

Simone Angélica Leite de Carvalho Silva

Dopplervelocimetria da artéria umbilical como marcador de alterações imunológicas placentárias e de risco de morte perinatal em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de Concentração – Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Iracema de Mattos Paranhos Calderon

Co-Orientadora: Renée Laufer Amorim

**Botucatu
2010**

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Silva, Simone Angélica Leite de Carvalho.

Dopplervelocimetria da artéria umbilical como marcador de alterações imunológicas placentárias e de risco de morte perinatal em gestações complicadas por diabete ou hiperglicemia leve / Simone Angélica Leite de Carvalho Silva. – 2010

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

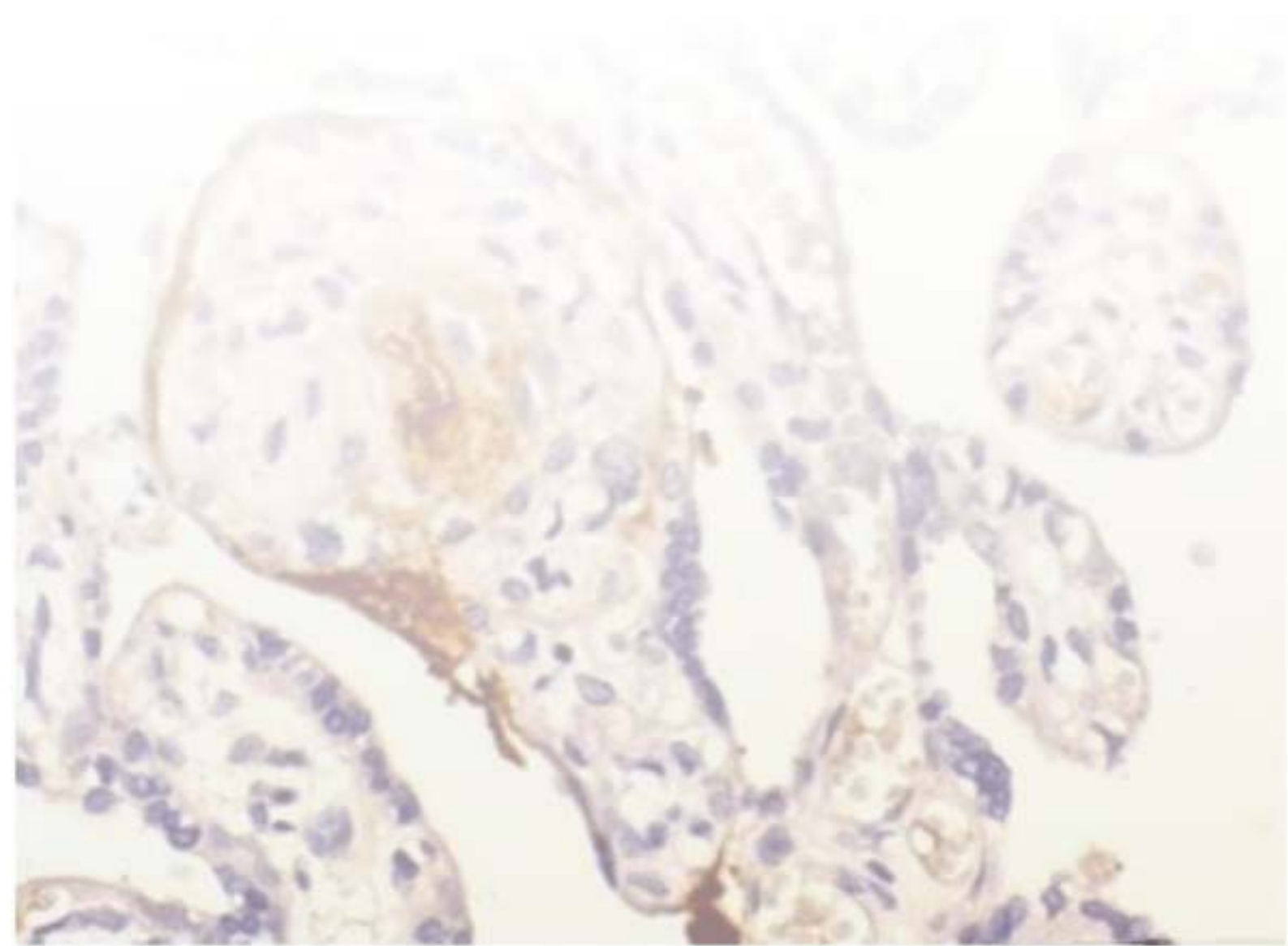
Orientadora: Iracema de Mattos Paranhos Calderon

Co-Orientadora: Renée Laufer Amorim

Capes: 40101150

1. Diabetes na gravidez. 2. Diabetes – Complicações e seqüelas.

Palavras-chave: CASPASE-3; COX-2; Diabete; Doppler umbilical; Hiperglicemia; Placenta; VEGF



Dedicatória

Amar é um sentimento altruísta

Amor é forte como a morte

Tentar entendê-lo apenas paralisa seu modelo

Interpretá-lo aprisiona nossa própria sorte

Tentar reprimi-lo sufoca nossa própria inspiração

Melhor fortalecê-lo sem questionar sua origem, destino ou razão

Amar é abstrato, o que se torna sublime sem explicação

Amor é sofrimento como chagas que sangra sem sentido

É a vontade de gritar no vácuo de um grito contido

É o caos dos sentimentos mais reprimidos

Pobre é o homem que não desfruta de seu sabor

Neste tempo de minutos contados

Onde ser eterno é ser efêmero no infinito

Melhor é viver esta vida com amor

Para preencher a infinitude de sua existência

Amar é contemplação do ego

É espelho de sua vontade no outro

É a busca da falta que em ti exprime

É a loucura abandonada da moral

Matá-lo na raiz destrói a semente do equilíbrio humano

Apodrece a fertilidade da alma

Adormece o sentido da vida

Simone Carvalho

Dedico esta Tese ao Amor, sentimento que consegue subtrair todos os medos e angústias quando dele provamos. Sentimento que me fez sentir acolhida nos meus laços familiares. Sentimento que foi a base da minha força para prosseguir nesta batalha tão sonhada.

À minha família

É sempre verdadeira a afirmação que tudo começa no lar. E será sempre assim.

Quando criança, às vezes brigamos para não ir a escola. Nossos pais sofrem por ter de impor a sua autoridade. Em todas as situações saem emocionalmente angustiados.

Só o tempo vai demonstrando a certeza dos fatos. A continuidade faz a realidade se sobrepor ao irreal.

Ninguém duvida que o único bem que os pais podem deixar para os seus filhos é o SABER. Este não é retirável por qualquer mortal. Vai para eternidade.

Neste momento em que chego à conclusão de Doutorado em Tocoginecologia não poderia deixar de reconhecer de que tudo aquilo que foi feito teve e tem o incentivo da minha família. Sem isto nada seria possível acontecer

Peço desculpas pelos momentos que me fiz irreverente, das ausências impostas, pelos medos e angústias infligida à minha família, mas, tudo foi preciso para que se chegasse a esse momento tão laborioso.

Por tudo isso, quero de todo meu coração, agradecer a minha família, representada aqui pelo meu Pai Romero, minha Mãe Valéria, meus irmãos Júnior (in memoriam) e Rafael e principalmente por meu filho ARTHUR, pela compreensão e paciência que sempre tiveram comigo, ao longo dessa jornada. Entretanto, tudo que foi feito, reconheço, foi para o meu bem.

O B R I G A D A

SIMONE ANGÉLICA LEITE DE CARVALHO SILVA &
FAMÍLIA CARVALHO SILVA

*“Sempre faço o que não consigo fazer
para aprender o que não sei”*

Pablo Picasso

*À Iracema Calderon (Cema), pela
amizade e por me mostrar que
vencer desafios fortalece todas as
nossas vontades em querer buscar
outras conquistas.*

Muito Obrigada!

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

*A uma inesperada e gratificante amiga,
Cláudia Magalhães, pelo acolhimento
despretensioso em seu lar, de forma
cuidadosa e atenciosa ao longo desta
jornada.*

Muito Obrigada!

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...

é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

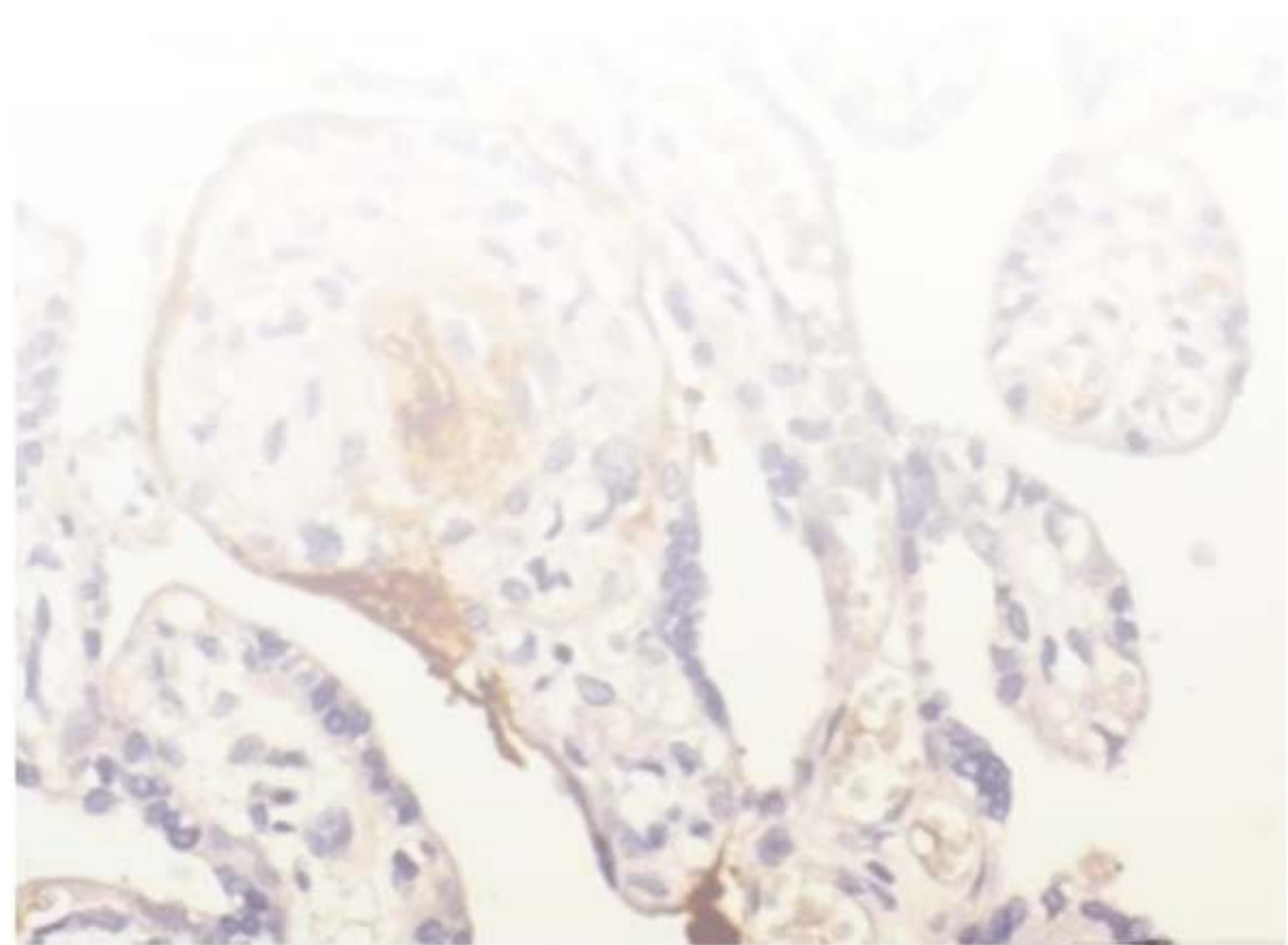
Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

Chico Xavier

*Ao meu companheiro, Eduardo Azevedo,
Por me mostrar que não existe ninguém
melhor, mas que podemos ser melhor
como Ser Humano.*

Pela intensidade de todos os nossos

sentimentos ...



Agradecimientos

Às pacientes que permitiram o fornecimento de informações para todo este conhecimento científico.

À Prof. Dra. Renée Laufer Amorim pela co-orientação o que enriqueceu cientificamente a construção desta tese e por disponibilizar o laboratório para realizar as análises imunistoquímicas.

À Doutoranda Marcela Marcondes Pinto Rodrigues pela ajuda fornecida na confecção das lâminas e na análise imunoistoquímica.

À Mestranda Juscielle Moreli pela co-participação e conferência da análise imunoistoquímica, o que fortaleceu ainda mais a veracidade dos dados.

À Doutoranda Glíciane Morceli pela ajuda na conferência dos dados perinatais.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial, Profa. Maria Aparecida Mourão Brasil, Prof. Adriano Dias e Profa. Líciana Vaz de Arruda Silveira, pelo apoio científico no planejamento do estudo, pela assistência técnica e discussão da análise estatística e por toda a contribuição científica prestada.

À Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pelo acolhimento e concessão das dependências e aparelhos durante a realização desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Aparecida Benedita Vasques, Sandra Aparecida de Carvalho Cruz, Regina Célia Gamito e, em especial, à Ana Cláudia Garcia Mira pela paciência diante tantos pedidos e dúvidas, pela dedicação e auxílio prestado.

Aos funcionários *Janete Ap. Nunes Silva, Regina C. Spadín, Lílian Cristina N. B. e Nathanael P. Sales* da seção de Pós-Graduação pela atenção e dedicação durante todo o período de pós-graduação.

Ao serviço da *Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação* no Campus da UNESP - Botucatu, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

À *Adnice Ruiz Pedro* pela revisão da formatação e impressão de toda a tese.

Aos novos colegas botucatuenses adquiridos, em especial, *Claudinha Magalhães, Vera Borges e Roberto Costa* pela hospitalidade e pelos momentos de descontração nesta longa jornada.

Aos Professores e preceptores da Maternidade da Encruzilhada - CISAM - Universidade de Pernambuco, em especial ao *Prof. Dr. Olímpio de Moraes Filho e Dr. Stevam Rios* por me substituir inúmeras vezes na minha função mediante minhas constantes ausências devido a freqüentes viagens a Botucatu.

À Diretora Geral da Maternidade da Encruzilhada - CISAM - Universidade, *Prof. Enfermeira Fátima Maia* pela credibilidade em minha pessoa, permitindo a criação de um serviço especializado em Diabetes na Gestação.

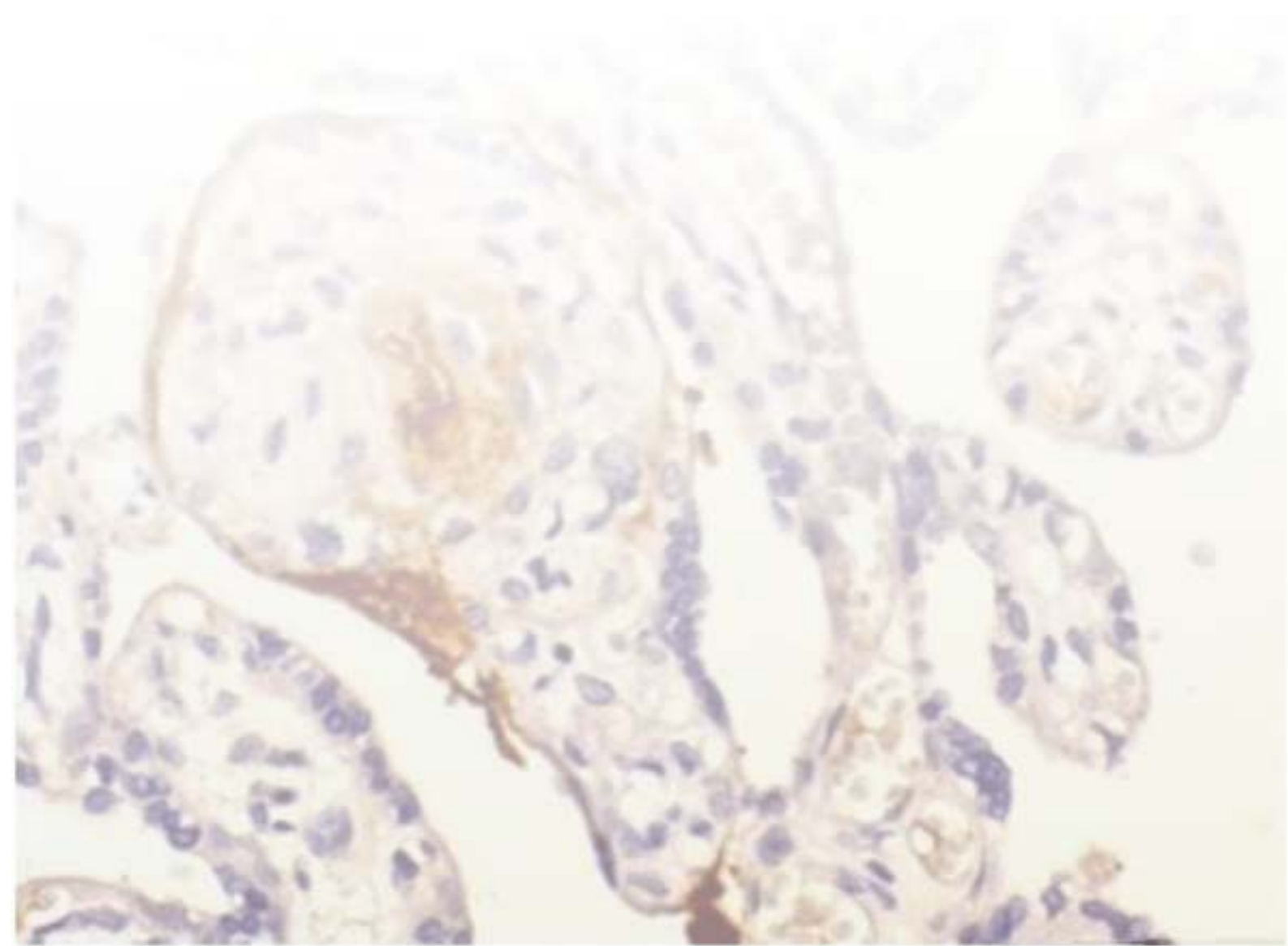
À Coordenadora do Ambulatório da Mulher (*Ana Laura*) e Superintendente (*Vilma Guimarães*) do IMIP pela paciência e compreensão diante das constantes viagens para confecção da Tese.

Aos estudantes e residentes de Ginecologia/Obstetrícia do CISAM - Universidade de Pernambuco e do IMIP pelo incentivo à conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas ginecologistas/obstetras e funcionários da Clínica Parto Seguro, em especial a Dra. Silvana Menelau, minha irmã de coração, que acreditou, apoiou e me incentivou nesta jornada.

Aos meus tios, tias, primos, primas, avós (in memoriam), em especial minha avó Iara Terezinha Ribeiro Leite pelo exemplo de força e vontade de viver.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.



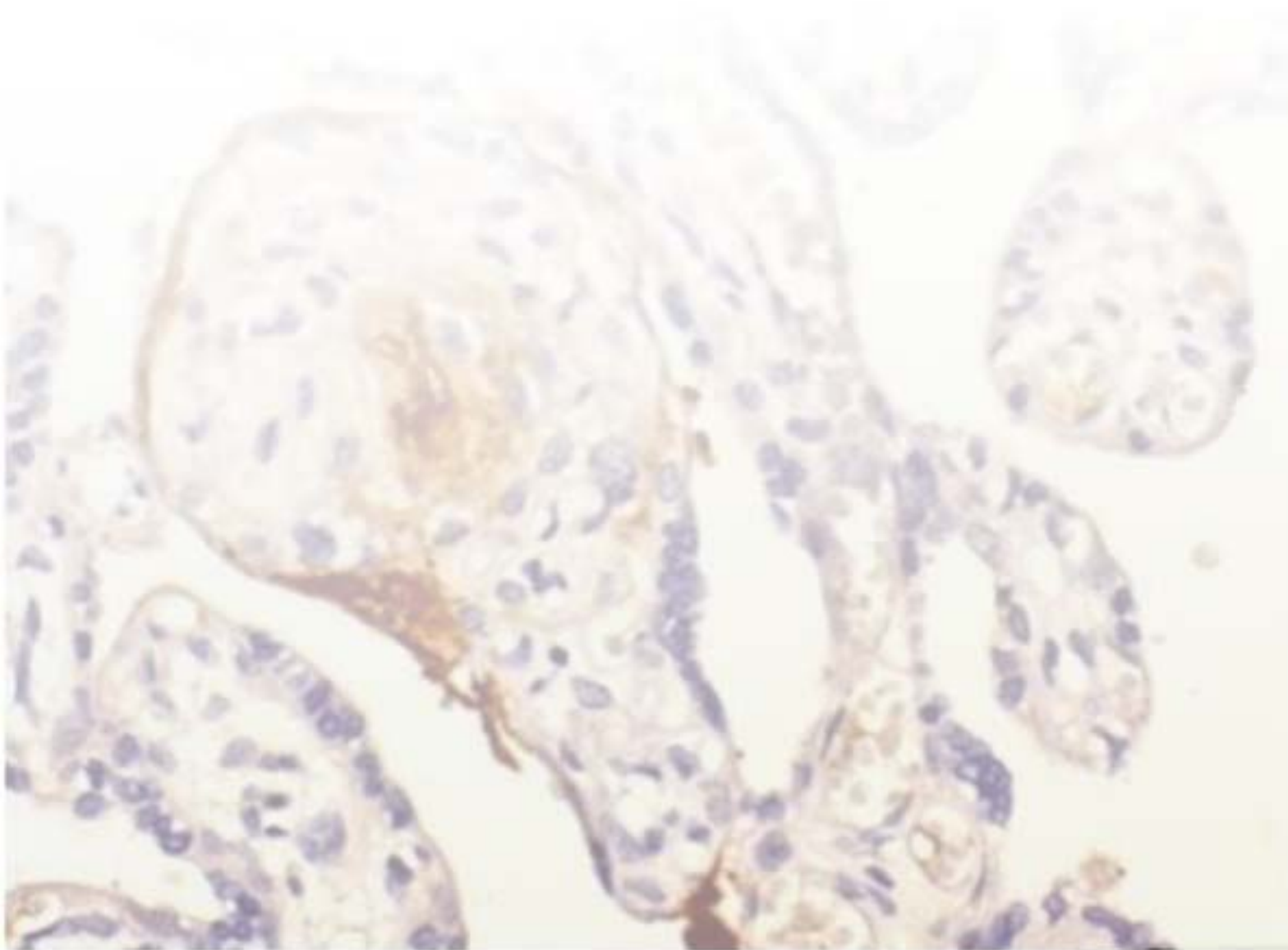
Sumário

ARTIGO DE REVISÃO

Biomarcadores da angiogênese placentária (VEGF) e de potenciais vias envolvidas (COX-2 e CASPASE-3) em gestações complicadas por hiperglicemia	17
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Vasculogênese e angiogênese	22
Marcadores da angiogênese	24
Angiogênese na placenta humana	26
Hiperglicemia materna e alterações da vascularização placentária.....	27
Marcador de inflamação e de proliferação e regeneração celular.....	31
Distúrbios hiperglicêmicos na gravidez e processo inflamatório crônico placentário.....	33
Marcador da apoptose celular	35
Apoptose celular e gravidez.....	36
Distúrbios hiperglicêmicos na gravidez e apoptose placentária.....	37
Considerações finais.....	38
Leituras suplementares	40
ARTIGO I	
Imunomarcações placentárias de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 em gestações complicadas por diabete ou hiperglicemia leve – relação com hiperglicemia e PI umbilical	46
Resumo.	48
Summary	49
Introdução	50
Material e método.....	55
Desenho do estudo.....	55
Material e Grupos de Estudo	55
Variáveis.....	56
Métodos de valiação	56
Média glicêmica da gestação (MG)	56
Dopplervelocimetria da artéria umbilical (PI umbilical).....	56
Preparo das amostras para as imunomarcações.....	57
Análise imunoistoquímica.....	58
Análise estatística	58

Resultados	60
Discussão.....	62
MG e PI umbilical	62
Imunomarcações pelo VEGF.....	63
Imunomarcações pela CASPASE-3.....	65
Imunomarcações pela COX-2.....	66
Considerações finais.....	67
Referências	69
Lista de Tabelas e Figuras	77
ARTIGO II	
Imunomarcações placentárias, hiperglicemia materna e PI umbilical em gestações complicadas por diabete ou hiperglicemia leve – relação com resultados perinatais.....	83
Resumo.....	85
Summary	86
Introdução	87
Sujeitos e método	91
Desenho do estudo	91
Sujeitos e Grupos de Estudo	91
Variáveis.....	92
Métodos de avaliação.....	93
Média glicêmica da gestação (MG).....	93
Dopplervelocimetria da artéria umbilical (PI umbilical).....	93
Preparo das amostras para as imunomarcações.....	93
Análise imunoistoquímica.....	94
Análise estatística.....	95
Resultados	97
Discussão	100
MG e resultados perinatais.....	100
Imunomarcações pelo VEGF, PI umbilical e resultados perinatais	101
Imunomarcações pela CASPASE-3 e resultados perinatais	103
Considerações finais.....	105
Agradecimentos	106
Divulgação de interesse	106
Detalhes da aprovação ética.....	106

Referências bibliográficas.....	107
Lista de Tabelas e Figuras.....	113
ANEXOS	118
Anexo 1 – Comitê de Ética	119
Anexo 2 – Umbilical Arterial Doppler Velocimetry and Placental Morphometric Changes in Maternal Hyperglycemia.....	120
Anexo 3 – Termo de submissão do manuscrito à revista BJOG.....	154



Artigo de Revisão

Biomarcadores da angiogênese placentária (VEGF) e de potenciais vias envolvidas (COX-2 e CASPASE-3) em gestações complicadas por hiperglicemia

Biomarcadores da angiogênese placentária (VEGF) e de potenciais vias envolvidas (COX-2 e CASPASE-3) em gestações complicadas por hiperglicemia

Placental angiogenesis biomarkers (VEGF) and potential pathways involved (COX-2 and CASPASE-3) in pregnancies complicated by hyperglycemia.

Simone Angélica Leite de Carvalho Silva¹, Iracema Mattos Paranhos Calderon², Renée Laufer Amorim³

¹ *Médica Preceptora da Residência Médica da Universidade de Pernambuco e do Instituto Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP); Doutoranda do Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.*

² *Profa. Livre-docente em Obstetrícia; Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.*

³ *Profa. Assistente Doutora da Disciplina de Patologia Veterinária / Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu/UNESP*

Endereço: Rua Capitão Sampaio Xavier nº 420/1801, Rosarinho Recife PE

CEP: 52050-210

Fone: (81) 32425276

Fax: (81) 32413006

simoneangelicacarvalho@hotmail.com

Resumo

O diabetes associado à gravidez cursa com resultados perinatais adversos (RPNA), diretamente dependentes da qualidade do controle metabólico materno e da integridade da função placentária. O modelo hipóxico-metabólico, descrito para explicar a fisiopatologia dos RPNA nestas gestações pode estar relacionado a diferentes vias de atuação no trofoblasto. Estes conceitos são relativamente novos e ainda pouco abordados na literatura. Assim, o objetivo dessa revisão foi explorar as relações entre a hiperglicemia materna e marcadores da angiogênese placentária, assim como marcadores de possíveis vias envolvidas neste processo. De interesse, as vias relacionadas à inflamação e/ou proliferação e à apoptose celular, potencialmente relacionadas aos processos de hipóxia intrauterina, característica de gestações complicadas por hiperglicemia não controlada. Para tal, foram selecionados marcadores de atuação no trofoblasto, entre eles, o fator de proliferação do endotélio vascular (VEGF); a enzima cicloxigenase (COX-2), marcador da inflamação e, também, da regeneração e proliferação celular, e a enzima proteolítica da família das caspases (CASPASE-3), marcador de células em apoptose. Como estratégia utilizou-se de pesquisa, definida por palavras-chaves de interesse, em bases de dados de acesso público (Lilacs, Scielo, Pubmed/Medline, Biblioteca Virtual em Saúde/Bireme e Biblioteca Cochrane, entre outras), além da pesquisa manual em livros de textos específicos. Para a seleção do material bibliográfico considerou-se aspectos relativos ao método dos estudos, à aplicabilidade clínica dos resultados e à qualidade das informações, destacando no texto os níveis de evidência científica das respectivas fontes.

