

Jusciele Brogin Moreli

**IL-10 E TNF- α no sangue materno e nas
placentas de gestações complicadas por diabetes
ou hiperglicemia leve – correlação com controle
glicêmico e resultados perinatais**

Dissertação 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
Mestre.

Orientadora: Iracema de Mattos Paranhos Calderon
Co-orientadora: Débora Cristina Damasceno

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

UNESP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Moreli, Jusciele Brogin.

IL-10 e TNF- α no sangue materno e nas placentas de gestações complicadas por diabete ou hiperglicemia leve: correlação com controle glicêmico e resultados perinatais / Jusciele Brogin Moreli. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Iracema de Mattos Paranhos Calderon

Co-Orientador: Débora Cristina Damasceno

Capes: 40101150

1. Diabete na gravidez.

Palavras-chave: Diabete; Gestação; Hiperglicemia; IL-10; TNF- α .

A gente vai falar daquilo que é óbvio...
E o óbvio muitas vezes, deixa de ser óbvio e explícito
Pra muitas pessoas... Diariamente
A poesia que passa por nós despercebida
A coragem que nos falta em determinado momento
A palavra que nos falta na hora exata
O gesto que eu deixei para ontem...
E hoje não me cabe mais...
Ontem já passou, acabou
A gente só tem agora
Pra olhar no olho
Pra reclamar, pra conversar
Pra falar olha, era pra ter respeitado, ficado de pé, ficado sentado ...
E depois logo em seguida reconhecer
Essa é a nossa única oportunidade
Eu não sei quantas são as pessoas
E para quais são as pessoas
As quais a gente poderia falar isso
Tem muita gente que nem tá aqui hoje
E que gostaria de ouvir isso
E você, talvez você nem saiba
O quanto é importante uma palavra tua pra alguém
E isso pode parecer a coisa mais óbvia e brega do mundo... Mas não é..

Fernando Amitteli

Dedicatória

À Deus e Nossa Senhora

Pela fé que me mantém viva.

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. É, principalmente, agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.”

Fernando Pessoa

Aos meus pais Nelo Antônio Moreli e Marli Brogin Moreli

Moldes que mesmo longe são suficientes para garantir minha alegria, paz, sucesso, discernimento e dignidade. Dedico minha conquista com a mais profunda admiração, respeito e amor.

“Amor de Família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um filho o quanto o ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então eles simplesmente demonstram...”

Pasini

Ao meu irmão Leandro Brogin Moreli

Frutos da mesma união podem ser diferentes. Diferença com inúmeros benefícios. Muito obrigada pelos inúmeros conselhos transmitidos com muito amor.

“Nunca estamos sós, é verdade. É bom saber que temos um irmão em quem podemos confiar. Pessoa que nos ajuda e acolhe com tanto carinho”

Autor desconhecido

À minha sobrinha Isabela Vilela Moreli

Sem palavras específicas, sem grandes frases, apenas com um olhar você ajuda sua madrinha. Amo muito você minha pequena.

“As mais belas frases de amor são ditas no silêncio de um olhar”

Paulo Coelho

À minha amiga e cunhada Vaniele Vilela Moreli

Gestos de carinho, atenção e delicadeza fazem-nos perceber quanto algumas pessoas são especiais na forma de ser e como são bem-vindas as suas ações.

“A amizade é um amor que nunca morre”

Mário Quintana

As minhas avós, avôs, tios, tias, primos e primas

Companheiros de sempre, parceiros de sonhos sem limites e torcedores fiéis da minha vitória.

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado”

Isaac Newton

A uma pessoa especial

“Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você”

Fernando Anitteli

À Iracema M.P. Calderon

Inicialmente gostaria de agradecer a confiança que possibilitou o desenvolvimento conjunto dessa dissertação. Muito obrigada pela amizade, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos científicos.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

Agradecimientos

“Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, mas tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, "O grande oceano de verdades"”

Isaac Newton

Nos anos que passei em Botucatu para desenvolver o meu mestrado conheci pessoas essenciais que participaram de forma espetacular na realização desse sonho. Sempre falamos que passamos a maioria do tempo com amigos do laboratório, orientadores, pacientes e assim formamos uma grande família. Gostaria de agradecer, com muito carinho:

Às pacientes participantes desse estudo

Gestantes que colaboraram e permitiram o desenvolvimento desse estudo.

À Dra. Débora Cristina Damasceno

Co-Orientadora. Agradeço de coração por tudo que você me ajudou a realizar. Que Deus pague tudo isso, pois com certeza nunca poderei pagar tanta gentileza. Muito obrigada pelos conhecimentos científicos e religiosos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetricia: Aline Bueno, Aline Netto, Ana Carolina I Kiss, Ana Maria Cirino Ruocco, Bruna Dallaqua, Edlaine de Lego, Felipe Saito, Fernanda Piculo, Gabriela Marine, Glilciane Morceli, Gustavo Volpato, Isabela Iessi, Joice Vernine, Kleber Eduardo Campos, Lessandra De Rosa, Paula Helena Ortiz Lima, Rafael Botaro Gelaleti, Renize Ap. Rios Dinibaldi, Silvana Barroso Corvino, Talísia, Vânia Bueno Magalhães e Yuri Sinzato. Muito obrigada por cada ajuda que recebi de vocês.

À Ms. Valéria Romero

Professora da graduação, incentivadora de todas as horas e grande amiga que possibilitou o meu estágio no laboratório.

À Dra. Magaly Sales Monteiro

Professora da graduação que abriu as portas para a pesquisa logo no início da minha graduação. Você me incentivou e colaborou com o meu amadurecimento científico.

À Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

Por todo conhecimento científico compartilhado.

À Dra. Estela Bevilacqua

Pelo incentivo, pelas preciosas e construtivas opiniões. Também gostaria de agradecer por você ter disponibilizado seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

À Dra. Simone Correa da Silva

Aluna de pós doutorado, pela amizade e a realização das dosagens das citocinas na placenta. Muito obrigada por atender meu pedido de socorro.

À Dra. Lygia Merini

Amiga fiel, presente em momentos especiais, grande incentivadora e grande profissional.

Ao Grupo de Apoio a Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-GAP

Pela ajuda no delineamento do projeto e análise estatística dos dados.

À Dra. Renée Laufer Amorin

Pela ajuda científica e humana, por permitir a utilização do laboratório para o desenvolvimento da técnica de imunistoquímica.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Veterinária

Amigos que compartilhei parte do meu mestrado e proporcionaram muitos conhecimentos e momentos alegres.

À Maria Carvalho

Pela ajuda e paciência nos finais de semana.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação Janete Ap. Nunes Silva, Regina C. Spadin, Lilian Cristina N.B. Nunes, Andréia Longo Devidé e Nathanael P. Salles

Pelo apoio e serviços prestados.

Aos Funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Aparecida Benedita Vasques, César Eduardo Guimarães, Regina Célia
Gamito e, em especial à Ana Claudia Garcia Mira

Pela dedicação, paciência e auxílios prestados.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Pela concessão do auxílio pesquisa (processo número 2007-00771-6) e
bolsa de mestrado (processo número 2009-03252-1) que possibilitaram o
desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Serviço de Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação no campus
da Unesp – Botucatu, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração
da ficha catalográfica.

Ao **Laboratório Clínico** da Faculdade de Medicina de Botucatu pela
colaboração nas dosagens.

*A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização
desse trabalho*

Sumário

<i>Artigo de Revisão</i>	02
Interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gestação –aspectos de interesse na clínica obstétrica	
<i>Artigo I</i>	23
IL-10 E TNF- α no sangue materno e nas placentas de gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia gestacional leve	
<i>Artigo II</i>	47
Influência da hiperglicemia materna na produção de IL-10 e TNF- α –relação com resultados perinatais	
<i>Anexo</i>	72

Artigo de Revisão – Interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gestação – aspectos de interesse na clínica obstétrica

**Interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gestação
– aspectos de interesse na clínica obstétrica ***

**Interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in pregnancy
– aspects of interest in clinical obstetrics**

Jusciele Brogin Moreli, Ana Maria Cirino Ruocco, Joice Monaliza Vernini,
Iracema Mattos Paranhos Calderon

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

Correspondência: Iracema MP Calderon

Rua Atílio Losi, 226 / Jd. Paraíso / Botucatu – CEP:18610-260

São Paulo – Brasil/ email: calderon@fmb.unesp.br

Contato: (+55) (14) 38116227

* Artigo elaborado segundo as normas da revista *Journal of Pregnancy*

Resumo

O objetivo dessa revisão foi explorar a literatura sobre a atuação das citocinas IL-10 e TNF- α na gestação, destacando aspectos de interesse para a clínica obstétrica. A literatura disponível destaca várias funções da IL-10 e do TNF- α na gestação. Via de regra, estas citocinas desempenham papéis antagônicos e dependentes do balanço entre elas, condição que é orquestrada pela função imunomoduladora específica da IL-10. O TNF- α tem ação de característica inflamatória, sendo relacionado a perdas fetais recorrentes, síndromes hipertensivas, restrição do crescimento fetal e diabetes melito gestacional. Entretanto, os resultados ainda são controversos e não completamente definidos. Tais conflitos são atribuídos à heterogeneidade dos estudos, principalmente relacionada à natureza, ao tamanho amostral, aos métodos de avaliação e à multiplicidade de fatores e condições que influenciam a produção das citocinas. Estas questões são fundamentais e devem ser consideradas em futuras investigações para que resultados mais consistentes possam nortear a prática obstétrica.

