicas maternas e fornece suporte nutricional para o embrião em desenvolvimento antes da formação da placenta (ELSAYES et al., 2009). A invasão trofoblástica no endométrio induz mudanças deciduais (ELSAYES et al., 2009). A imunologia da gestação envolve vários aspectos, tanto moleculares como celulares. Durante a implantação do embrião, há o contato direto entre os antígenos fetais e o sistema imune materno, nas artérias maternas e no espaço intervilloso da placenta humana, no qual as células maternas são capazes de reconhecer e responder especificamente a uma multiplicidade de antígenos estranhos com função mediadora da imunidade celular e humoral (ABBAS; LICHTMAN, 2005), gerando um estado de tolerância fetal em gestações bem-sucedidas (CHRISTIANSEN, 2005).

Papel das células NK no processo de tolerância fetal

A gravidez bem sucedida depende de adaptações imunológicas e mudanças dinâmicas nas populações de leucócitos permitindo ao feto crescimento e desenvolvimento no útero, apesar de ser reconhecido por células do sistema imunológico materno. Dentre os mecanismos de adaptações no endométrio materno, há uma relativa supressão da imunidade adaptativa, apresentando redução das células T e B, entretanto, o sistema imune inato assume um importante papel na defesa imune materna com o predomínio populacional de células *natural killer* (NK) (MOFFETT-KING, 2002).

As células *natural killer* (NK) são linfócitos do sistema imunológico inato com densidade granular aumentada, possuem atividades líticas diretas e secretam citocinas imunorregulatórias durante a fase reprodutiva sendo de grande importância na tolerância do feto (ZHANG et al., 2011; KATCHAR; DROUIN; STEERE, 2013).

As células *natural killer* uterinas (uNK) representam a população de células mais abundantes na interface materno-fetal no primeiro trimestre da gestação, cerca de 70% a 80%. As uNK estão presentes na decídua basal durante a fase de implantação, invasão trofoblástica, placentação e gestação inicial possuem diferenças fenotípicas e funcionais importantes quando comparadas às células *natural killer* periféricas (KITAYA et al., 2000; BULMER; LASH, 2005). As células NK periféricas representam de 10 a 15% dos linfócitos na corrente sanguínea e diminuem em número e função durante o curso da gestação (RAÍ; SACKS; TREW, 2005; MOSIMANN et al., 2013).

Fenotipicamente, as células expressam proteínas de membrana celular ou “*cluster of differentiation*” (CD) que são marcadores na diferenciação das subpopulações de linfócitos, assim, as células NK se caracterizam por expressar os receptores CD56 e CD16. Em seres humanos, as células uNK são fenotipicamente CD56^{bright}CD16⁻ em

contraste, com as células NK de sangue periférico que são predominantemente CD56^{dim}CD16⁺ (MOFFETT-KING, 2002).

De acordo com a expressão CD56⁺, as células NK podem ser divididas em duas subpopulações, CD56^{dim} e CD56^{bright}. As células NK CD56^{dim} apresentam alta citotoxicidade *in vitro*, e as células CD56^{bright} apresentam baixa citotoxicidade; no entanto, os linfócitos uterinos que expressão CD56^{bright} proliferam-se, agregam-se nas proximidades das artérias espiraladas e glândulas endometriais, e secretam citocinas como o fator inibidor de leucemia (*leukemia inhibitory factor* - LIF) e fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage-colony stimulating factor* - M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), interferon-gama (INF- γ) e interleucina -10 (IL-10), citocinas necessárias na formação e manutenção da decídua, crescimento da placenta, implantação embrionária e responsável pelo remodelamento das artérias espiraladas durante a invasão trofoblástica (LANIER, 2001; MOFFETT-KING, 2002; LOBO et al., 2004; QUENBY; FARQUHARSON, 2006; KATCHAR; DROUIN; STEERE, 2013).

O receptor CD16, denominado Fc γ RIIIa, é de baixa afinidade pela região Fc da imunoglobulina G (IgG), e é o principal responsável pela função de citotoxicidade dependente de anticorpos. Aproximadamente 90% das células NK periféricas são CD56^{dim} com alta expressão de CD16, sendo os 10% restantes CD56^{bright} com expressão mínima ou ausente de CD16 (RAÍ; SACKS; TREW, 2005), quando comparadas as células NK uterinas, CD56^{bright} CD16⁻, caracterizadas por não expressarem marcadores típicos como o CD16. Assim, as células CD56^{dim} são citotóxicas, enquanto as CD56^{bright} possuem funções imunorreguladoras, desempenhadas pela secreção de diversas citocinas (MOFFETT-KING, 2002; RODRIGUES et al., 2013).

Em casos de abortos recorrentes, há uma maior proporção de CD56^{dim}CD16⁺ em relação às células uNK CD56^{Bright}CD16⁻, o que sugere o papel destas células na

manutenção da gravidez (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; YAGEL, 2009). Em vez de ações citotóxicas predominantes para células infectadas por vírus ou células cancerosas, as células uNK, na decídua, participam na indução de células endoteliais e são capazes de modificar as artérias uterinas para aumentar o suplemento sanguíneo para a unidade feto-placentária (GULERIA; SAYEGH, 2007; BULMER; LASH, 2015; RÄTSEP et al., 2014).

Papel das citocinas no processo de tolerância fetal

As citocinas estão associadas a atividades de ativação, proliferação e diferenciação de células, atuando como mediadoras de respostas inflamatórias, podendo, ainda, induzir a produção de outras citocinas.

Sabe-se que os linfócitos TCD4⁺ são responsáveis pela produção da maioria das citocinas relacionadas aos processos imunológicos e foram classificadas inicialmente em duas populações: padrão de produção T “helper” 1 (Th1) e padrão de produção T “helper” 2 (Th2) (WU et al., 2014). Enquanto a primeira população atua na imunidade mediada por células, na inflamação, citotoxicidade e hipersensibilidade tardia, a segunda atua na imunidade humoral e regulação das ações inflamatórias de do perfil Th1 (RENGARAJAN; SZABO; GLIMCHER, 2000; WU et al., 2014). Outros perfis de citocinas, também têm sido descritos para os linfócitos T CD4⁺, entre estes, Th3, Tr1 e Th17 (REINHARDT et al., 2006). As interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL- 6, IL-7, IL-8 e TNF (fator de necrose tumoral) consideradas como pró-inflamatórias e as IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (fator transformador de crescimento β) como anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2011).

Desde a implantação até o termo da gestação, a interação entre citocinas pró e anti-inflamatórias são fundamentais para o resultado da gestação. Uma redução de

citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , e IL-6, e o aumento de citocinas com atividades regulatórias, como a IL-10, na evolução da gestação de mulheres reforçam o papel imunomodulador para a manutenção e desenvolvimento do concepto (DENNEY et al., 2011).

Interações maternas e fetais são bidirecionais. O feto e a placenta necessitam de ambiente adequado, em condições de homeostase, e a mãe garante esse ambiente com adaptações em seu metabolismo. Entretanto, desordens imunes ou inflamatórias, como alterações na capacidade de resposta de citocinas, podem contribuir para a ocorrência de resultados adversos na gravidez. Em relação ao balanço Th1/Th2 de gestações não-diabéticas, há predomínio de atividades definidas como Th2, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2 e IFN- γ (CLARK; ARCK; CHAOUAT, 1999) e necessidade de um discreto balanço entre citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2, para o crescimento e desenvolvimento do feto (AGARWAL et al., 2000). Entretanto, na gravidez complicada por diabetes ou hiperglicemia há aumento na contagem de leucócitos, apresentando índices mais elevados na razão entre as células Th1/Th2, e ativação mais pronunciada de monócitos (GROEN et al., 2015).

O TNF- α , a 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. Com a evolução da gestação, maiores concentrações de TNF- α foram relacionadas ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia e diabetes *mellitus* gestacional e, a redução de IL-10, ao parto pré-termo (RAGHPATHY et al., 2001; COUGHLAN et al., 2001; PERAÇOLI; RUDGE; PERAÇOLI, 2007; DENNEY et al., 2011). Elevadas concentrações de TNF- α foram encontradas no sangue de mães com DMG e nas placentas de mães com DM2, demonstrando que a intensidade da hiperglicemia reflete diretamente no ambiente intrauterino (MORELI et al., 2012).

Mulheres com falhas de implantação apresentam altas concentrações de TNF- α , que refletem a presença dominante da resposta imunológica de Th1. A maior expressão de citocinas Th1 sugere uma etiologia imunológica subjacente associada às falhas reprodutivas, como abortos recorrentes (NG et al., 2002; SAITO et al., 2010), abortos espontâneos e pré-eclâmpsia (SAITO; SAKAI, 2003) (SAITO et al., 2010). No entanto, o predomínio da imunidade Th2 foi também relatada em casos de aborto recorrente (CHAOUAT et al., 2003, SAITO et al., 2010). Assim, o balanço Th1/Th2 tornou-se insuficiente para explicar o mecanismo que previne a rejeição do aloenxerto fetal e outros perfis de citocinas foram descritos para os linfócitos TCD4⁺, entre eles, Th3 e Th17, que parecem atuar durante a gestação (REINHARDT et al., 2006; WU et al., 2014).

Respostas caracterizadas como Th17, T reguladoras (Treg) e células NK têm sido apontadas como fatores relevantes na gestação (SAITO et al., 2008; PECK; MELLINS, 2010; SAITO et al., 2010). A citocina IL-17 tem ação pró-inflamatória, definindo a resposta do tipo Th17 (PECK; MELLINS, 2010; CROME; WANG; LEVINGS, 2010), descrita como indutora de inflamação em doenças autoimunes e na rejeição aguda dos transplantes (NORMANTON; MARTI, 2013), além de mediar ambas as respostas de defesa antimicrobiana e inflamação patológica (PECK; MELLINS, 2009). Em contraste, as células Treg fazem a imunorregulação e a indução de tolerância, inibindo a produção e liberação de citocinas pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺, a produção de imunoglobulinas pelas células B (CD19⁺), a maturação de células dendríticas e a atividade citotóxica das células NK (SAKAGUCHI et al., 2005, AKBAR et al., 2007, SAITO et al., 2010).

O perfil de citocinas das células NK da decídua é diferente do perfil de células NK do sangue periférico. As NK da decídua foram descritas como produtoras de TGF- β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e não produtoras de IL-13, enquanto que as NK

do sangue periférico produzem TGF- β , sugerindo um papel importante desta citocina na manutenção da gestação, uma vez que é um importante fator imunorregulador de células T, células B, NK e células dendríticas (SAITO et al., 2008). Embora se saiba que o IFN- γ , TNF- α e a IL-2 são potencialmente deletérios para o conceito, IL-4, IL-6 e IL-10, em conjunto com o TGF- β , favorecem a implantação e controlam as respostas maternas nocivas (KRISHNAN et al., 1996). A IL-10 é reconhecida por auxiliar na manutenção da gestação humana por inibição direta da síntese de citocinas do tipo Th1 e na supressão de uma proporção significativa de células NK (RIVERA et al., 1998; VIGANO et al., 2001). Entretanto, *in vitro*, a combinação das interleucinas IL-2 e IL-12 aumentam a secreção de IL-10 produzida pelas células *natural killer* uterinas (uNK), e esta IL-10 aumenta a citotoxicidade das células uNK induzidas por IL-2 e outras células inflamatórias na placenta (VIGANO et al., 2001).

Estudos em modelos experimentais e em gestantes diabéticas relatam que a produção de citocinas auxilia no processo de regulação do diabetes ou hiperglicemia (RABINOVITCH, 1994; SPRANGER et al., 2003; MORELI et al., 2012; FAGUNDES et al., 2015). Indivíduos com aumento combinado de IL-6 e TNF- α ou com aumento de TNF- α e IL-1 β apresentam maior risco de desenvolver DM2 (SPRANGER et al., 2003). Ainda, gestantes com DM2 tem aumento de IL-17 no plasma, indicando que esta citocina é importante marcador imunológico de inflamação durante a progressão do diabetes (FAGUNDES et al., 2015). A supressão na produção de TNF- α parece ser necessária para a manutenção da gestação e a IL-10 representa fator de proteção para o desenvolvimento do feto no início da gestação (PERTYNSKA-MARCZEWSKA et al., 2010; MORELI et al., 2012). Por outro lado, a produção de citocinas derivadas de neutrófilos representa risco para a saúde fetal e contribui para as complicações observadas em gestantes diabéticas (PERTYNSKA-MARCZEWSKA et al., 2010).

Os neonatos apresentam um perfil de citocinas anti-inflamatórias que parece ser induzida durante a vida fetal. Este perfil pode ser reflexo do ambiente inflamatório materno, evidenciado por aumento de TNF- α (MORELI et al., 2012), IL-6 e IL-17 (FAGUNDES et al., 2015). Estudos em recém-nascidos, de animais e humanos, confirmaram que os linfócitos T tem desvios para o padrão Th2. Demonstraram, também, *in vitro*, a proliferação de linfócitos em presença de IL-4 e IL-7, sugerindo que os linfócitos são células imaturas e que podem ser moduladas (HOLT, 1997; PRESCOTT; SLY; HOLT, 1998; KHAN et al., 2006). De forma similar, a presença das citocinas IL4 e IL17 estimularam a atividade microbicida das células do sangue do cordão umbilical de conceptos de mães hiperglicêmicas (FAGUNDES et al., 2015).

Considerando a associação entre respostas imunológicas e resultados pré e pós-natal, a identificação de alterações no sistema imunológico na interface materno-fetal seria de interesse para a prevenção de resultados adversos da gestação. Entretanto, alguns dos mecanismos imunológicos para a manutenção e o resultado favorável da gravidez precisam ser melhor definidos. Entre eles, a expressão de receptores e marcadores imunorreguladores na placenta seriam de interesse para garantir transporte, proteção, nutrição, respiração e controle endócrino durante a gestação.

Transferência placentária de IgG e subclasses

Durante a gestação, ampla variedade de substâncias, incluindo solutos e nutrientes, são eficientemente transferidas, ativa ou passivamente, através da placenta para o feto (RIQUELME, 2009). Através deste mecanismo, anticorpos maternos são transferidos para o feto e conferem ao neonato uma proteção imunológica temporária, com todo o repertório materno vivenciado ao longo da vida, o que é essencial para o crescimento e o desenvolvimento fetal. Outros fatores com atividade anti-infecciosa

também são transferidos para o feto e apresentam importância imunológica nos processos de tolerância e regulação imunológica, como a liberação de citocinas (CHUCRI et al., 2010). Entre os tipos de anticorpos, apenas quantidades significativas de imunoglobulina G (IgG) são transferidos através da placenta para o feto (PALMEIRA et al., 2012). A imunidade humoral adquirida através de transferência materno-fetal de imunoglobulinas auxilia na prevenção de infecções perinatais.

Os anticorpos IgG têm papel importante na proteção para uma ampla gama de agentes patogênicos, toxinas e na imunidade. O transporte específico de IgG da circulação materna para os capilares fetais é realizado pelo Receptor Fc neonatal (FcRn) (SHAH et al., 2003). Este receptor participa da modulação da resposta imunológica humoral e mediada por células (PALMEIRA et al., 2012). O isolamento do receptor FcRn a partir da placenta humana indicam que interação da IgG com o FcRn impede a degradação, explicando, assim, a meia-vida longa desta classe de anticorpo (ROOPENIAN; AKILESH, 2007; SZLAUER et al., 2009; CIANGA et al., 2011; GAFENCU et al., 2003). Formas solúveis dos FcRn de baixa afinidade podem ser encontradas nos fluidos biológicos. Estas moléculas podem ser geradas pela clivagem enzimática dos receptores de membrana ou como produtos de *splicing* alternativo (GALON et al., 1995).

Em gestações de termo, as concentrações de IgG no sangue do cordão umbilical tem boa correlação com os níveis maternos de IgG (PALMEIRA et al., 2012). A concentração final de anticorpos na circulação dos neonatos depende dos níveis de células B CD19⁺, das concentrações de IgG e de sua transferência através da placenta, podendo variar entre diferentes populações ou entre recém-nascidos de mães com diferentes patologias (CHUCRI et al., 2010). A hiperglicemia altera a transferência de IgG através da placenta e diminui os níveis de imunoglobulina no sangue materno

(FRANÇA et al., 2011). A concentração de IgG é maior no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com hiperglicemia leve, possivelmente pelo aumento de transferência desta imunoglobulina através da placenta (FRANÇA et al., 2011). É possível que o aumento na concentração de IgG no sangue de cordão esteja relacionado a alterações no número e expressão de receptores FcRn.