Palavras-chave: placenta, diabetes melito, angiogênese, inflamação, apoptose

Abstract

Diabetes associated with pregnancy progresses with adverse perinatal outcomes (RPNA), directly dependent on the quality of maternal metabolic control and integrity of the placental function. The hypoxic metabolic model, described to explain the pathophysiology of RPNA in these pregnancies may be related to different ways of acting in the trophoblast. These concepts are relatively new and still little discussed in the literature. The objective of this review was to explore the relationship between maternal hyperglycemia and markers of placental angiogenesis, as well as markers of possible pathways involved in this process. Interestingly, the pathways related to inflammation and / or proliferation and cell apoptosis, potentially related to the processes of intrauterine hypoxia, a feature of pregnancies complicated by uncontrolled hyperglycemia. To this end, we selected markers of activity in the trophoblast, among them the proliferation of endothelial factor (VEGF), the enzyme cyclooxygenase (COX-2), a marker of inflammation and also of regeneration and cell proliferation, and proteolytic enzyme family of caspases (CASPASE-3), a marker of cells undergoing apoptosis. As a strategy used to search, defined as keywords of interest in databases with public access (Lilacs, SciELO, PubMed / Medline, Virtual Health Library / BIREME, Cochrane, among others), and the manual search books on specific texts. For the selection of bibliographical material considered aspects of the method of study, the clinical applicability of results and quality of information, highlighting text in the levels of scientific evidence of their sources.

Keywords: placenta, diabetes, angiogenesis, inflammation, apoptosis.

Introdução

A placenta é órgão altamente vascularizado que apresenta rápido crescimento em curto espaço de tempo, devendo suprir a demanda aumentada do metabolismo, necessária para o crescimento e o desenvolvimento fetal. Para o desempenho de suas funções, no entanto, depende em grande parte do adequado desenvolvimento da rede capilar fetal e uterina, com uma plasticidade tal, que permita as modificações necessárias ao longo da gestação¹ (D).

Diabete melito é síndrome caracterizada pela elevação crônica da glicemia de jejum e/ou das pós-prandiais, por defeito absoluto ou relativo da produção de insulina ou diminuição do seu efeito em órgãos alvo. Diabete gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose identificada pela primeira vez na gestação² (D). Nas gestações complicadas por diabete há exposição do organismo materno à hiperglicemia crônica, que resulta em distúrbios metabólicos diversos, levando a prejuízo fetal e placentário.

Na placenta, em especial, são relacionadas alterações decorrentes de proliferação endotelial, crescimento vascular exagerado e adesão de pericitos³ (D). Entretanto, muitas dessas informações e o real papel dos marcadores envolvidos nestes processos e, em decorrência, nos resultados perinatais, não estão bem estabelecidos na literatura.

Vasculogênese e angiogênese

Vasculogênese e angiogênese são mecanismos que induzem à formação de novos vasos sanguíneos. A vasculogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário, a partir da mobilização de precursores mesodérmicos pluripotentes, presentes no saco vitelino de embriões de aves e mamíferos e em órgãos específicos no organismo adulto⁴ (B). Estes progenitores, identificados como angioblastos, formam as células endoteliais, mas ainda não apresentam os marcadores característicos destas células nem a capacidade de formar lúmen. No saco vitelino, angioblastos e células hematopoéticas precursoras se diferenciam em íntima associação umas com as outras, formando as chamadas ilhotas sangüíneas. Os processos subsequentes de fusão das ilhotas sangüíneas e a formação de lúmen levam à trama vascular primordial⁵ (D).

A formação dos primeiros vasos sangüíneos ocorre através da diferenciação *in situ* de angioblastos e é caracterizada como vasculogênese. A partir destes vasos pré-existentes, novos capilares são formados por brotamento, resultando em um plexo vascular alongado e altamente ramificado, e este processo é denominado angiogênese⁵ (D). Estes mecanismos são considerados essenciais para o desenvolvimento e crescimento do embrião, do feto e do recém-nascido⁶ (D). Na maioria dos tecidos adultos, entretanto, o endotélio capilar representa uma população celular estável, com baixo índice mitótico. Angiogênese no adulto é observada em condições patológicas, ocorrendo de forma persistente e desregulada, como nos casos de neoplasias, e, fibroses, retinopatias e artrites reumatóides, ou em situações estritamente controladas, como no desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo, no endométrio pós-menstrual e na placentação¹ (D).

A angiogênese é processo dinâmico e essencial que ocorre a partir de vênulas ou capilares e que, após a transdução dos sinais de diferenciação, se desenvolve em seis importantes etapas: (1) vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular; (2) ativação de proteases produzidas pelas células endoteliais, que fragmentam a membrana basal da parede vascular e destroem a matriz adjacente; (3) proliferação das células endoteliais; (4) migração destas células, por meio de prolongamentos, em direção ao estímulo angiogênico, formando cordões celulares alinhados e maciços, referidos na literatura como "sprouts" (brotos); (5) formação de um lúmen, pela coalescência de vacúolos intra e intercelulares e, em seqüência, (6) recrutamento de pericitos para estabilizar a estrutura vascular e formar arteríolas ou vênulas⁷ (D).

As possíveis vias de ativação do processo angiogênico podem incluir, de forma isolada ou em associação, os seguintes eventos: i) aumento na produção de fatores de crescimento e citocinas, com ação direta na ativação das células endoteliais ou indireta em outras células promotoras da angiogênese; ii) síntese de enzimas, que permitem a ligação dos fatores angiogênicos aos seus receptores; iii) estímulos específicos para a produção de enzimas pelas células endoteliais e do estroma adjacente aos capilares, capazes de induzir a degradação da membrana basal e da matriz extracelular perivascular e iv) interrupção da síntese e expressão de inibidores fisiológicos da angiogênese, provavelmente nas primeiras fases da resposta angiogênica, e estímulo da síntese e/ou ativação dos inibidores da angiogênese, provavelmente em fases tardias da resposta angiogênica. De modo geral, estimuladores e inibidores da angiogênese operam em conjunto, controlando o crescimento dos vasos. Distúrbios neste processo, no entanto, podem levar a inúmeras "doenças angiogênicas", em diferentes tecidos⁸ (D), como a pré-eclampsia⁹ (B).

Dentre os fatores reguladores de ativação destacam-se a angiopoietina 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2) e seu receptor Tie-2, os componentes da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A, B, C e D) e seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb ou FGF-2) e o fator de crescimento placentário (PIGF).

Marcadores da angiogênese

A angiopoietina e o VEGF são moléculas reguladoras essenciais e multifuncionais, que regulam a morfogênese e o crescimento do sistema vascular, atuando como mitógenos endoteliais específicos, regulados por diferentes fatores e também pela hipóxia⁴ (B). A inibição da atividade de seus receptores específicos inibe a angiogênese e provoca a desestabilização da parede vascular e a inibição da migração e da proliferação das células endoteliais e de seus precursores.

O VEGF faz parte de uma família que consiste de seis membros: VEGF-A (ou VEGF), PIGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o VEGF-E (homólogo ao VEGF codificado pelo gene do orf vírus-parapoxvírus). A perda de um simples alelo do VEGF leva à letalidade embrionária, o que o torna um fator único no desenvolvimento do sistema vascular⁸ (D). É fator expresso por diferentes tecidos de baixa atividade angiogênica como cérebro, rins, fígado e baço, onde regula a permeabilidade vascular. É, também, essencial para o processo de angiogênese durante o desenvolvimento, onde apresenta uma variedade de efeitos sobre a célula endotelial (proliferação, migração e sobrevivência) e sobre a formação dos vasos de modo geral (organização em tubo e formação de lúmen). Esta ação também é observada nos sítios de implantação embrionária e de formação dos vasos placentários⁸ (D).

A transcrição do RNAm do VEGF é induzida por diferentes fatores de crescimento e citocinas, entre eles, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β e IL-1 β , agindo como mediadores indiretos da angiogênese. Os níveis de VEGF também podem ser regulados pela tensão de oxigênio. A hipóxia induz a uma rápida e reversível expressão de VEGF, aumentando a transcrição e a estabilização do RNAm. Por outro lado, a normoxia regula a produção de VEGF, promovendo a regressão de vasos neoformados⁸ (D).

A ação deste fator de crescimento ocorre por meio de receptores específicos presentes nas células endoteliais ou de seus precursores. Dois sítios de ligação de alta afinidade para o VEGF estão presentes nestas células: o VEGFR-1 (Flt-1) e o VEGFR-2 (Flk-1/ KDR), que também apresentam expressão regulada pela hipóxia⁸ (D). Outro membro desta família é o VEGFR-3 (Flt-4), que se liga ao VEGF-C e ao VEGF-D⁸ (D).

Os receptores VEGFR-1 e 2 apresentam diferentes propriedades de transdução de sinais. A interação do VEGF com o VEGFR-2 é crítica para a angiogênese, entretanto, as conseqüências da via de ativação do VEGF mediado pelo VEGFR-1 ainda não estão completamente estabelecidas. Durante a embriogênese, a expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 inicia-se no momento da formação das ilhotas vasculares. Assim, a presença de homozigotos mutantes, que inativam estes receptores, é letal porque impede o desenvolvimento da vascularização embrionária⁸ (D).

Angiogênese na placenta humana

Fatores relacionados ao processo de formação dos vasos desempenham papel de destaque no processo de placentação e sobrevivência fetal. Muitos destes fatores, pró e anti-angiogênicos, já foram descritos na placenta humana e de outros animais. Entretanto, ainda não foram estabelecidos os seus mecanismos de interação, as suas possíveis conseqüências moleculares e as respectivas alterações envolvidas nas inúmeras patologias da gestação.

Na placenta humana, o VEGF desempenha papel de relevância para o desenvolvimento da vascularização vilosa durante o primeiro trimestre da gestação e, na placenta a termo, para a manutenção da integridade e permeabilidade vascular. No primeiro trimestre de gestação, este fator de crescimento vascular é produzido pelo trofoblasto, apresentando maior expressão no citotrofoblasto viloso do que o sinciotrofoblasto. No trofoblasto extraviloso sua presença ainda é questionável¹⁰ (D).

Em contrapartida, os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos pelas células endoteliais dos vilos placentários, enquanto que o VEGFR-1 também é expresso no trofoblasto extraviloso¹⁰ (D). O VEGF derivado das células trofoblásticas parece assumir função parácrina, agindo não só no remodelamento e permeabilidade da microcirculação uterina, mas também na formação de vasos fetais nos vilos placentários, contribuindo para o efetivo aumento das trocas metabólicas entre os compartimentos materno e fetal¹¹ (D).

Hiperglicemia materna e alterações da vascularização placentária

A angiogênese é componente essencial para os processos reprodutivos e dela dependem a implantação ovular do blastocisto, a organogênese e o desenvolvimento placentário e a embriogênese¹¹ (D). Falhas em algum dos componentes deste complexo processo determinam desordens vasoproliferativas e angiogênese inadequada, comumente observadas em inúmeras complicações do ciclo reprodutivo, como hipóxia, doenças inflamatórias e outras síndromes. Em muitas destas situações, a angiogênese não determina sinais e sintomas, mas tem efeito direto na patogenia e no prognóstico da gestação⁶ (D).

Nas gestações complicadas pelo diabetes, há exposição do organismo materno à hiperglicemia crônica, resultando em distúrbios metabólicos diversos, inclusive no que se refere a proliferação endotelial, crescimento vascular e adesão de pericitos³ (D). Daí a importância do diagnóstico e do tratamento correto e precoce dos distúrbios hiperglicêmicos na gestação.

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) é recomendado para a confirmação diagnóstica do diabetes na gestação² (D). Apesar disso, a literatura atual vem considerando outras formas de diagnóstico da hiperglicemia na gestação, considerando que não só o diabetes, mas também, a hiperglicemia leve ou intolerância à glicose devem ser diagnosticadas e tratadas durante a gestação^{2, 12} (D, B). A associação do TOTG e do perfil glicêmico (PG), aplicados em paralelo durante a gestação, evidencia um grupo de gestantes que, pela resposta normal ao TOTG não são diabéticas, mas que, por apresentarem alteração no PG, se enquadram na definição atual de hiperglicemia leve (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação diagnóstica de Rudge ^{13, 14} de acordo com as respostas ao TTG100g e ao PG (B).

Grupos de Gestantes	TTG100g	PG
Não Diabéticas / normoglicêmicas	Normal	Normal
Hiperglicemia Leve	Normal	Alterado
Diabete Gestacional	Alterado	Normal
Diabete Gestacional ou Clínico	Alterado	Alterado

Estas gestantes já foram identificadas por Rudge *et al.* há mais de trinta anos¹³ (B) e, desde então, vêm sendo tratadas como se fossem portadoras de diabete gestacional¹⁴ (B). Esta descoberta direcionou pesquisas específicas e diferenciou vários resultados perinatais e placentários, diretamente dependentes da intensidade da hiperglicemia materna¹⁵ (B).

As placentas das gestantes com hiperglicemia leve têm alterações morfológicas semelhantes às das portadoras de diabete, mas apresentam maior incidência de endarterite que a observada nas placentas de gestantes diabéticas¹⁶ (B).

Em contrapartida, as alterações vasculares placentárias são diferenciadas entre grupos de gestantes portadoras de diabete, clínico ou gestacional (TOTG100g alterado e PG normal ou alterado), e de hiperglicemia leve (TOTG100g normal e PG alterado)¹⁷ (B). Neste estudo, as placentas de gestantes portadoras de hiperglicemia leve eram constituídas por vilosidades terminais pequenas e numerosas e vasos também pequenos e numerosos. Comparada às placentas de não-diabéticas, esta proliferação de vasos e vilosidades resultou em aumento da área vascular vilositária e similaridade no índice de

capilarização, com significativo incremento da superfície de trocas materno-fetal. Estes resultados evidenciaram a vicariância da placenta para garantir porte de oxigênio e de nutrientes para o feto. No diabete, gestacional e clínico, as dimensões vilositárias foram comparáveis às observadas em placentas de gestantes não-diabéticas, mas com menor área vascular, dependendo do tipo e da intensidade da hiperglicemia materna. Tais alterações caracterizaram atraso no desenvolvimento e insuficiência da placenta para garantir as trocas materno-fetais¹⁷ (B).

A complementação deste estudo relacionou os efeitos da hiperglicemia materna, de diferentes origens e intensidade, com os resultados normais ou alterados do índice de pulsatilidade (PI) da artéria umbilical. O controle glicêmico materno adequado se relacionou a fluxo placentário de baixa resistência, confirmado pelo resultado normal da dopplervelocimetria da artéria umbilical. Este resultado se associou à proliferação vascular placentária e, de acordo com os autores, deverá favorecer a macrosomia e garantir a oxigenação fetal. O controle glicêmico materno inadequado se associou à menor vascularização e conseqüente aumento na resistência vascular placentária, confirmado por valores aumentados de PI da artéria umbilical. Esta condição deverá favorecer a restrição do crescimento e a hipóxia fetal¹⁸ (B).

Segundo Mayhew *et al.*³, (D), o aumento na angiogênese feto-placentária e na capilarização dos vilos parece ser independente da severidade da doença. De acordo com outros autores, a placenta no diabete é submetida a uma gama de alterações estruturais e funcionais, de natureza e extensão dependentes de uma série de fatores, incluindo a intensidade da hiperglicemia materna no período de organogênese e desenvolvimento placentário. Aparentemente, estas placentas sofrem adaptações para

manter sua capacidade funcional, facilitando a passagem de glicose para o feto e, conseqüentemente, a macrosomia fetal¹⁹ (D). Entretanto, de acordo com resultados mais recentes, a hiperglicemia de intensidade mais severa pode ser fator limitante para a proliferação vascular placentária e, nesta condição, tanto a macrosomia como a restrição de crescimento fetal poderão ocorrer, associadas a risco diferenciado de hipóxia e morte perinatal (MPN)¹⁸ (B).

A macrosomia fetal é responsável por cerca de 0,49% da MPN e por 11,4% da morbidade perinatal em gestações concorrentes com distúrbios hiperglicêmicos²⁰ (D). Por outro lado, a restrição do crescimento fetal é risco previsto nas gestações concorrentes com o diabetes não controlado, geralmente de longa evolução e associado a complicações vasculares. O risco atribuível (RA) de MPN é de 6,12% nas gestações complicadas pelo diabetes gestacional ou clínico (TOTG100g e PG alterados) e de 4,16% nas gestantes portadoras de hiperglicemia leve (TOTG100g normal e PG alterado). Entre os fatores envolvidos neste desfecho adverso destacam-se a hipóxia intrauterina, a hiperglicemia materna e as conseqüentes alterações na vascularização placentária. Assim, o controle glicêmico materno e o diagnóstico de hipóxia intrauterina seriam decisivos na prevenção da MPN em gestações associadas ao diabetes ou hiperglicemia leve¹⁶ (B).

Não há na literatura consultada dados relativos aos fatores controladores da angiogênese placentária em gestantes portadoras de hiperglicemia leve. Em sua grande maioria, os estudos focam, exclusivamente, o diabetes gestacional ou pré-gestacional, onde a adaptação vascular é proporcional à hiperglicemia do meio intrauterino, fator nem sempre considerado. Apesar disso, alguns resultados evidenciaram que placentas

de gestantes com controle glicêmico adequado tinham expressão aumentada do fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) e menor expressão de Ang-1, Ang-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-2 e FGFR, achados opostos aos observados em placentas de não-diabéticas⁴ (B).

Até o presente momento, os resultados das expressões dos biomarcadores da angiogênese placentária em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve são raros ou inexistentes e, sobretudo, bastante controversos. Tal constatação justifica a pesquisa de alguns desses biomarcadores, na presença de hiperglicemia de origem e intensidade diferenciadas.

Marcador de inflamação e de proliferação e regeneração celular

A cicloxigenase (COX), também conhecida como uma endoperoxidase H sintetizadora de prostaglandinas (PGH sintetase), é a enzima necessária para a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas (PGs), sendo primeiramente identificada há vinte anos atrás. Por muitos anos, ficou conhecido apenas um tipo de enzima cicloxigenase, mas uma segunda enzima foi recentemente descoberta, sendo então referidas como COX-1 (constituente) e COX-2 (induzida). A COX-1 e a COX-2 atuam em diferentes processos fisiológicos e patológicos, que se estendem da inflamação à neoplasia²¹ (D).

Os produtos do metabolismo do ácido aracdônico compõem um conjunto de mediadores, que modulam a resposta inflamatória e imunológica. Estes produtos resultam da oxidação desse ácido, sob ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolípidos da membrana celular. A oxidação do ácido aracdônico é realizada por duas vias enzimáticas: a cicloxigenase, também conhecida como PGH sintetase, e a lipoxigenase.

A ação do sistema enzimático da cicloxigenase sobre os fosfolípidos de membrana converte o ácido aracdônico em uma PG endoperóxida estável, a PGG₂, que é subsequentemente reduzida para PGH₂. Esta, então, serve de substrato para a síntese de várias outras PGs, como PGE₂, PGD₂ e PGF₂ α . A PGH₂ pode ser ainda convertida em prostaciclina (PGI₂) ou tromboxano (TXA₂)²¹ (D).

A COX-1 (constituente) é enzima imprescindível para o organismo, sendo expressa em vários tecidos. Considera-se que está envolvida na produção das PGs que modulam as funções fisiológicas em diversos órgãos e sistemas celulares, incluindo rins, trato gastro-intestinal e plaquetas. Em contraste, a COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos, mas pode ser induzida por sinais pró-inflamatórios.. A COX-2 está também relacionada com a produção de PGs que modulam eventos fisiológicos do desenvolvimento e crescimento celular e a produção de endotoxinas bacterianas (lipossacarídeos); de alguns fatores de crescimento, tais como, fator de transformação do crescimento (TGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento para fibroblastos (FGF), e de oncogenes²¹ (D).

Em condições fisiológicas, a COX-2 está presente de forma ilimitada no cérebro e medula espinhal e, pode estar envolvida na transmissão nervosa, particularmente, nas situações de dor e febre. As PGs produzidas pela via da COX-2 desempenham papel importante na rotura do folículo na ovulação, provavelmente mediada pela geração direta ou pela ativação de enzimas proteolíticas. Na gestação, são elementos chave na implantação do óvulo e na angiogênese necessária para a formação da placenta²¹ (D). Independentemente da idade gestacional, termo ou pré-termo, a COX-2 é marcador de destaque no desencadeamento das contrações uterinas do trabalho de parto²² (A).

Distúrbios hiperglicêmicos na gravidez e processo inflamatório crônico placentário

A inflamação crônica da placenta tem diagnóstico complexo, que envolve diferentes tipos de células imunológicas em um ou mais sítios da placenta e da decídua. Mais especificamente, esta entidade é definida como inflamação crônica das vilosidades e dos espaços intervilositários, caracterizada por infiltrado de mononucleares nas vilosidades ou nos espaços intervilositários²³ (D).

O diabetes é reconhecidamente acompanhado de inflamação crônica da placenta²³(D), principalmente quando relacionado à restrição do crescimento fetal, pré-eclâmpsia e prematuridade extrema. Entretanto, questiona-se qual seria a base desta inflamação crônica. Ainda que a inflamação crônica placentária possa estar relacionada a uma infecção viral congênita, a predisposição a este tipo de infecção não está confirmada no diabetes. Ao contrário, a infecção viral tem sido sugerida como fator causal do diabetes decorrente de alterações imunológicas, presentes tanto no estado pré-diabético como no diabetes instalado²⁴ (D).

Na literatura consultada não foram encontrados resultados sobre a expressão *in vivo* da COX-2 nas vilosidades placentárias, que poderiam reforçar esta teoria de inflamação crônica e regeneração, especialmente, nas gestações associadas ao diabetes ou à hiperglicemia leve. Isto, talvez, fosse mais um fator causal do maior risco de restrição do crescimento fetal nos casos de difícil controle metabólico. Apenas em estudos experimentais em ratas diabéticas, identificou-se menor atividade da COX-2 na placenta em fetos mal-formados quando comparados com fetos normais de ratas não-diabéticas no período da organogênese^{25, 26}(B). Sabendo que o diabetes promove um ambiente inflamatório no decorrer da gestação, muitos estudos determinaram a

ocorrência de uma maior expressão de genes e receptores ligados a uma maior produção de mediadores inflamatórios e angiogênicos como forma de reestruturação nos estados hiperglicêmicos^{27,28}(B). Segundo Radelli *et al.* (2006), a interleucina -1 e TNF - α induzem à resposta pletórica que afetam profundamente a produção de proteínas na matriz da célula. Isto leva a fibrose e uma quebra da integridade das células endoteliais placentárias. Assim, os autores acreditam que a expressão de determinadas proteínas na placenta seja responsável pela reprogramação fetal adversa que ocorre nas gestações que cursam com diabetes²⁷ (B). Por outro lado, Receptores Ativados de Peroxisome (PPARs) atuam na homeostase lipídica e na inflamação. Como o diabetes demonstra elevado ambiente inflamatório, acredita-se que este receptor tenha influência na fisiopatologia. Neste estudo, os autores verificaram que existe uma menor expressão do PPARs, mas sem afetar sua fração ligante ao DNA. Isto pode favorecer a ação deste PPARs sobre citocinas pró-inflamatórias, determinando este ambiente nos casos de diabete²⁸ (B).

Desta forma, diante da escassez de estudos *in vivo* que envolvam, especificamente, a expressão da COX-2 na placenta de gestantes diabéticas, justificam-se pesquisas específicas sobre o papel deste biomarcador nos processos de placentogênese e desenvolvimento fetal e placentário, tanto nas gestações de baixo risco como naquelas complicadas por distúrbios hiperglicêmicos.

Marcador da apoptose celular

Apoptose é a morte celular, induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana plasmática da célula permanece intacta, mas sua estrutura é alterada e, assim, a célula apoptótica se torna alvo primário da fagocitose. A célula morta é rapidamente eliminada, antes que seu conteúdo possa extravasar e, dessa forma, esse tipo de morte celular não desencadeia a reação inflamatória do hospedeiro²⁹ (D).

Apoptose ou morte celular programada é um processo diferente de necrose. Na apoptose, as células entram em autodestruição, para que o organismo, como um todo, sobreviva. O indivíduo necessita que novas células sejam geradas para a manutenção dos processos vitais; em contrapartida, as supérfluas ou alteradas, devem ser eliminadas para salvaguardar o bem estar do organismo. Na necrose, a célula se edemacia e as organelas citoplasmáticas, em particular, as mitocôndrias, são danificadas e poucas alterações ocorrem no núcleo. Estas modificações alteram o equilíbrio interno, facilitando a passagem livre de água e íons para dentro da célula, que acaba se rompendo. Pela liberação de substâncias tóxicas celulares, há ativação do sistema imune, determinando intensa reação inflamatória. Assim, alguns tipos de glóbulos brancos, sobretudo os neutrófilos e macrófagos, convergem para o tecido em processo de necrose e fagocitam as células mortas. Apesar de causar danos celulares às regiões circunvizinhas, este processo é importante nos casos de infecções e, também, para a remoção de restos celulares²⁹ (D).

A apoptose pode se iniciar a partir de sinais externos, oriundos de receptores específicos da superfície celular, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como, radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, ausência de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e de corticosteróides. Essas diferentes vias e estímulos biomoleculares culminam com a ativação de proteases, denominadas caspases (“*Cystine Aspartases*”)³⁰ (D).

As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica. Até o momento já foram descritos, pelo menos, 39 membros dessa família. As caspases, quando ativadas, têm a capacidade de catalisar a ativação de outros membros de sua família, resultando em ampliação da cascata proteolítica. Alguns elementos, como a caspase 8, ocupam posição proximal na cascata e agem como reguladores e iniciadores; outros, como a caspase 3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular. Além da caspase 3, as caspases 6 e 7 são consideradas executoras. O outro grupo é formado pelas caspases iniciadoras, do qual fazem parte as caspases 8, 9 e 10 e, possivelmente, a caspase 2, cujo papel principal é ativar as executoras³¹ (D).

Apoptose celular e gravidez

Na evolução da gravidez normal, o trofoblasto sofre alterações em sua estrutura para assegurar a nutrição e a oxigenação do feto. Na gestação ocorre apoptose placentária, especialmente, no terceiro trimestre, o que pode favorecer complicações obstétricas³¹ (D). As anormalidades trofoblásticas parecem permear todos os eventos da

gestação, promovendo desde a implantação placentária inadequada até diversos tipos de anormalidades, que podem resultar em sérias complicações, entre elas, a pré-eclampsia e o trabalho de parto prematuro³² (D). A apoptose placentária também já foi estudada em outras intercorrências obstétricas como, gestação pós-termo³³ (B), abortamento recorrente³⁴ (B) e restrição de crescimento fetal³⁵ (B).

Distúrbios hiperglicêmicos na gravidez e apoptose placentária

Sgarbosa *et al.* (2006), analisaram o balanço entre apoptose e grau de expressão do Bcl-2 (proteína com efeito anti-apoptótico) em gestantes normoglicêmicas e portadoras de diabetes e de hiperglicemia leve. Encontraram elevado índice de apoptose nas gestantes com hiperglicemia leve em relação às portadoras de diabetes³⁶ (B). Poucos outros estudos, a maioria *in vitro*, analisaram a taxa de apoptose placentária em gestantes que cursam com hiperglicemia^{37, 38, 39} (B, D, D). Moley (2001)³⁸ (D) mostrou que a hiperglicemia favorece melhor ação do p53 e menor ação dos transportadores de glicose (GLUT 2 e 3), desencadeando o mecanismo de cascata de morte mitocondrial. Estudo *in vitro*, realizado em 2001, mostrou que culturas de células trofoblásticas respondem à hiperglicemia, aumentando a taxa de apoptose⁴⁰ (B). Estudo experimental também determinou que o tratamento da hiperglicemia em ratos previne os efeitos embriotóxicos da glicose *in vivo*, o que inclui mudanças na apoptose celular⁴¹ (B). Revisão realizada em 2009³⁹ (D) aborda a associação entre apoptose placentária e ocorrência de más-formações fetais. O diabetes materno inibe a expressão do gene *Pax3* e, como resultado desta ação, induz à apoptose da crista neural cardíaca e das células neuroepiteliais, explicando a associação dos defeitos de fechamento do tubo neural com o diabetes.

Estes dados também são controversos na literatura. Burleigh *et al.*, (2004) não encontraram diferença na taxa de morte celular em tecido trofoblástico, avaliando cinco mulheres diabéticas e normoglicêmicas⁴² (B). Entretanto, nenhum destes estudos correlacionou as possíveis vias envolvidas neste processo com a intensidade da hiperglicemia. Não se sabe ao certo como a hiperglicemia desencadeia este processo de apoptose. Em estudo experimental recente, Yang *et al.*, (2008), verificaram que a glicemia elevada reduz significativamente a expressão de VEGF na cultura de células endoteliais primárias da veia umbilical humana. Por outro lado, a adição de VEGF na cultura destas células, previne a apoptose, por supressão da taxa de Bax (fator pró-apoptótico)/Bcl-2 (fator anti-apoptótico) e por ativação da Caspase-3, além de atenuar a geração de espécies reativas de oxigênio e superprodução de cálcio⁴³ (B). Entretanto, são necessários estudos *in vivo* para confirmação desta associação.