Palavras-chave: citocinas, interleucina 10, fator de necrose tumoral alfa, gestação, placenta

Abstract

The purpose of this work was to review the literature concerning the action of cytokines IL-10 and TNF- α in pregnancy, giving emphasis to aspects of interest to clinical obstetrics. The literature available highlights several IL-10 and TNF- α actions in pregnancy. These cytokines usually play balance-dependent opposing roles orchestrated by the IL-10-specific immunomodulatory function. TNF- α action is characteristically inflammatory and has been associated with recurrent fetal loss, hypertensive syndromes, fetal growth restriction and gestational diabetes mellitus. However, study results are controversial and remain not clearly defined. These conflicts are attributed to the heterogeneity of the studies, particularly regarding sample nature and size, evaluation methods, and the multiplicity of factors and conditions that influence cytokine production. These questions are fundamental, and should be addressed in future investigations so that more consistent results can be obtained and applied to obstetric practice.

Key -words: cytokines, Interleukin 10, tumor necrosis factor-alpha, pregnancy, placenta

Introdução

Citocina e Gestação – Generalidades

As citocinas pertencem a uma diversificada família de pequenas proteínas solúveis, expressas por vários tipos de células e tecidos e, atuam como mediadores imunológicos. As subpopulações de citocinas, classicamente, as *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2) têm papel fundamental na diferenciação da natureza da resposta imune. Se há predomínio de citocinas Th1, o sistema imunológico vai gerar uma resposta mediada por células (tipo citotóxica), tendo como alvo patógenos intracelulares ou células cancerígenas [1]. A subpopulação Th2 induz à produção de anticorpos contra patógenos extracelulares, caracterizando a resposta imunológica do tipo humoral [2].

Até o momento, foram identificados pelo menos 33 tipos diferentes de interleucinas (IL) [3]. As subpopulações Th1 e Th2 foram as primeiras classes descritas, geralmente com formas opostas de atuação, e têm sido bastante estudadas [4]. No homem, a subpopulação Th1 é classicamente representada pelo interferon gama (IFN- γ) e pela interleucina 12 (IL-12); caracterizam a subpopulação Th2, a IL-4, IL-5 e IL-13 [5,6]. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas 1 beta (IL-1 β) e IL-6, tem destacada função pró-inflamatória, sendo também classificadas na subpopulação de linfócitos Th1 [6,7].

A IL-10 é um tipo especial de citocina que, em humanos, exerce dupla função imune: estimulante e contra-reguladora ou imunossupressora, o que a excluiria das classes Th1 e Th2. Apesar disso, ela foi originalmente descrita como uma citocina Th2, por sua ação antiinflamatória em roedores [6,8-9].

O TNF- α é essencial na orquestração da cascata de citocinas, sendo alvo terapêutico em muitas doenças inflamatórias. O aumento na produção de TNF- α foi relacionado à patogênese de várias doenças, tais como artrite reumatóide, doença de Crohn, aterosclerose, psoríase, sepse, diabetes melito e obesidade [10].

Especificamente na gestação, o sistema imunológico desempenha papel importante, tanto para garantir sua evolução normal, como para favorecer o desenvolvimento de complicações [11]. O sucesso da gestação parece ser resultado de um discreto balanço entre citocinas Th1 e Th2, envolvidas no crescimento e desenvolvimento do feto [12]. O TNF- α , a IL-1 β e a IL-6 são algumas das citocinas fundamentais no início da gestação, atuando no fenômeno de implantação do blastocisto e, de maneira adversa, nas perdas de primeiro trimestre. Com a evolução da gestação, elevadas concentrações de TNF- α foram relacionadas ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia e diabetes melito gestacional (DMG) e, a redução de IL-10, ao parto pré-termo [6,7,13-14]. Mecanismos placentários também estão envolvidos na regulação da resposta imune da gestação [15]. As células trofoblásticas e de Hofbauer, identificadas na placenta, produzem diversos tipos de citocinas, inicialmente com função autócrina ou parácrina, mas que podem atingir a circulação materna e provocar alterações metabólicas após a formação dos vilos placentários [16]. De acordo com a literatura, a placenta pode contribuir tanto para a redução da resposta imune materna, como perder seu papel regulatório e favorecer o desenvolvimento de algumas complicações, entre elas, o diabetes e a pré-eclâmpsia [14,16-17].

Considerando a associação entre respostas imunológicas e resultados obstétricos, a identificação precoce de alterações no sistema imunológico seria de interesse na prevenção de resultados adversos da gestação. Entretanto, o perfil imunológico ao longo da gravidez humana precisa ser melhor definido [6].

Entre as décadas de 1980 a 1990, a tolerância materna aos aloantígenos fetais foi explicada pelo predomínio da imunidade do tipo Th2 sobre o Th1, protegendo o feto do "ataque" materno. O predomínio de Th1 foi observado nos casos de aborto, recorrente [18-19] e espontâneo [18,20], e de pré-eclâmpsia [18,21]. No entanto, o predomínio da imunidade Th2 foi também relatada em casos de aborto recorrente [18,22] e, portanto, o paradigma Th1/Th2

tornou-se insuficiente para explicar o mecanismo que previne a rejeição do aloenxerto fetal. Diante disso, alguns autores já começam a expandir este clássico paradigma, incluindo respostas caracterizadas como Th17 e T reguladoras (Treg) [18,23]. A citocina IL-17 tem ação pró-inflamatória, caracterizando a resposta do tipo Th17 [23-24] e foram descritas como indutoras de inflamação em doenças autoimunes e na rejeição aguda dos transplantes. Em contraste, as células Treg fazem a imunorregulação e a indução de tolerância, inibindo a produção e proliferação de citocinas nas células T CD4+ e CD8+, a produção de imunoglobulina pelas células B, a atividade citotóxica das células *natural killer* e a maturação das células dendríticas, resultando na indução da tolerância [18,25-26].

Diversos paradigmas foram também propostos para a modulação do sistema imunológico específico da gestação [20]. Mais recentemente, as células Treg ou de resposta T *helper* tipo 3 (Th3) foram identificadas [27-28] por sua ação imunossupressora na gravidez [29]. Entre esses mecanismos de ação, a favor da modulação imunológica na gestação, a IL-10 parece ter papel fundamental nesse tipo de resposta [30-31].

Thaxton & Sharma [32] propõem um modelo contemporâneo do balanço modulatório das citocinas pró e antiinflamatórias na evolução da gestação, diretamente dependente da ação imunossupressora da IL-10 (Figura 1).

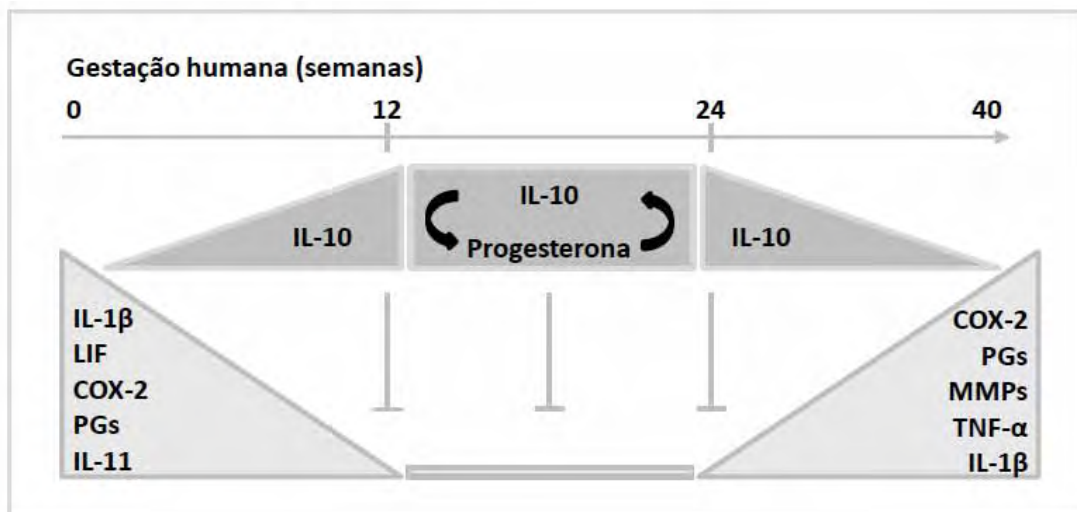


Figura 1 – Modulação das citocinas na gestação – reproduzido de Thaxton & Sharma [32]

Desde a implantação até o termo da gestação, a interação entre citocinas pró e anti-inflamatórias é fundamental para o resultado normal da gestação e a IL-10 parece ser a chave para que isto aconteça. Achados recentes evidenciaram diminuição global de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , e IL-6, e aumento das contra-regulatórias, como a IL-10, na evolução da gestação em mulheres saudáveis. De acordo com os autores, estas alterações reforçam o papel da imunomodulação na manutenção e desenvolvimento da gestação normal [6].