Justificativa do estudo

A hiperglicemia materna induz a alterações imunológicas maternas, fetais e placentárias. Entretanto, muitas delas, e seus respectivos mecanismos, ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo de interesse elucidar melhor o funcionamento da interface materno-fetal nas gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia. Assim, se iniciou uma linha de pesquisa específica, com alguns resultados já publicados e outros em investigação, justificando-se a proposição desse estudo, para avaliar o papel da hiperglicemia materna no perfil imunológico de seus recém-nascidos, bem como, avaliar os perfis imunorregulatórios das células NK, da produção de citocinas e da expressão de receptores que facilitam a transferência da imunidade materna para o feto.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de células NK e a produção de citocinas no sangue, materno e do cordão umbilical, e na placenta; quantificar a produção de anticorpos e a passagem de IgG total, e respectivas subclasses, via receptor FcRn no sangue de cordão e placenta em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia gestacional leve:

- (i) Imunofenotipagem e os percentuais de células CD16⁺, CD56⁺, CD19⁺ no sangue materno, cordão e placenta;
- (ii) Concentração das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12-p70, IL-17A, IFN- γ e TNF- α no sangue materno, cordão e placenta;
- (iii) Passagem transplacentária de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e correlacionar com as concentrações de IgG e subclasses presentes no sangue materno e sangue de cordão;
- (iv) Expressão do receptor FcRn na placenta e correlacionar com as concentrações de IgGs e o FcRn no sangue materno e de cordão;

Método

MÉTODO

Sujeitos

Foram incluídas gestantes portadoras de (i) hiperglicemia gestacional leve (HGL; TTG75g normal e PG alterado), (ii) diabetes *mellitus* gestacional (DMG; TTG 75g e PG alterados na gestação) e DM prévio tipo 2 (DM2, diagnosticado antes da gestação), (iii) não diabéticas (ND; TTG 75g e PG normais), atendidas no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da FMB-Unesp, referência para essas gestações de risco. O diagnóstico de DMG e HGL foi realizado de acordo com o protocolo do Serviço (RUDGE et al., 2005; ADA 2011).

Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral foram avaliadas a diferença das médias de hemoglobina glicada entre os grupos HGL e DMG, considerando-se a menor distância entre os resultados e o maior número de sujeitos para a amostra (MORELI et al., 2012). Assumindo uma perda de seguimento da ordem de 10% e corrigindo para os efeitos dos erros α (1%) e β (20%) atribuídos ao estudo, foram incluídas 120 gestantes, distribuídas em quatro grupos experimentais:

- ✓ grupo ND (controle / não-diabético): gestantes/nutrizes que, apesar de apresentarem fator de risco para DMG, tinham resposta normal aos testes diagnósticos realizados durante a gestação (TTG-75g e PG) (N = 30).
- ✓ grupo HGL: gestantes/nutrizes com diagnóstico de HGL, confirmado por resposta normal ao TTG-75g e alterações no Perfil Glicêmico (PG), aplicados em série, entre 24 e 28 semanas de gestação (N = 30);

- ✓ grupo DMG: gestantes/nutrizes com diagnóstico de DMG, confirmado por alteração no Teste de Tolerância à Glicose (TTG-75g), realizado entre 24 e 28 semanas de gestação (N = 30);
- ✓ grupo DM2: gestantes/nutrizes portadoras de DM tipo 2, diagnosticado antes da gestação, independentemente se tratada com insulina e/ou antidiabéticos orais (N = 30);

Desenho do estudo

Estudo prospectivo, tipo corte transversal, onde foram incluídas gestantes e seus recém-nascidos classificados nos grupos de estudo, descritos acima.

Definição dos critérios inclusão, exclusão e descontinuidade

Critérios de inclusão:

- ✓ Ser classificada nos grupos definidos no delineamento do estudo;
- ✓ Idade gestacional mínima de entrada no protocolo de tratamento de 30 semanas, para as portadoras de HGL e DMG, e de 20 semanas para as DM2;
- ✓ Idade gestacional no parto entre 37 a 41^{6/7} semanas, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- ✓ Realizar assistência pré-natal e parto no Serviço
- ✓ Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Critérios de exclusão:

- ✓ gravidez gemelar;
- ✓ malformações fetais;
- ✓ parto antes da 37^a semana de gestação.

Critérios de descontinuidade:

- ✓ abandono do pré-natal no Serviço;
- ✓ malformação fetal diagnosticada no momento do parto;
- ✓ perda de dados relativos ao parto e ao período neonatal.

Definição das variáveis**Variáveis de Caracterização das Mães e Recém-nascidos**

- ✓ Idade (em anos) e idade gestacional (em semanas completas), na entrada do protocolo de tratamento do Serviço;
- ✓ Índice de Massa Corporal (IMC) – calculado pela relação $[(\text{peso}/\text{altura}^2) \times 100]$, em Kg/m^2 , avaliado com o peso pré-gestacional;
- ✓ Média glicêmica mantida na gestação, categorizada em adequada ($\text{MG} < 120\text{mg}/\text{dL}$) e inadequada ($\text{MG} \geq 120\text{mg}/\text{dL}$) (Rudge et al., 2000);
- ✓ Percentual de hemoglobina glicada;
- ✓ Tipo de diabetes e distúrbios hiperglicêmicos;
- ✓ Níveis de Insulina, Bilirrubina e Glicose (mg/dL) do recém-nascido;
- ✓ Peso do recém-nascido;
- ✓ Relação peso / idade gestacional do recém-nascido - categorizada em pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional;
- ✓ Índice Ponderal do recém-nascido (RN) - calculado pela relação $[(\text{peso}/\text{comprimento}^3) \times 100]$ em g/cm^3 ;
- ✓ Índice Placentário - relação entre o peso (em gramas) da placenta e o peso (em gramas) do recém-nascido (RN).

Variáveis Independentes

Grupos de gestantes com respectivos recém-nascidos:

- ✓ ND (não diabéticas com fator de risco para diabetes gestacional) (TTG75g e PG normais);
- ✓ HGL (hiperglicemia gestacional leve) (TTG75g alterados antes da gestação);
- ✓ DMG (diabetes *mellitus* gestacional) (TTG75g e PG alterados na gestação);
- ✓ DM (diabetes *mellitus* tipo 2) (TTG75g e PG alterados).

Variáveis Dependentes

- ✓ Determinação dos percentuais de células e da concentração de citocinas no sangue materno, sangue de cordão e placenta;
- ✓ A passagem transplacentária de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) no sangue de cordão e placenta;
- ✓ A expressão do receptor FcRn, no sangue de cordão e placenta.

Métodos de Coleta e Avaliação

As coletas de sangue materno foram realizadas a partir da 37^o semana de gestação (no termo e antes do início de trabalho de parto). As coletas do sangue materno seguiram as orientações de biossegurança protocolares da Sociedade brasileira de patologia clínica/Medicina laboratorial para coleta de sangue venoso (SBPC/ML, 2010) e a quantidade máxima de sangue colhido foi de 10ml. A coleta de sangue de cordão foi realizada no momento do parto, logo após o nascimento, seguindo os mesmos procedimentos da coleta de sangue materno. As amostras de placenta foram coletadas logo após a dequitação. As amostras foram devidamente processadas e posteriormente armazenadas para as avaliações propostas, conforme fluxograma apresentado no Anexo 2:

- (i) Imunofenotipagem e os percentuais de células CD16⁺, CD56⁺ e CD19⁺ no sangue materno, cordão e placenta;

- (ii) Concentração das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12-p70, IL-17A, IFN- γ e TNF- α no sangue materno, cordão e placenta;
- (iii) Passagem transplacentária de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4);
- (iv) Expressão do receptor FcRn na placenta e correlacionar com as concentrações de IgG no sangue materno e de cordão;

Média glicêmica da gestação (MG)

Para as avaliações de glicemia e insulina do recém-nascido: (i) foram avaliadas pelo método da glicose oxidase (Glucose – Analyzer Beckman II, Fullerton, CA, USA®) e (ii) realizado através de imunoensaio quimioluminescente por micropartículas (Architect insulina, Abbot laboratórios, São Paulo, SP, Brasil®).

A Média Glicêmica (MG) foi calculada pela média aritmética de todas as dosagens de glicemia plasmática observadas nos perfis glicêmicos realizados durante a gestação: (i) a partir do diagnóstico realizado entre 24^a e a 28^a semanas de gestação para os grupos: HGL e DM e (ii) a partir da primeira consulta de pré-natal para gestantes com DM prévio à gestação (DM1 e DM2).

Obtenção de células mononucleares do sangue materno e sangue do recém-nascido

A partir da 37^a semana de gestação foram coletadas amostras de sangue materno (5 a 10ml) em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA®). O sangue de cordão (10ml) foi coletado no intraparto, logo após o clampeamento, em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA®). As amostras de sangue materno e do cordão umbilical foram centrifugadas por 15 minutos a 160G. O plasma foi retirado e reservado para as dosagens de citocinas e anticorpos. As células foram

separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160 G, sob temperatura de 4°C, sendo retirado o botão celular (células mononucleares). A seguir as células foram incubadas em estufa de CO₂, em placa de Petri, por 1 hora a 37°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml. As células mononucleares foram utilizadas nos ensaios de imunofenotipagem.

Para expressão do Receptor FcRn as células foram incubadas com Tampão de Lise (Bectan Dickison (BD), Pharm lyse™ –BD Biosciences, USA) por 10 min a 4°C e lavadas duas vezes com Tampão FACS (BD Biosciences, USA). As células foram utilizadas imediatamente para análise do receptor FcRn.

Obtenção de células da Placenta

Foram coletadas amostras de placenta no momento do parto e imediatamente lavadas com solução salina, após isso, foi retirada uma amostra, respeitando-se uma margem mínima de 2 cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária (CALDERON et al., 2007), a placenta foi cuidadosamente dissecada, a partir de procedimento adaptado descrito para o isolamento citotrofoblasto amniocoriônico isolando o tecido extraviloso da porção vilosa (STENQVIST et al., 2008; BORBELY et al., 2014). Os fragmentos viloso e extraviloso foram armazenados e depois processados para a separação de células. Fragmentos de placenta foram maceradas em PBS com Tween 20 suplementada com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de phenylmethylsulfonyl; 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA, 20 UI de aprotinina, e 0,5% de BSA) em uma proporção de 100 mg de tecido / ml, usando um homogeneizador de alimentação Gen 125 (Fisher Scientific®). O homogenato foi filtrado e reservado para quantificação de citocinas e o sedimento (células) foi fracionado por centrifugação (160 x g, 40 min), através de gradiente

de densidade. O processo de isolamento foi por Ficoll-Paque (densidade 1,077 g / l; Sigma Chemical, St. Louis, EUA). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e as bandas opacas nas interfaces entre PBS e Ficoll-Paque-1077 contendo as células mononucleares foram recolhidas cuidadosamente por aspiração com uma pipeta de Pasteur siliconizada e transferidas para tubos. Células NK foram purificadas por seleção positiva (DURIEZ et al., 2014). As células mononucleares foram contadas em câmara de *Newbauer*, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml. Uma parte das células foram utilizadas nos ensaios de imunofenotipagem.

Para expressão do receptor FcRn o sedimento foi fracionado por gradiente descontínuo. Gradiente de Ficoll-Histopaque foram preparados usando Histopaque 1119 (densidade de 1.119 g mL^{-1} , Sigma Chemical, St. Louis, USA) e Ficoll-Paque 1077 (densidade de 1.077 g mL^{-1} , Sigma Chemical, St. Louis, USA) para isolar as células. Após a centrifugação, uma banda opaca de células foi formada na interface entre o plasma e Ficoll-Paque-1077 e uma outra banda na interface entre o Ficoll-Paque-1077 e Histopaque-1119. Estas bandas foram cuidadosamente transferidos para tubos com uma pipeta de Pasteur siliconizada. As células foram lavadas duas vezes com meio 199 (Sigma Chemical, St. Louis, EUA). As células foram utilizadas imediatamente para os testes de expressão de FcRn.

Imunofenotipagem

Após a separação as células do sangue materno, de cordão umbilical e placentas foram lavadas com Tampão fosfato (PBS) acrescido de BSA (soro albumina bovino) por 10 minutos a 4°C . As células foram marcadas com $1\mu\text{l}$ de anti-CD4PE, anti-CD3PE, anti-CD56PE, anti-CD16FITC, anti-CD19FITC por 30 minutos. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS-BSA e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD

Bioscience, USA). O mínimo de 10.000 células foi avaliado pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Os dados foram analisados usando Cell Quest Software (BD Biosciences, EUA).

Quantificação das Citocinas

As concentrações de citocinas presentes nas amostras de plasma e na placenta foram avaliadas pelo Kit “*Cytometric Bead Array*” (CBA, BD Bioscience, USA)(Pillat et al., 2009). As análises destas citocinas foram realizadas através de citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados através do software *FCAP Array*.

Quantificação da concentração de Imunoglobulina G total e das subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4)

As concentrações da Imunoglobulina G e das subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foram determinadas pelo método imunoenzimático (ELISA-Bioscience, Viena, Áustria). As amostras de plasma sanguíneo utilizadas para a quantificação de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram previamente diluídas em solução tampão (PBS, 1% Tween-20 e 10% Soro Albumina Bovino) seguindo as respectivas proporções: 1:1000 (v/v); 1:1000 (v/v); 1:10000 (v/v); 1:1000 (v/v) e 1:100 (v/v). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas com um filtro de 450nm. Os resultados foram calculados pela curva padrão e expressos em mg/dL.

Expressão do Receptor FcRn nos leucócitos do sangue e da placenta

As células foram lavadas (10 min; 4°C) e ressuspensas em PBS contendo albumina de soro bovino (BSA- Sigma, ST Louis, USA; 5mg/mL). As células do sangue e

da placenta foram incubadas com 10 uL de anticorpo anti-FcRn produzidos em coelho (Sigma, ST Louis, USA) durante 30 min a 4°C. Após este período, as células foram lavadas duas vezes (10 min - 160 x g) e coradas com 10 uL de anti-Ig rabbit-FITC (BD Biosciences, EUA) durante 30 min a 4 ° C. As células foram lavadas e ressuspendidas em PBS contendo albumina de soro bovino (BSA- Sigma, ST Louis, USA; 5mg/mL) e analisada em citometria de fluxo. Para bloquear os receptores-FcγR, as células viáveis foram previamente incubadas com *anti-human* CD16-PE, CD32-PE e CD64-PE (BD Biosciences, EUA). Células, um mínimo de 10.000, foram avaliadas por tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de fluorescência (FL) em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences, EUA). Os dados foram analisados usando as células Quest Software (BD Biosciences, EUA).

Análise Estatística

A taxa de transferência placentária de IgG total, e de subclasses foram calculadas a partir da relação da concentração de anticorpos no sangue de cordão / concentração de anticorpos maternos x 100. Para a análise de (i) imunofenotipagem e os percentuais de células CD16⁺, CD56⁺, CD19⁺(ii) Concentração das citocinas IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12-p70, IL-17A, IFN-γ e TNF-α; (iii) Passagem transplacentária de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4); (iv) Expressão do receptor FcRn, utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para todos os testes, considerou-se $p < 0,05$, como limite de significância estatística.

Aspectos Éticos

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da gestante, livre de coação ou conflito de interesses da

instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As coletas respeitaram os protocolos técnicos do hospital e dos serviços envolvidos. As gestantes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE), conforme resolução Nº466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo número 4389-2012 (anexo 1).

Resultados

RESULTADOS

Os resultados desse estudo definiram dois artigos originais completos:

Artigo 1 – PUBLICADO ON LINE

Cristiane de Castro Pernet Hara, Eduardo Luzía França, Danny Laura Gomes Fagundes, Adriele Ataides de Queiroz, Marilza Vieira Cunha Rudge, Adenilda Cristina Honorio-França, Iracema de Mattos Paranhos Calderon.

Characterization of *Natural Killer* Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers. *Journal of Immunology Research.* (2016).