Considerações finais

Nesta revisão foram poucos os estudos *in vivo* relevantes, abordando alterações na proliferação vascular e nas possíveis vias envolvidas – inflamatória e apoptótica na placenta da gestante diabética. Até o momento, as alterações vasculares placentárias encontradas nestas gestantes sinalizam papel importante na definição dos resultados perinatais e, possivelmente, a apoptose e a inflamação estariam associadas., Entretanto, nada está definido em relação a estas potenciais associações e a qualidade do controle metabólico materno. Esta lacuna é também percebida em relação aos resultados perinatais adversos, comuns na gestação diabética mal controlada.

Sem dúvida, a literatura é carente de estudos específicos, incluindo vascularização placentária e potenciais vias envolvidas, nas gestações complicadas por hiperglicemia de intensidade variada. Estes estudos deverão enriquecer os conhecimentos sobre a fisiopatologia desta doença e, sobretudo, contribuir para a prevenção do risco de morbimortalidade perinatal.

Leituras suplementares

1. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004; 5: 103-113.
 2. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33 (Supplement 1): S62-S69.
 3. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 127-139.
 4. Janota J, Pomyje J, Toth D, Sosna O, Zivny J, Kuzel D, *et al.* Expression of angiopoietic factors in normal and type-i diabetes human placenta: a pilot study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 111: 153-156.
 5. Risau W. Differentiation of endothelium. *Faseb Journal* 1995; 9: 926-933.
 6. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 1997; 105: 417-437.
 7. Hudlicka O. Development of microcirculation: capillary growth and adaptation. Washington: American Physiological Society; 1984.
 8. Liekens S, Clercq ED, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 2001; 61: 253-270.
-

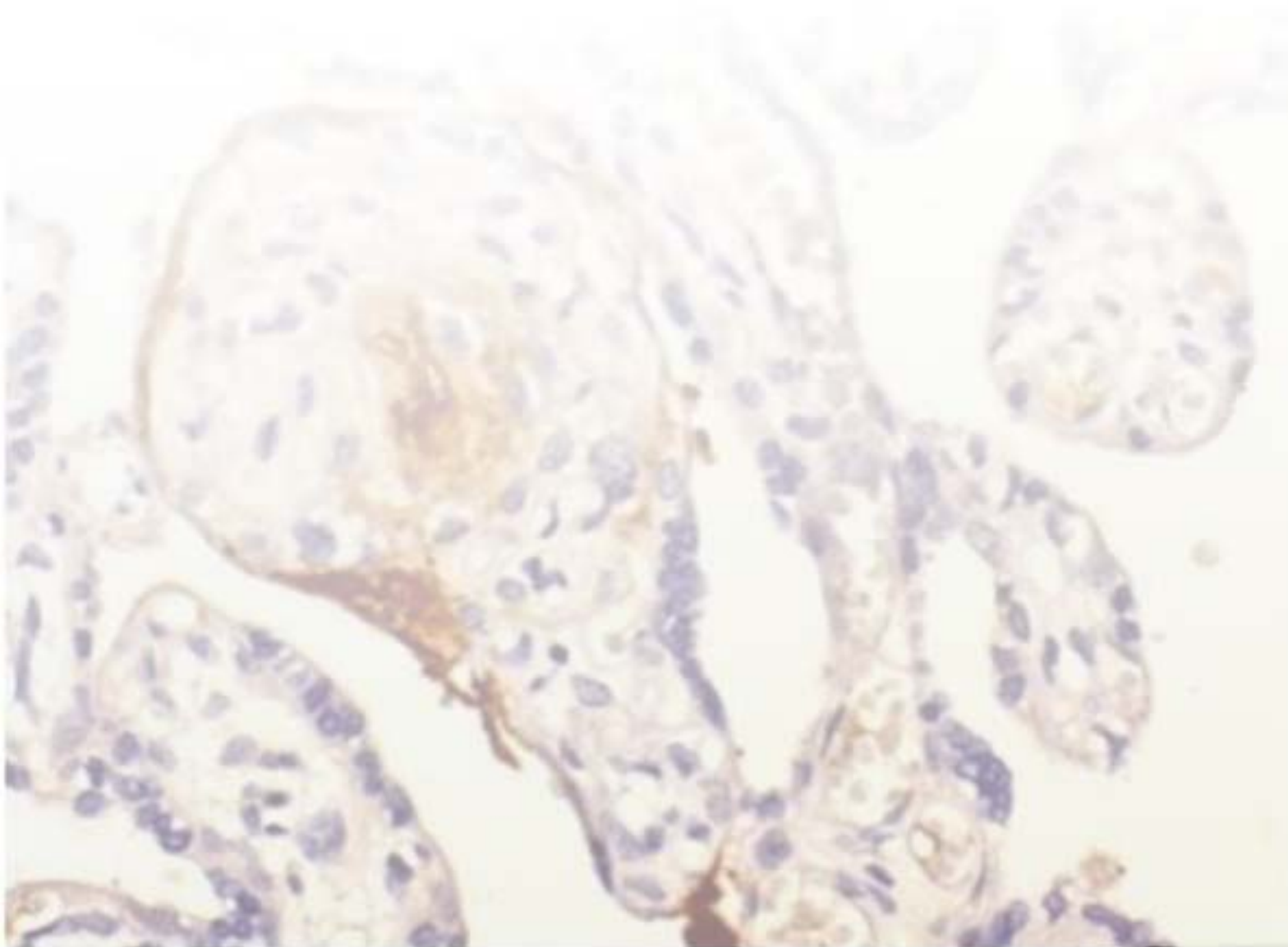
9. Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 223–228.
 10. Regnault TRH, Gala HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies - a review. *Placenta* 2002; 23: S119-S129.
 11. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001; 22: 1-13.
 12. HAPO (2008). Metzger E, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. The HAPO Study cooperative research group. *N Engl J Med*. 2008; 358:1991-2002.
 13. Rudge MVC, Peraçoli JC, Berezowski AT, Calderon IMP, Brasil MAM. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 1079 - 1089.
 14. Rudge MVC, Calderon IM, Ramos MD, Abbade JF. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. *Gynaecologic and Obstetric Investigation* 2000; 50: 108-112.
 15. Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Brasil MAM, Rugolo LMSS, Bossolan G, Odland JO. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materna e perinatal. *RBGO* 2005; 27: 691-7.
-

16. Calderon IMP, Lima CP, Rudge MVC, De Napoli G, Jeckel Neto EA, Ramos MD. Relação entre a Classificação Clínica de White e a Histopatologia das Placentas de Gestantes Diabéticas. *RBGO* 2000; 22: 401-411.
 17. Calderon IMP, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RAA, Brasil MAM, Rudge MVC. Morphometric study of placental villous and vessels in maternal hyperglycemia, gestational and overt diabetic pregnancies. *Diabetes Research* 2007; 78: 65-71.
 18. Calderon IMP, Carvalho SAL, Moreli JB, Consonni M, Brasil MAM and Rudge MVC. Umbilical arterial Doppler velocimetry and placental morphometric changes in maternal hyperglycemia. *BJOG* 2010 (*submitted / anexo 2*).
 19. Desoye G and Mouzon SH. The Human Placenta in Gestational Diabetes Mellitus – The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2007; 30 (Suppl 2): S120-S126.
 20. Calderon IMP and Rudge MVC. Macrossomia fetal: um desafio obstétrico. *RBGO* 2006; 28(4): 211-213.
 21. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 1998; 12:1063-73.
 22. Dunn-Albanese LR, Ackerman WE 4th, Xie Y, Iams JD, Kniss DA. Reciprocal expression of peroxisome proliferator- activated receptor – gamma and cyclooxygenase-2 in human term parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 809-16.
-

23. Salafia CM, Charles AK (2006). Diabetes and related metabolic states and the placenta. In: The diabetes in pregnancy dilemma – Leading changes with proven solutions. Oded Langer (ed). Maryland, University Press of America: 68-88.
 24. Devendra D, Eisenbarth GS. Interferon alpha – a potencial link in the pathogenesis of viral – induced type 1 diabetes and autoimmunity. Clin Immunol 2004; 111: 225-33.
 25. El-Bassiouni EA, Helmy MH, Abou Rawash N, El-zoghby SM, Kamel MA, Abou Raya NA. Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of PGE2 level, gene expression of cyclooxygenases and apoptosis. Br J Biomed Sci. 2005; 62: 161-5.
 26. Al-Matubsi HY, Salim MD, El-Sharaky AS, Kamel MA, Oriquat GA, Helmy MH, El-Bassiouni EA, Shourbaji M. Activities of cyclooxygenases, and levels of prostaglandins E2 and F2alpha, in fetopathy associated with experimental diabetic gestation. Diabetes Metab. 2010; 36: 43-50.
 27. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Mouzon SH. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. Diabetes 2003; 52: 2951-2958.
 28. Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, Lappas M. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: Gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. Placenta 2010; 31: 222-229.
-

29. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Adaptação, dano e morte celular. 7th ed. São Paulo: Elsevier; 2005.
 30. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 40: 770-6.
 31. Levy R, Nelson DM. To be or not to be, that is the question. Apoptosis in human trofoblasto. *Placenta* 2000; 21: 1-13.
 32. Nonvitz ER. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 591-9.
 33. Axt R, Meyberg R, Mink D, Waseman C, Reitnauer K, Schmidt W. Immunohistochemical detection of apoptosis in the human term and post – term placenta. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1999; 26: 56-9.
 34. Valdillo GS, Johson PM. Reproductive immunology conception, contraception and consequences. *The immunologist* 1996; 4: 172-8.
 35. Barrio E, Valvo MT, Romo A, Alvarez R, Gutierrez JI, Naval J, Fernandez AL. Intra – uterine growth retardation: study of placental apoptosis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 3: 451-6.
 36. Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MAM, Costa E, Calderon IMP, Gonçalves CR, Bevilacqua E, Rudge MVC. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemia, term placental trophoblast. *Diab Res Clin Prac.* 2006; 73: 143-149.
-

37. Al-Matubsi HY, Salim MD, El-Sharaky AS, Kamel MA, Oriquat GA, Helmy MH et al.,. Activities of cyclooxygenases, and levels of prostaglandins E2 and F2alpha, in fetopathy associated with experimental diabetic gestation. 2010; 36 (1): 43-50.
 38. Moley K. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endoc Metab.* 2001; 12 (2): 78-82.
 39. Chappell JH, Wang XD, Loeken MR. Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis* 2009; 14: 1472-1483.
 40. Weiss U, Cervar M, Puerstner P, Schmut O, Hass J, Mauschitz R et al.,. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, Jar and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia* 2001; 44: 209-219.
 41. Moley KH, Chi MMY, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Med.* 1998; 4 (12): 1421-1424.
 42. Burleigh DW, Stewart K, Grindle KM, Kay HH, Golos TG. Influence of maternal diabetes on placental fibroblast growth factor-2 expression, proliferation, and apoptosis. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11 (1): 36-41.
 43. Yang Z, Mo X, Gong Q, Pan Q, Yang X, Cai W, et al. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. *Apoptosis* 2008; 13: 1331-1343.
-



Artigo I

Imunomarcações placentárias de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve relação com hiperglicemia e PI umbilical

Imunomarcações placentárias de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve – relação com hiperglicemia e PI umbilical

Placental immunostainings of VEGF, COX-2 and CASPASE-3 in pregnancies complicated by diabetes or mild hyperglycemia - relationship with hyperglycemia and umbilical PI

Carvalho-Silva SAL^{a*}, Moreli JB^a, Amorim RL^b, Costa RAA^c, Rudge MVC^{c,d}, Calderon IMP^{c,d}

^a Pós-graduandas do Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil

^b Disciplina de Patologia Veterinária / Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, São Paulo, Brasil

^c Disciplina de Obstetrícia / Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil

^d Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil

*Correspondence to: Simone Angélica Leite de Carvalho Silva

Rua Capitão Sampaio Xavier, nº420/1801, Rosarinho, CEP: 52050-210

Recife, PE, Brasil / email: simoneangelicacarvalho@hotmail.com

Resumo: 275 palavras

Manuscrito: 4.149 palavras

Ilustrações: 3 tabelas e 2 figuras

Resumo

Objetivo: avaliar correlações entre média glicêmica (MG) e doppler umbilical (PI umbilical) com imunomarcações placentárias por VEGF, COX-2 e CASPASE-3, em gestações complicadas por diabetes melito (DM) ou hiperglicemia leve (HL). Método: corte transversal, em amostras de placentas de 41 gestantes, distribuídas em três grupos – DM (N = 20), HL (N = 7) e ND (N = 14). As amostras foram processadas para imunoistoquímica, utilizando sistema de polímero ligado a peroxidase. As lâminas foram randomizadas para avaliação cega, em sistema de análise de imagem. Foram avaliados MG, PI umbilical e imunomarcações placentárias por VEGF, CASPASE-3 e COX-2, em análise semi e quantitativa. Na análise estatística foram empregados ANOVA (teste F, seguido pelo teste de Tukey), *LSMeans test* e correlação de Spearman, com $p \leq 0,05$. Resultados: A MG diferenciou os grupos ND ($79,60 \pm 3,40$ mg/dl) e HL ($87,97 \pm 4,64$ mg/dl) do DM ($113,91 \pm 2,81$ mg/dl) ($p < 0,000$), mas não se correlacionou com as imunomarcações placentárias. O PI umbilical foi semelhante nos grupos ND ($1,03 \pm 0,20$) e DM ($1,05 \pm 0,20$), menor no grupo HL ($0,89 \pm 0,11$) ($p = 0,003$) e não se correlacionou com VEGF. O PI umbilical mostrou correlação inversa com CASPASE-3 e, a mesma tendência, em relação à COX-2. Na HL, a maioria dos vasos positivos eram fortemente marcados pelo VEGF; nos outros dois grupos predominou a intensidade moderada. Conclusão: A MG, em torno de 110mg/dl, foi fator limitante para as correlações propostas. Os resultados de PI umbilical foram parcial e inversamente definidos pelas condições de apoptose e regeneração celular das placentas. Estes resultados não estão definidos, mas reforçam a validade do controle glicêmico materno.

Palavras-chave: VEGF, COX-2, CASPASE-3, placenta, hiperglicemia, diabetes, doppler umbilical

Summary

Objective: To evaluate correlations between average glucose (MG) and doppler cord (Umbilical PI) with placental immunostainings for VEGF, COX-2 and caspase-3 in pregnancies complicated by diabetes mellitus (DM), or mild hyperglycemia (HL).

Method: cross-sectional samples of placentas of 41 pregnant women, divided into three groups – DM (N = 20) HL (N = 7) and ND (N = 14). The samples were processed for immunohistochemistry using polymer system linked to peroxidase. Slides were randomized to blinded evaluation in image analysis system. We evaluated MG, PI and umbilical placental immunostainings for VEGF, caspase-3 and COX-2, in semi and quantitative analysis. The statistical analysis used were ANOVA (F test, followed by Tukey test), LSMeans test and Spearman correlation, $p \leq 0.05$. **Results:** The MD differed in the groups ND (79.60 ± 3.40 mg / dl) and HL (87.97 ± 4.64 mg / dl) from DM (113.91 ± 2.81 mg / dl) ($p < 0.000$) but did not correlate with the placental immunostainings. Umbilical PI was similar in ND (1.03 ± 0.20) and DM (1.05 ± 0.20), lower in the HL group (0.89 ± 0.11) ($p = 0.003$) and not correlated with VEGF. Umbilical PI correlated inversely with caspase-3 and the same trend in relation to COX-2. At HL group, in the majority of vessels positive for VEGF were strongly marked, the other two groups predominantly moderate intensity. **Conclusion:** The MG, around 110mg/dl, was a limiting factor for the proposed correlations. The results of umbilical PI were partial and inverse defined by the conditions of apoptosis and cellular regeneration of the placentas. These results are not defined, but emphasize the validity of maternal glycemetic control.

Key-words: VEGF, COX-2, CASPASE-3, placenta, hyperglycemia, diabete, umbilical Doppler

Introdução

A placenta é órgão altamente vascularizado, que apresenta rápido crescimento em curto espaço de tempo, devendo suprir o aumento na demanda do metabolismo para o crescimento e desenvolvimento fetal. Para isso, depende, em grande parte, do adequado desenvolvimento da rede capilar fetal e uterina, com uma plasticidade tal, que permita as modificações necessárias ao longo da gestação[1].

Fatores relacionados ao processo de formação destes vasos desempenham papel de destaque no processo de placentação e sobrevida fetal. Muitos destes fatores, pró e anti-angiogênicos, já foram descritos na placenta humana e de outros animais. Entretanto, ainda não estão estabelecidos o exato mecanismo de como estes fatores interagem, as possíveis conseqüências moleculares desta interação e as respectivas alterações envolvidas nas diversas patologias da gestação [2].

O fator de proliferação do endotélio vascular (VEGF) tem ação relevante no desenvolvimento da vascularização vilosa durante o primeiro trimestre da gestação. Na placenta a termo, o VEGF é responsável pela manutenção da integridade e permeabilidade vascular. No primeiro trimestre da gestação, este fator pró-angiogênico é produzido pelo trofoblasto, tendo maior expressão no citotrofoblasto viloso do que o sinciciotrofoblasto. No trofoblasto extraviloso sua presença ainda é questionável, mas assume função parácrina, agindo no remodelamento e permeabilidade da microcirculação uterina e na formação dos vasos intravilositários. Assim, a ação do VEGF é imprescindível para o incremento das trocas metabólicas entre os compartimentos materno e fetal [3].

A Cicloxigenase (COX) é a enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas (PG) e marcador de proliferação e regeneração celular. Por muitos anos, era conhecido apenas um tipo de enzima cicloxigenase, mas uma segunda enzima foi recentemente descoberta, sendo então referidas como COX-1 (constituente) e COX-2 (induzida). A COX-1 e a COX-2 atuam em diferentes processos fisiológicos e patológicos, que se estendem da inflamação à neoplasia [4]. A COX-1 está expressa em vários tecidos do organismo, mas a COX-2 é induzida em condições específicas, como nos processos inflamatórios. De interesse, a COX-2 está relacionada à síntese de PG que modulam eventos fisiológicos do desenvolvimento e crescimento celular, fundamentais na reprodução humana. As PG resultantes da via ciclooxygenase estão presentes na rotura folicular da ovulação e, na gestação, modulam desde a implantação ovular e a angiogênese placentária, até à indução das contrações uterinas no trabalho de parto [4,5].

Apoptose é a via de morte celular, induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas [6]. A apoptose pode iniciar-se a partir de sinais externos, por receptores específicos na superfície celular ou por estímulos internos de estresse intracelular, como níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, característicos do estresse oxidativo. Essas diferentes vias culminam com a ativação de enzimas proteolíticas, as proteases conhecidas como caspases (*Cystine Aspartases*) [7]. Em condições fisiológicas, a apoptose está presente na placenta e, em maior frequência, no terceiro trimestre da gestação. Entretanto, os marcadores da apoptose placentária, tanto Bcl2 e como caspases, podem também estar envolvidos na apoptose da placenta insuficiente nas gestações de risco [8].

Na literatura atual, os marcadores da angiogênese vilositária, da inflamação e proliferação celular e da apoptose placentária são, principalmente, relacionados a gestações complicadas por pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal. Entretanto, potencialmente, estariam envolvidos também nas alterações placentárias de gestações sob qualquer condição de hipóxia intrauterina. Assim, o diabetes, pela hiperglicemia crônica ou mal controlada, pode ser uma delas.

Diabetes melito é síndrome caracterizada pela elevação crônica da glicemia de jejum e/ou das pós-prandiais, por defeito absoluto ou relativo da produção de insulina ou diminuição do seu efeito em órgãos específicos. Quando reconhecida pela primeira vez na gestação, é denominada diabetes melito gestacional (DMG) [9]. Na última década, a literatura vem reconhecendo a hiperglicemia materna, e consequente risco gestacional, em situações nas quais os critérios diagnósticos para DMG ainda não foram alcançados. Estes casos são classificados como hiperglicemia leve na gestação e, pelo risco gestacional, grupos de estudiosos recomendam o controle dos níveis glicêmicos maternos [10, 11]. Rudge *et al* [12], associando o perfil glicêmico ao teste de sobrecarga à glicose, identificaram a hiperglicemia leve desde a década de 90 e passaram a tratar estas gestantes como se fossem portadoras de DMG. Nestes 30 anos, os resultados observados por estes autores não deixam dúvida sobre a necessidade de controlar a hiperglicemia materna de qualquer origem e intensidade [13,14].

A hiperglicemia leve ou os quadros de diabetes, prévio ou gestacional, cursam com alterações morfológicas na placenta que podem interferir na sua função primordial, ou seja, nas trocas materno-fetais. Alguns resultados indicam maior ocorrência de alterações vasculares proliferativas, em especial, endarterite [15], e maior ou menor proliferação de vasos e vilosidades placentárias, relacionada ao valor normal ou alterado

do índice de pulsatilidade (PI) no doppler umbilical. De acordo com estes autores, as alterações placentárias se relacionaram à intensidade da hiperglicemia e ao correspondente nível de hipóxia do meio intrauterino, avaliado pelo PI umbilical [16]. Entretanto, a literatura é controversa sobre esses resultados.

Segundo Mayhew *et al.* [17], a exposição do organismo à hiperglicemia crônica resulta em distúrbios metabólicos diversos, originando hipóxia e comprometendo a proliferação endotelial, o crescimento vascular e a adesão de pericitos, parecem ser independente da severidade da doença. Para outros, a placenta no diabetes é submetida a uma gama de alterações estruturais e funcionais, de natureza e extensão dependentes de uma série de fatores, incluindo a intensidade da hiperglicemia materna no período de organogênese e desenvolvimento placentário. Estas placentas sofrem adaptações para manter sua capacidade funcional, facilitando a passagem de glicose para o feto e, conseqüentemente, a macrosomia fetal [18].

Em concordância com estes últimos, o controle da glicemia materna não alterou as expressões de fatores pró-angiogênicos, Ang-1, Ang-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-2 e FGFR, quando comparados aos de gestantes normoglicêmicas [19]. Estudo ainda em publicação demonstrou que o controle glicêmico materno adequado se relacionou a fluxo placentário de baixa resistência, confirmado por PI umbilical normal. Nestas condições, observou-se proliferação vascular placentária aumentada que, potencialmente, deverá favorecer a macrosomia e garantir a oxigenação fetal. Por outro lado, o controle glicêmico materno inadequado se associou a menor vascularização e conseqüente aumento na resistência vascular placentária, com valores aumentados de PI umbilical. Esta condição deverá favorecer a restrição do crescimento e a hipóxia fetal [20].

Os resultados sobre hiperglicemia e angiogênese placentária humana são poucos e conflitantes [16, 17, 18, 19]. Também, são raros e controversos, os que avaliaram apoptose em placentas de gestações associadas ao diabetes [21, 22]. Na literatura consultada, não foram encontrados estudos sobre marcadores da inflamação e da regeneração celular placentária em gestações de mulheres com hiperglicemia. O objetivo deste estudo foi avaliar as imunomarcações placentárias de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 e correlacionar estes achados com os níveis de glicemia materna e os resultados de PI umbilical, em gestantes normoglicêmicas, diabéticas e portadoras de hiperglicemia leve.

Material e método

Desenho do estudo

Corte transversal, que avaliou imunomarcações de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 em placentas de gestantes não diabéticas e portadoras de diabetes melito ou de hiperglicemia leve, relacionadas à hiperglicemia e ao PI umbilical. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (anexo 1).

Material e Grupos de Estudo

O estudo foi constituído por 41 amostras placentárias, provenientes do banco de placentas do Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. As amostras placentárias foram provenientes de 41 gestantes, acompanhadas no Serviço e classificadas como portadoras de diabetes, gestacional ou clínico (grupo DM; n = 20), e hiperglicemia leve (grupo HL; n = 7). As placentas do grupo não diabético (N-DM; n = 14) foram obtidas de gestantes que, apesar do risco para diabetes, tinham resposta normal aos testes diagnósticos [9, 12].

Variáveis

Foram incluídas as placentas de gestantes com pelo menos seis semanas de acompanhamento no Serviço e que tiveram parto em idade gestacional superior a 34 semanas. Foram consideradas como variáveis de controle, a idade materna, em anos completos; a idade gestacional no diagnóstico (diabete gestacional e hiperglicemia leve) ou na entrada no Serviço (diabete pré-gestacional), em semanas; a idade gestacional no parto, em semanas, e os níveis de pressão arterial média ($PAM = PS + 2PD/3$), em mmHG, obtidos pela média de todas as avaliações no pré-natal. Entre as portadoras de diabete, foram considerados os percentuais (%) de gestantes nas classes de Priscila White: A e A/B (diabéticas gestacionais), B e C (diabéticas clínicas, livres de vasculopatia) e D a FRH (diabéticas clínicas com vasculopatia) [15].

Métodos de valiação

Média glicêmica da gestação (MG)

A MG foi calculada pela média aritmética (Σ glicemias / número de glicemias) de todos os valores de glicose plasmática avaliados nos perfis glicêmicos, realizados em todas as consultas de pré-natal [13].

Dopplervelocimetria da artéria umbilical (PI umbilical)

Foi utilizado equipamento de ultrassonografia da marca Toshiba Powervision®, com transdutor multifrequência de 3,5 a 6,0 MHz, aplicando-se filtro de 50 a 100 Hz. Para a avaliação do índice de pulsatilidade da artéria umbilical (PI umbilical), foram avaliados os sonogramas correspondentes a, pelo menos, quatro ciclos uniformes,

obtidos em segmento de alça livre do cordão umbilical, sem a evidência de movimentos respiratórios e corporais do feto. Todos os exames foram realizados logo após o café da manhã e, a despeito dos vários exames realizados, considerou-se, neste estudo, o valor de PI umbilical obtido com intervalo máximo de 72 horas do parto [16].

Preparo das amostras para as imunomarcações

Fragmentos de tecidos placentários foram fixados em solução tamponada de formol e processados rotineiramente para inclusão em parafina. As amostras constituíram-se de cortes transversais, desde a face fetal (epitélio coriônico) até a face materna, com margem mínima de 2cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária [16]. Cortes histológicos foram confeccionados e corados com hematoxilina-eosina e, posteriormente, novos cortes foram feitos e distendidos em lâminas, devidamente identificadas, para as reações imunoistoquímicas.

A reação de imunoistoquímica baseou-se no sistema de polímero ligado a peroxidase. Após desparafinização e desidratação, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica em solução de Citrato 10mM, pH6,0, em câmara de pressão (Pascal, Dako)®. Realizou-se bloqueio da peroxidase endógena, com solução de água oxigenada 8% em metanol por 20 minutos, incubadas com os respectivos anticorpos primários (anti-VEGF, anti-COX-2 e anti-CASPASE-3 clivada). Os anticorpos primários foram diluídos em solução específica (Dako, código S3022)® e a reação se deu por 18 horas, em câmara úmida a 4C°. Posteriormente, aplicou-se o anticorpo secundário ligado à peroxidase (Advance, Dako)®, de acordo com instruções do fabricante. O cromógeno utilizado foi o DAB (Dako, código S3022)® e lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

Análise imunoistoquímica

A análise microscópica das lâminas foi cega e feita por dois observadores. Utilizou-se sistema computadorizado de análise de imagem (*software* Q-Win, versão 3.0, Leica)[®], que recebia imagem por câmara digital (CCD-IRIS/RGB, Sony)[®], acoplada a fotomicroscópio (DMR, Leica)[®]. As lâminas foram previamente examinadas em aumento de 400x para identificação da zona intermediária e, em cada lâmina, foram escolhidos 10 campos sequenciais, evitando-se áreas de infarto, depósitos de fibrina, troncos vilositários de primeira ordem, vilosidades âncora e artefatos [16, 23].

No total dos 410 campos foram contados o número e o percentual de vasos vilositários marcados pelo VEGF; o percentual de positividade de células do mesoblasto, marcadas pela COX-2 e a proporção de células do vilo placentário que sofreram apoptose, marcadas positivamente pela CASPASE-3. A seguir, realizou-se análise semi-quantitativa da intensidade de coloração de cada marcador, codificada em escores, zero (sem marcação), 1 (fraca marcação), 2 (moderada marcação) e 3 (forte marcação) (Figura 1).