Considerando que há muito a esclarecer sobre o verdadeiro papel das citocinas nas gestações humanas e interessados em contribuir para diminuir essa lacuna, esta revisão teve como objetivo explorar a literatura sobre a atuação das citocinas IL-10 e TNF- α na gestação, destacando aspectos de interesse para a clínica obstétrica.

Método

Os bancos de dados *National Library of Medicine* (Medline), Literatura Latino – americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO) e Pubmed foram consultados à procura de artigos nacionais, internacionais e das melhores evidências científicas disponíveis. Os trabalhos foram localizados com a utilização das palavras-chave:

"citocinas", "gestação", "placenta", "interleucina 10" e "fator de necrose tumoral alfa". Em determinadas pesquisas essas palavras foram utilizadas em inglês. Inicialmente não foi estipulado um período limite para inclusão dos trabalhos nesta revisão, porém foi dada preferência aos trabalhos publicados nos últimos 15 anos. Os trabalhos selecionados para inclusão na revisão foram avaliados pelos autores.

IL-10 e Gestação

A IL-10 é uma citocina particularmente intrigante. Em humanos, é caracterizada como pleiotrópica, com dupla função imune, estimulante e contra-reguladora (imunossupressora), que a exclui do paradigma Th1–Th2. Apesar disso, ela foi originalmente descrita como uma citocina de ação Th2 em roedores [6,8-9].

Esta citocina é codificada no cromossomo 1 e polimorfismos na região promotora do gene IL-10 podem interferir na sua regulação [32-33]. O seu receptor é composto de duas subunidades, IL-10R1 e IL-10R2, expressas em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, entre estas, o citotrofoblasto. O receptor IL-10R1 é responsável pela ligação da proteína IL-10; o IL-10R2 é específico para iniciar a cascata de transdução de sinais, necessários para o desempenho de sua função. Estes sinais envolvem enzimas, as chamadas Januscinases (Jaks), e fatores de transcrição chamados transdutores de sinal e ativadores de transcrição, denominados STAT. Após a ligação de IL-10 ao receptor, no citoplasma da célula ocorre a fosforilação das enzimas Jaks em resíduos de tirosina e consequente fosforilação dos STAT. Na sequência, duas proteínas STAT se ligam entre si e se dissociam do receptor; os dímeros de STAT migram, então, para o núcleo da célula onde se ligam a sequências de DNA nas regiões promotoras dos genes responsivos à citocina IL-10 [32,34].

A IL-10 é citocina chave no início da gestação, por seu envolvimento em diversos eventos importantes, entre eles, a formação da placenta. A IL-10 tem efeito protetor na unidade feto-

placentária, inibindo a secreção de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e IFN- γ [35] e, juntamente com a IL-4 e a IL-13, parece modular a invasão trofoblástica [12]. De acordo com Thaxton & Sharma [32], a IL-10 induz as células trofoblásticas na produção do fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF C) e do sistema molecular *water channels aquaporins* (AQP1), estimulando a angiogênese placentária. No final da gestação, a produção de IL-10 diminui progressivamente, predominando as concentrações de citocinas inflamatórias. De acordo com Hanna et al. [36] essa mudança no perfil das citocinas é condição necessária para desencadear o trabalho de parto espontâneo.

Outros resultados relacionam decréscimo na produção de IL-10 placentária, tanto na porção decidual como no trofoblasto, nas gestações complicadas por restrição do crescimento intrauterino [37]. Isso também foi confirmado em estudos experimentais com camundongos [38]. De modo contrário, maior produção de IL-10 foi observada em gestações de evolução normal quando comparadas com gestações de risco, destacando o papel fundamental da IL-10 na manutenção e desenvolvimento da gestação [39]. Estudo recente, com modelo experimental de hipertensão em ratas, demonstrou normalização dos níveis pressóricos e da função endotelial associada à administração de IL-10. Segundo os autores, estes resultados demonstram a importância da ação da IL-10 em condições de resposta inflamatória exacerbada [40].

Em síntese, a IL-10 é citocina importante para a manutenção e evolução da gestação. Neste período específico, sua ação imunossupressora desempenha papel chave (i) na regulação do balanço de sinais pró e antiinflamatórios, que orquestram o desenvolvimento adequado da gestação, e (ii) no crescimento e remodelamento placentário, também de interesse para o prognóstico favorável da gestação.

TNF- α e Gestação

O TNF- α é uma citocina inflamatória, pertence à subpopulação dos linfócitos Th1 e é codificada no cromossomo 6. Esta citocina regula uma série de funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose celular. Os macrófagos são os principais produtores de TNF- α e, também, altamente responsivos a esta citocina [10].

Os receptores de TNF são membros de uma grande família de proteínas e estão presentes em quase todos os tipos de células, envolvidas em respostas imunes e inflamatórias. Esses receptores aparecem como trímeros na membrana citoplasmática, antes mesmo da ligação com o TNF. Quando a citocina se liga ao receptor de TNF tipo I (TNF-RI) pode gerar dois eventos distintos, a expressão gênica ou a apoptose. Para a indução da expressão gênica de mediadores inflamatórios e proteínas antiapoptóticas (de sobrevivência), ocorre a ligação, na região citoplasmática do receptor, da proteína adaptadora TRADD (domínio de morte associado ao receptor de TNF), e subsequente ligação de dois fatores intermediários de sinalização: o fator associado ao receptor de TNF (TRAF) e a proteína de interação com o receptor (RIP). Para ativação de caspases e indução da apoptose, a proteína adaptadora TRADD liga-se ao domínio de morte associado ao Fas (FADD). Outro mecanismo de ação dessas citocinas inclui a ligação direta das caudas citoplasmáticas de outros membros da família de receptores de TNF à FADD, levando à apoptose, ou às TRAF, induzindo à expressão gênica [34].

O TNF- α aumenta com a evolução da gestação e a principal fonte de produção desta citocina parece ser a placenta [41]. O aumento de TNF- α pode exacerbar o quadro de resistência à insulina, normal na gestação, e favorecer o desenvolvimento do DMG [14]. Tal característica é explicada pela inibição da atividade tirosina-quinase do receptor de insulina em adipócitos e pela redução na fosforilação e ativação do substrato do receptor 1 de insulina (IRS-1), inibindo a via de sinalização da insulina [42]. Assim, a regulação do TNF- α durante a gestação pode prevenir os efeitos deletérios da resistência à insulina. De acordo com alguns autores, esta

constatação contradiz o conceito clássico de que a resistência à insulina na gestação é induzida, exclusivamente, pelos hormônios placentários [43].

Vários estudos avaliaram as concentrações de TNF- α circulante em gestantes com DMG, porém os resultados são ainda controversos. Alguns estudos observaram aumento de TNF- α no sangue de mães que desenvolveram DMG[44-49]. Entretanto, outros não confirmaram estes achados [50]. Outros resultados de gestações complicadas por DMG identificaram produção no tecido adiposo, visceral e subcutâneo, associada à produção placentária de TNF- α [14,51].

Observou-se aumento significativo na produção de TNF- α , na placenta e no tecido adiposo subcutâneo, em mulheres com DMG (n = 6) e não controladas (hiperglicemia), comparadas com as portadoras de DMG bem controladas, ou seja, condições de normoglicemia. De acordo com os autores, essas observações sugerem que os tecidos de mulheres com DMG aumentam a liberação de TNF- α em resposta à hiperglicemia. Como o TNF- α está envolvido na regulação do metabolismo de glicose e lipídios e da resistência à insulina, estes dados são consistentes com a hipótese de que o TNF- α está, especialmente, envolvido na gênese do DMG [14].