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7154524> - Fator de Impacto (JCR-2015): 2.812

Artigo 2 – PUBLICADO ON LINE

Estéfani Gonçalves de Souza*, Cristiane de Castro Pernet Hara*, Danny Laura Gomes Fagundes, Adriele Ataides de Queiroz, Glilciane Morceli, Iracema de Mattos Paranhos Calderon, Eduardo Luzía França, Adenilda Cristina Honorio-França. **Maternal-foetal Diabetes Modifies Neonatal Fc Receptor Expression**

on Human Leukocytes. *Scandinavian Journal of Immunology.* (2016) *equal participation. <http://dx.doi.org/10.1111/sji.12466> - Fator de Impacto (JCR-2015): 2.27

Artigo 1

ARTIGO 1 – PUBLICADO

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Immunology Research
Volume 2016, Article ID 7154524, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7154524>



Research Article

Characterization of Natural Killer Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers

Cristiane de Castro Pernet Hara,¹ Eduardo Luzia França,²
Danny Laura Gomes Fagundes,² Adriele Ataides de Queiroz,² Marilza Vieira Cunha Rudge,¹
Adenilda Cristina Honorio-França,² and Iracema de Mattos Paranhos Calderon¹

¹Graduate Program in Gynecology, Obstetrics and Mastology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), 13600-000 São Paulo, SP, Brazil

²Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, 78600-000 Barra do Garças, MT, Brazil

Correspondence should be addressed to Adenilda Cristina Honorio-França; denifran@terra.com.br

Received 26 February 2016; Revised 20 April 2016; Accepted 24 April 2016

Academic Editor: Kurt Blaser

Copyright © 2016 Cristiane de Castro Pernet Hara et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study characterized natural killer cells and cytokines in diabetic mothers, their placenta, and fetus. In the maternal blood from the hyperglycemic groups, the CD16⁺CD56⁻ NK cells increased, whereas that of CD16⁺CD56⁺ decreased in gestational diabetes mellitus [GDM] group. Cord blood from type 2 diabetes [DM-2] showed a higher proportion of CD16⁺CD56⁻ and CD16⁻CD56⁺. The placental extravillous layer of GDM and DM-2 showed an increase of CD16⁺CD56⁻ cells and, irrespective of region, the proportion of CD16⁻CD56⁺ cells was higher in mild gestational hyperglycemia [MGH] and GDM and lower in DM-2. IL-2 was lower in maternal blood and IFN- γ higher in maternal and cord blood from the GDM group. IL-17 was higher in maternal and cord blood from the DM-2 group. The placental extravillous layer of the MGH showed high levels of IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, and IFN- γ and low levels of IL-1 β and IL-8, whereas the placental villous layer contained high levels of IL-17 and IFN- γ . The GDM group, irrespective of region, showed higher levels of IL-8. The DM-2 group, irrespective of region, placenta showed high levels of TNF- α , IL-17, and IFN- γ . The hyperglycemia produces an inflammatory environment with a high content of inflammatory cytokines and cells expressing CD16⁺.

1. Introduction

During pregnancy, the maternal system undergoes adaptations involving cells and proteins associated with the immune-regulatory function to ensure fetal development. One of the tissues participating in immune-regulation of the maternal-fetal relationship is the placenta, a transient organ responsible for fetal protection, nutrition, breathing, and endocrine control [1]. Placental cells derived from both maternal and fetal organisms express molecules that play a fundamental role in maternal-fetal tolerance [2].

Decidua leukocytes, including macrophages, are a prominent population of T cells and natural killer (NK) cells [3] recognized by their direct *in vitro* cytotoxicity. NK cells are characterized as CD16 and CD56 according to the antigens on their surface. More than 95% of human uterine NK cells

(uNK) do not exhibit cytotoxicity and are phenotypically defined as CD56 [4–6]. These cells can recognize the fetal HLA-G histocompatibility antigen and produce cytotoxicity suppressors [7, 8]. The balance between peripheral blood NK cells and regulatory NK cells (NKreg) during pregnancy is essential [9].

The profile of NK cells in the decidua is different from that of NK cells in peripheral blood. Other studies report that decidual NK cells produce cytokines such as IFN- γ , TNF- α , and IL-4 [9]. TNF- α , IL-1 β , and IL-6 are essential in early pregnancy, but, with the evolution of gestation, high TNF- α levels can promote preeclampsia and gestational diabetes mellitus, while low IL-10 levels are associated with preterm birth [10–15]. Therefore, TNF- α production appears to be required for early pregnancy maintenance, whereas IL-10 plays a protective role in fetal development [16]. In diabetic

mothers, IL-17 levels increase during pregnancy, and the cord blood of their newborns shows low IFN- γ levels [17].

In normal pregnancy, IL-4 produced by trophoblasts stimulates Th2 lymphocytes and increases the levels of inhibitory receptors in decidual NK cells, which maintain their inactive phenotype (CD16⁻ CD56⁺) [7, 8]. The hyperglycemic condition, however, generates a proinflammatory environment capable of affecting fetal development, and the production of inflammatory cytokines can pose a risk to fetal health and promote the development of complications associated with diabetes in pregnancy [16].

The immune response associated with diabetes during pregnancy has yet to be completely understood, and the role of NK cells remains unknown. Diabetes possibly changes the expression of NK cells and cytokines in the maternal-placental-fetal unit. To investigate this hypothesis, the present study characterized the NK cells and cytokines of diabetic mothers, as well as their placentas and fetuses.

2. Materials and Methods

Placenta, maternal blood, and cord blood from diabetic mothers was evaluated in a cross-sectional study. The subjects attended the Diabetes and Pregnancy Facility, School of Medicine Obstetrics Course, UNESP, Botucatu, SP. This study was approved by the institutional Research Ethics Committee, and all the subjects gave informed written consent before entering the experimental protocol.

2.1. Subjects. Placenta and blood samples from pregnant women (18–45 years old) were analyzed by maternal glycemic status. Pregnant women with diabetes mellitus type 2 (DM-2) were referred to the Service with a confirmed diagnosis. Pregnant women underwent a 75 g oral glucose tolerance test [OGTT-75 g] [18] and glucose profile (GP) [19], which were applied in parallel between the 24th and 28th weeks of pregnancy. Altered GP were considered when any one value is found equal to or exceeding fasting glycemia of 90 mg/dL and postprandial level of 130 mg/dL [20]. The OGTT-75 g was altered when any of the following plasma glucose values are met or fasting glycemia of 92 mg/dL is exceeded: 1 h postload level of 180 mg/dL and 2 h postload level of 153 mg/dL [19]. According to the results of the OGTT-75 g and GP test, 55 pregnant women were classified into the following groups: nondiabetic [ND; normal 75 g OGTT and GP; $N = 15$], mild gestational hyperglycemia [MGH; normal 75 g OGTT and abnormal GP; $N = 15$], gestational diabetes mellitus [GDM; abnormal 75 g OGTT in pregnancy; $N = 10$], and diabetes mellitus type 2 [DM-2; abnormal 75 g OGTT prior to pregnancy; $N = 15$] [20].

The subjects continued attending the facility, irrespective of diagnosis, and the hyperglycemic patients followed a specific treatment for glycemic control [19].

2.2. Subject Follow-Up and Characterization. Patients with DM-2 or MGH were evaluated for GP with fasting and pre- and postprandial glycemic levels for 24 hours in two-week intervals until the 32nd week and then weekly until

delivery. Glycemic control was assessed during pregnancy. Adequate glycemic control during pregnancy was defined as a glycemic mean of 120 mg/dL or less, and inadequate control was defined as a glycemic mean higher than 120 mg/dL. Thus, pregnant women with MGH were treated with a diet recommended by a dietitian and exercise; insulin therapy was applied when they had inadequate glycemic control. Patients with DM-2 were treated with a diet, exercise, and insulin therapy since the beginning of the pregnancy [20]. The ND pregnant women did not receive any type of intervention against hyperglycemia control.

2.3. Blood Sampling and Preparation of Blood Cells. Samples of 8 mL of maternal blood were collected in the morning at 36th week of pregnancy, prior to the beginning of labor. The umbilical cord blood was intradelivery-collected shortly after clamping. The maternal blood and umbilical cord blood were collected in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, USA) treated with anticoagulant (EDTA). We centrifuged them at 160 G for 15 min to separate plasma from the cells. The plasma was stored at -80°C for later cytokines analysis. The isolation procedure was performed by centrifugation (40 min at $160\times g$), with Ficoll-Paque gradient (density 1.077 g/L; Sigma Chemical, St. Louis, USA). After centrifugation the supernatant was discarded, and the opaque bands at the interfaces between plasma and Ficoll-Paque-1077 containing cells were collected carefully by aspiration with a siliconized Pasteur pipet and transferred to tubes. NK cells were purified by positive selection with magnetic beads [21]. Cells were resuspended independently in serum-free medium 199 and used immediately for assays of flow cytometer.

2.4. Placenta Sampling and Preparation of Blood Cells. Placentas were collected at the moment of delivery and immediately washed with a saline solution. Samples of villous tissue were taken across the placenta halfway between the maternal and fetal sides and the large vessels were removed leaving only villous tissue [22, 23]. The basal plate was carefully dissected from the villous tissue and the amniochorionic membrane. Isolation of extravillous tissue was adapted from described procedure for amniochorionic cytotrophoblast isolation [23, 24]. These fragments were immediately stored in liquid nitrogen and later processed for cells separation. Placental fragments were macerated in PBS with Tween 20 supplemented with protease inhibitors (0.1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.1 mM of benzethonium chloride, 10 mM of EDTA, 20 UI of aprotinin, and 0.5% of BSA) in a proportion of 100 mg of tissue/mL, using a homogenizer Power Gen 125 (Fisher Scientific®). The homogenate was filtered and reserved from cytokines quantification and the sediment (cells) was fractioned by centrifugation ($160\times g$, 40 min) through gradient density. The isolation procedure was performed by Ficoll-Paque (density 1.077 g/L; Sigma Chemical, St. Louis, USA). After centrifugation the supernatant was discarded, and the opaque bands at the interfaces between PBS and Ficoll-Paque-1077 containing cells were collected carefully by aspiration with a siliconized Pasteur pipet and transferred to tubes. NK cells were purified by positive selection with magnetic beads [21]. The cells were washed twice

TABLE 1: Clinical data on the pregnant women with different glycemic status (ND: nondiabetic, MGH: mild gestational hyperglycemia, GDM: gestational diabetes mellitus, and DM-2: type 2 diabetes mellitus) and their newborns.

Parameters	ND (N = 15)	MGH (N = 15)	GDM (N = 10)	DM-2 (N = 15)
<i>Mothers</i>				
Age (years)	26.35 ± 4.20	27.63 ± 6.93	29.55 ± 6.55	32.55 ± 5.94
Gestational age (weeks)	39.17 ± 0.471	38.55 ± 1.39	38.12 ± 0.39	37.23 ± 1.29
Weight gain	13.02 ± 7.25	9.45 ± 4.78	11.31 ± 3.75	10.31 ± 6.75
BMI-1	27.52 ± 6.17	28.54 ± 7.05	28.66 ± 4.60	31.66 ± 6.96*
BMI-2	31.13 ± 7.67	31.88 ± 6.50	32.89 ± 6.33	34.09 ± 9.93
Glucose level (mg/dL)	81.96 ± 9.60	93.73 ± 7.20	104.20 ± 15.87	105.30 ± 15.87*
HbA1c (%)	5.07 ± 0.46	5.12 ± 0.44	5.79 ± 0.89*	5.72 ± 0.44*
<i>Newborn</i>				
Glucose (mg/dL)	77.71 ± 10.92	73.83 ± 15.08	59.04 ± 13.01	63.12 ± 16.11
Bilirubin	1.71 ± 0.48	1.74 ± 0.59	1.76 ± 0.80	1.82 ± 1.16
Insulin	>2	6.77 ± 2.77	6.65 ± 2.07	7.39 ± 5.7
Ponderal index	0.028 ± 0.002	0.028 ± 0.002	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.002
Placental index	0.168 ± 0.037	0.183 ± 0.0451*	0.177 ± 0.03*	0.187 ± 0.03*
Birth weight and gestational age (%)				
SGA	14.28	8.00	7.50	9.20
AGA	78.57	60.00	79.00	76.92
LGA	7.15	32.00	13.50	13.88

Note: HbA1c: glycated hemoglobin; BMI-1 and BMI-2: body mass index in the first and third trimester of pregnancy, respectively. Data correspond to the median of 55 mothers and newborns. The ponderal index of a newborn is the cube root of body weight × 100 divided by height in centimeters; the placental index is the ratio of placental weight to fetal weight. SGA: small for gestational age; AGA: adequate for gestational age, and LGA: large for gestational age.

*Statistical difference between ND and the other groups.

with 199 medium culture (Sigma Chemical, St. Louis, USA). The cells were used immediately for assays of flow cytometer.

2.5. Cell Subsets. To verify the presence of subsets of NK cells expressing CD16⁺ and/or CD56⁺ placenta and blood cells were stained with 5 μL of anti-CD3⁺ PERCP, anti-CD16 FITC, and anti-CD56 PE, for 30 min at room temperature. Cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing bovine serum albumin (BSA; Sigma, ST Louis, USA; 5 mg/mL) for flow cytometry analyses. Isotype controls (IgG1-FITC, IgG1-PE both from BD Biosciences) were used. A minimum of 10,000 cells were gated by size (FSC) and granularity (SSC) with a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software.

2.6. Quantification of Cytokines. Plasma blood and placenta homogenate were collected and stored at -80°C prior to analyses. The samples were thawed and cytokines [IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF-α, and IFN-γ] were measured by cytometric bead array [CBA, BD Biosciences, USA] according to the manufacturer procedures. A flow cytometer was used for these analyses [FACSCalibur, BD Biosciences, USA]. The data were analyzed using the software FCAP Array 1.0 [CBA, BD Biosciences, USA].

2.7. Statistical Analysis. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). The statistically significant difference was evaluated using the analysis of variance (ANOVA) for CD16⁺ and CD56⁺ expression and cytokines. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

3. Results

Clinical data of the mothers and newborns are shown in Table 1. In the first trimester of pregnancy, DM-2 mothers exhibited the highest body mass index (BMI) and glycemic index ($p < 0.05$). Glycated hemoglobin (HbA1c) levels were higher in GDM and DM-2, and the placental index was higher in the MGH, GDM, and MGH groups. The highest proportion of LGA newborns was found in MGH (Table 1).

The highest content of CD16⁺CD56⁻ NK cells in maternal blood was detected in GDM and DM-2, followed by MGH (Table 2). In the cord blood, the amount of CD16⁺CD56⁻ cells was higher in DM-2, and in the placental villous layer it was similar among the groups. In the placental extravillous layer, GDM and DM-2 contained the highest levels of CD16⁺CD56⁻ cells (Table 2).

In general, CD16⁻CD56⁺ cells were similar in maternal blood among the groups. In the cord blood, their frequency was higher in GDM and DM-2. In the placenta, irrespective of the layer, the CD16⁻CD56⁺ cell proportion was higher in

TABLE 2: Percentage of cell phenotypes CD16⁺ and/or CD56⁺ in the placenta, maternal blood, and cord blood of groups without diabetes (ND) or with mild hyperglycemia (MGH), gestational diabetes mellitus (GDM), and diabetes mellitus (DM-2).

Cells (%)	Sample	ND (N = 15)	MGH (N = 15)	GDM (N = 10)	DM-2 (N = 15)
CD16 ⁺ CD56 ⁻	Maternal blood	12.85 ± 6.73	30.67 ± 2.50*	84.40 ± 16.36*	57.27 ± 5.68*
	Cord blood	18.53 ± 3.11	23.71 ± 2.16	15.43 ± 8.59	41.94 ± 18.98*
	Placenta villi	4.70 ± 2.71	4.70 ± 2.71	4.19 ± 3.01	4.76 ± 2.48
	Placenta extravilli	4.85 ± 3.22	3.45 ± 1.64	10.65 ± 2.84**	10.20 ± 6.91**
CD16 ⁻ CD56 ⁺	Maternal blood	1.36 ± 0.19	1.90 ± 0.15	1.45 ± 0.26	1.45 ± 0.26
	Cord blood	0.50 ± 0.10	0.38 ± 0.15	2.76 ± 0.18*	2.16 ± 0.18*
	Placenta villi	13.37 ± 5.56	66.74 ± 20.19*	22.26 ± 16.11*	5.11 ± 3.10*
	Placenta extravilli	16.49 ± 7.67	27.56 ± 13.00**	30.17 ± 19.00*	8.54 ± 2.15*
CD16 ⁺ CD56 ⁺	Maternal blood	8.88 ± 3.34	6.69 ± 2.25	3.35 ± 1.02*	6.70 ± 2.25
	Cord blood	4.66 ± 2.56	5.87 ± 1.42	3.32 ± 2.20*	5.88 ± 1.41
	Placenta villi	3.13 ± 1.2	4.70 ± 1.92	4.20 ± 1.18	1.56 ± 0.55*
	Placenta extravilli	5.00 ± 1.1	7.46 ± 1.31*	6.76 ± 1.04**	3.68 ± 1.47**

Note: results are expressed as the mean of samples of maternal blood, cord blood, and placental tissue. *Statistical difference between ND and the other groups; **statistical difference between cells in placenta villi and placenta extravilli within the same group.