Análise estatística

Inicialmente, foi construído um banco de dados em planilha do Software Microsoft Excel for Windows. Neste banco foram armazenados os dados maternos previamente definidos e os resultados da análise imunoistoquímica. Antes do armazenamento no banco de dados, os resultados discordantes das avaliações imunoistoquímicas foram revistos até um consenso. Após conferência e validação de todos os resultados, o banco de dados foi adaptado para análise estatística no Software

SAS versão 9.1.3. Exceto pelos resultados de PI umbilical, as comparações entre médias foram realizadas pela análise de variância (teste F) seguida do teste de Tukey. Para a comparação dos resultados de PI umbilical entre os grupos, ajustou-se modelo linear generalizado (*LSMeans test*) com erro aleatório gama e função de ligação Log. Utilizou-se a correlação de Spearman para avaliar a influência da MG e do PI umbilical nos marcadores imunoistoquímicos placentários. Para todas as comparações estatísticas foi considerado o limite mínimo de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Os resultados relativos às características clínicas das gestantes estão na Tabela 1. A idade materna ($p = 0,029$), a MG inicial ($p = 0,000$) e a idade gestacional no parto ($p < 0,001$) diferenciaram os grupos de gestantes. As portadoras de hiperglicemia leve (HL) eram mais jovens ($25,00 \pm 5,42$ anos) e as gestantes do grupo diabetes (DM) tinham a MG inicial mais elevada ($122,80 \pm 48,53$ mg/dl) e a menor idade gestacional no parto ($37,08 \pm 0,79$ semanas). A pressão arterial média variou entre $86,67 \pm 7,39$ mmHg no grupo N-DM, $90,00 \pm 8,70$ mmHg no HL e $93,33 \pm 9,96$ mmHg no grupo DM, mas essa diferença não foi significativa ($p = 0,395$). Entre as portadoras de diabetes, 65,0% eram das classes A e A/B, 15,0% das classes B e C de Priscila White, totalizando 80,0% de gestantes diabéticas sem vasculopatia. Apenas 20,0% eram das classes D a FRH de Priscila White e apresentavam complicações vasculares.

A MG mantida na gestação foi de $79,60 \pm 3,40$ mg/dl no grupo de gestantes não diabéticas, $87,97 \pm 4,64$ mg/dl no grupo HL e de $113,91 \pm 2,81$ mg/dl no grupo DM. Estes resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,000$): as gestantes com HL tiveram MG comparável ao grupo de não diabéticas e as gestantes do grupo DM apresentaram os níveis mais elevados MG durante a gestação (Tabela 2).

O PI umbilical foi semelhante entre as gestantes dos grupos N-DM ($1,03 \pm 0,20$) e DM ($1,05 \pm 0,20$) e menor nas portadoras de HL ($0,89 \pm 0,11$) ($p = 0,003$) (Tabela 2).

Não houve correlação entre a MG e os marcadores placentários estudados. Da mesma forma, os valores de PI umbilical não se correlacionaram com o número ($p = 0,736$) ou com o percentual ($p = 0,745$) de vasos marcados pelo VEGF (Tabela 2). Entretanto, os resultados de intensidade de marcação pelo VEGF identificaram que,

apesar do menor percentual de vasos marcados no grupo HL (17,65%; $p = 0,003$), a maior proporção deles estava fortemente marcada (escore 3) (8,82%; $p = 0,003$). Nos grupos N-DM e DM, a maior proporção de vasos estava moderadamente marcada (escore 2), respectivamente, 17,65 e 20,59% dos vasos marcados pelo VEGF (Tabela 3 e Figura 2).

Os resultados evidenciaram correlação inversa entre o valor de PI umbilical e o marcador de apoptose celular (CASPASE-3). O valor do índice de Spearman (r) foi de $-0,45$ para a correlação entre PI umbilical e núcleos marcados pela CASPASE-3 ($p = 0,014$) e de $-0,46$ para a correlação entre PI umbilical e percentual de núcleos marcados pela CASPASE-3 ($p = 0,011$). O PI umbilical também mostrou tendência à correlação inversa com o percentual de marcação ($r = -0,31$; $p = 0,09$) e com a intensidade de marcação ($r = -0,34$; $p = 0,064$) pela COX-2 no tecido placentário (Tabela 2).

Discussão

MG e PI umbilical

Neste estudo, a MG das gestantes portadoras de HL alcançaram os níveis de normoglicemia observados no grupo não diabético. A MG do grupo de gestantes diabéticas apresentou valores médios de 110mg/dl, superiores aos observados nos outros dois grupos e confirmaram o regime de hiperglicemia intra-uterina. As portadoras de HL tiveram, também, os menores valores de PI umbilical, estatisticamente diferenciados dos avaliados nos grupos de gestantes não diabéticas e diabéticas. Tais achados ratificam resultados prévios do nosso grupo, nos quais diferentes níveis de glicemia materna se relacionaram a alterações morfológicas de vasos e vilosidades placentárias, responsáveis pelos resultados normais ou alterados do PI umbilical. A hipervascularização das vilosidades placentárias, observada em placentas de gestantes com HL, se relacionou a fluxo umbilical de baixa resistência e menores valores de PI umbilical. As placentas de gestantes diabéticas, ao contrário, exibiram características vasculares comparáveis ao grupo não diabético e o resultado foi resistência aumentada ao fluxo, com valores de PI umbilical mais elevados e semelhantes aos de gestantes não diabéticas [16, 20].

A relação inversa entre vascularização vilositária e resistência ao fluxo placentário é observação clássica nas gestações associadas à restrição de crescimento fetal, associada ou não à hipertensão arterial. Estes achados caracterizam o modelo hipóxico-restritivo, em que a dopplervelocimetria umbilical é marcador do risco fetal [24].

Mais recentemente, o modelo hipóxico-metabólico considera que a hiperglicemia materna leva à hipóxia intra-uterina e esta condição induz à resposta vicariante da placenta, para garantir aporte adequado de oxigênio ao feto [18, 25]. Entretanto, outros autores ponderam que, dependendo da intensidade da hiperglicemia e da hipóxia correspondente, a resposta da placenta torna-se inadequada e insuficiente para garantir as trocas materno-fetais [16, 20]. Assim, os resultados deste estudo indicam que, para a integridade da função placentária, o ideal seria manter a glicemia materna em torno de 110 mg/dl.

Imunomarcações pelo VEGF

Considerando os resultados de MG e PI umbilical, seria esperado que os resultados dos marcadores da proliferação vascular placentária fossem diferenciados entre os grupos de gestantes. Entretanto, a análise quantitativa não mostrou correlação entre MG ou PI umbilical e imunomarcações pelo VEGF. Isso só foi possível quando se comparou os escores de intensidade de marcação – nas placentas do grupo HL, apesar da menor proporção de vasos marcados, a maioria deles era fortemente corada pelo VEGF. Nas placentas de gestantes diabéticas e não-diabéticas, a intensidade moderada predominou nos vasos marcados pelo VEGF. Esta diferenciação indica maior proliferação vascular na HL e reforça a ponderação de que a qualidade do controle metabólico materno tem papel fundamental no modelo hipóxico-metabólico da resposta adaptativa placentária [16, 18, 20, 25]. Nas gestações de risco, a hipóxia intra-uterina parece ser fator primordial na angiogênese placentária. Esta condição estimula a liberação dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e placentário (PIGF),

duas glicoproteínas com reconhecido potencial angiogênico [1, 26, 27]. Entretanto, quando se individualiza a gestação complicada pelo diabetes, os resultados ainda não são totalmente consistentes.

Pequeno número de estudos avaliou características placentárias, dependentes da relação hiperglicemia-hipóxia intrauterina, considerando o tipo e a duração da doença e, sobretudo, da qualidade do controle glicêmico materno [16, 20, 28, 29, 30]. De acordo com Mayhew *et al.* [30], a hipóxia pode estar presente mesmo em diabéticas bem controladas e, neste caso, a origem seria fetal ou pós-placentária. Outros autores consideram que a fisiopatologia da angiogênese placentária, induzida pela hipóxia intrauterina e modulada por fatores pró e anti-angiogênicos, e seus respectivos receptores, é válida apenas para as gestações normais [31]. Estas divergências dificilmente serão esclarecidas, pois a época de início, a duração e a intensidade da hiperglicemia materna são características peculiares de cada amostragem avaliada e isso impede a reprodução e a comparação dos resultados disponíveis na literatura.

Ainda que controversos, os resultados deste estudo sugerem que a expressão do VEGF, e conseqüente angiogênese placentária, foi dependente do controle da hiperglicemia materna. Assim, o limite de glicemia para induzir a resposta adaptativa placentária nestas gestações seria de 110 mg/dl. A angiogênese placentária está melhor documentada nas gestações associadas a hipertensão arterial e restrição do crescimento fetal. No diabetes, qualquer alteração vascular é atribuída ao diabetes de longa evolução e de difícil controle [17, 32, 33].

Neste estudo, os níveis de pressão arterial média (PAM) foram estatisticamente semelhantes nos três grupos, mas indicaram que algumas das gestantes incluídas

apresentavam hipertensão arterial associada. No grupo DM, as gestantes das classes D a FRH, portadoras de vasculopatia diabética, representaram apenas 20,0% da amostra. Esta proporção poderia explicar os valores numericamente superiores de PAM, mas não seria suficiente para definir os resultados placentários observados neste grupo de gestantes. Outros fatores devem estar envolvidos, entre eles, a apoptose e a regeneração celular.

Imunomarcações pela CASPASE-3

Neste estudo, a MG não se correlacionou com a apoptose placentária. Entretanto, observou-se correlação inversa entre os valores de PI umbilical e o número e percentual de núcleos marcados pela CASPASE-3 nas células do trofoblasto. Considerando o valor do coeficiente de correlação ($r = -0,45$; $R^2 \cong 20,0$), a apoptose correspondeu a, pelo menos, 20% dos determinantes nos resultados do PI umbilical. Isto significa que quanto maior a quantidade de células em apoptose, menor seria o valor do PI umbilical e, conseqüentemente, a resistência vascular placentária. Estes resultados permitem inferir que o PI umbilical, menor no grupo HL, se relacionou com maior número de células em apoptose e, de modo contrário, a menor proporção de células placentárias em apoptose, nos grupos DM e não-diabético, resultou em valores mais elevados do PI umbilical. A apoptose placentária já foi descrita como processo fisiológico nas gestações a termo, resultado do amadurecimento e desenvolvimento da placenta [34, 35, 36]. Ao contrário, pode ser interpretada como alteração patológica nos casos de ruptura prematura das membranas [37, 38], pré-eclâmpsia [39] e restrição de crescimento intra-uterino [40].

No diabetes, este efeito adverso já foi relacionado à intensidade da hiperglicemia e à qualidade do controle metabólico materno, mas o verdadeiro papel da apoptose placentária não está definido na literatura. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que o índice apoptótico foi proporcional ao quadro materno – maior nas placentas de gestantes diabéticas e de valor intermediário naquelas com hiperglicemia leve. Entretanto, a diferença só foi significativa entre gestantes diabéticas e não-diabéticas [21].

Se a apoptose é evento fisiológico e comum na gestação a termo, os achados deste estudo identificaram maturidade no grupo HL e o atraso no desenvolvimento da placenta no DM [34, 35, 36]. Entretanto, os resultados das imunomarcações pela CASPASE-3 não sofreram influência dos níveis de glicemia no meio intra-uterino. Talvez, o limite de glicemia materna, em torno de 110mg/dl, não seja suficiente para alterar a maturidade e influenciar a apoptose placentária. Ou, ainda, o tamanho amostral pode ter sido adequado para identificar diferença nos níveis de glicemia e nos valores de PI umbilical, mas insuficiente para diferenciar as condições de apoptose nas respectivas placentas. A exemplo da literatura, esta questão permanece aberta e deverá ser definida em outras pesquisas.

Imunomarcações pela COX-2

Neste estudo não foram confirmadas correlações significativas entre MG ou PI umbilical e os resultados das imunomarcações placentárias pela COX-2. Apesar disso, observou-se tendência à correlação inversa entre percentual de células positivas e intensidade de marcação pela COX-2 nas placentas e os resultados de PI umbilical. Em gestações normais, a COX-2 já foi identificada na implantação embrionária [41], na fase

final da gestação [42] e no início do trabalho de parto [43] e, em condições patológicas, na corioamnionite [44] e na pré-eclâmpsia [45]. Na literatura consultada não foram encontrados resultados de COX-2 em gestações humanas complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve.

Em modelos experimentais, este marcador foi identificado em condições adversas, como malformações fetais, estresse oxidativo e apoptose placentária, diretamente dependentes da hiperglicemia materna no diabetes [46, 47, 48]. Entretanto, neste estudo, as células marcadas pela COX-2 devem ter caracterizado a regeneração e a proliferação de células do trofoblasto e, não necessariamente, a inflamação da placenta diabética.

Admitindo-se a tendência observada nos resultados, as condições de marcação pela COX-2 influenciaram, de maneira inversa, os resultados normais ou alterados de PI umbilical. O menor valor de PI umbilical se relacionou ao maior percentual de células, intensamente marcadas, pela COX-2 e isto não parece ser uma condição adversa. Reforçam esta interpretação, a correlação positiva entre doppler umbilical e relação PGI_2/TXA_2 , evidenciada em gestações complicadas pelo diabetes [49]. Apesar da falta de correlação entre COX-2 e MG, o limite de 110 mg/dl deve ter, mais uma vez, prevenido as condições adversas intra-útero, comuns nestas gestações.

Considerações finais

Os resultados deste estudo não são, necessariamente, definitivos e alguns fatores limitantes devem ser considerados. O número de amostras não foi homogêneo e, especificamente no grupo HL, esse número foi menor. Pelo cálculo do tamanho

amostral, seriam necessárias 14 amostras por grupo, o que não foi possível na HL. O total de amostras incluídas em cada grupo pode ter sido adequado para diferenciar os resultados de MG, PI umbilical e imunomarcações placentárias entre os grupos, mas não foi suficiente para definir as correlações propostas.

A despeito dessas limitações, os resultados deste estudo destacam alguns aspectos interessantes. De modo prático, a glicemia materna mantida em torno de 110mg/dl influenciou nas potenciais condições adversas intrauterinas e favoreceu o prognóstico da gestação complicada por diabetes ou hiperglicemia. Assim, a resposta adaptativa da placenta garantiu a necessária angiogênese vilositária, sem prejuízo de seu desenvolvimento e amadurecimento e, possivelmente, permitiu a regeneração celular e preveniu a inflamação e o estresse oxidativo intra-útero. Em decorrência, os resultados do PI umbilical confirmaram fluxo placentário de baixa resistência [16, 20, 49] e a asseguraram o menor risco de morte perinatal, ainda esperado nas gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve [2, 13]. Estudos futuros deverão explorar e definir melhor estes aspectos.

Referências

1. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I Molecular Regulation. *Placenta* 2004; 25: 103-113.
 2. Macintosh MCM, Fleming KM, Bailey JD, Modder J, Acolet D, Golightly S, Miller A. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *BMJ* 2006; 333: 177-182.
 3. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001; 22: 1-13.
 4. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 1998; 12:1063-73.
 5. Kirschenbaum A, Liotta DR, Yao S, Liu XH, Klausner AP, Unger P, Shapiro E, Leav I, Levine AC. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase - 1 and cyclooxygenase - 2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 3436-3441.
 6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Adaptação, dano e morte celular 2005; São Paulo: Elsevier. 3-48 pp.
 7. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 40: 770-6.
-

8. Levy R, Nelson DM, To be or not to be? That is the question. Apoptosis in human trofoblasto. *Placenta* 2000; 21: 1-13.
 9. American Diabetes Association (ADA). International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy (Consensus Panel). *Diabetes Care* 2010; 33 (3): 676-682.
 10. Metzger E, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. The HAPO Study Cooperative Research Group. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1991-2002.
 11. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* 2010; 33: 676-682.
 12. Rudge MVC, Peraçoli JC, Berezowski AT, Calderon IMP, Brasil MAM. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz J Med Biol Res.* 1990; 23: 1079 - 1089.
 13. Rudge MV, Calderon IM, Ramos MD, Abbade JF, Rugolo LM. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. *Gynecol Obstet Invest.* 2000; 50: 108-12.
-

14. Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Calderon Ide M, Geloneze B, Dias A, Rudge. Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 May-Jun; 24: 324-30.
 15. Calderon IMP, Lima CP, Rudge MVC, De Napoli G, Jeckel Neto EA, Ramos MD. Relação entre a Classificação Clínica de White e a Histopatologia das Placentas de Gestantes Diabéticas. *RBGO* 2000; 22: 401-411.
 16. Calderon IMP, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RAA, Brasil MAM, Rudge MVC. Morphometric study of placental villous and vessels in maternal hyperglycemia, gestational and overt diabetic pregnancies. *Diabetes Research* 2007; 78: 65-71.
 17. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 127-139.
 18. Desoye G, Mouzon SH. The Human Placenta in Gestational Diabetes Mellitus – The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2007; 30 (Suppl 2): S120-S126.
 19. Janota J, Pomyje J, Toth D, Sosna O, Zivny J, Kuzel D, Stranak Z, Necas E, ZivnyJH. Expression of angiopoietic factors in normal and type-I diabetes human placenta: a pilot study. *Eur J Obstet & Gynecol and Reprod Biol* 2003; 111: 153-156.
-

20. Calderon IMP, Carvalho SAL, Moreli JB, Consonni M, Brasil MAM and Rudge MVC. Umbilical arterial Doppler velocimetry and placental morphometric changes in maternal hyperglycemia. BJOG 2010 (*submitted / anexo 2*).
 21. Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MAM, Costa E, Calderon IMP, Gonçalves CR, Bevilacqua E, Rudge MVC. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemia, term placental trophoblast. Diab Res Clin Prac. 2006; 73: 143-149.
 22. Cobellis L, De Falco M, Torella M, Trabucco E, Caprio F, Federico E, et al. Modulation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. In Vivo. 2007; 21: 777-83.
 23. Thilveris JA, BasKett TF. Fine structure of the human placenta in prolonged pregnancy. Preliminary report. Gynecol Obstet Invest 1978; 9: 40-48.
 24. Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. Br J Obstet Gynaecol. 1985; 92: 31-8.
 25. Desoye G, Myatt L. The placenta, In: Reece EA, Coustan DR, Gabbe SG (Eds.), Diabetes in Women—Adolescence, Pregnancy, and Menopause, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004, pp. 147-157.
 26. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. Am J Obstet Gynecol 2003; 188: 177-82.
-

27. Myatt L. Placental adaptative responses and fetal programming. *J Physiol* 2006; 572: 25-30.
 28. Mayhew TM, Jairam IC. Stereological comparison of 3D spatial relationships involving villi and intervillous pores in human placentas from control and diabetic pregnancies. *J Anat* 2000; 197: 263-274.
 29. Mayhew TM, Sisley I. Quantitative studies on the villi, trophoblast and intervillous pores of placentae from women with well-controlled diabetes mellitus. *Placenta* 1998; 19: 371-377.
 30. Mayhew TM, Sørensen FB, Klebe JG, Jackson MR. Growth and maturation of villi in placentae from well-controlled diabetic women. *Placenta* 1994; 15: 57-65.
 31. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic Factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
 32. Widmer M, Villar J, Benigni A, Conde-Agudelo A, Karumanchi SA, Lindheimer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007; 109: 168-80.
 33. Barut F, Barut A, Dogan Gun B, Onak Kandemir N, Harma MI, Harma M, et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol.* 2010; 5: 24.
 34. Hsu C, Meaddough E, Basherra H, Harirah H, Lu L. Increased apoptosis in human amnion is associated with labor at term. *AJRI* 2000; 43: 255-258.
-

35. Bai X, Williams JLR, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD, Crocker IP. A placental protective role for trophoblast-derived TNF- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta* 2009; 30: 855-860.
 36. Kumagai K, Otsuki Y, Ito Y, Shibata M-A, Abe H, Ueki M. Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 681-689.
 37. Moore RM, Silver RJ, Moore JJ. Physiological apoptotic agents have different effects upon human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Placenta* 2003; 24: 173-180.
 38. Shen Z-Y, Li E-M, Lu S-Q, Shen J, Cai Y-M, Wu Y-E, et al. Autophagic and apoptotic cell death in amniotic epithelial cells. *Placenta* 2008; 29: 956-961.
 39. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 271-276.
 40. Huppertz B, Rote NS, Nelson DM, Reister F, Black S, Hunt JS. Apoptosis, molecular and genetic contributions. *Placenta* 2001; 22: S101-103.
 41. Marions L, Danielson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 961-965.
 42. Johansen B, Rakkestad K, Balboa MA, Dennis EA. Expression of cytosolic and secreted forms of phospholipase A2 and cyclooxygenases in human placenta, fetal membranes, and chronic cell lines. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2000; 60: 119-125.
-

43. Dunn-Albanese LR, Ackerman WE, Xie Y, Iams JD, Kniss DA. Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and cyclooxygenase-2 in human term parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 809-816.
 44. Temma K, Shimoya K, Zhang Q, Kimura T, Wasada K, Kanzaki T, et al. Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on the cyclooxygenase-2 of human placenta in chorioamnionitis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 167-171.
 45. Wetzka B, Nüsing R, Charnock-Jones DS, Schäfer W, Zahradnik HP, Smith SK. Cyclooxygenase-1 and -2 in human placenta and placental bed after normal and pre-eclamptic pregnancies. *Hum Reprod* 1997; 12: 2313-2320.
 46. Burdon C, Mann C, Cindrova-Davies T, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Oxidative Stress and the Induction of Cyclooxygenase Enzymes and Apoptosis in the Murine Placenta. *Placenta* 2007; 28: 724-733.
 47. Rudge MV, Damasceno DC, Volpato GT, Almeida FC, Calderon IM, Lemonica IP. Effect of Ginkgo biloba on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 1095-9.
 48. Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MVC, Padovani CR, Calderon IM. Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 116: 131-137.
-

49. Saldeen P, Olofsson P, Parhar RS, al-Sedairy S. Prostanoid production in umbilical vessels and its relation to glucose tolerance and umbilical artery flow resistance. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1996; 68: 35-41.
-

Lista de Tabelas e Figuras

- Figura 1 Imunomarcações placentárias relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas intensidades fraca (1), moderada (2) e intensa (3) – color HE, 200 \times ; bar: 10 e 20 mm
- Tabela 1 Características clínicas das gestantes dos grupos não-diabético (N-DM); hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM)
- Tabela 2 Associações entre média glicêmica da gestação (MG) e valores de PI umbilical com os grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM) e respectivas correlações com as imunomarcações placentárias
- Figura 2 Imunomarcações relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas placentas dos grupos não-diabético (N-DM) (1), hiperglicemia leve (HL) (2) e diabetes melito (DM) (3)
- Tabela 3 Distribuição percentual (%) das imunomarcações com VEGF nas diferentes categorias de intensidade nos grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM)
-
-

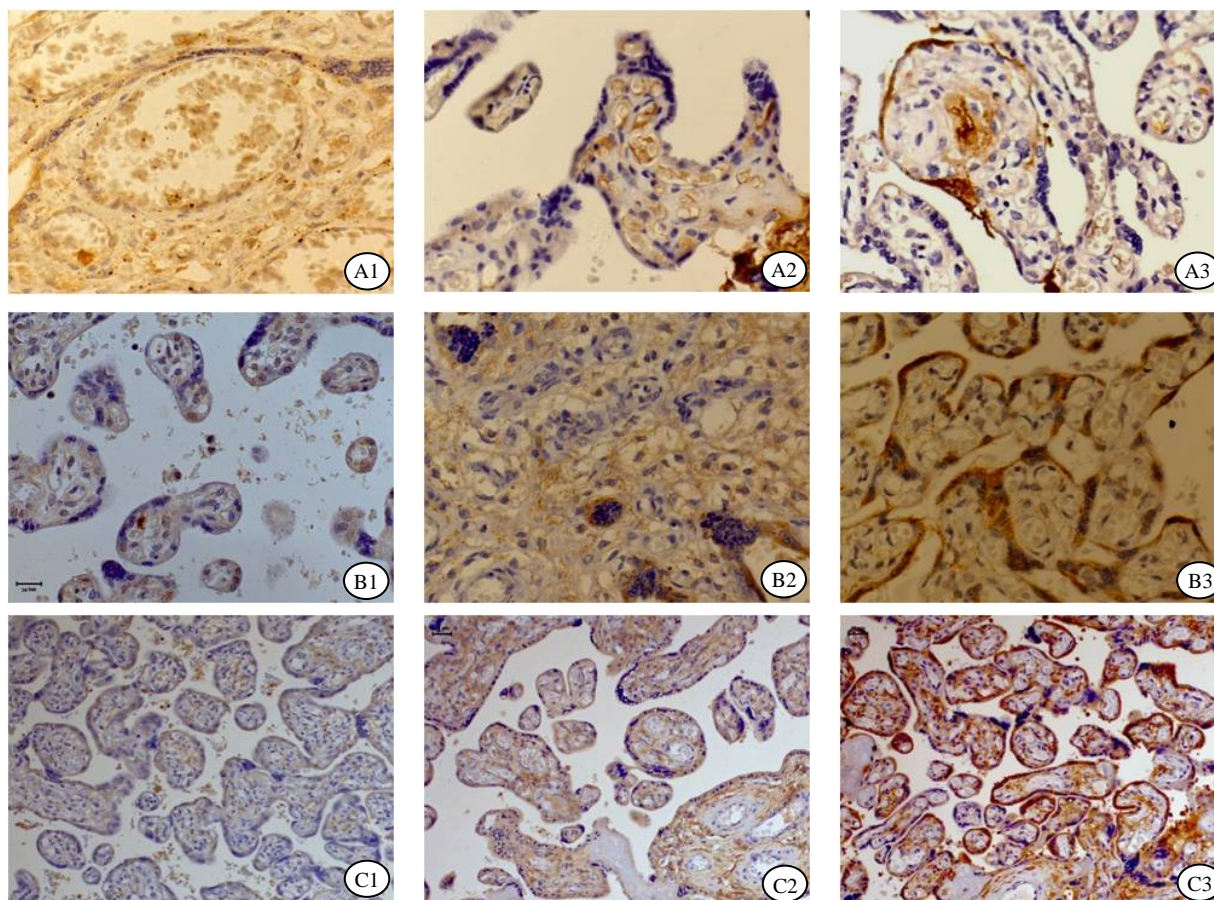


Figura 1 – Imunomarcações placentárias relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas intensidades fraca (1), moderada (2) e intensa (3) – color HE, 200 \times ; bar: 10 e 20 μ m

Tabela 1 – Características clínicas das gestantes dos grupos não-diabético (N-DM); hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM).

	N-DM n = 14	HL n = 7	DM n = 20	Valor p*
Idade materna (anos)	30,21 ± 7,95	25,00 ± 5,42	32,60 ± 4,66	0,029
IG diagnóstico (semanas) ⁽¹⁾	29,36 ± 3,07	30,00 ± 2,89	29,93 ± 5,70	0,242
MG inicial (mg/dL) ⁽²⁾	74,50 ± 8,61	93,50 ± 13,15	122,80 ± 48,53	0,000
IG parto (semanas) ⁽³⁾	39,03 ± 1,43	39,57 ± 1,42	37,08 ± 0,79	< 0,001
PAM (mmHg) ⁽⁴⁾	86,67 ± 7,39	90,00 ± 8,70	93,33 ± 9,96	0,395
Classes P White (DM)				
A e A/B (n / %) ⁽⁵⁾			13 (65,0)	
B e C (n / %) ⁽⁶⁾			03 (15,0)	
D a FRH (n / %) ⁽⁷⁾			04 (20,0)	

*ANOVA

(1) Idade gestacional no diagnóstico ou de entrada no Serviço

(2) Média glicêmica no diagnóstico ou de entrada no Serviço

(3) Idade gestacional no parto

(4) Pressão arterial média na gestação

(5) DM Gestacional

(6) DM pré-gestacional sem vasculopatia

(7) DM pré-gestacional com vasculopatia

Tabela 2 – Associações entre média glicêmica da gestação (MG) e valores de PI umbilical com os grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM) e respectivas correlações com as imunomarcações placentárias.