Outros efeitos do TNF- α também foram descritos em recém-nascidos de mães diabéticas e não diabéticas e em outras gestações de risco. O TNF- α está diminuído nos filhos macrossômicos de mães portadoras de DMG [45] e, de modo contrário, aumentado nas placentas de gestações complicadas por restrição do crescimento fetal [52]. Observou-se aumento nas concentrações de TNF- α em gestantes com pré-eclâmpsia (hipertensão com proteinúria) quando comparadas às portadoras de hipertensão gestacional (hipertensão sem proteinúria). Isto sugere que o TNF- α pode ser utilizado como marcador de gravidade nas síndromes hipertensivas na gestação [13].

Em síntese, o TNF- α está relacionado à obesidade, intolerância à glicose, diabetes melito tipo 2 (DM2) e DMG e tem correlação positiva com o índice de massa corporal (IMC) [14,44,48,53]. Especificamente na gestação, a produção de TNF- α do tecido adiposo materno é incrementada pela produção placentária desta citocina, constituindo fator diabetogênico adicional, de importância na patogênese da resistência à insulina e do DMG. Tal característica desafia a tradicional teoria de que os hormônios da reprodução são exclusivos na redução da sensibilidade à insulina durante a gestação [14,43,49,54]. Ainda que não totalmente definido, o TNF- α parece ser marcador do "dismetabolismo" e do controle glicêmico materno nas gestações complicadas por DM2 e DMG.

Considerações Finais

A literatura disponível destaca várias funções da IL-10 e do TNF- α na gestação normal. As ações parecem ser antagônicas e dependentes do balanço entre elas, condição que é orquestrada pela ação imunossupressora específica da IL-10. O TNF- α tem ação de característica inflamatória e é fator diabetogênico adicional na gestação. A perda do controle na produção dessas citocinas, com desvio favorável ao TNF- α , relaciona-se ao risco de desenvolver complicações obstétricas, especialmente, perdas fetais recorrentes, DMG, síndromes hipertensivas e restrição do crescimento fetal. Entretanto, os resultados ainda são controversos e não completamente reprodutíveis. Tais conflitos são atribuídos à heterogeneidade dos estudos, principalmente relacionada à natureza (*in vivo* e *in vitro*; humanos e animais), ao tamanho amostral, via de regra insuficiente, aos métodos de avaliação (imunoistoquímica ou ferramentas de biologia molecular) e à multiplicidade de fatores e condições que influenciam na produção das citocinas. Estas questões são fundamentais e devem ser consideradas em futuras investigações para que resultados mais consistentes possam nortear a prática obstétrica.

Agradecimentos

Os autores agradem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro.

Declaração de interesses

Não existe conflito de interesse

Referências

- [1] Wilczynski JR. Cancer and pregnancy share similar mechanisms of immunological escape. *Chemotherapy* 2006;52(3):107-110.
- [2] Kidd P. Th1/Th2 balance, the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8(3):223-246.
- [3] Chen Q, Carroll HP, Gadina M. The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. *Vitam Hor* 2006;74:207-228.
- [4] O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2000;10(12):542-550.
- [5] Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunol Lett* 2004;92(3):207-214.
- [6] Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, Goldenberg RL, Culhane JF. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 2011;53(2):170-177.
- [7] Raghpathy R. Pregnancy: success and failure within Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001;13(4):219-227.
- [8] Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 2003;86(2):123-129.
- [9] Wakkach A, Cottrez F, Groux H. Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine?. *Eur Cytokine Netw* 2000;11(2):153-160.

- [10]Patial S, Parameswaran N. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010;20(2):87-103.
- [11]Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy* 2005;88:64-79.
- [12]Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Ng SC. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14:305-310.
- [13]Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57:177-185.
- [14]Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JM, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2001;18:921-927.
- [15]Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14(7):353-356.
- [16]Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* 2006;27(8):794-798.
- [17]Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2505-2512.

[18] Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-Cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):601-610.

[19] Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998; 4:1020–1024.

[20] Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478–482.

[21] Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003; 59:161–173.

[22] Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, Frydman R. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:177–186.

[23] Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2009; 129:147–153.

[24] Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010;159:109–119.

[25] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345–352.

[26] Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2007;7:231–237.

- [27]Curotto de Lafaille MA, Shen S, Olivares-Villagómez D, Camps-Ramírez M, Lafaille J. Do regulatory T cells play a role in the control of homeostatic proliferation? *Int Rev Immunol* 2005;24:269-284.
- [28]Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101(5):455-458.
- [29]Zenclussen AC. CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2005;65(2):101-110.
- [30]Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006;117(4):433-442.
- [31]Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103(2):131-136.
- [32]Thaxton JE, Sharma S. Interleukin -10: A multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63: 482-491.
- [33]Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1. *J Immunol* 2004; 173(5):3215-3222.
- [34]Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Citocinas. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Imunologia celular e molecular*. 6th ed. Rio de Janeiro; 2008. pp 267-301.
- [35]Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989;46:111-147.

[36]Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000;164(11):5721-5728.

[37]Amu S, Hahn-Zoric M, Malik A, Ashraf R, Zaman S, Kjellmer I, Hagberg H, Padyukov L, Hanson LA. Cytokines in the placenta of Pakistani newborns with and without intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 2006;59(2):254-258.

[38]Rivera DL, Ollister SM, Liu X, Thompson JH, Zhang XJ, Pennline K, Azuero R, Clark DA, Miller MJ. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *Faseb J* 1998;12(2):189-197.

[39]Wu MY, Chen HF, Chen SU, Chao KH, Yang YS, Ho HN. Increase in production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46:386–392.

[40]Tinsley JH, South S, Chiasson VL, Mitchell BM. Interleukin-10 reduces inflammation, endothelial dysfunction, and blood pressure in hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298(3):713-719.

[41]Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11(6):212-217.

[42]Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 2001;107(2):181-189.

[43]Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002;51(7):2207-2213.

[44]Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajós P, Salamon F, Turi Z, Kovács M, Vargha P, Karádi I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;56:93-99.

[45]Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4137-4143.

[46]Kinalski M, Kuzmicki M, Telejko B, Bachórzewski R, Buraczyk M, Kretowski A, Kinalska I. Tumor necrosis factor-alpha system in patients with gestational diabetes. *Przegl Lek* 2006;63:173-175.

[47]McLachlan K, O'Neal D, Jenkins A, Alford F. Do adiponectin, TNF- α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:131-138.

[48]Altinova AE, Toruner F, Bozkurt N, Bukan N, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N, Arslan M. Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:161-165.

[49]Gao XL, Yang HX, Zhao Y. Variations of tumor necrosis factor-alpha, leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:701-705.

[50]Montazeri S, Nalliah S, Radhakrishnan AK. Association between polymorphisms in human tumor necrosis factor -alpha (-308) and -beta (252) genes and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;88:139-145.

[51]Kuźmicki M, Szamatowicz J, Kretowski A, Kuć P, Kretowski M, Wawrusiewicz N, Okruszko A, Leroith D, Górska M. Evaluation of adiponectin and TNF-alpha genes expression in women with gestational diabetes. Preliminary results. *Ginekol Pol.* 2006;77(12):930-936.

[52]Holcberg G, Huleihel M, Sapir O, Katz M, Tsadkin M, Furman B, Mazor M, Myatt L. Increased production of tumor necrosis factor-alpha TNF-alpha by IUGR human placenta. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001;94(1):69-72.

[53]Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, Sargent I, Redman C. Localization of tumour necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. Clin Exp Immunol 1992;88(1): 174-180.

[54]Richardson AC, Carpenter MW. Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus. Obstet Gynecol Clin North Am 2007 ;34(2):213-224.

Artigo I – IL-10 e TNF- α no sangue materno e nas placentas de gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia gestacional leve

IL-10 E TNF- α NO SANGUE MATERNO E NAS PLACENTAS DE GESTAÇÕES COMPLICADAS POR
DIABETE OU HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE*

Maternal and placental IL-10 and TNF- α levels in pregnancies complicated by
diabetes or mild gestational hyperglycemia

Maternal and placental IL-10 and TNF- α in hyperglycemia

Jusciele Brogin Moreli¹, Simone Correa da Silva^{1,2}, Lessandra De Rosa¹, Yuri Karen Sinzato¹,
Débora Cristina Damasceno¹, Estela Maris Forell Bevilacqua², Iracema Mattos Paranhos
Calderon¹

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

2. Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto / Universidade de São Paulo/ USP, São Paulo, Brasil

Correspondência: Iracema MP Calderon

Rua Atílio Losi, 226 / Jd. Paraíso / Botucatu – CEP: 18610-260

São Paulo – Brasil/ email: calderon@fmb.unesp.br

Contato: (+55)(14) 38116227

*Artigo padronizado segundo as normas da revista *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*