MGH and GDM and lower in the DM-2 group (Table 2). CD16⁺CD56⁺ cells were less frequent in maternal blood and cord blood from GDM. In the placenta villous tissue they were lower in DM-2, whereas in placenta extravillous tissue they were higher in MGH and GDM and lower in DM-2 (Table 2).

Cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , and IFN- γ) were assessed in the placenta, maternal blood, and cord blood from the groups (Table 3). The levels of IL-1 β in placenta extravillous tissue were lower in MGH and GDM. IL-2 levels were lower in the maternal blood from GDM and placenta villi from MGH, whereas IL-4 levels were higher in the cord blood from GDM and placental extravillous layer from MGH (Table 3).

In MGH and GDM, IL-6 concentrations were higher in the placental extravillous layer and lower in placenta villi, and, in DM-2, they were higher in placenta villi. In GDM IL-8 levels were higher in placenta irrespective of the layer, and in DM-2 they were lower in the placental extravillous layer. MGH and DM-2 showed lower IL-8 levels in the placental extravillous layer (Table 3). IL-10 levels were higher in the placental extravillous layer from MGH, GDM, and DM-2. IL-12p70 concentrations were higher in the placental extravillous layer from DM-2 (Table 3).

Irrespective of placental section, TNF- α levels were higher in DM-2 and lower in GDM. IFN- γ levels were higher in maternal and cord blood from GDM. Cytokine levels in the placenta were higher in MGH and DM-2. In placenta extravillous tissue IFN- γ levels were lower in GDM. In maternal and cord blood, the highest IL-17 levels were found in DM-2, and in the placenta they were higher in MGH and DM-2 (Table 3).

The placenta villous/extravillous cytokine ratio is shown in Table 4. For IL-1 β , IL-2, and IL-17, it was similar among the groups; for IL-4, it was lower in MGH and DM-2, and for IL-6 it was lower in MGH and GDM. DM-2 exhibited higher villous/extravillous IL-8, TNF- α , and IFN- γ ratio and lower

ratio for IL-12p70. For IL-8, the ratio was lower in GDM; for TNF- α it was lower in GDM and MGH; and for IL-10 it was lower in MGH (Table 4).

4. Discussion

Fetal and placental tissues require suitable environment, under homeostasis, whereas the maternal body is affected by factors related to metabolic alterations. The fetus receives passive immunity from the mother, which is crucial for newborn adaptation to the extrauterine environment because it provides protection during the first months of life [25–28]. Studies have showed that umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that alter the Nk function and act as a mechanism of fetal-maternal tolerance in human pregnancy [29]. In the present study we characterized the NK cell and cytokine profile in maternal and cord blood as well as the placenta, showing their differences as a function of hyperglycemic status.

NK cells have distinct phenotypes with different functions in discrete tissues; they mediate immune homeostasis in peripheral blood and secondary lymphoid tissues and regulate uterine vascularization [30]. The present study showed an increase in the subsets of cells expressing the CD16⁺ marker in mothers from DM-2 and GDM. This response was similar in fetuses from DM-2, but not in fetuses from GDM. An interesting result was that cells expressing CD16⁺ were frequent in the placental extravillous layer but not in the villous layer. In the peripheral blood, NK cells are typically the largest subset of perforin-expressing cytotoxic lymphocytes and constitute 5 to 15% of total lymphocytes [31]. However, human uterine NK cells (uNK) are phenotypically CD56⁺, which are not cytotoxic [4–6].

Other studies report that a large number of uNK cells are necessary to support successful embryo implantation. In general, the two major types of NK cells are CD56 (bright)

TABLE 3: Cytokine levels (pg/mL) in placental tissue, maternal blood, and cord blood in groups without diabetes (ND) or with mild hyperglycemia (MGH), gestational diabetes mellitus (GDM), and diabetes mellitus (DM-2).

Cytokines	Samples	Concentration (pg/mL)			
		ND (N = 15)	MGH (N = 15)	GDM (N = 10)	DM-2 (N = 15)
IL-1 β	Maternal blood	16.43 \pm 2.71	16.33 \pm 1.07	16.01 \pm 2.00	16.85 \pm 1.64
	Cord blood	15.49 \pm 2.12	15.84 \pm 0.79	16.54 \pm 1.80	14.96 \pm 2.39
	Placenta villi	10.78 \pm 4.05	8.24 \pm 0.66	9.68 \pm 1.24	8.24 \pm 0.49
	Placenta extravilli	12.14 \pm 4.29	8.23 \pm 2.04*	9.76 \pm 2.27*	10.86 \pm 2.58
IL-2	Maternal blood	15.34 \pm 4.86	15.37 \pm 3.74	9.76 \pm 0.48*	14.00 \pm 4.02
	Cord blood	12.77 \pm 3.20	14.05 \pm 3.76	12.41 \pm 2.74	11.76 \pm 3.61
	Placenta villi	10.42 \pm 0.46	7.28 \pm 3.11*	9.34 \pm 3.90	10.05 \pm 3.78
	Placenta extravilli	11.10 \pm 1.20	10.21 \pm 2.21	9.48 \pm 0.87	10.70 \pm 3.54
IL-4	Maternal blood	7.06 \pm 1.82	10.16 \pm 2.87	8.60 \pm 0.93	8.30 \pm 2.16
	Cord blood	7.76 \pm 1.97	12.80 \pm 5.90	14.76 \pm 6.58*	9.06 \pm 4.40
	Placenta villi	8.93 \pm 0.70	9.93 \pm 3.93	7.84 \pm 3.32	8.35 \pm 0.67
	Placenta extravilli	9.34 \pm 0.74	28.81 \pm 13.32* [#]	8.42 \pm 0.82	12.85 \pm 5.05
IL-6	Maternal blood	16.32 \pm 2.45	15.36 \pm 1.70	16.34 \pm 1.96	15.06 \pm 0.95
	Cord blood	16.29 \pm 2.37	16.39 \pm 1.54	16.20 \pm 2.00	14.27 \pm 1.40
	Placenta villi	20.29 \pm 13.68	7.93 \pm 0.67*	10.26 \pm 2.83*	47.45 \pm 17.10*
	Placenta extravilli	11.82 \pm 4.35 [#]	35.67 \pm 25.47* [#]	39.28 \pm 19.07* [#]	10.03 \pm 2.47 [#]
IL-8	Maternal blood	24.5 \pm 4.39	24.61 \pm 1.41	25.44 \pm 2.95	24.23 \pm 2.68
	Cord blood	26.95 \pm 4.95	26.41 \pm 3.38	28.44 \pm 4.12	23.24 \pm 4.99
	Placenta villi	28.77 \pm 19.81	19.32 \pm 5.27	35.57 \pm 12.03*	30.80 \pm 14.33
	Placenta extravilli	37.59 \pm 21.26 [#]	12.93 \pm 5.51 [#]	42.73 \pm 24.56 [#]	22.47 \pm 4.99* [#]
IL-10	Maternal blood	14.75 \pm 1.78	13.91 \pm 1.06	14.21 \pm 1.13	13.95 \pm 0.53
	Cord blood	14.40 \pm 0.69	15.33 \pm 1.91	14.58 \pm 0.81	13.38 \pm 1.06
	Placenta villi	13.59 \pm 5.49	10.42 \pm 2.74	9.08 \pm 3.74*	13.89 \pm 6.98
	Placenta extravilli	10.66 \pm 4.95 [#]	26.45 \pm 13.16* [#]	26.51 \pm 8.70* [#]	27.16 \pm 5.45* [#]
IL-12p70	Maternal blood	10.89 \pm 2.37	11.78 \pm 4.46	11.37 \pm 2.07	9.59 \pm 1.05
	Cord blood	10.51 \pm 1.25	11.79 \pm 1.36	10.19 \pm 0.52	11.19 \pm 0.90
	Placenta villi	5.39 \pm 1.22	5.76 \pm 1.04	8.59 \pm 4.81	10.68 \pm 4.94
	Placenta extravilli	4.74 \pm 0.51	7.9 \pm 1.09	10.06 \pm 3.60	15.34 \pm 0.59* [#]
TNF	Maternal blood	13.78 \pm 2.82	13.27 \pm 1.73	13.72 \pm 1.67	13.34 \pm 1.20
	Cord blood	13.74 \pm 0.91	14.28 \pm 1.15	12.54 \pm 0.80	11.76 \pm 0.75
	Placenta villi	7.48 \pm 1.17	12.77 \pm 5.18	8.88 \pm 1.91	28.69 \pm 13.82*
	Placenta extravilli	10.61 \pm 3.06 [#]	14.36 \pm 5.27	9.11 \pm 4.51	17.99 \pm 6.34* [#]
IFN- γ	Maternal blood	6.37 \pm 0.99	6.40 \pm 0.71	22.83 \pm 4.47*	6.80 \pm 1.55
	Cord blood	6.47 \pm 0.99	17.05 \pm 0.17	37.15 \pm 11.98*	8.45 \pm 3.88
	Placenta villi	6.63 \pm 1.02	12.88 \pm 5.64*	7.27 \pm 0.15	19.95 \pm 4.37*
	Placenta extravilli	7.48 \pm 1.18	14.11 \pm 7.95*	4.21 \pm 2.14* [#]	16.59 \pm 4.92*
IL-17A	Maternal blood	6.98 \pm 1.11	7.08 \pm 2.93	8.90 \pm 2.45	16.20 \pm 4.39*
	Cord blood	5.25 \pm 1.17	5.35 \pm 0.26	8.67 \pm 1.76*	15.46 \pm 2.78*
	Placenta villi	5.15 \pm 2.40	16.86 \pm 5.64*	5.11 \pm 1.23	17.49 \pm 5.39*
	Placenta extravilli	5.63 \pm 0.91	14.03 \pm 4.78*	7.69 \pm 5.14	14.42 \pm 7.20*

Note: results are expressed as the mean of samples of maternal blood, cord blood, and placental tissue. * Statistical difference between ND and the other groups; [#] statistical difference between cells in placenta villi and placenta extravilli within the same group.

TABLE 4: Placental villous/extravillous cytokine ratio in groups without diabetes (ND) or with mild hyperglycemia (MGH), gestational diabetes mellitus (GDM), and diabetes mellitus (DM-2).

Placental cytokines	Villous layer/extravillous layer ratio			
	ND (N = 15)	MGH (N = 15)	GDM (N = 10)	DM-2 (N = 15)
IL-1 β	0.68 \pm 0.23	1.04 \pm 0.21	1.05 \pm 0.18	0.79 \pm 0.15
IL-2	0.94 \pm 0.07	0.86 \pm 0.17	1.00 \pm 0.28	1.02 \pm 0.34
IL-4	2.13 \pm 1.09	0.45 \pm 0.29*	1.27 \pm 0.38	0.70 \pm 0.23*
IL-6	1.13 \pm 0.42	0.68 \pm 0.15*	0.45 \pm 0.08*	1.02 \pm 0.22
IL-8	0.75 \pm 0.41	0.92 \pm 0.20	0.25 \pm 0.08*	3.60 \pm 1.90*
IL-10	1.33 \pm 0.58	0.52 \pm 0.21*	0.90 \pm 0.35	0.75 \pm 0.44
IL-12	1.36 \pm 0.75	1.41 \pm 0.95	1.40 \pm 1.14	0.80 \pm 0.33*
IL-17	1.11 \pm 0.49	1.33 \pm 0.56	0.98 \pm 0.20	1.50 \pm 0.64
TNF- α	0.84 \pm 0.13	0.83 \pm 0.27*	0.36 \pm 0.10*	1.50 \pm 0.64*
IFN- γ	0.80 \pm 0.09	1.23 \pm 0.74	0.64 \pm 0.20	1.25 \pm 0.28*

Note: results are expressed as the mean of samples of placental tissue.
* Statistical difference between ND and the other groups.

and CD56 (dim) cells. Most CD56 (bright) cells are not found in peripheral circulation but reside almost exclusively in the secondary lymph tissue, and their main activity is the production of cytokines, which increases the number of inhibitory receptors in decidual NK cells, maintaining the nonactivated phenotype (CD16⁻CD56⁺) [7, 8].

In the present study, the subsets of cells expressing CD56⁺ in placenta were higher in MGH and GDM and less frequent in DM-2. The molecular mechanisms determining NK cell phenotype have yet to be elucidated [32]. NK cells in the human uterus (uNK) and decidua (dNK) have a unique functional profile. They participate in tissue remodeling and neoangiogenesis, regulating fetal trophoblast invasion, placental vascularization, and especially cytokine and chemokine production [8, 33]. Studies showed that women with GDM have abnormal NK cell function due expression of surface receptors and cytokine production [34], whereas in women with type I diabetes mellitus alterations occur in immunological balances during pregnancy with proinflammatory systemic environment and greatest impact on CD56 Nk cells [35]. In the present study, the increase in CD16⁺ and decrease in CD56⁺ cell expression in the placenta from DM-2 suggest intensification of the innate immune response in diabetic mothers, possibly modulated by the secretion of proinflammatory cytokines that stimulate the NK cells [36]. Both pro- and anti-inflammatory cytokines have the ability to affect the activity of NK cells [37].

The hyperglycemia status of the women under study affected the cytokine profile in maternal blood and placental tissue. In GDM and DM-2, the levels of inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-17 were higher in maternal and cord blood. Similarly, earlier studies showed that mild gestational diabetes and gestational diabetes affect IFN- γ in cord blood and IL-17 in maternal blood, suggesting that IL-17 is an important immunological indicator of inflammation during diabetes progression [17].

Major changes in cytokine levels were observed in the placenta and were associated with its layer (extravillous layer at the maternal interface and villous layer at the fetal interface). In fact, in DM-2 the maternal portion of placenta contained high levels of IL-12, IL-17, TNF- α , and IFN- γ , and the fetal interface had high levels of IL-6, TNF- α , IL-17, and IFN- γ , indicating that the fetal environment is supplied with inflammatory cytokines. This inflammatory profile was weaker in placentas from GDM and MGH. In MGH, placental levels of IL-1 β and IL-8 were low but those of IL-6, IL-17, and IFN- γ were high. In placenta villi in GDM, despite the high IL-8 levels, the concentration of IL-10 was low. Low placental IL-10 levels have been associated with fetal loss, premature delivery, and preeclampsia, irrespective of the prevalence of maternal diabetes [38].

In a previous study it was found that placental TNF- α levels are higher in diabetic women, suggesting that the previous inflammatory and hyperglycemic environment stimulates placental production of TNF- α in a full-term pregnancy [15]. TNF- α production by immune cells in response to different inflammatory stimuli is enhanced by membrane rupture in complicated pregnancies [21, 39].

Cytokine IL-12 is reported to potentiate IFN- γ production by NK cells [40, 41], which is likely related to the higher number of cells expressing CD16⁺ in the placenta of diabetic mothers (DM-2). One remarkable result is that the villous/extravillous IFN- γ and TNF- α ratio was higher in DM-2 placenta. It should be considered that during pregnancy immunological adaptations occur, but the hyperglycemia can alter these adaptations and be responsible for the greater frequency of complications in pregnant women with diabetes [42].

This finding corroborates the hypothesis that the placenta is capable of modifying the concentrations of cells and cytokines from the maternal blood before transferring them to the fetus and that this activity is affected by the inflammatory environment produced by hyperglycemia. An appropriate pro- or anti-inflammatory cytokine balance in decidua is required to support fetal development and must therefore be preserved during antimicrobial responses to prevent inflammation-induced tissue damage and maintain a successful pregnancy [21].

5. Conclusion

In conclusion, the levels of cells expressing CD16⁺ and cytokines in maternal blood, cord blood, and placental tissue are modified in pregnancies complicated by diabetes. Diabetic mothers release a larger amount of cytokines, indicating their important role in regulating the immune response during pregnancy. Despite our findings, changes in the profile of NK cells and cytokines in the placenta of patients with different types of hyperglycemia deserve further attention, given their function over the course of pregnancy.

Competing Interests

The authors declare no nonfinancial or any other competing interests.