	N-DM n = 14	HL n = 7	DM n = 20	Valor <i>p</i>
MG (mg/dL)*	79,60 ± 3,40	87,97 ± 4,64	113,91 ± 2,81	< 0,0001
PI umb**	1,03 ± 0,20	0,89 ± 0,11	1,05 ± 0,20	0,003
	MG		PI umb	
	Índice <i>r</i>	Valor <i>p</i>	Índice <i>r</i>	Valor <i>p</i>
VEGF[#]				
No. vasos	0,06	0,717	-0,07	0,735
% vasos	0,21	0,233	-0,07	0,745
CASPASE-3[#]				
No. núcleos	-0,07	0,682	-0,45	0,014
% núcleos	-0,08	0,631	-0,46	0,011
COX-2[#]				
% marcação	-0,10	0,529	-0,31	0,095
Intensidade	-0,09	0,595	-0,34	0,064

*MG: média glicêmica da gestação [controle = HL < DM] / teste Tukey

**PI umb: índice de pulsatilidade da artéria umbilical [controle = DM > HL] / LSMeans Test

Correlação de Spearman

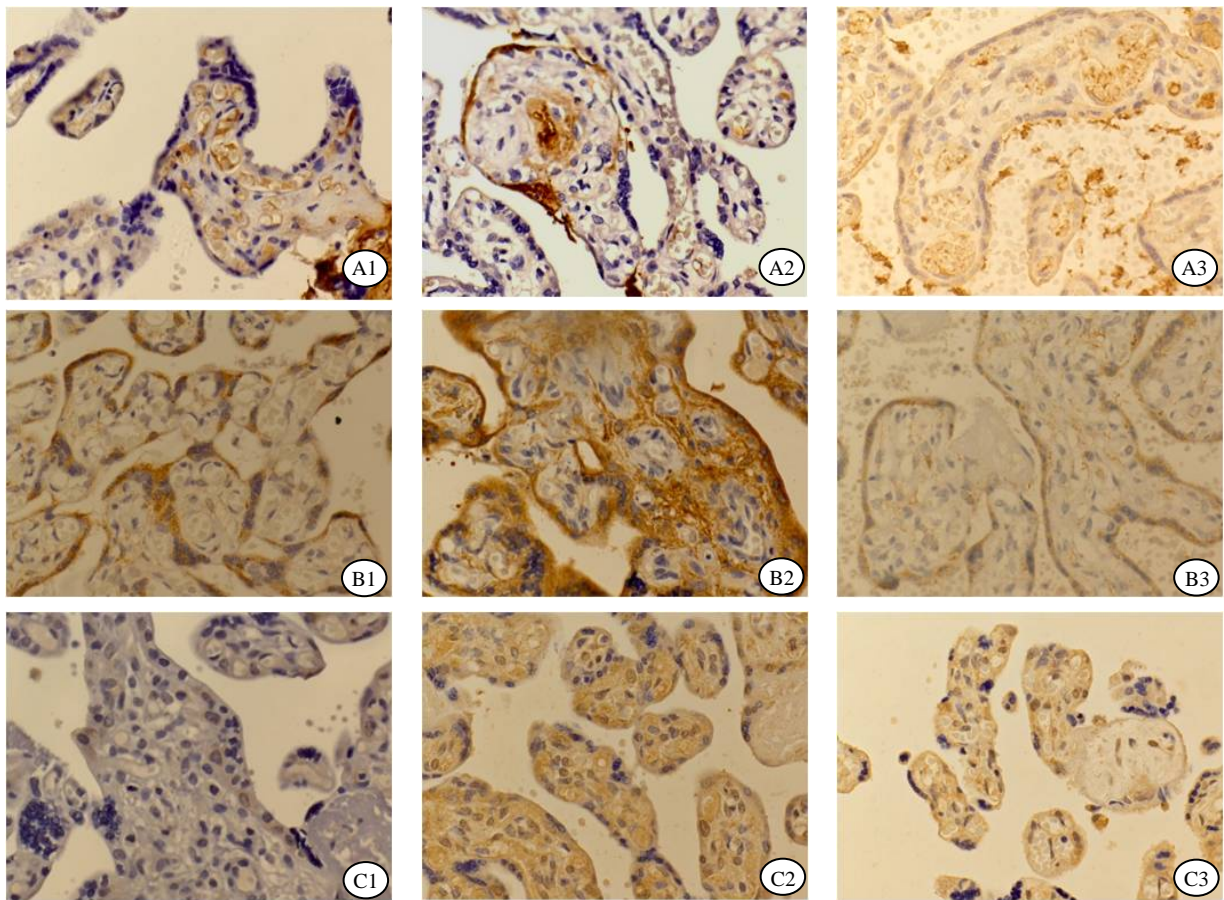


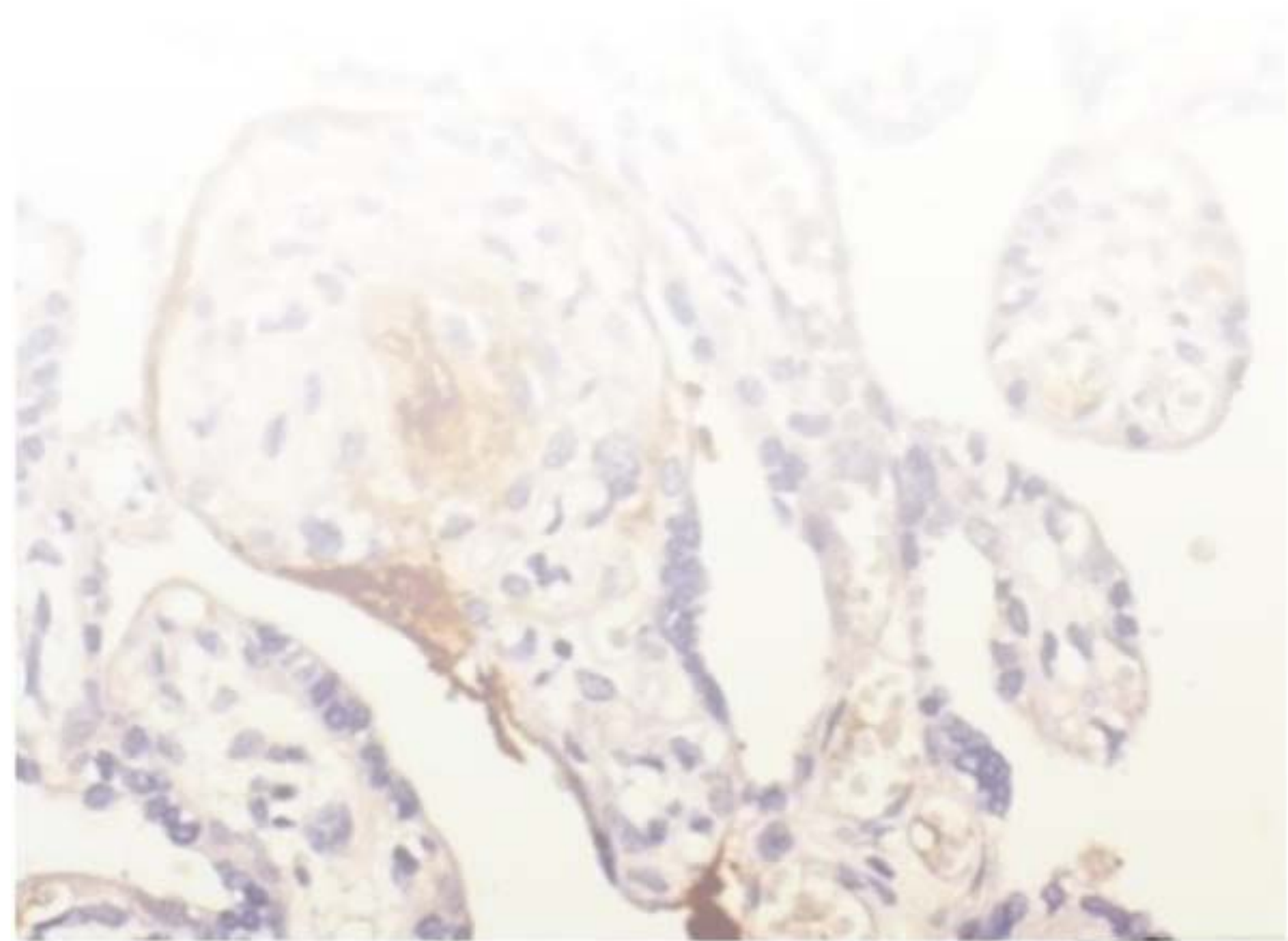
Figura 2 – Imunomarcações relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas placentas dos grupos não-diabético (N-DM) (1), hiperglicemia leve (HL) (2) e diabetes melito (DM) (3) – color HE, 200_x; bar: 10 e 20 mm

Tabela 3 – Distribuição percentual (%) das imunomarcações com VEGF nas diferentes categorias de intensidade nos grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM).

	N-DM n = 14	HL n = 7	DM n = 20	Valor <i>p</i>
% Grupos	35,29	17,65	47,06	0,035*
% Intensidade				0,006**
1	5,88	2,94	8,82	
2	17,65	5,88	20,59	
3	11,76	8,82	17,65	

*Razão de Verossimilhança

**LSMeans Test (Intensidade 2 ≠ Intensidade 3)



Artigo II

Imunomarcações placentárias, hiperglicemia materna e PI umbilical em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve relação com resultados perinatais

Imunomarcações placentárias, hiperglicemia materna e PI umbilical em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve – relação com resultados perinatais

Placental immunostainings, umbilical PI and maternal hyperglycemia in pregnancies complicated by diabetes or mild hyperglycemia - relationship with perinatal outcome

Simone Angélica Leite de Carvalho Silva^a, Jusciele Brogin Moreli^a, Claudia Garcia Magalhães^b, Débora Cristina Damasceno^{a,b}, Marilza Vieira Cunha Rudge^{a,b}, Iracema Mattos Paranhos Calderon^{a,b}

^a Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista/UNESP, São Paulo, Brasil

^b Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista/UNESP, São Paulo, Brasil

Correspondência ao autor: Simone Angélica Leite de Carvalho Silva

Rua Capitão Sampaio Xavier, nº 420/1801, Rosarinho, Recife, PE / Brasil

CEP- 52050-210

Email: simoneangelicacarvalho@hotmail.com

Resumo

O objetivo foi avaliar correlações entre média glicêmica (MG), doppler artéria umbilical (PI umbilical), imunomarcações placentárias (VEGF, COX-2 e CASPASE-3) e resultados perinatais adversos (RPNA), em gestações complicadas por diabetes melito (DM) ou hiperglicemia leve (HL). Foram incluídas 41 gestantes, e respectivas placentas e recém-nascidos (RN), distribuídas em três grupos – DM (N = 20), HL (N = 7) e ND (N = 14). Foram avaliados a MG, o PI umbilical e as imunomarcações placentárias e avaliou-se associação e correlação com os RPNA, relativos ao crescimento feto-placentário e à oxigenação intrauterina. As amostras placentárias foram processadas para imunistoquímica, utilizando sistema de polímero ligado a peroxidase. As lâminas foram randomizadas para avaliação cega, em sistema de análise de imagem. Na análise estatística foram empregados ANOVA, Qui-quadrado, *LSMeans test* e testes de correlações, com $p \leq 0,05$. A MG diferenciou os grupos ND ($79,60 \pm 3,40$ mg/dl) e HL ($87,97 \pm 4,64$ mg/dl) do DM ($113,91 \pm 2,81$ mg/dl) ($p < 0,000$) e se associou a RPNA: quanto maior a MG, menor a idade gestacional e o percentual de RN–AIG, além da ocorrência de fototerapia e do maior tempo de internação. O PI umbilical foi semelhante nos grupos ND ($1,03 \pm 0,20$) e DM ($1,05 \pm 0,20$), menor no grupo HL ($0,89 \pm 0,11$) ($p = 0,003$) e teve correlação negativa com o peso placentário ($r = -0,4208$). Os vasos marcados pelo VEGF apresentaram correlação direta com o índice ponderal ($r = 0,3899$) e, inversa, com os níveis de bilirrubina de cordão ($r = -0,5298$). As células em apoptose, mostraram correlação direta com o peso ($r = 0,4018$) e índice placentários ($r = 0,3785$) e com os níveis de Ht ($r = 0,3600$) e Hb ($r = 0,3735$) de cordão. A COX-2 não se correlacionou com RPNA. A MG no limite de 110 mg/dl foi determinante para o RPNA. A proliferação vascular (VEGF) favoreceu o crescimento fetal e preveniu a hipóxia intrauterina. O PI umbilical e a CASPASE-3 avaliaram o desenvolvimento e a capacidade da placenta em garantir as trocas materno-fetais. Apesar das limitações, estes resultados são, na maioria, inéditos e deverão ser explorados em pesquisas futuras. Palavras-chave: Hiperglicemia, Doppler umbilical, VEGF, COX-2, CASPASE-3, placenta, resultados perinatais.

Summary

The objective was to evaluate correlations between average glucose (MG), umbilical artery Doppler (PI umbilical), placental immunostainings (VEGF, COX-2 and CASPASE-3) and adverse perinatal outcomes (RPNA) in pregnancies complicated by diabetes mellitus (DM) or mild hyperglycemia (HL). We included 41 pregnant women, and respective placentas and newborns (NB), divided into in three groups - DM (N = 20) HL (N = 7) and ND (N = 14). We evaluated the MG, umbilical PI and placental immunostainings and it was evaluated association and correlation with RPNA on growth and the fetal-placental oxygenation uterus. The placental samples were processed for immunohistochemistry using polymer system linked to peroxidase. Slides were randomized to blinded evaluation in image analysis system. The statistical analysis used were ANOVA, chi-square test LSMMeans and tests of correlations, with $p \leq 0.05$. MG differed the groups ND (79.60 ± 3.40 mg / dl) and HL (87.97 ± 4.64 mg / dl) from DM (113.91 ± 2.81 mg / dl) ($p < 0.000$) and joined the RPNA: as higher was the MG, the gestational age and the percentage of RN-AIG were lower, besides the occurrence of phototherapy and longer hospitalization. Umbilical PI was similar in ND (1.03 ± 0.20) and DM (1.05 ± 0.20), lower in the HL group (0.89 ± 0.11) ($P = 0.003$) and had negative correlation ($r = - 0.4208$) with placental weight. The vessels marked by VEGF correlated directly with weight index ($r = 0.3899$) and inversely with bilirubin levels of the cord ($r = - 0.5298$). The apoptotic cells showed a direct correlation with weight ($r = 0.4018$) and placental index ($r = 0.3785$) and Ht levels ($r = 0.3600$) and Hb levels ($r = 0.3735$) of the cord. COX-2 did not correlate with RPNA. The MG in the limit of 110 mg / dl was crucial to RPNA. The vascular proliferation (VEGF) has encouraged the growth and prevented fetal intrauterine hypoxia. Umbilical PI and CASPASE-3 assessed the development of the placenta and the ability to ensure the maternal-fetal exchanges. Despite the limitations, these results are mostly unknown and should be explored in future research. Keywords: Hyperglycemia, Doppler umbilical, VEGF, COX-2, CASPASE-3, placenta and perinatal outcomes.

Introdução

Diabete melito é síndrome caracterizada pela elevação crônica da glicemia de jejum e/ou das pós-prandiais, por defeito absoluto ou relativo da produção de insulina ou diminuição de sua ação em órgãos específicos. Classicamente, cursam com a gestação, o diabete melito, tipo 1 ou 2, e o diabete melito gestacional (DMG), definido por hiperglicemia de qualquer intensidade, identificada pela primeira vez na gestação (ADA, 2010). Mais recentemente, a literatura vem chamando a atenção para a hiperglicemia leve (HL) que, como o diabete, também deve ser diagnosticada e tratada na gestação. O diagnóstico de DMG é confirmado pelo teste de tolerância à glicose (TTG100g) ou, de modo alternativo, pelo TTG75g (ADA, 2010). A literatura considera como portadoras de HL, as gestantes com (i) fator de risco e ausência de critérios para o diagnóstico de DMG (HAPO, 2008), (ii) apenas um valor alterado nos testes diagnósticos (IADPSG, 2010) ou (iii) TTG normal e perfil glicêmico alterado (Rudge *et al.*, 2000; Rudge *et al.*, 2005).

Nas gestações complicadas por hiperglicemia, o feto é exposto a risco elevado de morbidade e mortalidade, decorrentes de hipóxia e de alterações metabólicas no ambiente uterino. A hiperglicemia materna induz a hiperglicemia e hiperinsulinismo fetal e esta é a base fisiopatológica para os resultados perinatais adversos (RPNA) (Rudge *et al.*, 2000; Rudge *et al.*, 2005). A glicose é a principal fonte de energia e, a insulina, o hormônio do crescimento fetal; o resultado dessa associação é a macrossomia ou os recém-nascidos grandes para a idade gestacional. Este estímulo intrauterino pode refletir na vida pós-natal e contribuir para obesidade do adulto, com todos os seus desdobramentos. Assim, a macrossomia fetal é considerada como fator

determinante na programação intrauterina para a vida pós-natal (Barnes-Powell, 2007; Daskalakis *et al.*, 2008; Grissa *et al.*, 2010).

A placenta constitui a interface entre o meio materno e fetal, desempenhando papel importante na manutenção e proteção do feto em desenvolvimento. Este órgão, temporário e exclusivo da gestação, é responsável por múltiplas funções, incluindo a transferência de nutrientes da mãe para o feto e de catabólitos fetais para o meio materno. Nas gestações que cursam com hiperglicemia materna, o aporte exagerado de glicose resulta em efeitos adversos na organogênese e desenvolvimento da placenta e, conseqüentemente, no crescimento e oxigenação fetal (Björk & Persson, 1984; Taricco *et al.*, 2003; Calderon *et al.*, 2007).

A relação entre alterações morfológicas placentárias, doppler umbilical anormal e RPNA é a base fisiopatológica da avaliação biofísica da vitalidade fetal (Berkowitz *et al.*, 1988). Sem dúvida, o doppler umbilical é específico para o diagnóstico da restrição do crescimento fetal (RCF) e da hipóxia intrauterina, eventos adversos comuns nas gestações associadas às síndromes hipertensivas (Cruz-Martinez & Figueras, 2009). Esta condição é, classicamente, definida na literatura como modelo hipóxico-restritivo. Mas, a acurácia diagnóstica deste exame não está definida nas gestações complicadas pelo diabetes. Alguns autores relatam associação entre aumento da resistência no fluxo da artéria umbilical e RPNA, independentemente dos níveis de HbA1c no final da gestação (Pietryga *et al.*, 2006). Outros consideram que o Doppler umbilical teria melhor desempenho nas gestações complicadas pelo diabetes de longa evolução, associado à vasculopatia, hipertensão arterial e RCF (Maulik *et al.*, 2002).

Estudos anteriores do nosso grupo evidenciaram que as placentas sob regime de hiperglicemia tinham maior ocorrência de alterações vasculares proliferativas, em especial, endarterite (Calderon *et al.*, 2000). Observou-se, também, maior ou menor proliferação de vasos e vilosidades placentárias, relacionada ao valor normal ou alterado do índice de pulsatilidade (PI) no doppler umbilical. Esses resultados foram diretamente dependentes da intensidade da hiperglicemia no meio intrauterino (Calderon *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2010/em publicação).

O modelo hipóxico-metabólico considera que a hiperglicemia materna leva à hipóxia intrauterina e que, esta condição, induz à resposta vicariante da placenta para garantir aporte adequado de oxigênio ao feto (Desoye & Myatt, 2004; Desoye & Mouzon, 2007). De acordo com os nossos resultados, a vicariância placentária deve acontecer até um determinado nível de hiperglicemia, com correspondente grau de hipóxia. Atingidos estes limites, a placenta não consegue promover a angiogênese e garantir a vascularização adequada, tornando-se insuficiente para as trocas materno-fetais (Calderon *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2010/em publicação).

Alguns estudos enfocaram a relação entre hiperglicemia, hipóxia e proliferação vascular placentária, utilizando marcadores imunoistoquímicos específicos, como o fator de proliferação do endotélio vascular (VEGF). Entretanto, os resultados são poucos e conflitantes (ADA, 2010; IADPSG, 2010; Desoye & Mouzon, 2007; Rudge *et al.*, 1990). Da mesma forma, outras possíveis vias envolvidas: (i) apoptose das células trofoblásticas, marcadas pela CASPASE e (ii) inflamação, evento concorrente com a hipóxia tecidual, marcada pela COX induzida (COX-2) (Dubois *et al.*, 1998), ainda foram pouco exploradas. Na literatura consultada, os estudos que avaliaram apoptose

em placentas de gestações associadas ao diabetes são raros e controversos (Sgarbosa *et al.*, 2006; Cobellis *et al.*, 2007) e não foram encontrados estudos sobre marcadores da inflamação em gestações de mulheres portadoras de hiperglicemia.

Pesquisas recentes do nosso grupo sugerem que níveis de glicemia superiores a 110 mg/dl seriam limitantes para a proliferação vascular placentária, marcada pelo VEGF, e que a CASPASE-3 influenciaria negativamente nos resultados de PI umbilical. À semelhança da CASPASE-3, identificou-se tendência a uma correlação inversa entre COX-2 e PI umbilical (dados não publicados). Assim, estes resultados destacam potenciais correlações entre biomarcadores placentários e prognóstico perinatal nas gestações associadas à hiperglicemia materna.

Considerando estas perspectivas, pouco exploradas e indefinidas, o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis interações entre hiperglicemia, imunomarcações placentárias e PI umbilical com os resultados perinatais, dependentes de oxigenação e nutrição fetal, em gestações complicadas por diabetes e hiperglicemia leve.

Sujeitos e método

Desenho do estudo

Corte transversal, que avaliou a intensidade da hiperglicemia intrauterina, as imunomarcações placentárias de VEGF, COX-2 e CASPASE-3 e os resultados de PI umbilical, relacionados ao prognóstico perinatal de gestações complicadas por diabetes melito ou hiperglicemia leve. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (anexo 1).

Sujeitos e Grupos de Estudo

O estudo foi constituído por 41 gestantes, e respectivas placentas e recém-nascidos, acompanhadas no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. As gestantes foram diferenciadas em três grupos: portadoras de diabetes, gestacional ou clínico (grupo DM; n = 20) e de hiperglicemia leve (grupo HL; n = 7) ou não-diabéticas (N-DM; n = 14), representadas por gestantes que, apesar do risco para diabetes, tinham resposta normal aos testes diagnósticos (ADA, 2010; Rudge *et al.*, 1990).

Variáveis

Foram incluídas gestantes com pelo menos seis semanas de acompanhamento no Serviço e que tiveram parto em idade gestacional superior a 34 semanas. Foram consideradas como variáveis maternas de controle, a média glicêmica (MG; em mg/dl) inicial e a avaliada durante toda a gestação, os resultados do índice de pulsatilidade da artéria umbilical (PI umbilical), obtidos com intervalo máximo de 72 horas antes do parto, e os níveis de pressão arterial média ($PAM = PS + 2PD/3$, em mmHg), obtidos pelas avaliações dos níveis pressão sistólica (PS) e diastólica (PD) no pré-natal.

Relativas ao desenvolvimento fetal e placentário foram avaliadas as seguintes variáveis: idade gestacional no parto (em semanas) e percentual (%) de RN nas classes de termo ($IG > 37$ semanas) e pré-termo ($IG \leq 37$ semanas); peso dos recém-nascidos (RN) (em gramas) e % de RN nas classes de peso/idade gestacional: pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG); índice ponderal de Rohrer (peso RN/comprimento³, em g/cm³); dias de internação; o peso da placenta (em gramas) e o índice placentário (peso placenta/peso RN).

Relativas à oxigenação intrauterina foram avaliadas: escores de Apgar de primeiro (Apgar 1) e quinto (Apgar 5) minutos; níveis de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e bilirrubina não-conjugada no sangue de cordão umbilical e percentual de RN que receberam fototerapia na primeira semana de vida. De acordo com o protocolo do serviço, todas essas avaliações são realizadas de rotina nas gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve (Rudge *et al.*, 2005).

Métodos de avaliação

Média glicêmica da gestação (MG)

A MG foi calculada pela média aritmética (Σ glicemias / número de glicemias) de todos os valores de glicose plasmática avaliados nos perfis glicêmicos, realizados em todas as consultas de pré-natal (Rudge *et al.*, 2000).

Dopplervelocimetria da artéria umbilical (PI umbilical)

Foi utilizado equipamento de ultrassonografia da marca Toshiba Powervision®, com transdutor multifrequência de 3,5 a 6,0 MHz, aplicando-se filtro de 50 a 100 Hz. Para a avaliação do índice de pulsatilidade da artéria umbilical (PI umbilical), foram avaliados os sonogramas correspondentes a pelo menos quatro ciclos uniformes, obtidos em segmento de alça livre do cordão umbilical, sem a evidência de movimentos respiratórios e corporais do feto. Todos os exames foram realizados logo após o café da manhã e, a despeito dos vários exames realizados, considerou-se, neste estudo, o valor de PI umbilical obtido com intervalo máximo de 72 horas do parto (Calderon *et al.*, 2007).

Preparo das amostras para as imunomarcações

Fragmentos de tecidos placentários foram fixados em solução tamponada de formol e processados rotineiramente para inclusão em parafina. As amostras constituíram de cortes transversais, desde a face fetal (epitélio coriônico) até a face materna, com margem mínima de 2cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária (Calderon *et al.*, 2007). Cortes histológicos foram confeccionados e corados

com hematoxilina-eosina e, posteriormente, novos cortes foram feitos e distendidos em lâminas, devidamente identificadas, para as reações imunoistoquímicas.

A reação de imunoistoquímica baseou-se no sistema de polímero ligado a peroxidase. Após desparafinização e desidratação, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em solução de Citrato 10mM, pH6,0, em câmara de pressão (Pascal, Dako). Realizou-se bloqueio da peroxidase endógena, com solução de água oxigenada 8% em metanol por 20 minutos, incubadas com os respectivos anticorpos primários (anti-VEGF, anti-COX-2 e anti-CASPASE-3 clivada). Os anticorpos primários foram diluídos em solução específica (Dako, código S3022)® e a reação se deu por 18 horas, em câmara úmida a 4C°. Posteriormente, aplicou-se o anticorpo secundário ligado à peroxidase (Advance, Dako)®, de acordo com instruções do fabricante. O cromógeno utilizado foi o DAB (Dako, código S3022)® e lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

Análise imunoistoquímica

A análise microscópica das lâminas foi cega e feita por dois observadores. Utilizou-se sistema computadorizado de análise de imagem (software Q-Win, versão 3.0, Leica®), que recebia imagem por câmara digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a fotomicroscópio (DMR, Leica®). As lâminas foram previamente examinadas em aumento de 400x para identificação da zona intermediária e, em cada lâmina, foram escolhidos 10 campos sequenciais, evitando-se áreas de infarto, depósitos de fibrina, troncos vilositários de primeira ordem, vilosidades âncora e artefatos (Calderon *et al.*, 2007; Giles *et al.*, 1985).

No total dos 410 campos foram contados o número e o percentual de vasos vilositários marcados pelo VEGF; o percentual de positividade de células do mesoblasto, marcadas pela COX-2 e o número e a proporção de células do vilos placentário que sofreram apoptose, marcadas positivamente pela CASPASE-3. A seguir, realizou-se análise semi-quantitativa da intensidade de coloração de cada marcador, codificada em escores, zero (sem marcação), 1 (fraca marcação), 2 (moderada marcação) e 3 (forte marcação).

Análise estatística

Inicialmente, foi construído um banco de dados em planilha do Software Microsoft Excel for Windows. Neste banco foram armazenados os dados maternos, fetais e placentários, previamente definidos, e os resultados da análise imunoistoquímica. Antes do armazenamento, os resultados discordantes das avaliações imunoistoquímicas foram revistos até um consenso. Após conferência e validação de todos os resultados, o banco de dados foi adaptado para análise estatística no Software SAS versão 9.1.3. Os resultados relativos a características maternas e resultados perinatais, expressos por média e desvio-padrão, foram comparados entre os grupos por análise de variância (ANOVA, teste F) seguida do teste de Tukey. Os resultados expressos em percentual (%) foram comparados entre os grupos pelo teste do qui-quadrado, com as necessárias adequações. Para a comparação dos resultados de PI umbilical entre os grupos ajustou-se modelo linear generalizado (*LSMeans test*) com erro aleatório gama e função de ligação Log. No estudo da influência dos marcadores placentários nas variáveis perinatais categorizadas (idade gestacional / termo e pré-

termo, Apgar1, Apgar 5, classes de RN e necessidade de fototerapia), ajustou-se modelo linear generalizado (*LSMeans test*) com erro multinomial e função de ligação acumulativo logit. Para estudar as influências dos marcadores placentários nas variáveis perinatais contínuas (peso placentário, índice placentário, índice ponderal, hematócrito, hemoglobina, bilirrubina e dias de internação) utilizou-se as correlações de Spearman (distribuição normal) e de Pearson (distribuição anormal dos dados). Para todas as comparações estatísticas foi considerado o limite mínimo de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

A MG inicial ($p = 0,000$) e a MG mantida na gestação ($p < 0,0001$) diferenciaram os grupos de gestantes. As gestantes do grupo diabetes (DM) tinham a MG inicial mais elevada ($122,80 \pm 48,53$ mg/dl) e também os maiores valores de MG durante a gestação ($113,91 \pm 2,81$ mg/dl). O PI umbilical foi semelhante entre as gestantes dos grupos N-DM ($1,03 \pm 0,20$) e DM ($1,05 \pm 0,20$) e menor nas portadoras de HL ($0,89 \pm 0,11$) ($p = 0,003$). A pressão arterial média variou entre $86,67 \pm 7,39$ mmHg no grupo N-DM, $90,00 \pm 8,70$ mmHg no HL e $93,33 \pm 9,96$ mmHg no grupo DM, mas essa diferença não foi significativa ($p = 0,395$) (Tabela 1).