Resumo

Objetivo –Avaliar a produção de IL-10 e TNF- α no sangue materno e placenta de gestantes com diabetes ou hiperglicemia. **Método** –192 gestantes foram distribuídas nos grupos: com risco e não diabético (FR+; TTG-100g e PG normais), hiperglicemia gestacional leve (HGL; TTG-100g normal e PG alterado), diabetes melito gestacional (DMG; TTG-100g e PG alterados na gestação) e DM2 (TTG-100g alterado prévio à gestação). IL-10 e TNF- α foram determinadas por ELISA, no sangue materno e placentas. **Resultados** –Todas as gestantes tinham o IMC compatível com sobrepeso ou obesidade. A média glicêmica (MG) diferenciou os grupos (DM2 = DMG > HGL > FR+). A produção de IL-10 na placenta não diferenciou os grupos, mas mostrou tendência à queda no sangue das mães DM2 ($0,79 \pm 0,92$ pg/mL; $p = 0,0591$). O TNF- α no sangue foi maior no DMG e menor no HGL ($6,42 \pm 10,36$ vs $1,95 \pm 1,37$ pg/mL; $p = 0,0190$); nas placentas, essa concentração foi maior no DM2 ($490,18 \pm 962,31$ pg/mL; $p = 0,0008$). Foram correlações significativas: (i) TNF- α sangue e IMC, inicial ($r = 0,56$; $p = 0,04$) e final ($r = 0,85$; $p = 0,0037$) e IL-10 placentária e IMC final ($r = -0,99$; $p < 0,001$) no HGL; (ii) IL-10 placentária e MG materna ($r = 0,99$; $p = 0,001$) no FR+ e (iii) TNF- α placentário e IMC inicial ($r = -0,88$; $p = 0,0091$) no DM2. **Conclusão** –A produção de TNF- α no sangue e placenta foi proporcional à gravidade do quadro clínico, e correspondente hiperglicemia materna, e antagônica à tendência de menor produção materna de IL-10 no DM2. A MG e o IMC influenciaram no balanço dessas citocinas.

Palavras chave: citocinas, diabetes, hiperglicemia gestacional leve, placenta

Abstract

Objective—At evaluating the IL-10 and TNF- α production in maternal blood and placenta from pregnant women with diabetes or hyperglycemia. **Methods** —192 pregnant women were distributed into groups: risk factor and nondiabetic (RF+; normal 100g-GTT + normal GP), mild gestational hyperglycemia (MGH; normal 100g-GTT + abnormal GP); gestational diabetes mellitus (GDM; 100g-GTT + GP abnormal in the pregnancy) and DM2 (100g-GTT + GP abnormal before pregnancy). **Results** —All the women presented a BMI corresponding to overweight or obesity. The glucose mean (GM) was statistically different among the groups (DM2 = GDM > MGH > RF+). IL-10 production in the placenta did not differ among the groups, but tended to decrease in the maternal blood DM2 (0.79 ± 0.92 pg/mL; $p = 0.0591$). TNF- α in blood was higher in GDM and lower in MGH (6.42 ± 10.36 vs 1.95 ± 1.37 pg/mL; $p = 0.0190$); in the placental samples there was increase in DM2 (490.18 ± 962.31 pg/mL; $p = 0.0008$). There were significant correlations: (i) Blood TNF- α initial BMI ($r = 0.56$; $p = 0.04$) and final BMI ($r = 0.85$; $p = 0.0037$) and placental IL-10 with final BMI ($r = -0.99$; $p < 0.001$) in MGH group (ii) placental IL-10 and GM ($r = 0.99$; $p = 0.001$) in RF+ group and (iii) placental TNF- α and initial BMI ($r = -0.88$; $p = 0.0091$) in DM2 group. **Conclusion**—Blood and placental TNF- α production was proportional to the severity of clinical state and it was according to maternal hyperglycemia, and opposed to the trend toward lower maternal production of IL-10 in DM2. The GM and BMI influenced the balance of these cytokines.

Keywords: cytokines, diabetes, mild gestational hyperglycemia, placenta

Introdução

Nas gestações complicadas por hiperglicemia, as alterações maternas, placentária e fetais não são restritas às mulheres portadoras de diabetes melito (DM), pré-gestacional (DM1 e DM2) ou gestacional (DMG). Elas ocorrem, também, em gestantes com níveis glicêmicos inferiores aos limites definidos para o DMG, quadro reconhecido na literatura atual como hiperglicemia gestacional leve (HGL) [1,2]. Gestantes portadoras de HGL (grupo IB de Rudge) já foram identificadas por Rudge desde 1990 [3], quando associou o teste oral de tolerância à glicose de 100g (TTG-100g) e o perfil glicêmico (PG), aplicados em paralelo, em todas as gestantes com risco para desenvolver DMG. As respostas a estes dois testes diferenciaram o DM gestacional e/ou pré-gestacional (TTG-100g e PG alterados, prévio ou na gestação; grupo IIB de Rudge), a HGL (TTG-100g normal e PG alterado; grupo IB de Rudge) e as mulheres com risco e não diabéticas (TTG-100g e PG normais; grupo IA de Rudge). No grupo HGL a mortalidade perinatal é 10 vezes maior que nas gestantes não diabéticas e a incidência de recém-nascidos macrossômicos ou grandes para idade gestacional é estatisticamente semelhante à observada nas gestantes diabéticas [3,4]. Diante desses achados, os autores passaram a orientar a inclusão deste grupo de gestantes no mesmo protocolo de tratamento das gestantes diabéticas.

Independentemente da classificação, o aumento progressivo da resistência à insulina na gestação e a redução da capacidade das células β pancreáticas de secretar insulina são fatores importantes na patogênese da hiperglicemia materna, de qualquer tipo ou intensidade [3,5]. A resistência materna à insulina foi descrita, durante muitos anos, como consequência da ação de hormônios placentários diabetogênicos (lactogênio placentário, progesterona, cortisol e outros). Atualmente, as citocinas inflamatórias estão sendo apontadas como fator diabetogênico adicional, entre elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [6,7]. De modo contrário, a IL-10, de ação imunossupressora e antiinflamatória, tem sido postulada como mediadora na produção das citocinas inflamatórias da gestação, incluindo o TNF- α [8,9]. Por

sua ação reguladora sobre a produção de TNF- α , a IL-10 deve, portanto, prevenir a cascata dos eventos adversos resultantes da hiperglicemia materna.

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória, inicialmente classificada na subpopulação Th2 e produzida por células do sistema imunológico e da interface materno fetal. Tem papel fundamental na manutenção da gestação, por exercer efeito protetor na unidade feto-placentária, inibindo a secreção de citocinas inflamatórias, tais como o próprio TNF- α , a IL-6 e o interferon gama (IFN- γ)[8]. A IL-10, associada a IL-4 e IL-13, modula a invasão trofoblástica e favorece o desenvolvimento placentário e fetal [9,10]. Alguns autores identificaram maior produção de IL-10 nas gestações de bom prognóstico quando comparadas àquelas de risco [11].

O TNF- α é produzido por células do sistema imune, do tecido adiposo e, na gestação, também na interface materno fetal, quando a placenta passa a ser a fonte primária de sua produção. Essa citocina atua na cascata de sinalização insulínica, inibindo a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em tirosina, impedindo a captação da glicose pelo transportador GLUT 4[7,12,13]. Estudos *in vitro*, em placentas de gestantes com DMG, evidenciaram que a produção dessa citocina é proporcional à concentração de glicose[6].

Os resultados de estudos que relacionam concentrações de citocinas nas gestações complicadas pelo DM clínico ou gestacional são controversos e ainda não totalmente definidos. Especificamente, nas mulheres portadoras de HGL esses estudos inexistem. Considerando que a hiperglicemia interfere no papel regulatório da placenta e favorece o desvio do balanço das citocinas, diferentes concentrações de IL-10 e TNF- α deverão ser observadas nos vários tipos e intensidade de hiperglicemia associada à gestação. Assim, o objetivo desse estudo foi (i) avaliar as concentrações maternas e placentárias de IL-10 e TNF- α e (ii) identificar fatores que se correlacionam com a produção dessas citocinas nos

grupos de gestantes portadoras de HGL, DMG e DM2, comparadas a gestantes não diabéticas, com risco para DMG (grupo FR+).

Método

Este estudo foi realizado no Serviço Especializado de Diabete e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP, Brasil, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (anexo 1).

Desenho e Sujeitos do Estudo

Estudo de corte transversal, que avaliou as concentrações de IL-10 e TNF- α , no sangue materno e placenta, de 192 gestantes portadoras de hiperglicemia de origem e intensidade variada. As gestantes com DM2 foram referenciadas para o Serviço com o diagnóstico já confirmado. Todas as gestantes identificadas com risco para desenvolver diabete na gestação (glicemia de jejum ≥ 90 mg/dL e/ou presença de fator de risco) foram submetidas ao TTG-100g e ao PG, aplicados em paralelo, entre a 24^a. e a 28^a. semanas de gestação; as respostas aos dois testes foram consideradas para o diagnóstico de DMG e de HGL [3,4,14]. O TTG-100g alterado confirmou o diagnóstico de DMG [5]; para o diagnóstico de HGL, considerou-se a resposta normal ao TTG-100g associada ao PG alterado [3,4]. As gestantes com os dois testes normais foram consideradas como portadoras de risco para DMG, entretanto, não diabéticas e não hiperglicêmicas.