Acknowledgments

The authors are very grateful to the Diabetes and Pregnancy Service, Obstetrics Discipline of Botucatu Medical School, UNESP. This research was supported by FAPESP (no. 2012/24212-4 and no. 2013/13017-9), FAPEMAT (no. 158085/2014), and CNPq (no. 308702/2013-1 and no. 475238/2013-3).

References

- [1] G. J. King, "Comparative placentation in ungulates," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 266, no. 6, pp. 588–602, 1993.
- [2] I. Guleria and M. H. Sayegh, "Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 6, pp. 3345–3351, 2007.
- [3] L. A. Salamonsen and L. J. Lathbury, "Endometrial leukocytes and menstruation," *Human Reproduction Update*, vol. 6, no. 1, pp. 16–27, 2000.
- [4] X. F. Li, D. S. Charnock-Jones, E. Zhang et al., "Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 86, no. 4, pp. 1823–1834, 2001.
- [5] S. Kalkunte, C. O. Chichester, F. Gotsch, C. L. Sentman, R. Romero, and S. Sharma, "Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 59, no. 5, pp. 425–432, 2008.
- [6] V. Male, A. Sharkey, L. Masters, P. R. Kennedy, L. E. Farrell, and A. Moffett, "The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire," *European Journal of Immunology*, vol. 41, no. 10, pp. 3017–3027, 2011.
- [7] N. Rouas-Freiss, R. M.-B. Gonçalves, C. Menier, J. Dausset, and E. D. Carosella, "Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 21, pp. 11520–11525, 1997.
- [8] A. Moffett-King, "Natural killer cells and pregnancy," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 9, pp. 656–663, 2002.
- [9] S. Shigeru, N. Akitoshi, M.-H. Subaru, and A. Shiozaki, "The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 77, no. 1, pp. 14–22, 2008.
- [10] R. Raghupathy, "Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy," *Immunology Today*, vol. 18, no. 10, pp. 478–482, 1997.
- [11] M. T. Coughlan, K. Oliva, H. M. Georgiou, J. M. H. Permezel, and G. E. Rice, "Glucose-induced release of tumour necrosis factor- α from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus," *Diabetic Medicine*, vol. 18, no. 11, pp. 921–927, 2001.
- [12] J. C. Peraçoli, M. V. C. Rudge, and M. T. S. Peraçoli, "Tumor necrosis factor- α in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, no. 3, pp. 177–185, 2007.
- [13] J. M. Denney, E. L. Nelson, P. D. Wadhwa et al., "Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy," *Cytokine*, vol. 53, no. 2, pp. 170–177, 2011.
- [14] J. B. Moreli, G. Morceli, A. K. C. De Luca et al., "Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF- α production: the relationship with perinatal outcomes," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 32, no. 3, pp. 604–610, 2012.
- [15] J. B. Moreli, S. Corrêa-Silva, D. C. Damasceno et al., "Changes in the TNF- α /IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 107, no. 3, pp. 362–369, 2015.
- [16] M. Pertyńska-Marczewska, E. Głowacka, A. Grodzicka et al., "Profile of peripheral blood neutrophil cytokines in diabetes type 1 pregnant women and its correlation with selected parameters in the newborns," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 63, no. 2, pp. 150–160, 2010.
- [17] D. L. Gomes Fagundes, E. L. França, R. T. da Silva Fernandes et al., "Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers," *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, vol. 29, no. 6, pp. 998–1004, 2016.
- [18] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 35, pp. S64–S71, 2012.
- [19] M. V. C. Rudge, I. D. M. P. Calderon, M. D. Ramos, J. F. Abbade, and L. M. S. S. Rugolo, "Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes: a retrospective 10-year analysis," *Gynecologic and Obstetric Investigation*, vol. 50, no. 2, pp. 108–112, 2000.
- [20] I. M. P. Calderon, D. C. Damasceno, R. L. Amorin, R. A. A. Costa, M. A. M. Brasil, and M. V. C. Rudge, "Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 78, no. 1, pp. 65–71, 2007.
- [21] M. Duriez, H. Quillay, Y. Madec et al., "Human decidual macrophages and NK cells differentially express Toll-like receptors and display distinct cytokine profiles upon TLR stimulation," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, article 316, 14 pages, 2014.
- [22] Z. L. Vincent, M. D. Mitchell, and A. P. Ponnampalam, "Regulation of MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in human placenta," *Journal of Inflammation Research*, vol. 8, pp. 193–200, 2015.
- [23] A.-C. Stenqvist, T. Chen, M. Hedlund et al., "An efficient optimized method for isolation of villous trophoblast cells from human early pregnancy placenta suitable for functional and molecular studies," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 60, no. 1, pp. 33–42, 2008.
- [24] A. U. Borbely, S. Sandri, I. R. Fernandes et al., "The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 12, article 7, 2014.
- [25] E. L. França, I. D. M. P. Calderon, E. L. Vieira, G. Morceli, and A. C. Honorio-França, "Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 928187, 7 pages, 2012.
- [26] G. Morceli, E. L. França, V. B. Magalhães, D. C. Damasceno, I. M. P. Calderon, and A. C. Honorio-França, "Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum," *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, vol. 100, no. 4, pp. 550–556, 2011.
- [27] G. Morceli, A. C. Honorio-França, D. L. G. Fagundes, I. M. P. Calderon, and E. L. França, "Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Article ID e56915, 2013.
- [28] D. L. G. Fagundes, E. L. França, G. Morceli, M. V. C. Rudge, I. D. M. P. Calderon, and A. C. Honorio-França, "The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, Article ID 590190, 8 pages, 2013.

- [29] S. T. Cox, R. Laza-Briviesca, H. Pearson et al., "Umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that mediate loss of natural killer cell function and cytotoxicity," *European Journal of Immunology*, vol. 45, no. 8, pp. 2324–2334, 2015.
- [30] F. Cichocki, E. Sitnicka, and Y. T. Bryceson, "NK cell development and function—plasticity and redundancy unleashed," *Seminars in Immunology*, vol. 26, no. 2, pp. 114–126, 2014.
- [31] S. C. C. Chiang, J. Theorell, M. Entesarian et al., "Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production," *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1345–1356, 2013.
- [32] A. S. Cerdeira, A. Rajakumar, C. M. Royle et al., "Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors," *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 8, pp. 3939–3948, 2013.
- [33] J. Hanna, D. Goldman-Wohl, Y. Hamani et al., "Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 1065–1074, 2006.
- [34] H. Chiba, A. Fukui, K. Fuchinoue, A. Funamizu, K. Tanaka, and H. Mizunuma, "Expression of natural cytotoxicity receptors on and intracellular cytokine production by NK cells in women with gestational diabetes mellitus," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 75, no. 5, pp. 529–538, 2016.
- [35] S. D. Burke, A. V. C. Seaward, H. Ramshaw et al., "Homing receptor expression is deviated on CD56⁺ blood lymphocytes during pregnancy in Type 1 diabetic women," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, article e0119526, 2015.
- [36] G. Chaouat, S. Dubanchet, and N. Ledée, "Cytokines: important for implantation?" *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 24, no. 11, pp. 491–505, 2007.
- [37] D. L. Schminkey and M. Groer, "Imitating a stress response: a new hypothesis about the innate immune system's role in pregnancy," *Medical Hypotheses*, vol. 82, no. 6, pp. 721–729, 2014.
- [38] J. E. Thaxton and S. Sharma, "Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 63, no. 6, pp. 482–491, 2010.
- [39] S.-L. Opsjøn, D. Novick, N. C. Wathen, A. P. Cope, D. Wallach, and D. Aderka, "Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 29, no. 2, pp. 119–134, 1995.
- [40] T. A. Fehniger, M. H. Shah, M. J. Turner et al., "Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 8, pp. 4511–4520, 1999.
- [41] M. Vitale, A. Bassini, P. Secchiero et al., "NK-active cytokines IL-2, IL-12, and IL-15 selectively modulate specific protein kinase C (PKC) isoforms in primary human NK cells," *Anatomical Record*, vol. 266, no. 2, pp. 87–92, 2002.
- [42] B. Groen, A. E. van der Wijk, P. P. van den Berg et al., "Immunological adaptations to pregnancy in women with type 1 diabetes," *Scientific Reports*, vol. 5, Article ID 13618, 2015.

Artigo 2

ARTIGO 2 – PUBLICADO**Scandinavian Journal of Immunology**

© The Foundation for the Scandinavian Journal of Immunology



Edited By: R. Jonsson and H-G. Ljunggren

Impact Factor: 2.27

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 105/150 (Immunology)

Online ISSN: 1365-3083

Maternal–Foetal Diabetes Modifies Neonatal Fc Receptor Expression on Human Leucocytes

E. G. de Souza^{*a}, C. C. P. Hara^{†a}, D. L. G. Fagundes^{*}, A. A. de Queiroz^{*}, G. Morceli[†], I. M. P. Calderon[†], E. L. França^{*} & A. C. Honorio-França^{*}

^{*}Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil; [†]Graduate Program in Gynecology, Obstetrics and Mastology, Botucatu Medical School, São Paulo State University/UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Received 9 May 2016; Accepted in revised form 21 July 2016

Correspondence to: A. C. Honorio-França, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UPM, Rodovia BR070, Km 5 s/no, Barra do Garças – MT CEP: 78698-000, Brazil. E-mail: denifran@terra.com.br

^{*}Equal participation.

Abstract

This study investigated the expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in maternal blood, cord blood and placental cells and determined IgG levels in maternal blood and cord blood from diabetic mothers. Peripheral blood, cord blood and placenta samples were collected from 26 mothers with normoglycaemia (non-diabetic, ND group) and 52 with hyperglycaemia (26 with mild gestational hyperglycaemia, MGH group, and 26 with type 2 diabetes mellitus, DM-2 group). Cells expressing CD19⁺ and FcRn were identified by flow cytometry. Total IgG and its subclasses were quantified by ELISA. Maternal blood from DM-2 and cord blood from MGH exhibited a higher proportion of CD19⁺ expression by B cells. DM-2 showed a lower proportion of CD19⁺ cells in placenta. FcRn expression increased in cells from cord blood and placenta from MGH. Maternal blood, cord blood and placenta cells from DM-2 showed lower FcRn expression. Blood IgG levels were lower in DM-2, and cord blood IgG levels were higher in MGH. The highest levels of IgG4 were detected in the blood of hyperglycaemic mothers. The highest IgG3 and IgG4 levels in cord blood were detected in MGH, and the lowest IgG2 and IgG3 levels in DM-2. Maternal hyperglycaemia compromised placental transfer of IgG1, IgG3 and IgG4. The results suggest that regardless of hyperglycaemia degree, it decreases FcRn expression in placenta and blood cells and compromises the production and transfer of antibodies from maternal blood to newborns.

Introduction

Maternal dysfunctions have adverse implications for the foetus [1]. That is, the case of diabetes mellitus, which is associated with insufficient or absent insulin secretion by the pancreas that results in increased blood glucose levels and an inflammatory response [2]. Diabetes, a chronic disorder with multiple aetiologies, affects the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins of the mother. As a result, it may compromise foetal development due to unbalanced nutrient availability in maternal bloodstream and failure in placental transport capacity [3–8]. The modified glucose metabolism of diabetic mothers can also affect immunological and biochemical components that are transferred to the foetus and newborn [4, 5]. This is an important issue for infants born to diabetic mothers, considering that antibodies transferred from the mother are fundamental for their adaptation to the extra-uterine environment.

The transfer of maternal antibodies to the newborn protects them against common childhood diseases,

especially respiratory and gastrointestinal disorders [9, 10]. Newborns usually exhibit high IgG levels at birth, and until administration of the first vaccines, this immunoglobulin and its subclasses are their primary humoral protection against vaccine-preventable childhood diseases [11]. IgGs are transported across the placenta by an active process involving the neonatal Fc receptor (FcRn), but the levels of IgG subclasses vary as a function of their affinity to these trophoblastic receptors [12, 13].

FcRn is functionally expressed in several tissues and cells [14–16]. It mediates IgG homeostasis in adults, maintaining its levels in the bloodstream, and promotes IgG transfer from mother to foetus in the prenatal period, via the placenta, providing humoral immunity to the newborn [17, 18].

Despite the importance of the passive immunity provided by maternal–newborn IgG transfer in the prenatal and post-natal period, before maturation of the newborn immune system, little is known about the mechanisms underlying this process in diabetic mothers. Diabetes has been found to affect IgG levels in cord blood [4], and a

change in immunoglobulin levels is possibly associated with FcRn. This study evaluated IgG levels in the blood and cord blood of pregnant women and their association with FcRn expression in cells from maternal blood, cord blood and placenta.

Materials and methods

Maternal blood, cord blood and placenta from diabetic mothers were evaluated in a cross-sectional study. The subjects attended the Diabetes and Pregnancy Facility, School of Medicine Obstetrics Course, UNESP, Botucatu, SP. This study was approved by the institutional Research Ethics Committee, and all the subjects gave informed written consent before entering the experimental protocol. **Subjects.** Women at 24–28 weeks of pregnancy underwent a 75-g oral glucose tolerance test (OGTT-75 g) [19] and analysis of glucose profile (GP) [20]. The GP test assesses maternal plasma glucose levels every 2 h over a 10-h period, providing the mothers with a standard 2840-calorie diet spread over five meals [20], which were applied in parallel between the 24th and 28th weeks of pregnancy. The GP test involves the assessment of maternal plasma glucose levels each 2 h, for a period of 10 h, with standard diet of 2840 calories, divided into five meals [20]. Altered GP were considered when any one values are found equal or exceed fasting glycaemia of 4.9 mM and post-prandial of 7.2 mM [20]. The OGTT-75 g was altered when any of the following plasma glucose values are met or exceeded fasting glycaemia of 5.1 mM; post-load 1 h of 9.9 mM and post-load 2 h of 8.5 mM [19]. According to the results of the 75 g – oral glucose tolerance test (OGTT-75 g) and glucose profile (GP) test, 78 pregnant women were classified into the following groups: non-diabetic group (normal 75 g-OGTT and normal GP; $n = 26$), mild gestational hyperglycaemic group (normal 75 g-OGTT and abnormal GP; $n = 26$) and type II diabetes mellitus group (abnormal GTT-75 g, prior the pregnancy, and abnormal GP; $n = 26$) [21]. The subjects continued attending the facility, irrespective of diagnosis, and the hyperglycaemic patients followed a specific treatment for glycaemic control.

Subject follow-up and characterization. Patients with DM-2 or MGH were evaluated for GP with fasting, pre- and post-prandial glycaemic levels for 24 h in two-week intervals until the 32nd week and then weekly until delivery. Glycaemic control was assessed during pregnancy. Adequate glycaemic control during pregnancy was defined as a glycaemic mean of 6.6 mM or less, and inadequate control was defined as a glycaemic mean higher than 6.6 mM. Thus, pregnant women with MGH were treated with a diet recommended by a dietitian and exercise; insulin therapy was applied when had inadequate glycaemic control. Patients with DM-2 were treated with a diet, exercise and insulin therapy since the beginning of the

pregnancy [21]. The ND pregnant women did not receive any type of intervention to hyperglycaemia control.

These patients were characterized by the gestational age at delivery, weights and body mass indexes in the first and third trimester of gestation and glycated haemoglobin levels (HbA1c) in the third trimester of gestation. For the pregnant women classified as DM-2 and MGH, the glycaemic mean (GM) was calculated by the arithmetic mean of plasma glycaemia levels in all GP performed for diagnose and treatment control. In the ND group, it was calculated by the glycaemic levels evaluated during the diagnostic GP. Plasma glucose was evaluated by the glucose oxidase method (Glucose Analyzer II Beckman[®], Brea, CA, USA).

Blood sampling. Samples of 8 ml of maternal blood were collected prior to the beginning of labour and cord blood at birth in tubes with anticoagulant (EDTA). We centrifuged them at 160 g for 15 min to separate plasma from the cells. The plasma was stored at -80°C for later antibody analysis.

Blood leucocytes. We centrifuged them at 160 g for 15 min to separate plasma from the cells. Cells were incubated with lysing buffer (Becton Dickinson (BD), Pharm lyse[™] – BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) for 10 min at 4°C and washed twice with FACS buffer (BD Biosciences). The cells were used immediately for assays of FcRn expression. For determinations of cells subsets, the samples were separated over a Ficoll-Paque 1077 (density of 1.077 g/ml; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) to isolate the MN cells.