Exceto pela idade gestacional no parto, pelo percentual de RN de peso adequado (RN-AIG) e pelos dias de internação, os demais resultados perinatais não foram diferentes entre os grupos. Os RN de mães portadoras de DM apresentaram a menor idade gestacional no parto ($37,08 \pm 0,79$ semanas) ($p < 0,001$) e menor percentual deles foi classificado como RN-AIG (38,9%; $p = 0,040$). Estes RN também permaneceram maior número de dias internados ($4,94 \pm 3,26$; $p = 0,005$) (Tabela 1).

Entre os resultados das imunomarcações pelo VEGF, a intensidade de marcação foi o único que se diferenciou entre os grupos avaliados. As placentas dos grupos HL apresentaram menor percentual de vasos marcados pelo VEGF (17,65%; $p = 0,035$), entretanto, a maior proporção desses vasos (8,82%; $p = 0,006$) estava fortemente marcada (escore 3). Nos grupos N-DM e DM, a maior proporção de vasos estava moderadamente marcada (escore 2), respectivamente, 17,65 e 20,59% dos vasos marcados pelo VEGF (Figura 1).

O desenvolvimento fetal e placentário foi influenciado pela MG da gestação, pelos resultados de PI umbilical, pelo percentual de vasos marcados pelo VEGF e pelo número e percentual de núcleos nas células em apoptose, marcados pela CASPASE-3. A MG mantida na gestação foi maior nas gestantes que tiveram RN de pré-termo ($p = 0,0054$) ou com desvios do crescimento fetal (RN-GIG ou RN-PIG; $p = 0,0379$). A MG da gestação também se correlacionou de maneira direta com os dias de internação dos RN ($r = 0,6894$; $p < 0,0003$). O PI umbilical mostrou correlação inversa com o peso placentário ($r = -0,4208$; $p < 0,0257$) e o percentual de vasos marcados pelo VEGF teve correlação direta com o índice ponderal dos RN ($r = 0,3899$; $p < 0,0249$). O número e o percentual de núcleos marcados pela CASPASE-3 mostraram-se diretamente correlacionados com o peso das placentas (respectivamente, $r = 0,4126$ e $p = 0,0138$ e $r = 0,4018$ e $p = 0,0167$). O percentual de núcleos em apoptose também se correlacionou, de maneira direta, com o índice placentário ($r = 0,3785$ e $p = 0,0273$) e, da mesma forma, a intensidade de marcação pela CASPASE-3 contribuiu para a definição dos valores do índice placentário ($r = 0,3783$; $p = 0,0274$). As imunomarcações placentárias pela COX-2 não se correlacionaram com nenhum desses resultados perinatais (Tabela 2).

As condições de oxigenação intrauterinas, e conseqüente resultado perinatal, foram influenciadas pelos resultados de MG da gestação, dos vasos marcados pelo VEGF e pelas células em apoptose, marcadas pela CASPASE-3. Os maiores valores de MG se associaram à maior proporção de RN que necessitaram de fototerapia no período neonatal ($p = 0,0043$). O número ($r = -0,4872$; $p = 0,0054$) e o percentual ($r = -0,5298$; $p = 0,0022$) de vasos marcados pelo VEGF mostraram correlação inversa com os níveis de bilirrubina no cordão umbilical; o número de núcleos marcados pela CASPASE-3 foi

diretamente correlacionado aos valores de Ht ($r = 0,3600$; $p = 0,0336$) e Hb ($r = 0,3735$; $p = 0,0271$) e a intensidade de marcação pela CASPASE-3 mostrou tendência à correlação inversa com os níveis de Hb dos RN ($r = -0,3290$; $p = 0,0536$). Os valores de PI umbilical e das imunomarcações pela COX-2 não se correlacionaram com os resultados perinatais dependentes da oxigenação intrauterina (Tabela 3).

Discussão

MG e resultados perinatais

Neste estudo, quanto maior a MG mantida na gestação, pior foi o prognóstico perinatal. A MG, mantida em níveis inferiores a 110 mg/dl no grupo com HL e mais elevada no grupo de gestantes com DM (113,91 mg/dl), diferenciou os resultados de prematuridade e de adequação do peso dos RN. No grupo de mães portadoras de DM, os RN tiveram maior risco de prematuridade e de desvios do crescimento fetal. Além disso, os RN deste grupo confirmaram risco elevado de morbidade neonatal, indiretamente avaliada pela maior ocorrência de fototerapia e pelo tempo de alta prolongado. Este estudo ratifica a importância de rastrear, diagnosticar e tratar, não só o diabetes gestacional, mas também as formas mais leves de hiperglicemia (Rudge *et al.*, 2000; Rudge *et al.* 2005; Crowther *et al.*, 2005; Landon *et al.*, 2007; HAPO, 2008; IADPSG, 2010).

O feto da gestante diabética é exposto a regime de estresse hipóxico e alterações metabólicas múltiplas (Daskalakis *et al.*, 2008). Vários outros estudos já identificaram a hiperglicemia materna como responsável pelo resultado perinatal adverso (RPNA) (Macintosh *et al.*, 2006; Barnes-Powell, 2007), mas o limite ideal para o controle glicêmico na gestação continua indefinido (HAPO, 2008). Neste estudo, o grupo de gestantes com DM apresentou MG de $113,91 \pm 2,81$ mg/dl associada a uma gama de RPNA. Por outro lado, a MG de $87,97 \pm 4,64$ mg/dl, mantida no grupo de mães HL e semelhante ao grupo N-DM, preveniu o risco perinatal e o prognóstico foi comparável ao de mães não-diabéticas. Isto sinaliza que o controle metabólico ideal para estas gestações seria definido pelos limites de MG materna mantida entre 80 e 110 mg/dl.

Imunomarcações pelo VEGF, PI umbilical e resultados perinatais

Neste estudo, as imunomarcações placentárias pelo VEGF evidenciaram correlação direta com o índice ponderal dos RN e, de maneira indireta, com os níveis de bilirrubina no sangue de cordão.

O VEGF é marcador da proliferação vascular (ADA, 2010; IADPSG, 2010; Desoye & Mouzon, 2007; Rudge *et al.*, 1990), o índice ponderal avalia a proporcionalidade do desenvolvimento/crescimento fetal (Leão Filho & Lira, 2003) e a bilirrubina não-conjugada do cordão umbilical indica as condições de oxigenação intrauterina e o consequente risco de icterícia neonatal (Rudge *et al.*, 2000).

Nas placentas de mães com hiperglicemia leve, mantida abaixo de 110 mg/dl, houve predomínio de vasos fortemente marcados pelo VEGF, o que favoreceu o crescimento fetal, preveniu a hipóxia intra-uterina e, conseqüentemente, a icterícia neonatal. Por outro lado, no grupo de gestantes diabéticas, com MG em torno de 110 mg/dl, a maioria dos vasos estava moderadamente marcada pelo VEGF e se correlacionou ao menor percentual de RN–AIG e ao maior risco de morbidade e de necessidade de fototerapia neonatal. Isto indica relação direta entre proliferação vascular vilositária e prognóstico perinatal, diferenciada pela qualidade do controle glicêmico materno.

A vasculogênese aumentada nas placentas de mães portadoras de hiperglicemia leve deve ter influenciado, também, nos menores valores de PI umbilical, inversamente correlacionados ao peso placentário. Em resposta à hipóxia metabólica do diabetes, ocorreu a proliferação vascular vilositária e o aumento do peso placentário, caracterizando vicariância da placenta para garantir as necessidades do feto em

desenvolvimento. Estes resultados reproduzem o modelo hipóxico-metabólico das gestações complicadas pelo diabetes (Desoye & Mouzon, 2007) e corroboram dados anteriores do nosso grupo, que confirmaram relação inversa da MG materna com a área (ou número) de vasos vilositários vilositários e com o valor de PI umbilical (Calderon *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2010/em publicação).

A acurácia diagnóstica do Doppler da artéria umbilical nas gestações complicadas pelo diabetes ainda é controversa. Alguns autores admitem associação entre aumento da resistência no fluxo da artéria umbilical e RPNA, independentemente do controle metabólico materno (Pietryga *et al.*, 2006). Outros consideram que este exame tem melhor desempenho nos casos de diabetes mal controlado, de longa evolução e com vasculopatia, hipertensão arterial e restrição do crescimento fetal associadas (Maulik *et al.*, 2002). Apesar de indicarem que algumas mulheres pudessem apresentar hipertensão arterial, os índices de PAM não diferenciaram os grupos de mães avaliados neste estudo e os casos de diabetes com vasculopatia (classes D a FRH de Priscila White) representaram apenas 20% das gestantes incluídas no grupo DM. Portanto, estes fatores não tiveram peso importante na definição dos resultados de PI umbilical.

Neste estudo, o menor valor de PI umbilical no grupo de mães com HL, confirmou baixa resistência ao fluxo placentário e condições circulatórias adequadas de oxigenação e nutrição fetal, reforçando a teoria da resposta adaptativa dessas placentas e a capacidade funcional da placenta como órgão de trocas materno e fetal (Desoye & Mouzon, 2007), diretamente dependente da intensidade da hiperglicemia e da hipóxia correspondente no ambiente intrauterino (Calderon *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2010/em publicação).

Imunomarcações pela CASPASE-3 e resultados perinatais

Os resultados das imunomarcações placentárias pela CASPASE-3 mostraram correlação direta com o tamanho da placenta (peso e índice placentário) e com as concentrações de Ht e Hb no cordão umbilical. Nestas condições, quanto maior o número de células trofoblásticas em apoptose, maior o tamanho da placenta e mais elevadas as concentrações de Ht e Hb de cordão.

A apoptose placentária já foi descrita como processo fisiológico nas gestações a termo (Bai *et al.*, 2009; Kumagai *et al.*, 2001; Hus *et al.*, 2000) e considerado patológico nas gestações que cursam com ruptura prematura das membranas (Moore *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2008), pré-eclâmpsia (Allaire *et al.*, 2000) e restrição de crescimento intra-uterino (Huppertz *et al.*, 2001). No diabetes mal controlado, este processo foi relacionado à intensidade da hiperglicemia e à qualidade do controle metabólico materno, resultando em efeitos adversos na organogênese e desenvolvimento da placenta e, conseqüentemente, no crescimento e oxigenação fetal (Björk & Persson, 1984; Taricco *et al.*, 2003; Calderon *et al.*, 2007). Entretanto, o verdadeiro papel da apoptose placentária não está definido nestas gestações.

Considerando os dados deste estudo, a CASPASE-3 foi marcador do desenvolvimento e da maturidade das placentas e, sendo assim, este processo aconteceu de forma fisiológica. Em decorrência, seriam esperados diminuição proporcional dos níveis de Ht e Hb de cordão. Os níveis elevados destes componentes, observados neste estudo, sugerem hipóxia intrauterina, incompatível com a maturidade e o desenvolvimento da placenta. Por outro lado, a intensidade das imunomarcações pela

CASPASE-3 foi diretamente correlacionada às concentrações de Hb de cordão, reforçando a hipótese de apoptose placentária fisiológica no final da gestação.

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que o índice apoptótico foi numericamente proporcional ao quadro materno – maior nas placentas de gestantes diabéticas e de valor intermediário naquelas com hiperglicemia leve, mas esta diferença só foi significativa quando se comparou gestantes diabéticas com não-diabéticas (Sgarbosa *et al.*, 2006). Mais recentemente, outros dados nossos identificaram correlação inversa entre CASPASE-3 e valor de PI umbilical, mas não se correlacionou com os os níveis de MG mantidos na gestação (não publicados). A dinâmica dos eventos de apoptose no desenvolvimento placentário ainda é controversa (Sgarbosa *et al.*, 2006) e estes dados devem ser melhor explorados.

Considerações finais

Os resultados deste estudo evidenciaram influência da MG mantida na gestação sobre os RPNA, relativos à prematuridade, aos desvios do crescimento fetal e à maior ocorrência de morbidade perinatal, caracterizada pela necessidade de fototerapia e pelo tempo de internação dos recém-nascidos. Estes resultados ratificaram a importância da hiperglicemia do meio intra-uterino na gênese da maioria dos efeitos adversos, placentários, fetais e neonatais, nestas gestações complicadas pelo diabetes e pela hiperglicemia leve. Nesse contexto, o ideal seria manter a MG em níveis inferiores a 110 mg/dl.

As correlações com as imunomarcações placentárias mostraram que a proliferação vascular, marcada pelo VEGF, definiu parcialmente os resultados do desenvolvimento placentário e os resultados perinatais decorrentes da hipóxia intrauterina. As imunomarcações pela CASPASE-3 sugeriram apoptose placentária fisiológica no final da gestação, parcialmente comprovada pelos resultados de peso e índice placentário. Entretanto, a correlação inversa entre intensidade de marcação pela CASPASE-3 e níveis de Hb de cordão negou a hipótese da morte celular programada fisiológica e evidenciou potencial hipóxia no ambiente intrauterino. As imunomarcações das células trofoblásticas pela COX-2 não se correlacionaram aos resultados perinatais e a hipótese de envolvimento da via da inflamação não pode ser esclarecida.

Em síntese, a MG no limite de 110 mg/dl foi determinante para o RPNA. A proliferação vascular (VEGF) favoreceu o crescimento fetal e preveniu a hipóxia intrauterina. O PI umbilical e a CASPASE-3 avaliaram o desenvolvimento e a capacidade da placenta em garantir as trocas materno-fetais. Apesar das limitações, estes resultados são, na maioria, inéditos e deverão ser explorados em pesquisas futuras.

Agradecimentos

Agradecimento especial ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu/UNESP, pelo suporte técnico, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (FAPESP / processo nº. 2007-00771-6).

Divulgação de interesse

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse.

Detalhes da aprovação ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEP/FMB), Universidade Estadual Paulista / UNESP, em 05 de novembro de 2007 (termo de aprovação em anexo).

Referências

1. Allaire, AD., Ballenger, KA., Wells, SR., *et al.*, 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 96, 271-276.
 2. American Diabetes Association (ADA). International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy (Consensus Panel), 2010. *Diabetes Care.* 33, 676-682.
 3. Bai, X., Williams, JLR., Greenwood, SL., *et al.*, 2009. A placental protective role for trophoblast-derived TNF- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Placenta.* 30, 855-860.
 4. Barnes-Powell LL., 2007. Infants of diabetic mothers: effects of hyperglycemia on the fetus and neonate. *Neonatal Netw.* 26, 283-290.
 5. Björk, O., Persson, B., 1984. Villous structure in different parts of the cotyledon in placenta of insulin-dependent diabetic women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 63, 37-43.
 6. Berkowitz, GS., Chitkara, U., Rosenberg, J., *et al.*, 1988. Sonographic estimation of fetal weight and Doppler analysis of umbilical artery velocimetry in the prediction of intrauterine growth retardation: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 158: 1149-53.
-

7. Calderon, IMP., Lima, CP., Rudge, MVC., *et al.*, 2000. Relação entre a Classificação Clínica de White e a Histopatologia das Placentas de Gestantes Diabéticas. RBGO. 22, 401-411.
 8. Calderon, IMP., Damasceno, DC., Amorin, RL., *et al.*, 2007. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestacional or overt diabetes. Diab. Res. and Clin. Prac. 78, 65-71.
 9. Calderon, IMP., Silva, SALC., Moreli, JB., *et al.*, 2010. Umbilical arterial Doppler velocimetry and placental morphometric changes in maternal hyperglycemia. (*submitted / anexo 2*).
 10. Cobellis, L., De Falco, M., Torella, M., *et al.*, 2007. Modulation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. In Vivo. 21, 777-83.
 11. Crowther, CA., Hiller, JE., Moss, JR., *et al.*, 2005. Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes. N Engl J Med. 352, 2477-2486.
 12. Cruz-Martinez, R., Figueras, F., 2009. The role of Doppler and placental screening. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 23, 845-855.
 13. Daskalakis, G., Marinopoulos, S., Krielesi, V., *et al.*, 2008. Placental pathology in women with gestational diabetes. Acta obst et Gynecol. 87, 403-407.
-

14. Desoye, G., Myatt, L., 2004. The placenta, in: Reece, E.A., Coustan, D.R., Gabbe, S.G. (Eds.), *Diabetes in Women—Adolescence, Pregnancy, and Menopause*, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 147–157.
 15. Desoye, G., Mouzon, S.H., 2007. The human placenta in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 30, S120-S126.
 16. Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., *et al.*, 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 12, 1063-73.
 17. Giles, W.B., Trudinger, B.J., Baird, P.J., 1985. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *Br J Obstet Gynaecol*. 92, 31-8.
 18. Grissa, O., Yessoufou, A., Mrisak, I., *et al.*, 2010. Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia. *BMC Pregnancy & Childbirth* (<http://www.biomedcentral.com/1471-2393/10/7>), acesso em 11/04/2010.
 19. Hsu, C., Meaddough, E., Basherra, H., *et al.*, 2000. Increased apoptosis in human amnion is associated with labor at term. *AJRI*. 43, 255-258.
 20. Huppertz, B., Rote, N.S., Nelson, D.M., *et al.*, 2001. Apoptosis, molecular and genetic contributions. *Placenta*. 22, S101-103.
-

21. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy (IADPSG) (Consensus Panel). *Diabetes Care*. 2010; 33 (3): 676-682.
 22. Kumagai, K., Otsuki, Y., Ito, Y., *et al.*, 2001. Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Mol Hum Reprod*. 7, 681-689.
 23. Landon, MB., Thom, E., Spong, CY., *et al.*, 2007. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Unit Network Randomized Clinical Trial in Progress. Standard therapy versus no therapy for mild gestational diabetes. *Diabetes Care*. 30, S194-S199.
 24. Leão Filho, JC., Lira, PIC., 2003. Estudo da proporcionalidade corporal de recém-nascidos a termo segundo o Índice Ponderal de Rohrer e grau de retardo de crescimento intra-uterino. *Cad. Saúde Pública*. 19, 1603-1610.
 25. Macintosh, MCM., Fleming, KM., Bailey, JD., *et al.*, 2006. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *BMJ*. 333, 177-182.
 26. Maulik, D., Lysikiewicz, A., Sicuranza, G., 2002. Umbilical arterial Doppler sonography for fetal surveillance in pregnancies complicated by pregestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 12, 417-22.
-

27. Metzger, E., Lowe, LP., Dyer, AR., *et al.*, 2008. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. The HAPO Study Cooperative Research Group. *N Engl J Med.* 358, 1991-2002.
 28. Moore, RM., Silver, RJ., Moore, JJ., 2003. Physiological apoptotic agents have different effects upon human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Placenta.* 24, 173-180.
 29. Pietryga, M., Brazert, J., Wender-Ozegowaska, E., *et al.*, 2006. Placental Doppler velocimetry in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med.* 34, 108-110.
 30. Rudge, MVC., Peraçoli, JC., Berezowski, AT., *et al.*, 1990. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz J Med Biol Res.* 23, 1079 - 1089.
 31. Rudge, MVC., Calderon, IMP., Ramos, MD., *et al.*, 2000. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. *Gynecol Obstet Invest.* 50, 108-112.
 32. Rudge, MV., Calderon, IM., Ramos, MD., *et al.*, 2005. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: Um problema de saúde pública materno e perinatal. *RBGO.* 27, 691-697.
 33. Sgarbosa, F., Barbisan LF., Brasil, MAM., *et al.*, 2006. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diab Res and Clin Prac.* 73, 143-149.
-

34. Shen, Z-Y., Li, E-M., Lu, S-Q., *et al.*, 2008. Autophagic and apoptotic cell death in amniotic epithelial cells. *Placenta*. 29, 956-961.

 35. Taricco, E., Radaelli, T., Nobile, S., *et al.*, 2003. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. *Placenta*. 24, 343-347.
-

Lista de Tabelas e Figuras

- Tabela 1 Características clínicas maternas e resultados perinatais nos grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM)
- Figura 1 Imunomarcações placentárias relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas intensidades fraca (1), moderada (2) e intensa (3) – color HE, 200 \times ; bar: 10 e 20 mm
- Tabela 2 Associações e correlações entre média glicêmica da gestação (MG), valores de PI umbilical e imunomarcações placentárias com os resultados perinatais relacionados ao desenvolvimento fetal e placentário
- Tabela 3 Associações e correlações entre média glicêmica da gestação (MG), valores de PI umbilical e imunomarcações placentárias com os resultados perinatais relacionados às condições de oxigenação intrauterina
-

Tabela 1 – Características clínicas maternas e resultados perinatais nos grupos não-diabético (N-DM), hiperglicemia leve (HL) e diabetes melito (DM)

	N-DM n = 14	HL n = 7	DM n = 20	Valor p
Mães				
MG ⁽¹⁾ inicial (m ± dp)*	74,50 ± 8,61	93,50 ± 13,15	122,80 ± 48,53	0,0000
MG gestação (m ± dp)*	79,60 ± 3,40	87,97 ± 4,64	113,91 ± 2,81	<0,0001
PI umb ⁽²⁾ (m ± dp)*	1,03 ± 0,20	0,89 ± 0,11	1,05 ± 0,20	0,0032
PAM ⁽³⁾ (m ± dp)*	86,67 ± 7,39	90,00 ± 8,70	93,33 ± 9,96	0,395
Recém-nascidos (RN)				
IG ⁽⁴⁾ parto (m ± dp)*	39,03 ± 1,43	39,57 ± 1,42	37,08 ± 0,79	<0,001
Peso RN (m ± dp)*	3372,08 ± 482,47	3522,85 ± 507,68	3646,66 ± 780,01	0,534
Classes RN⁽⁵⁾				
PIG (%)**	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (11,1)	0,328
AIG (%)**	10 (83,3)	5 (71,4)	7 (38,9)	0,040
GIG (%)**	2 (16,7)	2 (28,6)	9 (44,4)	0,273
Hematócrito (m ± dp)*	45,45 ± 7,62	44,90 ± 5,41	47,88 ± 5,27	0,461
Hemoglobina (m ± dp)*	15,93 ± 2,71	15,55 ± 1,52	16,11 ± 1,63	0,852
Bilirrubina (m ± dp)*	2,47 ± 2,35	1,85 ± 0,41	2,18 ± 1,63	0,782
Fototerapia (n / %)**	3 (25,0)	1 (14,3)	9 (50,0)	0,164
DI ⁽⁶⁾ (m ± dp)*	2,41 ± 0,66	2,00 ± 0,00	4,94 ± 3,26	0,005
Placentas				
Peso (m ± dp)*	685,45 ± 189,26	610,71 ± 122,82	748,82 ± 209,31	0,268
IP ⁽⁷⁾ (m ± dp)*	0,20 ± 0,037	0,17 ± 0,019	0,19 ± 0,04	0,207

* ANOVA

** Qui quadrado

(1) Média glicêmica da gestação (mg/dL)

(2) Índice de pulsatilidade da artéria umbilical

(3) Pressão arterial média (mmHg)

(4) Idade gestacional no parto (semanas)

(5) Peso pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional

(6) Dias de internação

(7) Índice placentário (Peso placenta/peso fetal)

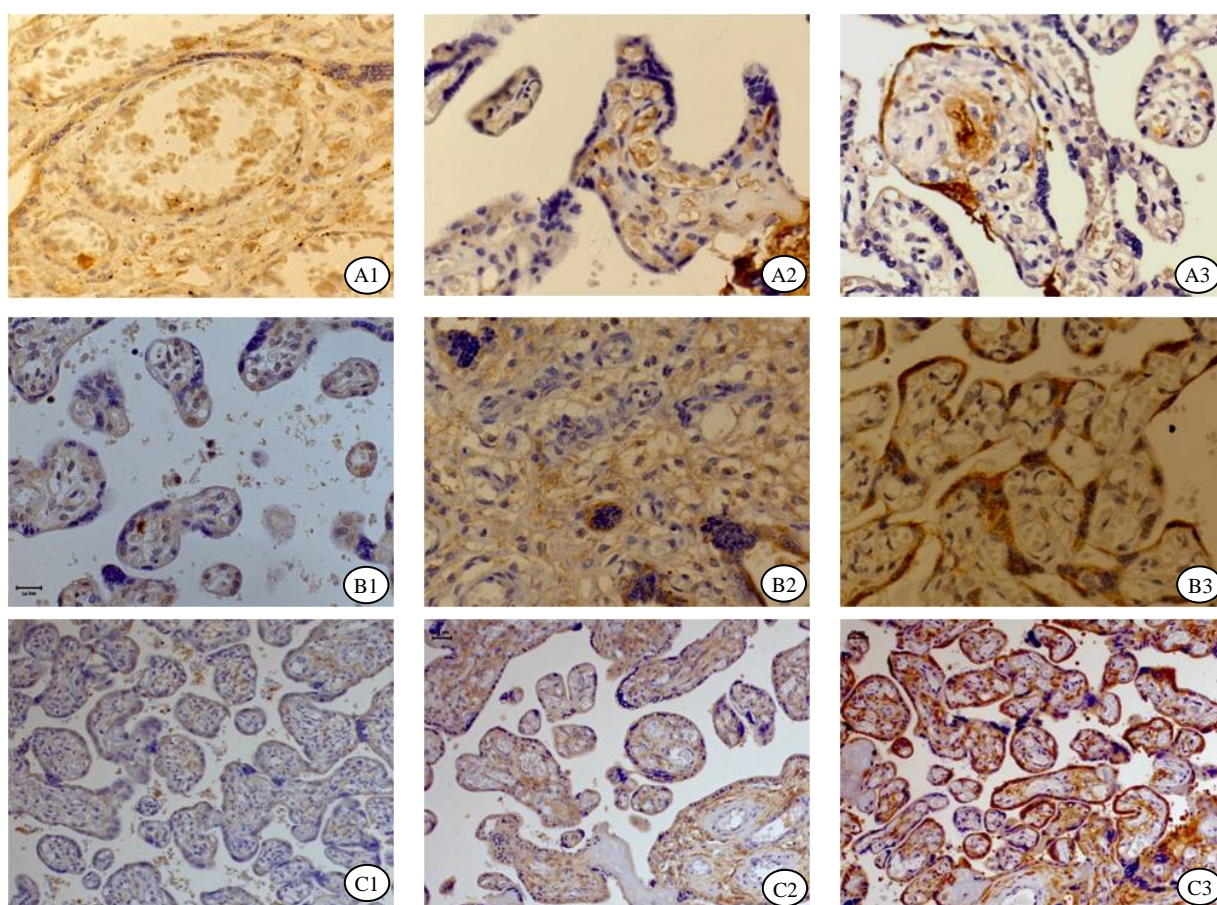


Figura 1 – Imunomarcações placentárias relativas a VEGF (A), COX-2 (B) e CASPASE-3 (C) nas intensidades fraca (1), moderada (2) e intensa (3) – color HE, 200 \times ; bar: 10 e 20 mm

Tabela 2 – Associações e correlações entre média glicêmica da gestação (MG), valores de PI umbilical e imunomarcações placentárias com os resultados perinatais relacionados ao desenvolvimento fetal e placentário

	IG Parto	Classes RN	Índice ponderal	Dias internação	Peso placentário	Índice placentário
	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
MG	0,0054 ⁽¹⁾	0,0379 ⁽²⁾	0,1121	<0,0003 ⁽³⁾	0,3018	0,9346
PI	0,7623	0,5443	0,2908	0,6327	0,0257 ⁽⁴⁾	0,1343
VEGF						
No. vasos	0,9817	0,8556	0,3288	0,5016	0,4616	0,9598
% vasos	0,9162	0,6687	0,0249 ⁽⁵⁾	0,5040	0,1714	0,7851
Intensidade	0,8482	0,4268	0,7842	0,9295	0,1348	0,3479
CASPASE-3						
No. núcleos	0,8076	0,2157	0,2987	0,9938	0,0138 ⁽⁶⁾	0,0801
% núcleos	0,6366	0,1250	0,3678	0,9279	0,0167 ⁽⁷⁾	0,0273 ⁽⁸⁾
Intensidade	0,5216	0,0725	0,9248	0,2883	0,1700	0,0274 ⁽⁹⁾
COX-2						
% marcação	0,9831	0,5458	0,3268	0,8673	0,2304	0,3752
Intensidade	0,4818	0,8254	0,7278	0,5558	0,8860	0,7880