Assim, de acordo com os resultados do TTG-100g e do PG, as 192 gestantes foram classificadas nos grupos: FR+(n=72; TTG-100g e PG normais), HGL (n=44; TTG-100g normal e PG alterado), DMG (n=59; TTG-100g e PG alterados na gestação) e DM2 (n=17; TTG 100g alterado prévio à gestação) (Quadro 1) [3,4].

Acompanhamento dos sujeitos

As gestantes FR+ não foram tratadas. Para o controle da hiperglicemia materna seguiu-se o protocolo do Serviço, utilizando-se o PG, com níveis glicêmicos de jejum, pré e pós prandiais avaliados por 24 horas, em intervalos de duas semanas até a 32ª. semana e, semanalmente, desta idade gestacional ao parto. As gestantes com HGL e DMG foram tratadas com dieta, indicada por nutricionista, associada a exercício e, quando necessário, iniciou-se a terapia insulínica. As mulheres com DM2 foram tratadas com dieta, exercício e terapia insulínica desde o início da gestação [4,5,15,16].

Crítérios de inclusão e exclusão e caracterização dos sujeitos

Os critérios de inclusão foram definidos por (a) ser classificada nos grupos de estudo; (b) ter idade gestacional máxima de entrada no protocolo de tratamento de 30 semanas para as portadoras de HGL e DMG e de 20 semanas para as gestantes DM2; (c) realizar assistência pré-natal e parto no Serviço; (d) assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídas as gestações múltiplas, as com malformações fetais e aquelas com parto antes da 34ª. semana.

A população de gestantes foi caracterizada por idade gestacional no parto, hábito de tabagismo e presença de hipertensão arterial, peso e índice de massa corporal, iniciais e finais, média glicêmica (MG) no período de tratamento e níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) no terceiro trimestre da gestação. A MG foi calculada pela média aritmética das glicemias plasmáticas avaliadas em todos os PG realizados no diagnóstico (grupo FR+) e no controle de tratamento (grupos DM2, DMG e HGL). A glicose plasmática foi avaliada pelo método da glicose oxidase (Glucose – analyzer II Beckman, Fullerton, CA, USA[®]) e, a HbA1c, pelo método de cromatografia (*High-performance liquid chromatography* - D10TM Hemoglobin Testing System, BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA[®]).

Coleta do sangue materno e avaliação das citocinas

A partir da 34ª. semana de gestação e antes do início do trabalho de parto, amostras de sangue materno (5 a 10mL) foram coletadas em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Uma alíquota desta amostra foi separada e imediatamente encaminhada para dosagem dos níveis de HbA1c. A amostra restante foi centrifugada a 4 °C, por 15 minutos, a 1000g, e o plasma foi armazenado a -80°C até a dosagem das citocinas.

As concentrações plasmáticas de IL-10 e TNF- α foram determinadas por ensaio imunoenzimático (Human IL-10 Quantikine ELISA kit e Human TNF- α Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA[®]), de acordo com as especificações do fabricante. Para o cálculo das concentrações de cada sujeito utilizou-se a curva padrão do produto, construída durante o ensaio.

Coleta das placentas e avaliação das citocinas

As placentas de todas as gestantes foram coletadas no momento do parto, imediatamente lavadas com solução salina e, em seguida, foi retirada uma amostra da região vilosa, respeitando-se uma margem mínima de 2 cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária [15]. Estes fragmentos foram armazenados em nitrogênio até a análise. Para estas avaliações, 10 amostras de tecido placentário de cada grupo foram selecionadas por randomização eletrônica (*computer-generated randomization*).

Os fragmentos congelados de placenta foram macerados em tampão com *cocktail* de inibidores de proteases. Após o preparo do macerado placentário foi realizada a dosagem proteica das amostras e, em seguida, o ensaio imunoenzimático (Human IL-10 Quantikine ELISA kit e Human TNF- α Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA[®]), de acordo com as especificações do fabricante. Para o cálculo das concentrações de cada sujeito utilizou-se a curva padrão do produto, construída durante o ensaio.

Análise estatística

Para as variáveis quantitativas com distribuição normal foram empregados análise de variância e teste de comparações múltiplas de Tukey. Para as variáveis quantitativas com distribuição anormal foram utilizados o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gama e função de ligação log e o *LSMeans Test* para as comparações múltiplas. Para o estudo das associações, utilizou-se a correlação de Spearman para as variáveis quantitativas com distribuição anormal e o teste de qui-quadrado de Pearson para as variáveis quantitativas com distribuição normal. As análises foram realizadas no software SAS, versão 9.1, considerando-se o limite de significância estatística de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

Características Maternas

As gestantes dos grupos DMG e DM2 eram mais velhas e apresentaram menor idade gestacional no parto. Apesar disso, todos os partos ocorreram no termo das gestações (IG no parto superior a 37 semanas). As mulheres do grupo DMG tinham o maior peso inicial ($89,07 \pm 23,41$ Kg; $p < 0,0001$) e os maiores valores de IMC inicial ($34,37 \pm 7,96$ Kg/m²; $p = 0,0023$); esta última característica também foi observada no grupo HGL (IMC inicial = $34,24 \pm 9,10$ Kg/m²; $p = 0,0023$). No grupo HGL observou-se tendência aos maiores valores de IMC final ($37,87 \pm 8,82$ Kg/m²; $p = 0,0053$). A média glicêmica (MG) da gestação foi mais elevada nos grupos DMG e DM2 (respectivamente, $107,68 \pm 13,85$ e $114,50 \pm 22,54$ mg/dL), valores intermediários foram avaliados no grupo HGL ($97,53 \pm 9,62$ mg/dL) e o grupo FR+ apresentou os menores níveis de glicemia plasmática ($81,08 \pm 9,13$ mg/dL) ($p < 0,0001$). Os níveis de HbA1c do terceiro trimestre confirmaram os níveis de MG observados; os maiores valores corresponderam aos grupos DMG ($6,14 \pm 0,74$ %) e DM2 ($6,53 \pm 0,86$ %) ($p < 0,0001$) (Tabela 1).

A proporção de tabagistas e de hipertensas não diferenciou os grupos de gestantes. Entretanto, a hipertensão arterial crônica predominou no grupo DM2 (58,82%) e os casos de hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE) foram mais frequentes no grupo FR+ (22,22%; $p = 0,0020$). A cesárea foi mais prevalente no grupo DM2 (82,35%; $p = 0,0018$) (Tabela 1).

Concentrações de IL-10 e TNF- α no sangue materno e placenta

As concentrações de IL-10 no sangue materno e na placenta não diferenciaram os grupos avaliados. Apesar disso, observou-se tendência à redução de IL-10 no sangue de mães do grupo DM2 ($0,79 \pm 0,92$ pg/mL; $p = 0,0591$) (Tabela 2).

As concentrações de TNF- α no sangue materno e placenta diferenciaram os grupos estudados. No sangue materno, o grupo DMG apresentou as maiores concentrações de TNF- α ($6,42 \pm 10,36$ pg/mL); o grupo FR+ teve valores intermediários e as menores concentrações foram observadas no grupo HGL ($1,95 \pm 1,37$ pg/mL) ($p = 0,0190$). Na placenta, níveis elevados de TNF- α foram avaliados no grupo DM2 ($490,18 \pm 962,31$ pg/mL); o grupo FR+ apresentou níveis intermediários e os menores valores foram confirmados nos grupos DMG ($66,13 \pm 48,42$ pg/mL) e HGL ($51,76 \pm 37,62$ pg/mL) ($p = 0,0008$) (Tabela 2).

Correlações entre características maternas e concentrações de IL-10 e TNF- α

No grupo HGL, o IMC, inicial e final, mostrou correlação positiva com TNF- α do sangue materno, com valores de r correspondentes, respectivamente, a 0,56 ($p = 0,04$) e 0,85 ($p = 0,0037$); o IMC final se correlacionou inversamente com a concentração de IL-10 placentária ($r = -0,99$; $p < 0,001$); (Figura 1). No grupo FR+ observou-se correlação positiva entre MG e IL-10 da placenta ($r = 0,99$; $p = 0,001$). No grupo DM2 confirmou-se correlação inversa entre IMC inicial e TNF- α placentário ($r = -0,88$; $p = 0,0091$) (Figura 2).