Placenta leucocytes. The placentas collected during delivery were immediately washed with a saline solution and sampled in the villous region. The section sampled was cut from the placental edge at a distance of at least 2 cm from umbilical cord insertion [21]. The placenta sections were stored in liquid nitrogen to be subsequently processed for cell isolation.

For cell isolation, the placenta sections were macerated in PBS with 0.03% Tween-20 using a PowerGen 125 homogenizer (Fisher Scientific[®], Waltham, MA, USA). The homogenate was filtered, and the sediment containing the cells was fractionated by density gradient centrifugation ($160 \times g$, 40 min). Discontinuous Ficoll–Hypaque gradients were prepared using Histopaque 1119 (density of 1.119 g/ml; Sigma Chemical) and Ficoll-Paque 1077 (density of 1.077 g/ml; Sigma Chemical) to isolate the cells. After centrifugation, the supernatant was discarded. One opaque band where the cells had settled was formed in the interface between plasma and Ficoll-Paque-1077 and another band in the interface between Ficoll-Paque-1077 and Histopaque-1119. These bands were carefully transferred to tubes with a siliconized Pasteur pipette. The cells were washed twice with Medium 199 (Sigma Chemical). The cells were used immediately for assays of cell subsets and FcRn expression.

Cell subsets. For verifying the presence of subsets of B cells expressing CD19⁺, placenta and blood cells were stained with 5 µl of anti-CD19 fluorescein isothiocyanate (FITC), for 30 min at room temperature. Cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing bovine serum albumin (5 mg/ml; BSA-Sigma, ST Louis, MO, USA) for flow cytometry analyses. Isotypic controls (IgG1-FITC, IgG1-PE both from BD Biosciences) were used. Data were analysed using the FlowJo 7.2.5 software.

FcRn expression in the blood and placenta leucocytes. Cells were washed (10 min; 4 °C) and resuspended in PBS containing bovine serum albumin (5 mg/ml; BSA-Sigma). Blood cells and placenta cells were incubated with 10 µl of anti-FcRn antibody produced in rabbit (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 4 °C. After this period, the cells were washed twice (10 min – 160 × g) and stained with 10 µl of anti-Ig rabbit-FITC (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. The cells were washed and resuspended in PBS containing bovine serum albumin (5 mg/ml; BSA-Sigma) for flow cytometry analyses. For block FcγR receptors, the viable cells were preincubated with anti-human CD16-PE, anti-human CD32-PE and anti-human CD64-PE (BD Biosciences). A minimum of 10 000 cells were gated by size (FSC), granularity (SSC) and fluorescence intensity (FL) with a flow cytometer (FACSCalibur; BD Biosciences). Data were analysed using the CELLS QUEST Software (BD Biosciences).

Immunoglobulin G and subclass determination. The concentrations of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 were obtained using the immunoenzymatic method (ELISA-Bioscience, Vienna, Austria). The blood samples used for the measurement of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 were previously diluted in assay buffer (PBS, 1% Tween-20 and 10% bovine serum albumin) in the following respective proportions: 1:1000 (v/v); 1:1000 (v/v); 1:10000 (v/v); 1:1000 (v/v) and 1:100 (v/v). The reading was performed at 450 nm. The values were calculated using the standard curve and expressed in mg/dl.

Statistical analysis. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Placental transfer ratios of the total, subclass and specific antibodies were defined in each assay as the ratio of cord concentrations/maternal concentrations × 100. The statistically significant difference was evaluated using the analysis of variance (ANOVA) for total, IgG subclass, CD19⁺ and FcRn expressions. Statistical significance was considered for a *P*-value <0.05.

Results

The clinical characteristics of the groups are shown in Table 1. The women were similar in age, gestational age at birth and weight before pregnancy (*P* > 0.05). Glucose and HbA1c levels were higher in DM-2. Neonates from MGH and DM-2 exhibited higher placental indexes (Table 1).

Table 1 Maternal and newborn clinical data of non-diabetic (ND) group, Mild gestational hyperglycaemic group (MGH) and type II diabetes mellitus (DM-2).

Parameters	ND	MGH	DM-2
Mothers			
Age (years)	26.3 ± 4.2	27.6 ± 6.9	30.5 ± 5.9
Gestational age (weeks)	38.0 ± 1.4	37.6 ± 1.6	37.3 ± 0.5
Glycaemic mean (mmol)	4.5 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.8 ± 0.9*
HbA1c (%)	5.1 ± 0.5	5.1 ± 0.4	6.3 ± 0.6*
BMI-1	27.5 ± 6.2	28.5 ± 7.0	31.7 ± 7.0
BMI-2	31.1 ± 7.7	31.9 ± 6.5	34.1 ± 9.9
Newborn			
Birthweight (g)	3138.3 ± 308.3	3256.4 ± 484.1	3520 ± 698.1
Glucose level (mmol)	3.2 ± 0.6	4.1 ± 0.8	3.5 ± 0.9
Placental index	0.168 ± 0.037	0.183 ± 0.045*	0.177 ± 0.030*

HbA1c – Glycated haemoglobin; BMI-1 (Body Mass Index in the first trimester of pregnancy); BMI-2 (Body Mass Index in the third trimester of pregnancy). Data are expressed as mean and standard deviation (SD). Placental index corresponds to the ratio of placental to foetal weight.

*Intergroup differences.

Maternal blood from DM-2 and cord blood from MGH exhibited the highest proportion of B cells expressing CD19⁺. DM-2 showed the lowest proportion of CD19⁺ cells in placenta and a higher proportion of cells expressing CD19⁺ in maternal blood (Fig. 1).

The incubation assays with anti-FcRn antibodies revealed that FcRn expression increased in cells from cord blood and placenta from MGH. Maternal blood, cord blood and placenta cells from DM-2 showed lower FcRn expression (Figs 2 and 3).

The effects of changes in FcRn expression on immunoglobulin concentration demonstrated lower maternal blood IgG levels in DM-2 and higher IgG levels in cord blood from MGH (Table 2). However, IgG levels in the newborns, acquired by placental transfer, were similar between ND and hyperglycaemic groups (Fig. 4).

With respect to IgG subclasses, the levels of blood IgG1 and IgG4 were higher in MGH. DM-2 exhibited the lowest levels of blood IgG2 and the highest of IgG4. IgG3 levels did not vary among the groups (Table 2), and in MGH were higher in cord blood than in maternal blood. In DM-2, IgG4 levels were higher in maternal blood than in cord blood, and in MGH were lower in maternal blood than in cord blood.

Cord blood IgG2 and IgG3 levels were lower in DM-2 than in ND (Table 2). In MGH, IgG3 and IgG4 levels in cord blood were higher than in ND. However, the ratios between cord blood and maternal blood levels of IgG1, IgG3 and IgG4 were lower in DM-2, whereas placental IgG3 transfer was higher in MGH (Fig. 4).

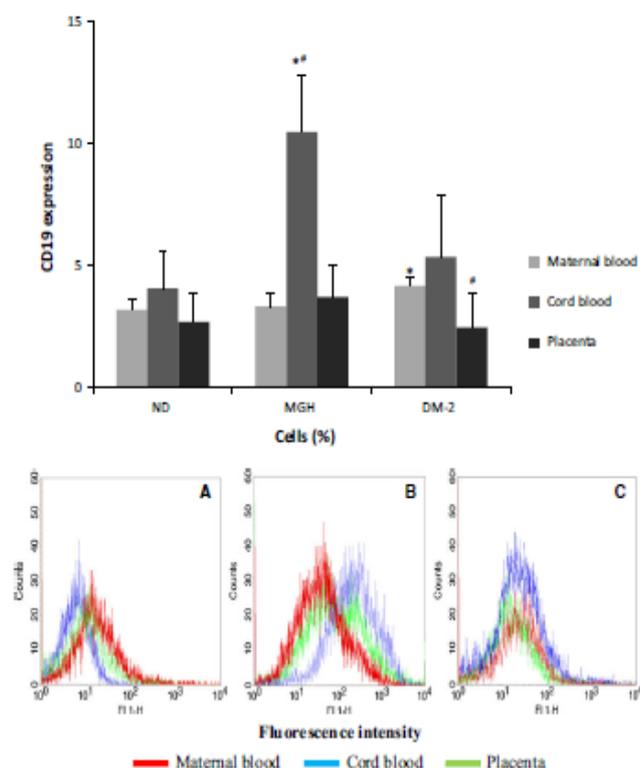


Figure 1 Subsets of cells expressing CD19⁺ in maternal blood, cord blood and placenta of the non-diabetic (ND) group and groups with mild gestational hyperglycaemia (MGH) and diabetes (DM-2). The results represent the mean and SD of cells from samples of maternal blood, cord blood and placenta from each group. *indicates intergroup differences within each sample; and **indicates differences between sample (placenta and blood) considering the same subsets of immune cells. Fluorescence intensity in non-diabetic (A), mild hyperglycaemic (B) and diabetic (C) groups. Immunofluorescence analyses were carried out by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

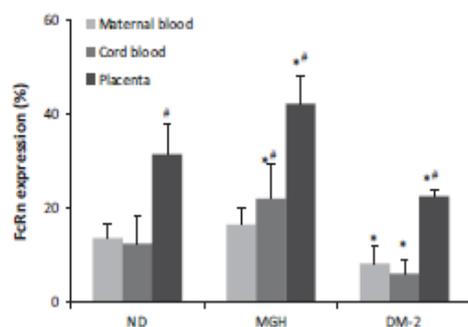


Figure 2 FcRn expression in maternal blood, cord blood and placenta of the non-diabetic (ND) group and groups with mild gestational hyperglycaemia (MGH) and diabetes (DM-2). Notes: Data are expressed as mean and standard deviation (SD) from samples of maternal blood, cord blood and placenta from each group. *Statistical differences between FcRn expression in ND and MGH and between ND and DM-2 considering the same sample ($P < 0.05$); **statistical differences between FcRn expression in maternal blood, cord blood and placenta within a same group ($P < 0.05$).

IgG levels in maternal blood and cord blood were positively correlated (Pearson's test, Fig. 5). In ND, IgG levels in maternal blood were positively correlated with

those of cord blood. MGH, in particular, exhibited a negative correlation between IgG levels in maternal and cord blood. MGH and DM-2 exhibited a negative correlation between maternal IgG levels and transfer rates.

Discussion

Placental immunoglobulin transfer from mother to foetus protects the newborn against different infections in the first months of life [9, 10] and is mediated by the FcRn receptor. The present study, however, showed that hyperglycaemia affects FcRn expression in maternal blood and placental cells, as well as blood immunoglobulin levels.

The neonatal Fc receptor (FcRn) is responsible for transporting maternal IgGs to foetus/newborns and maintaining IgG homeostasis in adults [22]. Associated with IgG, FcRn has been shown to have important functions such as half-life extension of this immunoglobulin and transcytosis across the epithelial cells of the upper airway, proximal small intestine and placenta [23, 24]. Hyperglycaemia, however, changes IgG transfer across the placenta and lowers immunoglobulin levels in maternal blood [4]. The high glucose levels in hyperglycaemic women likely facilitate IgG transfer across the placenta and expand

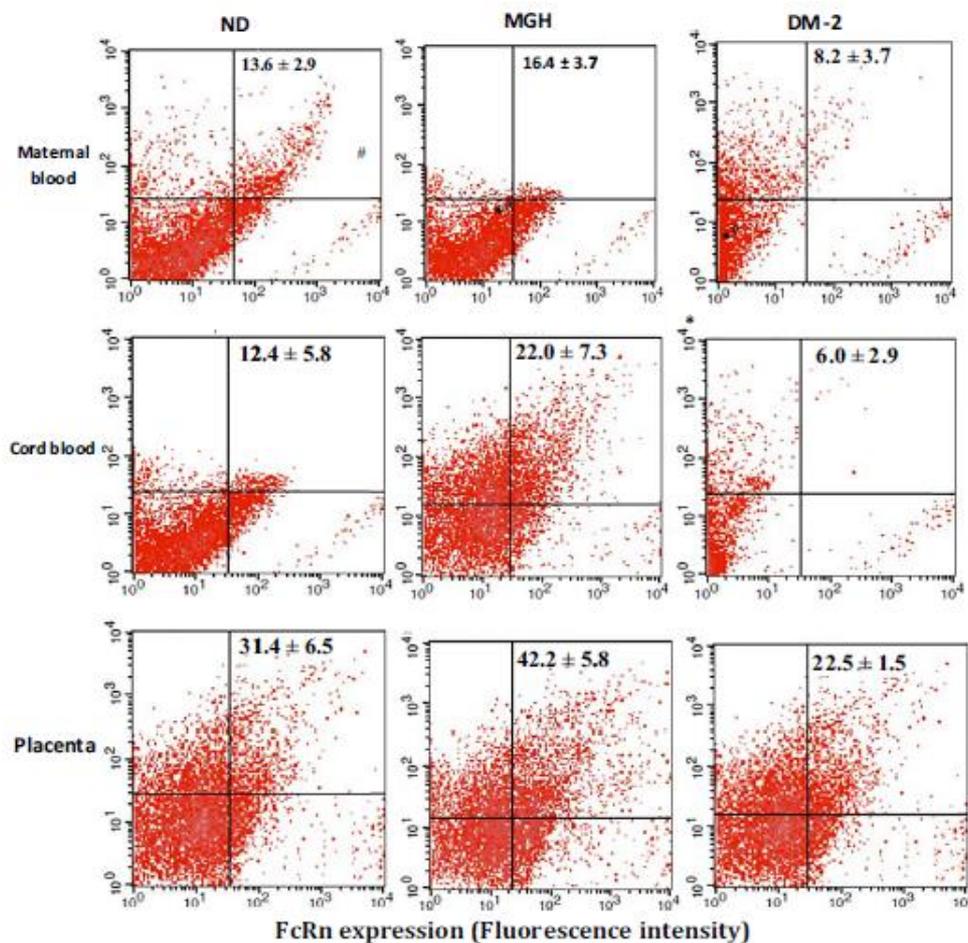


Figure 3 FcRn expression in cells of maternal blood and cord of the non-diabetic (ND) group and groups with mild gestational hyperglycaemia (MGH) and diabetes (DM-2), indexed by fluorescence intensity. Immunofluorescence assays were carried out by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson).

glucose flow to the foetus because during pregnancy the number of glucose transporters increases [25]. In the present study, we found that irrespective of the significant CD19⁺ expression by B cells, IgG levels in maternal blood from DM-2 were low.

Responses mediated by IgG are varied and depend on the type of secondary immune response. The clinical manifestation of the IgG profile of a given individual is also determined by inherited allotypes [26]. In addition, the mechanisms that regulate receptor expression in B cells depend on the degree of glycosylation and epigenetic

influence on glycosyltransferase expression [27], which is affected by several factors such as age, hormones, cytokines, pregnancy and metabolic disease [28]. Interestingly, the increase in cells expressing CD19⁺ detected in the blood from DM-2 did not affect FcRn expression. Other studies reported that FcRn is functionally expressed in several cells [14–16] and that maternal hyperglycaemia modifies the phenotype of blood cells [8]. In the present study, the change in the frequency of B cells and FcRn expression in blood cells may be associated with alterations caused by diabetes and pregnancy.

Table 2 Total IgG and IgG subclasses in maternal blood and cord blood of the non-diabetic (ND) group and groups with mild gestational hyperglycaemia (MGH) and diabetes (DM-2).

Antibody	Sample	ND	MGH	DM-2	Statistical
IgG (mg/dl)	Maternal blood	2014.6 ± 322.4	1705.7 ± 280.2	1585.5 ± 248.6 ^a	<i>P</i> = 3.17
	Cord blood	1580.3 ± 373.8 ^b	1718.9 ± 324.8 ^a	1450.1 ± 232.6	<i>P</i> = 0.014
IgG1 (mg/dl)	Maternal blood	1491.0 ± 351.5	1215.4 ± 182.7 ^a	1308.2 ± 265.0	<i>P</i> = 2.74
	Cord blood	1149.1 ± 251.2 ^b	1145.0 ± 251.8	1133.0 ± 266.8	<i>P</i> = 0.024
IgG2 (mg/dl)	Maternal blood	204.7 ± 42.9	265.8 ± 74.3 ^a	112.7 ± 3.5 ^a	<i>P</i> = 15.1
	Cord blood	192.5 ± 31.8	204.2 ± 13.1	158.1 ± 43.8 ^{ab}	<i>P</i> = 0.002
IgG3 (mg/dl)	Maternal blood	70.1 ± 40.7	63.3 ± 39.5	55.1 ± 16.0	<i>P</i> = 4.54
	Cord blood	78.1 ± 45.7	111.0 ± 29.5 ^{ab}	47.9 ± 13.0 ^a	<i>P</i> = 0.001
IgG4 (mg/dl)	Maternal blood	34.8 ± 7.7	53.7 ± 25.8 ^a	54.6 ± 18.9 ^a	<i>P</i> = 4.88
	Cord blood	42.3 ± 25.3	70.3 ± 33.0 ^{ab}	27.1 ± 6.3 ^b	<i>P</i> = 0.001

Data are expressed as mean and standard deviation (SD).