(1) MG: Pré-termo > Termo / GLM analysis

(2) MG: AIG < GIG; AIG < PIG / GLM analysis

(3) MG / Dias internação: $r = 0,6894$ / Spearman

(4) PI / Peso placentário: $r = -0,4208$ / Spearman

(5) VEGF (% vasos marcados) / Índice ponderal RN: $r = 0,3899$ / Spearman

(6) CASPASE-3 (número núcleos marcados) / Peso placentário: $r = 0,4126$ / Spearman

(7) CASPASE-3 (% núcleos marcados) / Peso placentário: $r = 0,4018$ / Spearman

(8) CASPASE-3 (% núcleos marcados) / Índice placentário: $r = 0,3785$ / Spearman

(9) CASPASE-3 (intensidade de marcação) / Índice placentário: $r = 0,3783$ / Spearman

Tabela 3 – Associações e correlações entre média glicêmica da gestação (MG), valores de PI umbilical e imunomarcações placentárias com os resultados perinatais relacionados às condições de oxigenação intrauterina

	Apgar 1	Apgar 5	Ht	Hb	Bilirrubina	Fototerapia
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
MG	0,8209	0,5117	0,1058	0,2685	0,4399	0,0043 ⁽¹⁾
PI	0,9484	0,1552	0,8904	0,6929	0,2210	0,1935
VEGF						
No. vasos	0,9244	0,8477	0,8482	0,8559	0,0054 ⁽²⁾	0,3859
% vasos	0,5620	0,9886	0,8682	0,5138	0,0022 ⁽³⁾	0,5171
Intensidade	0,2733	0,7674	0,5475	0,6890	0,6076	0,6777
CASPASE-3						
No. núcleos	0,9989	0,2439	0,0336 ⁽⁴⁾	0,0271 ⁽⁵⁾	0,5926	0,2174
% núcleos	0,4054	0,5486	0,1336	0,0845	0,5120	0,1234
Intensidade	0,0605	0,7674	0,0780	0,0536 ⁽⁶⁾	0,1427	0,2393
COX-2						
% marcação	0,1139	0,7850	0,0678	0,0919	0,9290	0,3212
Intensidade	0,1652	0,8285	0,2662	0,3192	0,0965	0,4083

(1) MG: Fototerapia > sem Fototerapia / GLM analysis

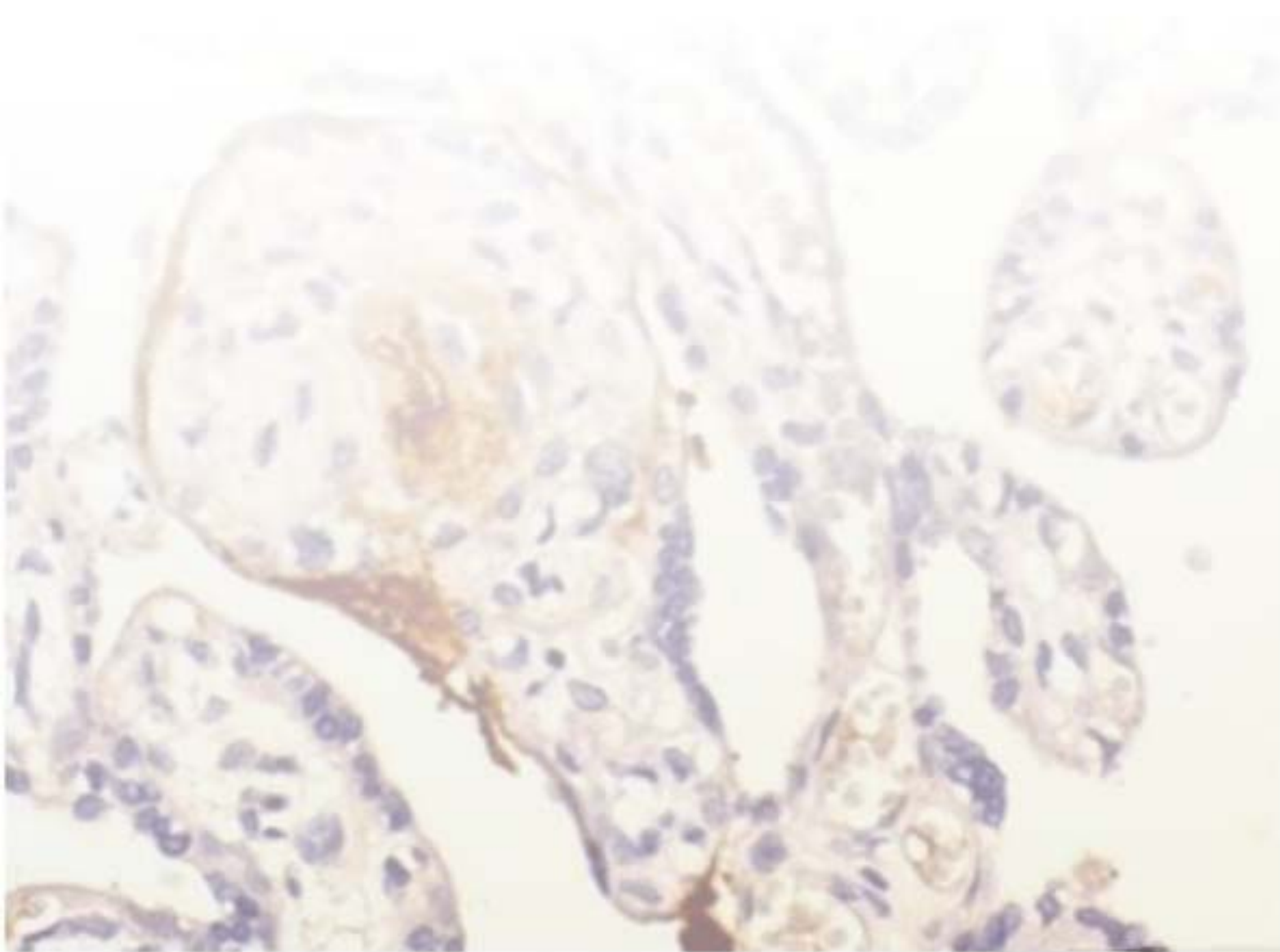
(2) VEGF (número vasos marcados) / Bilirrubina: $r = -0,4872$ / Pearson

(3) VEGF (% vasos marcados) / Bilirrubina: $r = -0,5298$ / Pearson

(4) CASPASE-3 (número núcleos marcados) / Hematócrito (Ht): $r = 0,3600$ / Spearman

(5) CASPASE-3 (número núcleos marcados) / Hemoglobina (Hb): $r = 0,3735$ / Spearman

(6) CASPASE-3 (intensidade de marcação) / Hemoglobina (Hb): $r = -0,3290$ (tendência) / Spearman



Anexos

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de novembro de 2.007

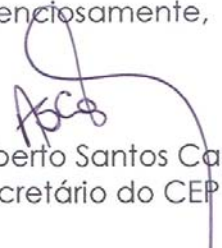
OF. 462/2007-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Profª Iracema,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que nesta data (05/11/2007) foi ratificada a aprovação do projeto de Vossa Senhoria enviado à FAPESP para aprovação de financiamento intitulado "Dopplervelocimetria da artéria umbilical como marcador de alterações imunológicas placentárias e de risco de morte perinatal em gestação complicadas por diabetes e hiperglicemia diária" após o reconhecimento de que este projeto é parte integrante do sub-projeto inicial, intitulado "Alterações morfométricas de vilosidades e vasos placentários associados à dopplervelocimetria da artéria umbilical na oxigenação e nutrição fetais em gestantes portadoras de diabetes ou de hiperglicemia diária (Grupo IB)", já aprovado por este CEP aos 8 de novembro de 2004.

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo 2 - Submitted to BJOG.

Umbilical Arterial Doppler Velocimetry and Placental Morphometric Changes in Maternal Hyperglycemia

“Doppler velocimetry and placental changes in hyperglycemia”

Iracema Mattos Paranhos Calderon^{a,b}; Simone Angélica Leite de Carvalho^b; Jusciele Brogin Moreli^b; Marcos Consonni^a; Maria Aparecida Mourão Brasil^c and Marilza Vieira Cunha Rudge^{a,b}

^a Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University / Brazil

^b Post-graduate Programm in Gynecology, Obstetrics and Mastology, Botucatu Medical School / Sao Paulo State University / Brazil

^c Research Support Center, Botucatu Medical School / Sao Paulo State University / Brazil

Corresponding author at: Iracema MP Calderon

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; Faculdade de Medicina de Botucatu / Unesp

Distrito de Rubião Jr. s/n; CEP – 18618-000 / Botucatu – SP / Brasil

E-mail: calderon@fmb.unesp.br

Keywords: diabetes, hyperglycemia, umbilical arterial Doppler velocimetry, placental villous, morphometric study.

Word count of the text – 3567 words

Synopsis – The maternal hyperglycemia of varied intensity correlates with placental morphometric changes that influence normal or altered umbilical PI values and resistance in uteroplacental flow.

Abstract

Objective: to compare umbilical arterial Doppler velocimetry with placental morphometric characteristics in pregnant women with or without hyperglycemia. **Design:** a transversal study. **Population and setting:** Pregnant women (n = 134) with gestational age \geq 34 weeks. **Methods:** Subjects underwent Doppler velocimetry within 10 days of delivery; they were classified into: G1 normal glycemia and PI (n = 26), G2 hyperglycemia with normal PI (n = 102), and G3 hyperglycemia with altered PI (n = 15). Placental samples underwent randomized morphometric analysis using an image analyzer. **Main outcome measures:** Villous areas, number and their respective vessels were compared. Statistical analysis was by analysis of variance, and stepwise, with $p \leq 0.05$. **Results:** The average maternal glycemia levels were 85.8, 103.0, 116.8mg/dL for G1, G2, and G3 respectively. G2 placentas had a higher number of smaller terminal villi than G1 but the villous area was similar. The high number of small villous vessels defined a smaller vascular area and lower capillarization index in this group. Terminal villi and their respective vessel characteristics in G3 were similar to G1. **Conclusion:** Maternal hyperglycemia of varied intensity correlates with placental morphometric changes that influence normal or altered umbilical PI values and resistance in uteroplacental flow.

Keywords – diabetes, hyperglycemia, umbilical arterial Doppler velocimetry, placental villous, morphometric study.

Introduction

That the use of Doppler velocimetry in high risk pregnancies results in reduction of the perinatal death index, the need to induce birth, and the number of hospitalizations.⁽¹⁾ The Cochrane Library has concluded that this examination is a good obstetric tool and reduces the risk of perinatal death risk.⁽²⁾

Umbilical artery Doppler velocimetry evaluates blood flow resistance in the fetoplacental unit and predicts perinatal prognosis.^(3, 4) Earlier works have reported morphological differences in umbilical artery pulsatile waveforms in both ordinary and pathological pregnancies. These observations have been confirmed in subsequent studies, and specific methods for quantifying blood flow velocity in the maternal-fetal exchange surface have appeared. The most common are the systolic/diastolic ratio (S/D ratio), pulsatility index (PI), and the Pourcelot resistance index (RI). Reference values have been standardized for different gestational age ranges.^(3, 5-7)

There is no doubt in literature that umbilical arterial Doppler velocimetry has high specificity and positive predictive value for diagnosing intra-uterine growth restriction (IUGR) and perinatal hypoxia.^(8, 9)

The diagnostic accuracy of umbilical arterial Doppler velocimetry has not been defined in diabetes complicated pregnancies. Several researchers compared the umbilical S/D ratio with cardiotocography at rest (CTG) and fetal biophysical profile (BBP) in 207 diabetes complicated pregnancies. CTG with a non-reactive fetus (RR=1.7; 95%CI = 1.2 – 2.5) and an umbilical artery S/D ratio >3 (RR=2.6; 95%CI = 1.9 – 3.5) were correlated with adverse perinatal outcome.⁽¹⁰⁾ These authors considered umbilical arterial Doppler velocimetry better than CTG in identifying adverse perinatal

outcome. However, high specificity indexes (92.0%) and negative predictive values (86.0%) qualify S/D ratio as a good predictor of a healthy fetus, comparing well with the most common biophysical tests for fetal health evaluation.⁽¹¹⁾ However, these results remain controversial.⁽¹²⁾

There is much controversy between umbilical arterial Doppler velocimetry evaluations and the quality of maternal glycemic control. Altered S/D ratio and glycemia levels over 120mg/dl have resulted in a higher rate of fetal death and neonatal morbidity.⁽¹³⁾ According to these authors, a normal result could help decide whether or not to wait for a spontaneous birth. Other studies report increased S/D values and worse perinatal prognosis without interference from glycosylated hemoglobin levels (HbA_{1C}) in the third trimester of pregnancy.^(14, 15) Some researchers consider that umbilical arterial Doppler velocimetry would have benefit in a prolonged evolution of diabetes, associated with vasculopathy, arterial hypertension, and IUGR, independent of glycemia levels.⁽¹⁴⁾ In the absence of arterial hypertension, an altered PI showed an increased placental vascular resistance and was related to a higher risk of fetal and neonatal complications. This reinforces the need for rigorous control of maternal glycemia and an adequate fetal welfare evaluation in these types of pregnancy.^(15, 16)

The relationship between placental morphological alterations, abnormal umbilical arterial Doppler velocimetry and the worst perinatal prognosis became the physiological basis for biophysical tests of fetal vitality.⁽¹⁷⁾ In at risk gestations, the maternal-fetal exchange surface is larger, but the villi have few branches and vessels. The placenta cannot sufficiently oxygenate and nourish the fetus causing hypoxia and IUGR.⁽⁴⁾

A classic study has shown a reduction in placental villous vessels in pregnancies with IUGR and altered umbilical artery S/D ratios, characterized similar to the obstructive model of placental insufficiency. The authors considered that these alterations in the vascular bed, compatible with placental insufficiency, IUGR and hypoxia, could be identified during prenatal care by measuring increased umbilical arterial flow resistance.⁽¹⁸⁾ Twin and diabetes-associated gestations were excluded from this study and few other studies have shown a specific interest in diabetes, pregnancy, and the placental metabolic insufficiency model.

There is little in the literature comparing umbilical arterial Doppler velocimetry and placental microvascular alterations in diabetes-complicated pregnancies. Abnormal ultrasonography has shown that vascular obstruction in placental villi occurred more frequently in women with more advanced diabetes. In gestational diabetes, reduced nitric oxide synthesis and villous vessel activity was observed, suggesting placental tissue hypoxia.^(19, 20)

Excessive glucose accumulation in the intrauterine environment, facilitated by specific receptors in the placental membrane, prejudices placenta formation and development, and consequently fetal growth and oxygenation.^(21, 22) These placentas weigh more, are functional immature, and have increased glycogen stock and impaired maternal-fetal exchanges.⁽²³⁾ Therefore, maternal hyperglycemia, characteristic of gestations associated with diabetes, must be investigated, diagnosed, and controlled during prenatal care.⁽²⁴⁾

Glucose overload tests, GTT100g and GTT75g, identify women who have gestational or clinical diabetes. The glycemia profile also identifies another specific group of pregnant women, characterized by mild hyperglycemia.^(25, 26) This group

makes up 13.0% of pregnant women tested to confirm diabetes, with a similar macrosomia index to that of children of diabetic mothers, and a tenfold higher risk of perinatal death than the general population. Because of these adverse results, this group was included in the maternal hyperglycemia control protocol.⁽²⁴⁾

According to the American Diabetes Association (ADA)⁽²⁷⁾, gestational diabetes mellitus occurs when two abnormal values are observed in the 100-g or 75-g oral glucose tolerance tests (OGTT). The Glucose Profile test (GP) is generally used to evaluate the quality of diabetes treatment, with fasting plasma glucose levels $> 90\text{mg/dL}$ and/or 2-h postprandial plasma glucose $>130\text{mg/dL}$.^(24, 26) A study in Brazil⁽²⁶⁾ using the National Diabetes Data Group criteria to assess for diabetes and Gillmer's threshold values to establish GP⁽²⁵⁾, unexpectedly, instead of two (normal and diabetic), found four groups of pregnant women: IA = normal OGTT + normal GP; IB = normal OGTT + abnormal GP; IIA = abnormal OGTT + normal GP; IIB = abnormal OGTT + abnormal GP.

According to the ADA's criteria, groups IIA and IIB are diabetic while group IB is not because the OGTT is normal. However, Rudge et al.⁽²⁴⁾ demonstrated that in groups IB, IIA and IIB the risk for macrosomia was statistically similar and the perinatal mortality rate was 10-fold higher than in group IA (non-diabetic). Thus, they concluded that the adverse perinatal outcomes observed were due to hyperglycemia, which was present in the IB group, but under diagnosed by OGTT. Since then, normal OGTT and abnormal GP became the criteria used to diagnose mild hyperglycemia (IB group) and determined the treatment of these patients in the Pregnancy and Diabetes Service of Botucatu Medical School – São Paulo State University.

Perinatal outcome in pregnancies complicated by diabetes or mild hyperglycemia depends on the quality of maternal glycemia control, fetal welfare and development evaluation, and the care given to newborns in specialized neonatal units. These pre-requisites have been well developed in recent decades, and have changed the prognosis in children of mothers with diabetes and daily hyperglycemia. However, there are not enough studies in the literature to confirm the effectiveness of umbilical arterial Doppler velocimetry, specifically related to placenta vascular bed changes in these risky pregnancies.

The objective of this study was to compare morphometric evaluations of terminal villi and placental villous vessels with the umbilical artery pulsatility index (PI) in gestations with maternal hyperglycemia diagnosed by TTG100g ⁽²⁷⁾ or glycemic profile. ^(25, 26)

Method

Study design

A transverse study was performed to evaluate the area and number of terminal villi and villous vessels in placentas of women with hyperglycemia, of any etiology, associated with umbilical arterial Doppler velocimetry. The pregnant women attended the Diabetes and Pregnancy Service, of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Brazil.

Subjects

This study included 117 pregnant women diagnosed with hyperglycemia, confirmed by GTT100g⁽²⁷⁾ and/or glycemia profile⁽²⁴⁻²⁶⁾, and normal or altered umbilical artery PI.⁽⁷⁾ Another 26 pregnant women without hyperglycemia and with normal umbilical artery PI were used as controls. All 143 pregnant women underwent Doppler velocimetry within 10 days of birth⁽¹⁸⁾ and at a minimum gestational age of 34 weeks. Three experimental groups were formed based on the results: G1 normoglycemia/normal PI (n = 26), G2 hyperglycemia/normal PI (n = 102), and G3 hyperglycemia/altered PI (n = 15). All women were seen at the Service and, independent of the diagnostic test results, those with hyperglycemia were included in the treatment protocol to control maternal glycemia.⁽²⁴⁾

The control variables were presence (yes) or absence (no) of smoking and arterial hypertension⁽²⁸⁾ and glycemic mean (GM) in pregnancy, characterized as lower than or higher than 120mg/dl. GM was evaluated by the arithmetic average of all

plasmatic glycemia dosages observed in the glycemia profiles obtained during pregnancy and classified as adequate ($GM < 120\text{mg/dl}$) or inadequate ($GM \geq 120\text{mg/dl}$).⁽²⁴⁾

Umbilical arterial Doppler velocimetry

Patients were examined at the Fetal Medicine Unit by ultrasonography with colored pulsatile Doppler, with 5.0MHz transducer and 50Hz filter. Umbilical artery PI was evaluated using the Campbell et al.⁽²⁹⁾ modified technique. Sonograms, of at least four umbilical artery cycles were obtained at the free segment of the umbilical cord, in the absence of fetus respiratory and corporeal movements and analyzed in real time. Results were considered normal or altered according to gestational age and standard reference values. All examinations were performed immediately after breakfast and, despite successive evaluations in each pregnant women, the last PI, within 10 days of birth, was selected for analysis.

Placental morphometry

Samples of placental tissue were collected from the afterbirth in transversal cuts from the fetal side (chorionic epithelium) to maternal side (decidual epithelium), with a 2cm minimum margin from the umbilical cord insertion and the placental border.⁽³⁰⁾ Samples were kept in 10% formaldehyde solution for 24 to 48 hours and fixed in paraffin blocks. A total of 60 blocks were numbered and 31 were randomly selected for morphometric study.⁽¹⁸⁾ These blocks were longitudinally sectioned into thin cuts,

mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin. Two slides from each block were used to obtain the morphometric characteristics of terminal villi and villous vessels: 10 slides from 5 placentas of the normoglycemia/normal PI group, 32 slides from 16 placentas of hyperglycemia/normal PI group, and 20 slides from 10 placentas of the hyperglycemia/altered PI group.

Morphometric analysis was blinded, and performed by a single researcher, using computer image analysis software and images from a digital camera connected to a photomicroscope. Slides were previously examined at 400X to identify the intermediate zone⁽³⁰⁾ and five areas per slide were chosen avoiding infarcted areas, fibrin deposit, first-order villous trunks, anchor villi, and histological artifacts⁽¹⁸⁾. Fifty areas of normoglycemia/normal PI, 160 of hyperglycemia/normal PI, and 100 of hyperglycemia/altered PI were evaluated, corresponding to 310 fields from 31 placentas. Group comparisons were by terminal villi, and respective villous vessels which were entirely in the microscopic field at 200X, with corresponding area of 293992.0 μm^2 .

Total and average area were evaluated in square micrometer (μm^2), and the number of terminal villi and their respective villous vessels were counted⁽¹⁸⁾. Terminal villi and villous vessel total area corresponded to the sum of the area of all villi and vessels measured in the field of view. Terminal villi and villous vessel average area was calculated by the relationship between total area and the respective number of villi or vessels in the field (Figure 1). The relationship between total area of villous vessels and terminal villi (vascular total area/villous total area) defined the villous capillary index⁽³¹⁾, expressed as a percentage.

Statistical analysis

Distribution in the groups was evaluated by the Chi-Square and Fisher Exact tests. Comparisons between means were by analysis of variance (F test) followed by Student-Newman-Keuls test. When required, data were transformed into $\log\chi$ ou $\chi^{1/2}$ to establish the normal distribution. The multiple regression coefficient R^2 was used to evaluate the relationship of PI values in umbilical arteries due to mean maternal glycemia and morphometric variables in villi and placental vessels. A 95% minimum significance limit ($p \leq 0.05$) was considered in all cases.

Results

The average gestational age at birth was 37.2 ± 1.5 weeks in the normoglycemia/normal PI group, 37.2 ± 1.4 in the hyperglycemia/normal PI group, and 37.0 ± 1.2 weeks in the hyperglycemia/altered PI group.

Group distributions were similar for smoking ($p=0.550$) and arterial hypertension ($p=0.290$). All woman in the normoglycemia/normal PI group had a glycemic mean below 120mg/dL ($GM<120\text{mg/dL}$). In the hyperglycemia groups, 77.4% with normal PI, and 66.7% with altered PI had a $GM\geq 120\text{mg/dL}$ (Table 1).

Pregnancy glycemia averages were statistically different between groups ($p=0.0000$); the normoglycemia/normal PI group had a $GM=85.8\text{mg/dL}$. Higher levels were seen in the hyperglycemia groups proportional to fetoplacental circulation PI values; in the hyperglycemia/normal PI group $GM=103.0\text{mg/dL}$, and in the hyperglycemia/altered PI $GM=116.8\text{mg/dL}$ (Table 2).

Average and SD values of umbilical artery PI are shown in Figure 2; in the normoglycemia/normal PI group $PI=0.91\pm 0.10$; in the hyperglycemia/normal PI group, $PI=0.90\pm 0.16$, and in the hyperglycemia/altered PI group, $PI=1.29\pm 0.16$.

Placentas from the hyperglycemia/normal PI group had a total terminal villi area equivalent to the other groups ($p>0.05$), and were characterized by the smallest average area ($9793.9\mu\text{m}^2$) and higher number of terminal villi ($p<0.05$) (Table 2; Figure 3 – C, D). In these placentas villous vessels presented the smallest areas, the smallest total area ($11794.6\mu\text{m}^2$) and the smallest average area ($366.5\mu\text{m}^2$), the highest number (36.9) and the lowest capillarity index (18.8%) (Table 3; Figure 3 – C, D).

Placenta morphometric characteristics from the hyperglycemia/altered PI group were statistically similar to the normoglycemia/normal PI group ($p>0.05$). Total and average area and number of terminal villi or villous vessels, and capillarity index did not differ between these two groups (Tables 2 and 3; Figure 3 – A, B, E, F).

The significant results from the multiple regression analysis are shown in Table 4. In the normoglycemia/normal PI group, R^2 showed that the umbilical artery PI varied directly with the capillarity index and GM, and indirectly with the number of villi, reaching a maximum R^2 value of 0.63 ($p=0.007$). In the hyperglycemia groups, the umbilical artery PI index had a direct relationship with GM and total villous vessel area and an indirect relationship with the number of vessels; maximum R^2 was 0.32 ($p=0.000$).

Discussion

In pregnant women with a hyperglycemia level of $103\pm 8.5\text{mg/dL}$, a normal PI was related to placental villi and villous vessels which were smaller and higher in number, and with a total villi area similar in size to the normoglycemia/normal PI group. Despite the total and average vascular area, and capillarity index being inferior to the normoglycemia/normal PI group, the increased number of villous vessels assured less resistance to placental blood flow; the ideal condition for fetal oxygenation.

In placentas of women with a higher hyperglycemia levels, corresponding to $116.8\pm 18.9\text{mg/dL}$, terminal villi and villous vessel size and number was comparable with the normoglycemia/normal PI group and consequently had the same values for total and average area, and capillarity index. These maternal-fetal exchange surface characteristics, despite being similar to the normoglycemia and normal PI group, resulted in more resistance to placental blood flow, a risk condition for fetal hypoxia.

Morphometric results from the hyperglycemia/normal PI group showed that slightly elevated hyperglycemia stimulates placental angiogenesis, which is responsible for this group's normal umbilical artery PI value. According to Nakatsu et al.⁽³²⁾ proliferation in a hypoxia situation is stimulated by endothelial (VEGF) and placental (PIGF) growth factors with proven angiogenic potential. The interaction between maternal hyperglycemia, intrauterine hypoxia, and consequent vascular proliferation would theoretically be demonstrated, permitting a conclusion of clinical interest in obstetrics. Normal PI values in the umbilical artery, associated with ideal maternal glycemia control, permit pregnancy continuity and spontaneous birth. In these cases, the risk of perinatal hypoxia must be minimum^(10, 11, 13), despite the favorable condition for fetal macrosomia.

However, morphometric results in the hyperglycemia/altered PI group do not confirm increased numbers of villous vessels. The placenta with the same maternal-fetal exchange surface characteristics as the normoglycemia/normal PI group and the same level of development was unable to respond to the need for vascular proliferation under hypoxia conditions. In more advanced intrauterine hyperglycemia, this apparent anatomical normality was neither adequate for placenta functional capacity nor did it prevent the adverse effects of perinatal hypoxia. In diabetes, the functionally capable placenta must have sufficient villi and villous vessel proliferation to compensate for their smaller size. Consequently, the umbilical artery PI had a more elevated value.

Multiple regression analysis confirmed umbilical artery PI dependency on maternal glycemia levels and placental vascular changes. The higher the hyperglycemia level, the lower the placental response ability to adaptation in the villous vascular bed. As a result, there is a higher flow resistance in the uterine-placental region and a higher risk of hypoxia and IUGR. These have previously been reported in pregnancies complicated by diabetes.^(21, 22)

Reduced numbers of placental villous vessels were seen in pregnancies with IUGR and altered Doppler velocimetry, characterizing the obstructive model of placental insufficiency.⁽¹⁸⁾ In this classic study, the authors did not include diabetes-complicated pregnancies, therefore they could not observe the antagonistic effect of hypoxia, stimulating or inhibiting angiogenesis. They also did not reproduce the metabolic placental insufficiency model.

In this metabolic model, angiogenesis is stimulated by less stressed hypoxia levels as a result of slightly elevated intrauterine hyperglycemia. However, more severe

hypoxia, supported by higher glycemia levels, results in an inhibited placental vascular response, blood flow resistance, and altered umbilical artery PI.

Factors which contribute to this are oxidative stress resulting from decreased nitric acid synthesis⁽²⁰⁾, vasoconstriction by predominantly tromboxane production⁽³³⁾, the larger blood diffusion distance, the thickness of the trophoblastic layer, and placental immaturity, directly related to maternal hyperglycemia levels.^(23, 31-34) Such conditions favor intrauterine hypoxia and can influence placental capacity to promote angiogenesis. The final result would be a higher flow resistance, confirmed by elevated umbilical artery PI levels, and the consequent risk of hypoxia and IUGR, which have been reported as adverse effects in children of diabetic mothers.^(15, 35)

In the restrictive placental insufficiency model, a poor maternal circulatory adaptation with remarkable vasoconstriction, vascular obstruction, and placental infarct causes severe hypoxia which is responsible for placental vascular proliferation.⁽¹⁸⁾ These classic findings along with those seen in this study suggest angiogenesis damage in terminal villi with more serious hypoxia, independent of pathology.