Discussão

Os resultados deste estudo evidenciaram comportamentos diferenciados na produção de TNF- α no sangue e placenta, proporcional à gravidade do quadro clínico materno e, conseqüentemente, aos níveis de hiperglicemia. As concentrações de IL-10 no sangue materno indicaram tendência à menor produção nos quadros mais graves do diabetes. Estes achados sugerem influência do tipo e da intensidade da hiperglicemia materna no balanço das citocinas anti e pró-inflamatórias e reforçam dados da literatura sobre a ação regulatória da IL-10 sobre o TNF- α [8,9].

A relação direta entre produção de IL-10 e sucesso na gestação inicial já foi demonstrada anteriormente, por Wu [11], comparando gestações normais com aquelas de risco gestacional,

que resultaram em perdas fetais. A hiperglicemia representa risco gestacional, desde a implantação do blastocisto, no DM prévio à gestação, até o final da gestação e parto, no diabetes prévio ou gestacional [3,4,16,17]. Assim, seria esperada redução na concentração de IL-10 nos grupos de mães com hiperglicemia, proporcional à gravidade do quadro clínico e dos níveis de hiperglicemia.

Em nosso estudo, as concentrações plasmáticas de IL-10 mostraram tendência à queda no quadro mais grave (DM2). Apesar dessa tendência, não se confirmou correlação entre IL-10 com a MG materna. Os resultados de IL-10 nas gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia são poucos e controversos. Um estudo demonstrou aumento da concentração de IL-10 no soro de gestantes com DMG [18]. Em outro estudo, as concentrações maternas de IL-10 não foram diferentes no DMG, apesar da identificação do polimorfismo (SNP; -597) no gene promotor de IL-10, que correspondeu a aumento no risco (2,2 vezes) de desenvolver DMG [19]. Neste estudo, o tratamento das gestantes diabéticas e hiperglicêmicas manteve a MG e os níveis de HbA1c em limites característicos do controle glicêmico adequado (74,5% das gestantes com HbA1c <6,5%) [15,17,19]. Isto pode explicar a não diferenciação nas concentrações plasmáticas de IL-10 e a falta de correlação com a MG.

As concentrações placentárias de IL-10 foram semelhantes em todos os grupos avaliados, mas mostraram dependência direta da MG no grupo FR+ e indireta do IMC final no grupo HGL. O IMC caracterizou obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$) [20] em todas as gestantes do estudo no final da gestação; a MG foi mantida nos limites de normoglicemia [15,17] nos grupos DM2, DMG e HGL, isto pode ter minimizado o efeito adverso da hiperglicemia na produção de IL-10 pela placenta. Além do IMC e da MG, o número de 10 amostras placentárias, avaliadas em cada grupo, pode ter sido insuficiente para demonstrar as diferenças esperadas nas concentrações de IL-10 placentárias.

Na literatura consultada poucos estudos relacionam produção placentária de IL-10 com diabetes ou hiperglicemia, o que dificulta a discussão de nossos resultados. Uma revisão recente e completa sobre IL-10 e gravidez destaca seu papel imunomodulador e antigênico, associado ao estímulo à angiogênese placentária na gestação normal. A redução de IL-10 nas placentas foi relacionada a perdas fetais, parto prematuro e pré-eclâmpsia, sem referência ao diabetes materno [9]. Outro estudo, com cultura de células trofoblásticas, concluiu que a hiperglicemia facilita o acúmulo de glicogênio intracelular, mas não tem efeito sobre o metabolismo ou a função do trofoblasto. Os ácidos graxos não esterificados, aumentados no diabetes, teriam papel mais importante no incremento da produção de citocinas placentárias, tanto inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), como antiinflamatórias (IL-10) [21]. Futuras investigações, com maior número de placentas e gestantes, pareadas por faixas de glicemia e de IMC, deverão contribuir para a definição do papel da IL-10 na placenta de gestantes diabéticas ou hiperglicêmicas.

Em nosso estudo, as concentrações maternas de TNF- α foram diferentes entre os grupos (DMG \geq FR+ \geq DM2 > HGL); no grupo HGL, estas concentrações plasmáticas foram diretamente dependentes do IMC inicial e final. A produção placentária de TNF- α também diferenciou os grupos avaliados (DM2 > FR+ > DMG = HGL); no grupo DM2, a produção placentária de TNF- α mostrou correlação inversa com o IMC inicial.

Na literatura, a produção de TNF- α é diretamente dependente do IMC e do nível de glicose maternos, tendo reconhecido papel na gênese da resistência à insulina (RI) na evolução da gestação [6,7,22-28]. Nossos resultados não reproduziram totalmente os já encontrados na literatura. As relações entre TNF- α e glicemia materna não foi observada e a relação inversa entre IMC inicial e TNF- α placentário no grupo DM2 não foi um resultado esperado. Independentemente do grupo, a obesidade, característica marcante em todos os grupos, e a MG, nos limites de normalidade, devem ter influenciado nossos resultados. Outras avaliações,

com estas características maternas melhor diferenciadas, deverão esclarecer estas controvérsias.

Chama atenção o elevado valor das concentrações de TNF- α no sangue de mães do grupo FR+, comparável aos grupos DMG e DM2. Essa citocina já foi relacionada à regulação do metabolismo de glicose e de lipídios e à resistência insulínica [6] e, por sua ação inflamatória no endotélio vascular, a hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE) [29-31]. Apesar da normoglicemia, as gestantes do grupo FR+ tinham sobrepeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 30 \text{ Kg/m}^2$) no início e tornaram-se obesas ($\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) no final da gestação; as mulheres dos outros grupos sempre foram obesas. Entre as gestantes do grupo FR+, 22,2% apresentaram HG e PE, proporção significativamente maior que nos outros grupos. Portanto, o "dismetabolismo" acelerado e a maior ocorrência de PE devem justificar o aumento de TNF- α no sangue das mães desse grupo.

Na placenta, a produção de TNF- α foi mais elevada no grupo DM2, seguido do grupo FR+ e os menores valores foram observados nos grupos DMG e HGL. Alguns dados da literatura devem ser considerados na discussão deste resultado: (i) o ambiente inflamatório pré-existente nas mulheres com DM2 estimula a produção placentária de TNF- α na gestação[12]; (ii) nas gestações diabéticas, a placenta e o tecido adiposo respondem ao aumento de glicose e tornam-se fontes importantes de produção de TNF- α [6]. Assim, o ambiente inflamatório, decorrente do tipo do diabetes e da intensidade da hiperglicemia, e o IMC maternos foram fatores determinantes na produção placentária de TNF- α . Entretanto, não explicariam a produção elevada de TNF- α no grupo FR+, sem diabetes ou hiperglicemia. Neste grupo específico, o ambiente inflamatório decorrente da associação com a PE [29-31] parece ter sido mais importante que aquele associado à hiperglicemia.

Em síntese, os resultados do nosso estudo indicaram que, nas gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia, o balanço na produção das citocinas IL-10 e TNF- α foi

influenciado pelo tipo de diabetes ou de hiperglicemia gestacional, o que diferenciou a intensidade da hiperglicemia refletida diretamente no ambiente intrauterino. Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram que, nestas gestações, pequenas variações nos níveis da hiperglicemia materna determinam alterações na angiogênese [15,32,33] e na apoptose celular placentárias [33,34], decisivas para o prognóstico da gestação. Do ponto de vista clínico, nossos resultados reforçam a importância do controle da hiperglicemia materna, independentemente do diagnóstico de diabetes ou de hiperglicemia gestacional leve.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, e ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP, pelo suporte técnico na análise estatística.

Declaração de interesse

Não existe conflito de interesse

Referências

- [1] International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676-682.
- [2] Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. The HAPO Study Cooperative Research Group. *N Engl J Med* 2008; 358:1991-2002.
- [3] 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; 23:107-1089.
- [4] 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; 50:108-112.
- [5] 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; 33:676-682.
- [6] Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JM, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor- α from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2001;18:921-927.
- [7] Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; 51:2207-2213.
- [8] Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989; 46:111-147.

- [9]Thaxton JE, Sharma S. Interleukin -10: A multi-faceted agent of pregnancy. Am J Reprod Immunol 2010; 63:482-491.
- [10]Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Ng SC. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. Gynecol Endocrinol 2000; 14:305-310.
- [11]Wu MY, Chen HF, Chen SU, Chao KH, Yang YS, Ho HN. Increase in production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. Am J Reprod Immunol 2001; 46:386–392.
- [12]Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Trends Endocrinol Metab 2000; 11:212-217.
- [13]Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. J Clin Invest 2001; 107:181-189.
- [14].Gillmer MDG, Beard RW, Brooke FM, Oakley NW. Carbohydrate metabolism in pregnancy. Br Med J 1975; 3:399–404.
- [15]Calderon IM, Damasceno DC, Amorim 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; 78:65-71.
- [16]Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Maestá I, Souza LMS, Peraçoli JC. Perspectiva perinatal decorrentes do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelo diabetes. Rev Bras Ginec Obstet 1995; 17:26-32.