^aStatistical differences between immunoglobulin levels in women with normoglycaemia and hyperglycaemia considering a same parameter (*P* < 0.05).

^bStatistical difference between immunoglobulin levels in maternal blood and cord blood within a same group (*P* < 0.05).

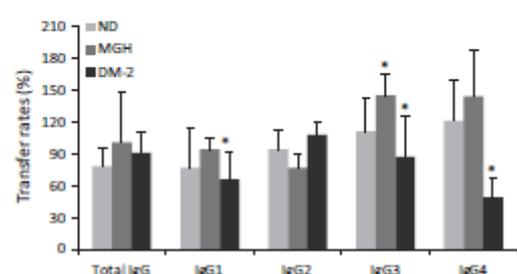


Figure 4 Placental transfer rates of total IgG and IgG subclasses of newborns born to mothers of non-diabetic (ND) group and groups with mild gestational hyperglycaemia (MGH) and diabetes (DM-2). The results are expressed as mean and standard deviation (SD); *statistical difference between the groups (*P* < 0.05).

The importance of placental transport of IgG subclasses must be considered because it is necessary to prevent newborn susceptibility to certain infections [9, 29]. The IgG subclasses are quite different with respect to the immune response they trigger and the function they exert [26].

Data on IgG levels and its subclasses in non-diabetic pregnant women are controversial. Some authors have reported that cord blood contains higher total IgG and IgG1 levels and lower IgG2 and IgG3 levels than those of maternal blood [30], whereas others found higher IgG1, IgG3 and IgG4 levels in cord blood [31]. In the present study, the highest IgG1 levels were detected in MGH women. IgG1 is the main IgG subclass transported via the placenta, followed by IgG3, IgG4 and IgG2, which show lower affinity to the FcRn receptor [26]. In this study, MGH exhibited the highest amount of FcRn receptor in cord blood and placenta cells, probably associated with the high levels of IgG1. Although similar IgG1 levels were detected in the cord blood of DM-2, this group exhibited lower placental transfer of this immunoglobulin and lower

FcRn content in placenta cells, reinforcing the association between FcRn expression and placental IgG1 transfer.

IgG1 is the main IgG subclass provided to the foetus via the placenta, and given the evidence of the effects of maternal glucose levels on its transference, we suggest the existence of a relationship between maternal glucose levels, FcRn expression in blood and placenta cells and the mother/child immunoglobulin transfer rate. This is the first study to report changes in blood IgG subclasses and FcRn expression in blood and placenta cells in diabetic mothers and their implications for newborns.

One noteworthy aspect is that placental transfer of IgG3 was higher in MGH than ND women. Other studies report that placental modifications caused by hyperglycaemia can change the transport of molecules. Discontinuity in the trophoblastic layer of the placenta of hyperglycaemic mothers [32] facilitates the passage of glucose [33] and possibly of some immunoglobulins. In addition, the greater villous capillarization in the placenta of women with mild gestational hyperglycaemia [21] can promote maternal-foetal transfer of substances.

The IgG levels in maternal blood and cord blood were correlated, as were IgG levels in maternal blood and rates of placental IgG transfer. IgG exhibited a positive correlation between cord blood and the blood of ND mothers, whereas in MGH, immunoglobulin levels in maternal blood were inversely correlated with those of cord blood. In hyperglycaemic mothers, IgG in maternal blood and rates of placental IgG transfer were also inversely correlated. Other studies have reported a correlation between cytokines in maternal blood and cord blood in diabetic mothers, suggesting the influence of immune components on the regulation of immune cells in newborns [8]. In the present study, the correlation between maternal blood and rates of placental IgG transfer in diabetic mothers indicates that hyperglycaemia affects foetal IgG levels.

The acquisition of passive immunity is particularly important in the neonatal period, when the immune system

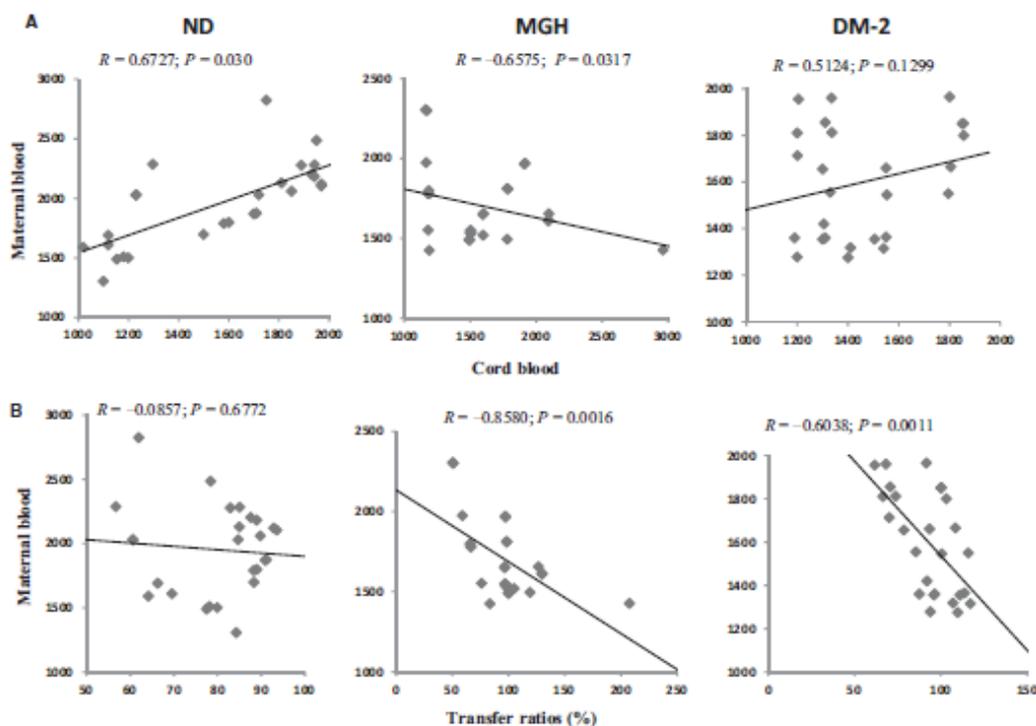


Figure 5 Correlations between total IgG in maternal and IgG cord blood (A) and correlation between maternal IgG levels and transfer rates (B) of samples from mothers non-diabetic (ND), mild hyperglycaemia (MGH) and diabetic (DM-2).

of newborns is still immature. Maternal IgG, transferred in the intrauterine environment, quickly provides passive immunity to the foetus, and in the first months of life protects newborns from a number of infections [11]. On the other hand, the modified glucose metabolism of diabetic mothers affect immunological components [4, 5] and induce oxidative stress [34] factors proinflammatory [8, 35–37] and the placental hypervascularization [38].

These alterations, especially observed in the placenta, act in a vicariant mode, in attempts to protect the developing foetus [39]. The key to these changes is the maternal hyperglycaemia, with consequent foetal hyperglycaemia and hyperinsulinemia inducing hypoxia and inflammation in the middle intrauterine and increased susceptibility to infections in newborn. Thereby, the control of maternal hyperglycaemia [21, 36, 40] can reverse these processes and prevent perinatal complications.

Conclusion

The results suggest that mild or severe maternal hyperglycaemia affects IgG production, IgG placental transfer rate and FcRn expression. In addition, they indicate that

alterations in maternal–infant transfer of IgG antibodies may be associated with changes in FcRn expression in the placenta and blood cells.

Acknowledgment

We are very grateful to the Diabetes and Pregnancy Service, Obstetrics Discipline of Botucatu Medical School, UNESP. This research was supported by FAPESP (2012/18033-0; 2012/24212-4; 2013/13017-9), FAPEMAT (158085/2014) and CNPq (308702/2013-1; 475238/2013-3). The authors declare no conflict of interest and non-financial competing interests.

References

- Schaefer-Graf U, Graf K, Kulbacka I et al. Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:1858–65.
- Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci* 2008;13:1227–39.
- França EL, Morceli G, Fagundes DLG et al. Secretory IgA Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *APMIS* 2011;119:710–9.

- 4 França EL, Calderon IMP, Vieira EL *et al.* Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers. *Clin Develop Immunol* 2012;9:28187-7. DOI: 10.1155/2012/928187.
- 5 Moreli G, França EL, Magalhães VB *et al.* Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. *Acta Paediatr* 2011;100:550-6.
- 6 Fagundes DLG, França EL, Moreli G *et al.* The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. *Clin Develop Immunol* 2013;590190-8. DOI: 10.1155/2013/590190.
- 7 Moreli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG *et al.* Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostrum phagocytes in diabetic women. *PLoS One* 2013;8:e6915.
- 8 Fagundes DLG, França EL, Fernandes RTS *et al.* Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:998-1004.
- 9 Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Anlanian C *et al.* Transfer of antibodies across the placenta and breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20:528-35.
- 10 Lessa AIS, Krebs WJ, Brasil TB *et al.* Preterm and term neonates transplacentally acquire IgG antibodies specific to LPS from *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* I and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62:236-46.
- 11 Van der Berg JP, Westerbeek EAM, Van der Klis FRM *et al.* Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev* 2011;87:67-72.
- 12 Palmeira P, Quindel C, Siveira-Lessa AL *et al.* IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Develop Immunol* 2012;985646-13. DOI: 10.1155/2012/985646.
- 13 Kelch R, Hurt K, Cassens U *et al.* Semi quantitative measurement of IgG subclasses and IgM of platelet specific antibodies in a glycoprotein-specific platelet-antigen capture assay. *Br J Haematol* 2002;117:141-50.
- 14 Akilesh S, Huber TB, Wu H *et al.* Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:967-72.
- 15 Montoya HP, Vaccaro C, Hafler M *et al.* Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2788-93.
- 16 Cui D, Zhang L, Li J *et al.* Bovine FcRn-mediated human immunoglobulin G transfer across the milk-blood barrier in transgenic mice. *PLoS One* 2014;9:e115972.
- 17 Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM *et al.* Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 1996;157:3317-22.
- 18 Simister NE, Story CM, Chen HL *et al.* An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol* 1996;26:1527-31.
- 19 American Diabetes Association. (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35:S64-71.
- 20 Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD *et al.* Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. *Gynecol Obstet Intest* 2000;50:108-12.
- 21 Calderon IMP, Damasceno DC, Amorim RL *et al.* Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;78:65-71.
- 22 Feng Y, Gong R, Dimitrov DS. Design, expression and characterization of a soluble single-chain functional human neonatal Fc receptor. *Protein Expr Purif* 2001;79:66-71.
- 23 Lencer WI, Blumberg RS. A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol* 2005;15:5-9.
- 24 Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS *et al.* Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J Immunol* 2009;182:7663-71.
- 25 Güther K, Quraishi AN, Ilsley NP. Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:695-701.
- 26 Vikarsson G, Deckers G, Rispen T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers Immunol* 2014;5:529.
- 27 Menni C, Keser T, Mangino M *et al.* Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One* 2013;8:e82558.
- 28 Chen G, Wang Y, Qiu L *et al.* Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *J Proteomics* 2012;75:2824-34.
- 29 Costa-Carvalho BT, Vieira HM, Dimantas RB *et al.* Transfer of IgG subclasses across placenta in term and preterm newborns. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:201-4.
- 30 Akbulut H, Çelik I, Çelik A *et al.* Placental transfer of total IgG and IgG subclasses in a Turkish population living in eastern Anatolia. *Nobel Med* 2012;8:59-64.
- 31 Hashira S, Okitsu-Negishi S, Yoshino K. Placental transfer of IgG subclasses in a Japanese population. *Pediatr Int* 2000;42:337-42.
- 32 Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MA *et al.* Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:143-9.
- 33 Rudge MVC, Nero UD, Damasceno DC *et al.* Influence of weight, volume and mass density of placental weight in newborns of pregnant women with hypertension or diabetes Mellitus. *Diabetes Clin* 2012;5:362-7.
- 34 Damasceno DC, Volpato GT, Calderon MPC *et al.* Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci* 2002;72:235-44.
- 35 Moreli JB, Moreli G, Magalhães CG *et al.* Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF- α production: the relationship with perinatal outcomes. *J Clin Immunol* 2012;32:604-10.
- 36 Moreli JB, Santos JH, Rocha CR *et al.* DNA damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 676758.
- 37 Hara CCP, França EL, Fagundes DLG *et al.* Characterization of natural killer cells and cytokines in maternal placenta and fetus of diabetic mothers. *J Immunol Res* 2016; 2016: 7154524.
- 38 Pietro L, Daher S, Rudge MVC *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta* 2010;31:770-80.
- 39 Cvitic S, Desoje G, Hiden U. Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 145846.
- 40 Wahabi HA, Esmail SA, Efyed A *et al.* Pre-existing diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes BMC Research. *Notes* 2012;5:496.

Síntese dos resultados dos artigos

SÍNTESE DOS RESULTADOS DOS ARTIGOS

ARTIGO 01

<i>Amostra</i>	<i>Parâmetro</i>		<i>Resultado</i>	
<i>MÃE</i>	IMC _i		↑	DM-2
	Média glicêmica		↑	DM-2
	HbA _{1c}		↑	DMG
			↑	DM-2
	Citocinas	IL-2	↓	DMG
		IFN- γ	↑	DMG
		IL-17	↑	DM-2
	Células NK	CD16 ⁺ CD56 ⁻	↑	DMG e DM-2 >>> HGL
		CD16 ⁻ CD56 ⁺	Semelhante entre os grupos	
CD16 ⁺ CD56 ⁺		↓	DMG	
<i>RN</i>	Índice Placentário		↑	DM-2
			↑	DMG
			↑	HGL
	LGA		↑	HGL
	Citocinas	IL-4	↑	DMG
		IFN- γ	↑	DMG
		IL-17	↑	DMG e DM-2
	Células NK	CD16 ⁺ CD56 ⁻	↑	DM-2
		CD16 ⁻ CD56 ⁺	↑	DMG e DM-2
		CD16 ⁺ CD56 ⁺	↓	DMG

		Extraviloso		Viloso
<i>Placenta</i>	Citocinas	IL1- β	↓ HGL e DMG	Semelhante
		IL-2	Semelhante	↓ HGL
		IL-4	↑ HGL	Semelhante
		IL-6	↑ HGL e DMG	↓ DMG e HGL ↑ DM-2
		IL-8	↑ DMG ↓ HGL e DM-2	↑ DMG
		IL-10	↑ HGL, DMG e DM-2	↓ DMG
		IL-12p70	↑ DM-2	Semelhante
		TNF- α	↑ DM-2	↑ DM-2
		IFN- γ	↑ HGL e DM-2 ↓ DMG	↑ HGL e DM-2
		IL-17	↑ HGL e DM-2	↑ HGL e DM-2
		Células NK	CD16 ⁺ CD56 ⁻	↑ DMG e DM-2
	CD16 ⁻ CD56 ⁺		↑ HGL e DMG ↓ DM-2	↑ HGL e DMG ↓ DM-2
	CD16 ⁺ CD56 ⁺		↑ HGL e DMG ↓ DM-2	↓ DM-2

ARTIGO 2

Amostra/Parâmetro	Grupo/Resultado	
	HGL	DM-2
Sangue Materno	Semelhante Expressão de CD19	↑CD19
Sangue do cordão	↑ CD19	Semelhante Expressão de CD19
Placenta	Semelhante Expressão de CD19	Semelhante Expressão de CD19
Sangue Materno	↑ IgG2 e IgG4 ↓ IgG1	↓ IgG total e IgG2 ↑ IgG4
Sangue do cordão	↑ IgGtotal, IgG3 e IgG4	↓ IgG2 IgG3 e IgG4
[Sangue do cordão/sangue materno].100	↑ IgG3	↓ IgG1, IgG3 e IgG4
Sangue Materno	Semelhante Expressão de FcRn	↓ Expressão do receptor FcRn
Sangue do cordão	↑ Expressão do receptor FcRn	↓ Expressão do receptor FcRn
Placenta	↑ Expressão do receptor FcRn	↓ Expressão do receptor FcRn
IgG total [Sangue materno/sangue do cordão]	Correlação negativa	
IgG total [Sangue materno/tx. de transferência]	Correlação negativa	Correlação negativa

Conclusões

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sobre o percentual de células NK, produção de citocinas e expressão do receptor que facilitam a transferência de imunidade materna para unidade feto-placentária permitem as seguintes conclusões:

- ✓ A hiperglicemia materna influencia no perfil imunológico materno e de seus recém-nascidos, produzindo um ambiente inflamatório com elevada produção de citocinas, apresentando alterações na expressão de células NK, na expressão do receptor FcRn na placenta, na produção e taxa de transferência de IgG.
- ✓ Reforçam, ainda, a hipótese que a placenta é capaz de modular células e citocinas do sangue materno antes de transferir para o feto e que a hiperglicemia modifica o fenótipo das células.
- ✓ Os resultados sugerem o IFN- γ como potencial marcador no sangue materno para o grupo DMG e a IL17-A como potencial marcador no sangue materno para o grupo DM2, sugerindo ambas citocinas como biomarcadores na predição dessas condições associadas à gestação.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

AGARWAL, R. et al. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. **Gynecol Endocrinol.**, London, v. 14, n. 5, p. 305-310, out. 2000. PMID: 11109968.