The literature is very confusing when characterizing the placenta vascular bed in most obstetric complications. As for diabetes, increase, decrease, and maintenance of vessel number with pathology have been described^(31, 36). As for IUGR, the placenta presented villi with few branches and deficient vascularization⁽⁴⁾, which confirms the smaller number of vessels and increased resistance to previously observed uterine-placental flow.^(1, 18) In risky gestations, defined by chronic arterial hypertension and pre-eclampsia sometimes in association with IUGR, diabetes and premature birth, there are reports of less vessels in terminal villi.⁽³⁷⁾ Non-differentiation of intrauterine hypoxia

intensity, responsible for stimulating or inhibiting placental angiogenesis, could explain these controversial results.

The results of umbilical artery Doppler velocimetry, analyzed separately from placental changes, also conflict in the literature. Most have recognized a direct relationship with the worst perinatal prognosis, but have not confirmed dependency with levels of plasmatic glycemia or glycosylated hemoglobin. Others have considered the association between diabetes, vasculopathy, and arterial hypertension to explain the increased resistance to placental flow, identified by altered examination indices.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

In this study, arterial hypertension and smoking, usual prejudicial vascular factors, were uniformly distributed between groups and, in the placental morphometric study, all pregnant women from classes D to FRH had normal PI. Thus, the effects of maternal hyperglycemia, of varying origin and intensity, differentiated intrauterine hypoxia levels and placental morphometric characteristics, defining the normal or altered umbilical artery PI results. In other words, adequate maternal glycemia control assured low placental flow resistance favoring fetal oxygenation. Inadequate maternal glycemia control was associated with increased placental vascular resistance and a higher risk of fetal hypoxia.

In other studies, Mayhew et al., were not able to relate placental villi vascularization to intrauterine hypoxia and concluded that in diabetes this condition is mainly due to metabolism.^(31, 36, 38) On the other hand, Nicolaides' review showed acidemia, not necessarily associated with hypoxia in gestations complicated by maternal diabetes.⁽³⁹⁾

Our results confirmed that the metabolic etiology of increased placental flow resistance and the consequent harm to fetal oxygenation from varied intensity hypoxia was directly dependent on the quality of maternal metabolic control.

From a practical point of view, adequate maternal metabolic control and normal PI in the umbilical artery allay the obstetrician's concerns. However altered umbilical artery PI associated with inadequate maternal metabolic control, must be considered and interpreted as a sign of placental insufficiency. Perinatal morbidity-mortality⁽²⁴⁾, reactive fetus in basal cardiotocography⁽⁴⁰⁾ and normal umbilical arterial Doppler velocimetry^(11, 16) reinforce these correlations when maternal glycemia is normal.

Conclusion

The effects of maternal hyperglycemia, of varying origin and intensity, differentiated intrauterine hypoxia levels and placental morphometric characteristics, defining the normal or altered umbilical artery PI results. This investigation should be continued, following up on these initial observations. Morphometry of the distance between villous vessels and the maternal-fetal exchange surface (blood diffusion distance), the villous capillarities and the glycogen deposit diameter associated with umbilical cord pH at birth, and the comparison of umbilical artery Doppler velocimetry and fetal cerebral circulation could help confirm intrauterine hypoxia, and to define the role of placental morphometric changes, under different intensity maternal hyperglycemia.

Acknowledgement

Special thanks to the Research Support Center, Botucatu Medical School / Sao Paulo State University / Brazil, for their technical support.

Disclosure of Interests

The authors declare that they have no conflicts on interest.

Contribution to Authorship

IMPC: conception, design of the study, acquisition of data, analysis, drafting of manuscript and final version. MC: doppler analysis and contribution to the manuscript. SALC and JBM: laboratory analysis and contribution to the manuscript. MAMB: statistical analysis and contribution to the manuscript. MVCR: substantial contribution to conception, design, and drafting of manuscript.

Details of Ethics Approval

This study was approved by the University Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Brazil.

Funding

This study was funded by Foundation of Support to Research of the Sao Paulo (FAPESP), Brazil, grant 2007/00771-6.

References

1. Fok RY, Pavlova Z, Benirschke K, Paul RH, Platt LD. The correlation of arterial lesions with umbilical artery Doppler velocimetry in the placentas of small-for-dates pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1990 Apr;75(4):578-83.
 2. Neilson JP, Alfirevic Z. Doppler ultrasound for fetal assessment in high risk pregnancies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(2):CD000073.
 3. Trudinger BJ, Giles WB, Cook CM, Bombardieri J, Collins L. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: clinical significance. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985 Jan;92(1):23-30.
 4. Divon MY, Ferber A. Doppler evaluation of the fetus. *Clin Obstet Gynecol.* 2002 Dec;45(4):1015-25.
 5. Thompson RS, Trudinger BJ, Cook CM. Doppler ultrasound waveforms in the fetal umbilical artery: quantitative analysis technique. *Ultrasound Med Biol.* 1985 Sep-Oct;11(5):707-18.
 6. Thompson RS, Trudinger BJ, Cook CM. A comparison of Doppler ultrasound waveform indices in the umbilical artery--II. Indices derived from the mean velocity and first moment waveforms. *Ultrasound Med Biol.* 1986 Nov;12(11):845-54.
 7. Thompson RS, Trudinger BJ, Cook CM, Giles WB. Umbilical artery velocity waveforms: normal reference values for A/B ratio and Pourcelot ratio. *Br J Obstet Gynaecol.* 1988 Jun;95(6):589-91.
-

8. Divon MY, Guidetti DA, Braverman JJ, Oberlander E, Langer O, Merkatz IR. Intrauterine growth retardation--a prospective study of the diagnostic value of real-time sonography combined with umbilical artery flow velocimetry. *Obstet Gynecol.* 1988 Oct;72(4):611-4.
 9. Baschat AA, Weiner CP. Umbilical artery doppler screening for detection of the small fetus in need of antepartum surveillance. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Jan;182(1 Pt 1):154-8.
 10. Bracero LA, Figueroa R, Byrne DW, Han HJ. Comparison of umbilical Doppler velocimetry, nonstress testing, and biophysical profile in pregnancies complicated by diabetes. *J Ultrasound Med.* 1996 Apr;15(4):301-8.
 11. Ben-Ami M, Battino S, Geslevich Y, Shalev E. A random single Doppler study of the umbilical artery in the evaluation of pregnancies complicated by diabetes. *Am J Perinatol.* 1995 Nov;12(6):437-8.
 12. Tan A, Norizah W, Rahman H, Aziz B, Cheah F. Umbilical artery resistance index in diabetic pregnancies: the associations with fetal outcome and neonatal septal hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Research.* 2005 Aug.;31(4):296-301.
 13. Bracero L, Schulman H, Fleischer A, Farmakides G, Rochelson B. Umbilical artery velocimetry in diabetes and pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1986 Nov;68(5):654-8.
-

14. Maulik D, Lysikiewicz A, Sicuranza G. Umbilical arterial Doppler sonography for fetal surveillance in pregnancies complicated by pregestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002 Dec;12(6):417-22.
 15. Pietryga M, Brazert J, Wender-Ozegowska E, Dubiel M, Gudmundsson S. Placental Doppler velocimetry in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med.* 2006;34(2):108-10.
 16. Fadda GM, Cherchi PL, D'Antona D, Ambrosini G, Marchesoni D, Capobianco G, et al. Umbilical artery pulsatility index in pregnancies complicated by insulin-dependent diabetes mellitus without hypertension. *Gynecol Obstet Invest.* 2001;51(3):173-7.
 17. Berkowitz GS, Chitkara U, Rosenberg J, Cogswell C, Walker B, Lahman EA, et al. Sonographic estimation of fetal weight and Doppler analysis of umbilical artery velocimetry in the prediction of intrauterine growth retardation: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 1988 May;158(5):1149-53.
 18. Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985 Jan;92(1):31-8.
 19. Szymanowski K, Spaczynski M, Szperek D, Biczysko R. [Doppler evaluation of blood flow in the umbilical artery when confronted with morphologic changes in human placenta of pregnancy complicated by diabetes]. *Ginekol Pol.* 1994 Apr;65(4):163-70.
-

20. Dollberg S, Brockman DE, Myatt L. Nitric oxide synthase activity in umbilical and placental vascular tissue of gestational diabetic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest.* 1997;44(3):177-81.
 21. Bjork O, Persson B. Villous structure in different parts of the cotyledon in placentas of insulin-dependent diabetic women. A morphometric study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1984;63(1):37-43.
 22. Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, Cetin I. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. *Placenta.* 2003 Apr;24(4):343-7.
 23. Gewolb IH, Merdian W, Warshaw JB, Enders AC. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes.* 1986 Nov;35(11):1254-61.
 24. Rudge MV, Calderon IM, Ramos MD, Abbade JF, Rugolo LM. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50(2):108-12.
 25. Backx CJ, Lotgering FK, Cornelis H, Wallenburg S. Oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *J Perinat Med.* 1989;17(4):253-7.
 26. Rudge MV, Peracoli JC, Berezowski AT, Calderon IM, Brasil MA. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz J Med Biol Res.* 1990;23(11):1079-89.
-

27. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32 Suppl 1:S62-7.
 28. NHBPEP. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Jul;183(1):S1-S22.
 29. Campbell S, Diaz-Recasens J, Griffin DR, Cohen-Overbeek TE, Pearce JM, Willson K, et al. New doppler technique for assessing uteroplacental blood flow. *Lancet*. 1983 Mar 26;1(8326 Pt 1):675-7.
 30. Thliveris JA, Baskett TF. Fine structure of the human placenta in prolonged pregnancy. Preliminary report. *Gynecol Obstet Invest*. 1978;9(1):40-8.
 31. Mayhew TM, Sorensen FB, Klebe JG, Jackson MR. Growth and maturation of villi in placentae from well-controlled diabetic women. *Placenta*. 1994 Jan;15(1):57-65.
 32. Nakatsu MN, Sainson RC, Perez-del-Pulgar S, Aoto JN, Aitkenhead M, Taylor KL, et al. VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab Invest*. 2003 Dec;83(12):1873-85.
 33. Saldeen P, Olofsson P, Parhar RS, al-Sedairy S. Prostanoid production in umbilical vessels and its relation to glucose tolerance and umbilical artery flow resistance. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996 Sep;68(1-2):35-41.
-

34. Calderon IM, Damasceno DC, Amarin RL, Costa RA, Brasil MA, Rudge MV. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 Oct;78(1):65-71.
 35. Bracero LA, Haberman S, Byrne DW. Maternal glycemic control and umbilical artery Doppler velocimetry. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002 Nov;12(5):342-8.
 36. Mayhew TM, Sisley I. Quantitative studies on the villi, trophoblast and intervillous pores of placentae from women with well-controlled diabetes mellitus. *Placenta.* 1998 Jul-Aug;19(5-6):371-7.
 37. Bracero LA, Beneck D, Kirshenbaum N, Peiffer M, Stalter P, Schulman H. Doppler velocimetry and placental disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Aug;161(2):388-93.
 38. Mayhew TM, Jairam IC. Stereological comparison of 3D spatial relationships involving villi and intervillous pores in human placentas from control and diabetic pregnancies. *J Anat.* 2000;197:263-74.
 39. Nicolaides K, Rizzo G, Hecher K. Doppler studies in pregnancies with maternal diabetes mellitus. In: Nicolaides K, Rizzo G, Hecher K, editors. *Placental and fetal Doppler.* London: The Parthenon Publishing Group Inc; 2000. p. 121-33.
 40. Mascaro M, Calderon I, RAA C, Maestá I, Bossolan G, Rudge M. Carditocografia anteparto e prognóstico perinatal em gestações complicadas pelo diabete: Influência do controle metabólico materno. *Rev Bras Ginec Obstet.* 2002;24:593-9. (<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v24n9/v24n9a05.pdf>).
-

List of tables and figures

NUMBER	TITLE
Table 1	Characteristics of pregnant women in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI, and hyperglycemia/altered PI groups
Table 2	Total and mean area, number of terminal villi, and glycemic mean (GM) in pregnancy in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal, PI and hyperglycemia/altered PI groups
Table 3	Total and mean area, number of villous vessels, villous capillarity index in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI and hyperglycemia/altered PI groups
Table 4	Multiple regression analysis for glycemic mean in pregnancy and placenta morphometric variables with umbilical artery PI values in pregnant women with normoglycemia and normal PI, and hyperglycemia and normal or altered PI
Figure 1	Photomicrography of terminal villi and villous vessels according to the standardization criteria in the placental morphometric analysis of the experimental groups
Figure 2	Pulsatile index (PI) for umbilical arteries in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI and hyperglycemia/altered PI groups
Figure 3	Photomicrography of placentas for normoglycemia/normal PI (A), hyperglycemia/normal PI (B), and hyperglycemia/altered PI groups (C,D)

Table 1. Characteristics of pregnant women in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI, and hyperglycemia/altered PI groups.

	Normoglycemia		Hyperglycemia		Hyperglycemia		<i>p</i>
	normal PI		normal PI		Altered PI		
	n	%	n	%	n	%	
Smoking–yes	4	15.4	9	8.8	1	6.7	0.550
Smoking–no	22	84.6	93	91.2	14	93.3	
AH–yes	12	46.2	21	20.6	4	26.7	0.290
AH–no	14	53.8	81	79.4	11	73.3	
GM<120mg/dL*	26	100.0 ^a	73	22.6 ^b	5	33.3 ^b	0.000
GM≥120mg/dL	0	0.0	29	77.4	10	66.7	
Pregnant women	26		102		15		143

AH = arterial hypertension

GM = glycemic mean in pregnancy

*values followed by different letters are significantly different to controls at 5% probability.

Table 2. Total and mean area, number of terminal villi, and glycemic mean (GM) in pregnancy in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal, PI and hyperglycemia/altered PI groups.

Terminal villi		Normoglycemia normal PI	Hyperglycemia normal PI	Hyperglycemia altered PI	<i>p</i>
Total area (μm^2)*	m	68 659.4a ₁	71 290.9a ₁	68 551.1a ₁	0.7200
	sd	24 695.3	31 911.1	26 000.2	
Average area (μm^2)*	m	15708.8a ₂	9 793.9b ₂	15 923.0a ₂	0.0001
	sd	18 839.6	10 188.8	11 910.9	
Number*	m	5.9a ₃	11.4b ₃	5.2a ₃	0.0000
	sd	2.8	9.6	1.9	
GM (mg/dL)*	m	85.8a ₄	103.0b ₄	116.8c ₄	0.0000
	sd	9.1	8.5	18.9	

*averages followed by different letters and same index are significantly different at 5% level of probability

Table 3. Total and mean area, number of villous vessels, villous capillarity index in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI and hyperglycemia/altered PI groups.

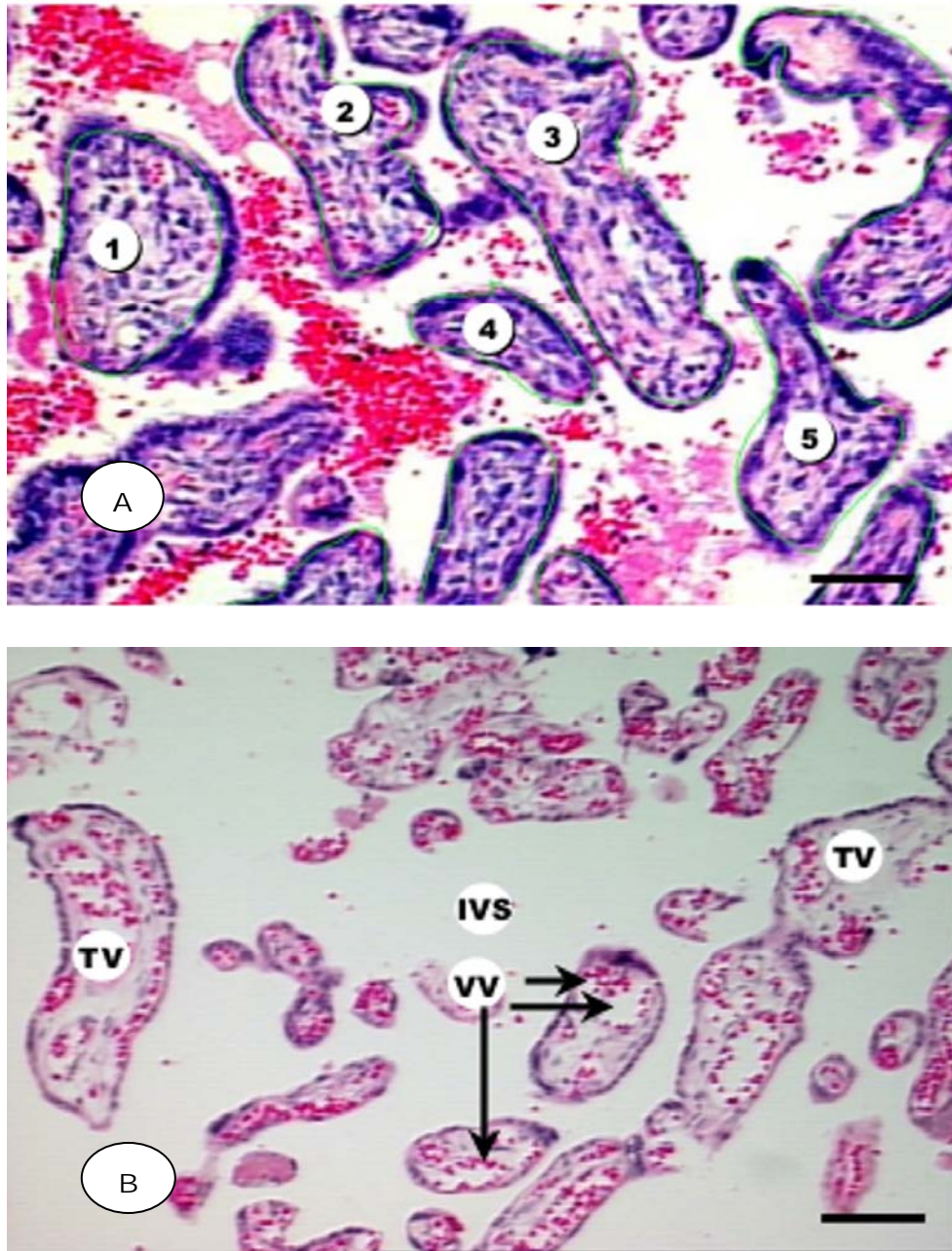
Villous vessels		Normoglycemia	Hyperglycemia	Hyperglycemia	<i>p</i>
		normal PI	normal PI	altered PI	
Total area (μm^2)*	m	15 181.6a ₁	11 794.6b ₁	14 344.4a ₁	0.0093
	sd	9 017.3	8114.5	8 420.0	
Average area (μm^2)*	m	708.2a ₂	366.5b ₂	700.2a ₂	0.0001
	sd	556.6	262.2	559.2	
Number*	m	23.4a ₃	36.9b ₃	22.2a ₃	0.0001
	sd	8.2	24.9	8.3	
Capillarity index (%)*	m	23.4a ₄	18.8b ₄	21.9a ₄	0.0001
	sd	11.9	19.6	10.9	

*averages followed by different letters and same index are significantly different at 5% level of probability

Table 4. Multiple regression analysis for glycemic mean in pregnancy and placenta morphometric variables with umbilical artery PI values in pregnant women with normoglycemia and normal PI, and hyperglycemia and normal or altered PI.

	R	R ²	p*
Normoglycemia / normal PI			
Capillarity index (+)	0.67	0.45	0.000
Glycemic mean (+)	0.75	0.57	0.001
Hyperglycemia / normal/altered PI			
Glycemic mean (+)	0.45	0.21	0.000
Total area of vessels (+)	0.53	0.28	0.000
Number of vessels (-)	0.56	0.32	0.000

*p< 0.05 – significant to the 5% level of probability



Legend – (A) Terminal villi totally inside the field and standardized for morphometrical analysis; terminal villous total area = $1 + 2 + 3 + 4 + 5$; villi mean area = $(1 + 2 + 3 + 4 + 5)/5$ — color HE, 200 \times ; bar: 10 μ m. (B) Terminal villi (TV) and respective villous vessels (VV, arrows) in the maternal–fetal exchange surface in contact with intervillous space (IVS) — color HE, 200 \times ; bar: 10 μ m.

Figure 1. Photomicrography of terminal villi and villous vessels according to the standardization criteria in the placental morphometric analysis of the experimental groups.

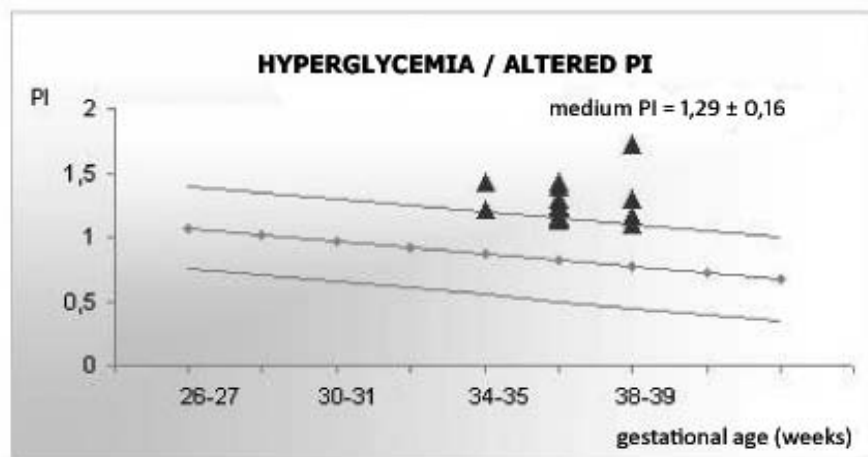
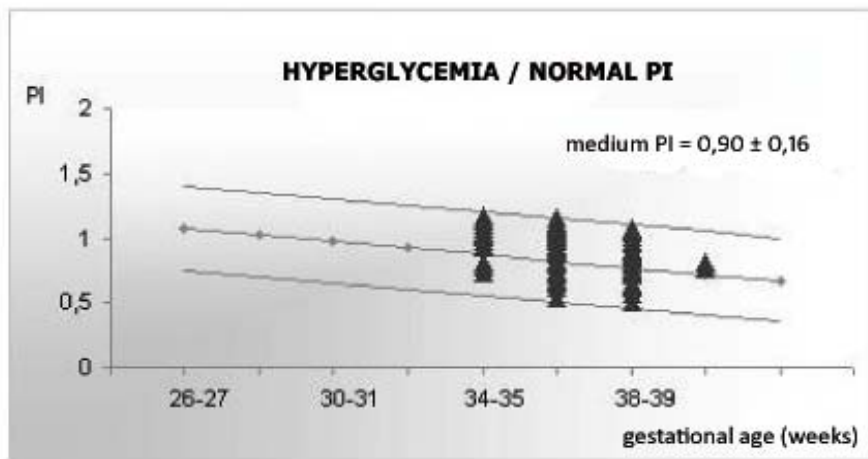
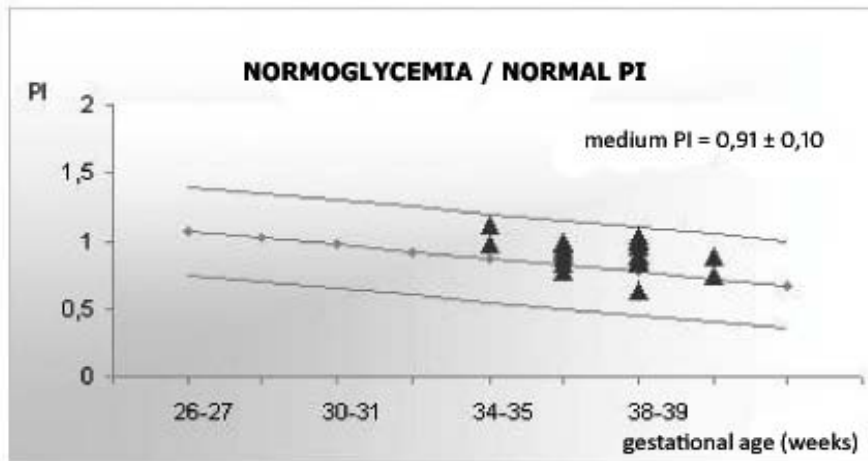


Figure 2. Pulsatile index (PI) for umbilical arteries in the normoglycemia/normal PI, hyperglycemia/normal PI and hyperglycemia/altered PI groups.

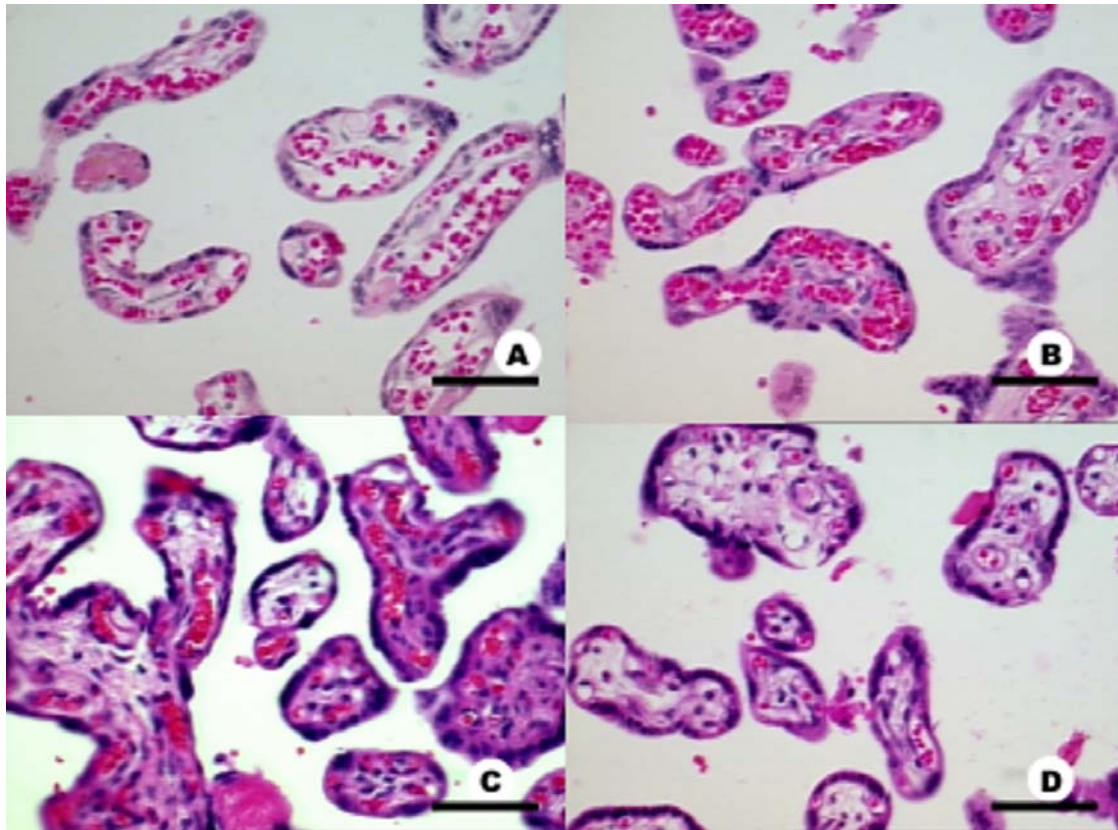


Figure 3. Photomicrography of placentas for normoglycemia/normal PI (A), hyperglycemia/normal PI (B), and hyperglycemia/alterated PI groups (C,D) — color HE, 400_x; bar: 5mm.

Anexo 3 – Comprovante de submissão do anexo 2 à revista BJOG.

BJOG - Windows Internet Explorer

http://bjog.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&ms_id=14942&ms_rev_no=0&ms_

Windows Live Bing

What's New Profile Mail Photos Calendar Share

Sign in

Favorites CNPq CAPES - Coordenação de A... FAPESP - Fundação de Am... National Center for Biotech... Suggested Sites Free Hotmail Web Slice Gallery

BJOG

Page Safety Tools

Editors: Please remember the 2011 theme issue 'Infections in pregnancy', for appropriate papers please invite Julia Hussein, Austin Ugwumadu and Steve Witkin to consult

[Home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	2010-OG-7816
Current Revision #	0
Submission Date	6th March 10
Current Stage	Initial Quality Check Started
Title	UMBILICAL ARTERIAL DOPPLER VELOCIMETRY AND PLACENTAL MORPHOMETRIC CHANGES IN MATERNAL HYPERGLYCEMIA
Running Title	Doppler velocimetry and placental changes in hyperglycemia
Manuscript Type	Main Research Article

start enviado_BJOG BJOG - Windows Inte... 17:45