AKBAR, A. N. et al. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 3, p. 231-237, mar. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. S11-S61, jan. 2011. doi:10.2337/dc11-S011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. S8-S16, jan. 2015. doi:10.2337/dc15-S005.

BENIRSCHKE, K. The placenta: structure and function. **Neo Reviews.**, v. 5, n. 6, p. 252-261, jun. 2004. Disponível em: <<http://neoreviews.aappublications.org/content/5/6/e252>>
Acesso em: 11 de julho de 2016.

BORBELY, A. U. et al. The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, n. 1, p.1-7, 2014.

BULMER, J. N.; LASH, G. E. The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, v. 868, p. 95-126, 2015. doi:10.1007/978-3-319-18881-2_5.

BULMER, J. N.; LASH, G. E. Human uterine *natural killer* cells: a reappraisal. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.511-521, fev. 2005. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.035>.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ.

Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences, v. 370, n. 1663, p. 1-8, jan. 2015. doi: 10.1098/rstb.2014.0066.

CALDERON, I. M. P. et al. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 78, p. 65-71, 2007.

CHAOUAT, G. et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. **Am J Reprod Immunol**, v. 50, n. 3, p. 177-186, set. 2003. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00080.x.

CHRISTIANSEN, O. B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent cell receptor gene clusters. **PLoS Genetics**, v. 1, p. 129-139, 2005.

CHUCRI, T. M. et al. A review of immune transfer by the placenta. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 87, n. 1-2, p.14-20, dez. 2010. doi: 10.1016/j.jri.2010.08.062.

CIANGA, C. et al. Nonclassical major histocompatibility complex I-like Fc neonatal receptor (FcRn) expression in neonatal human tissues. **Human Immunology**, v. 72, n. 12, p.1176-1187, dez. 2011. doi: 10.1016/j.humimm.2011.08.020.

CLARK, D. A.; ARCK, P. C.; CHAOUAT, G. Why Did Your Mother Reject You? Immunogenetic Determinants of the Response to Environmental Selective Pressure Expressed at the Uterine Level. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 1, p. 5-22, jan. 1999. doi:10.1111/j.1600-0897.1999.tb00071.x.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends In Immunology**, v. 22, n. 11, p. 633-640, nov. 2001. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9.

COUGHLAN, M. T. et al. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 18, n. 11, p.921-927, nov. 2001. doi: 10.1046/j.1464-5491.2001.00614.x

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 159, n. 2, p.109-119, fev. 2010. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x.

DENNEY, J. M. et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p.170-177, fev. 2011. doi: 10.1016/j.cyto.2010.11.005.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Adolfo M. et. al. organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio, São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016, 348 p.

DURIEZ, M. et al. Human decidual macrophages and NK cells differentially express Toll-like receptors and display distinct cytokine profiles upon TLR stimulation. **Front. Microbiol.**, v. 5, p.1-14, 1 jul. 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00316.

ELSAYES, K. M. et al. Imaging of the Placenta: A Multimodality Pictorial Review. **Radiographics**, v. 29, n. 5, p.1371-1391, set. 2009. doi: 10.1148/rg.295085242

FAGUNDES, D. L. G. et al. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. **The Journal Of Maternal-fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, n. 6, p.998-1004, 7 abr. 2015. doi:10.3109/14767058.2015.1031739.

FRANÇA, E. L. et al. Secretory IgA-Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *Apmis*, v. 119, n. 10, p.710-719, 18 jul. 2011. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02789.x.

FRANÇA-BOTELHO, A. C. et al. Phagocytosis of Giardia lamblia trophozoites by human colostral leukocytes. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 4, p.438-443, 1 abr. 2006.

doi:10.1080/08035250500421592.

GAFENCU, A. et al. Investigation of IgG Receptors Expressed on the Surface of Human Placental Endothelial Cells. **Placenta**, v. 24, n. 6, p.664-676, jul. 2003. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4004\(03\)00041-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4004(03)00041-9).

GALON, J. et al. Ligands and biological activities of soluble Fcγ receptors. **Immunol Letters**, v. 44, p.175-81, 1995.

GIBBONS, D. et al. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. **Nature Medicine**, v. 20, n. 10, p.1206-1210, 21 set. 2014. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3670>

GOLBERT, A.; CAMPOS, M. A. A. Diabetes melito tipo 1 e gestação. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 307-314, mar. 2008. doi:10.1590/S0004-27302008000200018.

GROEN, B. et al. Immunological Adaptations to Pregnancy in Women with Type 1 Diabetes. **Sci. Rep.**, v. 5, p.1-13, 22 set. 2015. doi:10.1038/srep13618.

GULERIA, I.; SAYEGH, M. H. Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance. **The Journal Of Immunology**, Boston, v. 178, n. 6, p.3345-3351, 15 mar. 2007. doi: 10.4049/jimmunol.178.6.3345.

HOLT, P. G.; MACAUBAS, C. Development of long term tolerance versus sensitization to environmental allergens during the perinatal period. **Curr Opin Immunol**. V. 9, p. 782-7, 1997.

HONORIO, A. C. et al. Avaliação da resposta imune materna e fetal de ratas diabéticas. **Rev. Bras Ginecol Obstet**. v. 18, p. 233-38, 1996.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Colostral Mononuclear Phagocytes are Able to Kill Enteropathogenic Escherichia coli Opsonized with Colostral IgA. **Scand. J. Immunol.**, v. 46, n. 1, p.59-66, jul. 1997. doi:10.1046/j.1365-3083.1997.d01-86.x.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Colostral neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking γ chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. **J Leukoc Biol.** v. 69, n. 2, p. 289-96, feb. 2001.

KATCHAR, K.; DROUIN, E. E.; STEERE, A. C. Natural killer cells and natural killer T cells in Lyme arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 6, p.1-11, 2013. doi:10.1186/ar4373.

KHAN, N. A. et al. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. **Journal Of Autoimmunity**, v. 26, n. 4, p.268-277, jun. 2006.

doi:10.1016/j.jaut.2006.03.003

KITAYA, K. et al. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 3, p. 683-687, 2000.

KRISHNAN, L. et al. T Helper 1 Response Against Leishmania major in Pregnant C57BL/6 Mice Increases Implantation Failure and Fetal Resorptions Correlation with Increased IFN- γ and TNF and Reduced 11-10 Production by Placental Cells. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 653-662, jan. 1996.

LANIER, L. L. On guard-activating NK cell receptors. **Nature Immunology**, v. 2, n. 1, p.23-27, 01 jan. 2001. doi:10.1038/83130.

LOBO, S. C. et al. The Immune Environment in Human Endometrium during the Window of Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, [s.l.], v. 52, n. 4, p.244-251, out. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00217.x>.

- MOSIMANN, B. et al. Natural Killer Cells and Their Activation Status in Normal Pregnancy. **International Journal Of Reproductive Medicine**, v. 2013, p.1-8, 2013. doi:10.1155/2013/906813.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 9, p.656-663, set. 2002. doi:10.1038/nri886.
- MORCELLI, G. et al. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. **Acta Paediatrica**, v. 100, n. 4, p.550-556, 17 nov. 2010. doi:10.1111/j.1651-2227.2010.02070.x.
- MORELI, J. B. et al. Influence of Maternal Hyperglycemia on IL-10 and TNF- α Production: The Relationship with Perinatal Outcomes. **Journal Of Clinical Immunology**, v. 32, n. 3, p.604-610, 30 dez. 2011. doi:10.1007/s10875-011-9634-3.
- NEGRATO, C. A. et al. Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. **Diabetes/metabolism Research And Reviews**, v. 24, n. 4, p.324-330, 2008. doi:10.1002/dmrr.815.
- NG, S. C. et al. Expression of Intracellular Th1 and Th2 Cytokines in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, Implantation Failures after IVF/ET or Normal Pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 48, n. 2, p.77-86, ago. 2002. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01105.x
- NIEMEIJER-KANTERS, S.D.J.M. et al. Effect of intensive lipid-lowering strategy on low-density lipoprotein particle size in patients with type 2 diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 1, p.209-216, maio 2001. doi:10.1016/s0021-9150(00)00642-0.
- NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein (são Paulo)**, v. 11, n. 2, p.237-246, jun. 2013. doi:10.1590/s1679-45082013000200019.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol. Apr. 2011**, Campinas, v. 61, n. 2, p.260-265, abr. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>>. Acesso em: 08 set. 2016.

PALMEIRA, P. et al. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. **Clinical And Developmental Immunology**, v. 2012, p.1-13, 2012. doi:10.1155/2012/985646

PECK, A.; MELLINS, E. D. Precarious Balance: Th17 Cells in Host Defense. **Infection And Immunity**, v. 78, n. 1, p.32-38, 9 nov. 2009. doi:10.1128/iai.00929-09.

PECK, A.; MELLINS, E. D. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. **Immunology**, v. 129, n. 2, p.147-153, fev. 2010. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03189.x.

PERAÇOLI, J. C.; RUDGE, M. V. C.; PERAÇOLI, M. T. S. Tumor Necrosis Factor-alpha in Gestation and Puerperium of Women with Gestational Hypertension and Pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 57, n. 3, p.177-185, mar. 2007. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00455.x.

PERTYŃSKA-MARCZEWSKA, M. et al. ORIGINAL ARTICLE: Profile of Peripheral Blood Neutrophil Cytokines in Diabetes Type 1 Pregnant Women and its Correlation with Selected Parameters in the Newborns. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 2, p.150-160, 20 dez. 2009. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00775.x.

PILLAT, M. M. et al. Changes in T cell phenotype and activated MAPKs are correlated to impaired cellular responses to antigens and glucocorticoids during HTLV-I infection. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 216, n. 1-2, p.76-84, 30 nov. 2009. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.08.016.

PRESCOTT, S. L.; SLY, P. D.; HOLT, P. G. Raised serum IgE associated with reduced responsiveness to DPT vaccination during infancy. **The Lancet**, v. 351, n. 9114, p.1489-1497, maio 1998. doi:10.1016/s0140-6736(05)78871-1.

QUENBY, S.; FARQUHARSON, R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 13, n. 1, p.24-28, jan. 2006. doi:10.1016/s1472-6483(10)62012-3.

RABINOVITCH, A. Immunoregulatory and Cytokine Imbalances in the Pathogenesis of IDDM: Therapeutic Intervention by Immunostimulation? **Diabetes**, v. 43, n. 5, p.613-621, 1 maio 1994. doi:10.2337/diab.43.5.613.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars In Immunology**, v. 13, n. 4, p.219-227, ago. 2001. doi:10.1006/smim.2001.0316.

RAÍ R.; SACKS G.; TREW G. Natural killer cells and reproductive failure: theory, practice and prejudice. **Human Reproduction**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.1123-1126, 21 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh804>.

RATSEP, M. T. et al. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. **Reproduction**, v. 149, n. 2, p.91-102, 23 out. 2014. doi:10.1530/rep-14-0271.

REINHARDT, R. L. et al. T helper cell effector fates — who, how and where? **Current Opinion In Immunology**, v. 18, n. 3, p.271-277, jun. 2006. doi:10.1016/j.coi.2006.03.003.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **Immunology Today**, v. 21, n. 10, p.479-483, out. 2000. doi:10.1016/s0167-5699(00)01712-6.

- RIBAS, J. T. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias na gestação. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 181-188, jun. 2015;
- RIQUELME, G. Placental Chloride Channels: A Review. **Placenta**, v. 30, n. 8, p.659-669, ago. 2009. doi:10.1016/j.placenta.2009.06.002.
- RIVERA, D. L. et al. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. **FASEB Journal**, v. 12, n. 02, p.189-197, 1998.
- RODRIGUES, M. N. et al. Role of natural killer (NK) cells during pregnancy: A review. **Open Journal Of Animal Sciences**, v. 03, n. 02, p.138-144, 2013. doi:10.4236/ojas.2013.32021.
- ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p.715-725, 17 ago. 2007. doi:10.1038/nri2155.
- RUDGE, M. V. C. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. **Gynecol Obst Invest.**, v. 50, p. 108-12, 2000.
- RUDGE, M. V. C. et al. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 11, p.691-697, nov. 2005.
- SAITO, S. et al. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 1, p.14-22, jan. 2008. doi:10.1016/j.jri.2007.04.007. Erratum to **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 78, n. 1, p.84-85, jun. 2008.
- SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p.601-610, 17 mar. 2010. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x.

- SAITO, S.; SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 2, p.161-173, ago. 2003. doi:10.1016/s0165-0378(03)00045-7.
- SAJI, F. et al. Cytokine production in chorioamnionitis. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 2, p.185-196, jul. 2000. doi:10.1016/s0165-0378(00)00064-4.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p.345-352, abr. 2005. doi:10.1038/ni1178.
- SHAH, U. et al. Distribution of the IgG Fc Receptor, FcRn, in the Human Fetal Intestine. **Pediatr Res**, v. 53, n. 2, p.295-301, fev. 2003. doi:10.1203/01.pdr.0000047663.81816.e3.
- SPRANGER, J. et al. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes: Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p.812-817, 1 mar. 2003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML 2010). *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso*. 2. ed. Barueri-SP: Minha Editora, 2010. 130 p.
- STENQVIST, A. et al. ORIGINAL ARTICLE: An Efficient Optimized Method for Isolation of Villous Trophoblast Cells from Human Early Pregnancy Placenta Suitable for Functional and Molecular Studies. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 1, p.33-42, 28 jun. 2008.
- SZLAUER, R. et al. Functional Expression of the Human Neonatal Fc-receptor, hFcRn, in Isolated Cultured Human Syncytiotrophoblasts. **Placenta**, v. 30, n. 6, p.507-515, jun. 2009.

WU, L. et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, n. 1, p.74-78, 2014.

YAGEL, S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v. 201, n. 4, p.344-350, out. 2009.

ZHANG, J. et al. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell Mol Immunol**, v. 8, n. 1, p.1-11, 16 August 2010. doi: 10.1038/cmi.2010.38.

Anexo 1

ANEXO 1

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)


Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
 CEP: 18.618-970
 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
 e-mail coordenadora: tsarden@fmb.unesp.br




 Comitê de Ética em Pesquisa
 nº 42

Registrado no Ministério da Saúde
 em 30 de abril de 1997

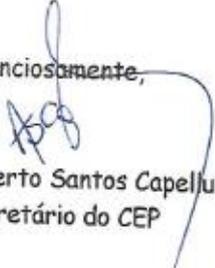
Botucatu, 01 de outubro de 2.012 OF. 504 /2012

Ilustríssima Senhora
 Prof^ª. Dr^ª. Iracema de Mattos Paranhos Calderon
 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
 Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^ª Iracema,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4389-2012) "Marcadores da imunomodulação no sangue materno e fetal e nas placentas de mães diabéticas ou com hiperglicemia gestacional leve", a ser conduzido por Gilciane Morceli, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada por Adenilda Cristina Honório-França, com a colaboração de Cristiane de Castro Pernet Hara, Débora Cristina Damasceno, Danny Laura Gomes Fagundes, Eduardo Luiza França, Jusiele Brogin Moreli e Marilza Vieira Cunha Rudge, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/10/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
 Secretário do CEP

Anexo 2

FLUXOGRAMA 1 - Processamento das Amostras