[17] 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 materno e perinatal. *Rev Bras GinecolObstet* 2005; 27:691-697.

[18] Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J ClinEndocrinolMetab* 2006; 91:4137-4143.

[19] Montazeri S, Nalliah S, Radhakrishnan AK. Is there a genetic variation association in the IL-10 and TNF alpha promoter gene with gestational diabetes mellitus? *Hereditas* 2010; 147:94-102.

[20] World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/en/>.

[21] Pathmaperuma AN, Maña P, Cheung SN, Kugathas K, Josiah A, Koina ME, Broomfield A, Delghingaro-Augusto V, Ellwood DA, Dahlstrom JE, Nolan CJ. Fatty acids alter glycerolipid metabolism and induce lipid droplet formation, syncytialisation and cytokine production in human trophoblasts with minimal glucose effect or interaction. *Placenta* 2010; 31:230-239.

[22] Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, Sargent I, Redman C. Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. *ClinExpImmunol* 1992; 88:174-180.

[23] Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajós P, Salamon F, Turi Z, Kovács M, Vargha P, Karádi I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res ClinPract* 2002; 56:93-99.

[24] Kinalski M, Kuzmicki M, Telejko B, Bachórzewski R, Buraczyk M, Kretowski A, Kinalska I. Tumor necrosis factor-alpha system in patients with gestational diabetes. *PrzeglLek* 2006; 63:173-175.

[25]McLachlan K, O'Neal D, Jenkins A, Alford F. Do adiponectin, TNF- α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:131-138.

[26]Altinova AE, Toruner F, Bozkurt N, Bukan N, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N, Arslan M. Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in gestational diabetes mellitus. *GynecolEndocrinol* 2007; 23:161-165.

[27]Richardson AC, Carpenter MW. Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus. *ObstetGynecolClin North Am* 2007; 34:213-224.

[28]Gao XL, Yang HX, Zhao Y. Variations of tumor necrosis factor-alpha, leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121:701-705.

[29]Saito S, Sakai M: Th1/Th2 balance in preeclampsia. *JReprodImmunol* 2003; 59:161–173.

[30]Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta* 2003; 24:S21–S27.

[31]Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J ReprodImmunol*.2007; 57:177-85.

[32]Pietro L, Daher S, Rudge MV, Calderon IM, Damasceno DC, Sinzato YK, Bandeira C, Bevilacqua E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta* 2010; 3:7707-80.

[33]Carvalho Silva SAL. 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]. Faculdade de Medicina (Botucatu): Universidade Estadual Paulista; 2010.

[34]Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MAM, Costa E, Calderon IMP, Gonçalves CR, Bevilacqua E, Rudge MV. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res ClinPract* 2006; 73:143-149.

Quadro 1 – Definição dos grupos de estudo

	TTG 100g	PG
FR+	normal	normal
HGL	normal	alterado
DMG (diagnóstico na gestação)	alterado	alterado
DM2 (diagnóstico prévio à gestação)	alterado	alterado
TTG-100g: teste de tolerância à glicose com sobrecarga de 100g; PG: perfil glicêmico		

Tabela 1- Características maternas da população estudada

	FR+(n = 72)	HGL (n = 44)	DMG (n = 59)	DM2 (n = 17)	
	m(dp)	m(dp)	m(dp)	m(dp)	<i>p</i> *
Idade (anos)	28,36(6,66)b	31,81(5,53)a,b	32,23(6,34)a	32,24(5,60)a	0,0013
IG (dias)	269,89(11,47)a,b	271,66(9,00)a	264,48(11,05)a,b	259,82(3,49)c	<0,0001
Peso In (kg)	75,39(20,33)b	85,95(23,21)a,b	89,07(23,41)a	77,43(17,31)a,b	0,0062
Peso Fi (Kg)	87,15(20,00)	96,00(22,77)	95,42(16,31)	90,69(19,83)	0,2318
IMC In (Kg/m ²)	28,99(7,66)b	34,24(9,10)a	34,37(7,96)a	31,69(6,66)a,b	0,0023
IMC Fi (Kg/m ²)	33,28(7,22)	37,87(8,82)	36,63(5,20)	35,79(7,62)	0,0553
MG (mg/dL)	81,08(9,13)c	97,53(9,62)b	107,68(13,85)a	114,50(22,54)a	<0,0001
HbA1c (%)	5,50(0,53)b	5,72(0,76)b	6,14(0,74)a	6,53(0,86)a	<0,0001
MG: média glicêmica; IG: idade gestacional no parto; In: inicial; Fi: final; IMC: índice de massa corporal. *Valores de cada variável seguidos de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade					
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	<i>p</i>
Tabagistas	12(16,66)	8(18,18)	13(22,03)	7(41,17)	0,3898
HA total	29(40,27)	16(36,36)	26(44,06)	10(58,82)	0,8413
Tipos HA					0,0020
HAC	13(18,05)a,b	13 (29,55)a,b	21(35,60)a	10(58,82)b	
HG+PE	16(22,22)a	3(6,82)b	5(8,50)b	0 (0,0)b	
Cesárea	31(43,05)b	23(52,27)b	39(66,10)b	14(82,35)a	0,0018
HA: hipertensão arterial; HAC: hipertensão arterial crônica; HG: hipertensão gestacional; PE: pré- eclâmpsia *Valores de cada variável seguidos de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade					

Tabela 2- Níveis de citocinas IL-10 e TNF- α no sangue materno e nas placentas.

		FR+	HGL	DMG	DM2	p^*
IL-10 Sg (pg/mL)	Média (dp)	3,60(6,88)	1,20(0,98)	2,01(2,62)	0,79(0,92)	0,0591
	Mediana (P25; P75)	1,56 (0,75;3,57)	1,00 (0,55;1,19)	1,26 (0,34;2,65)	0,53 (0,19;1,39)	
IL-10 Pl (pg/mL)	Média (dp)	1595,58(1360,80)	1183,09(938,55)	724,83(871,56)	834,83(831,42)	0,5094
	Mediana (P25; P75)	1451,81 (479,27; 2711,90)	803,06 (762,82;1859,55)	317,37 (216,20;675,00)	451,41 (391,52;2032,31)	
TNF- α Sg (pg/mL)	Média (dp)	4,43 (6,65)a,b	1,95(1,37)c	6,42(10,36)a	3,15(2,46)b	0,0190
	Mediana (P25; P75)	1,90 (0,90;5,72)	1,88 (0,90;3,20)	2,13 (1,07;4,30)	1,88 (1,62;3,96)	
TNF- α Pl (pg/mL)	Média (dp)	179,59 (179,94)b	51,76(37,62)c	66,13(48,42)c	490,18(962,31)a	0,0008
	Mediana (P25; P75)	126,97 (71,84;287,35)	52,15 (38,78;62,25)	2,13 (1,07;96,96)	122,20 (70,75;214,60)	

Sg: sangue materno; Pl: placenta.
*Valores de cada variável seguidos de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

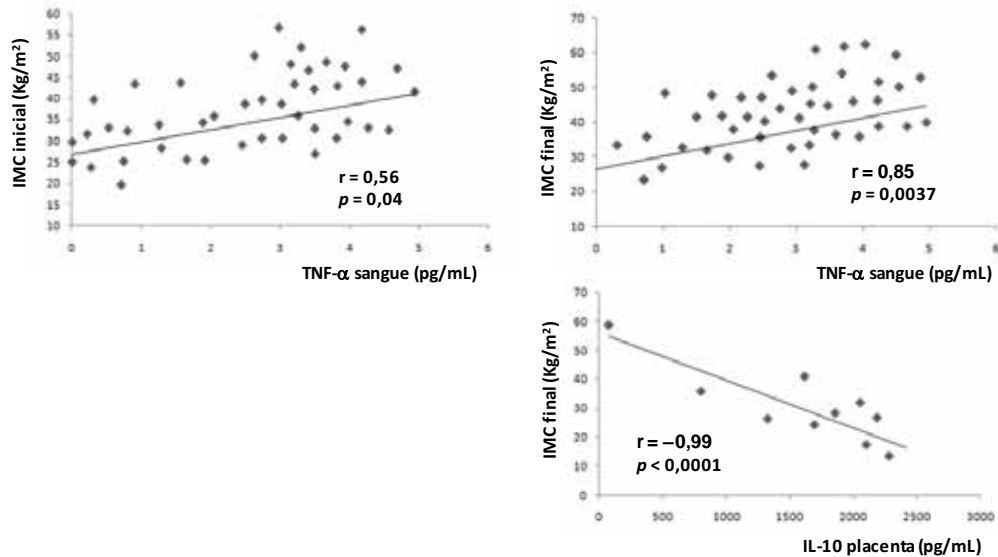


Figura 1 – Correlações significativas no grupo HGL

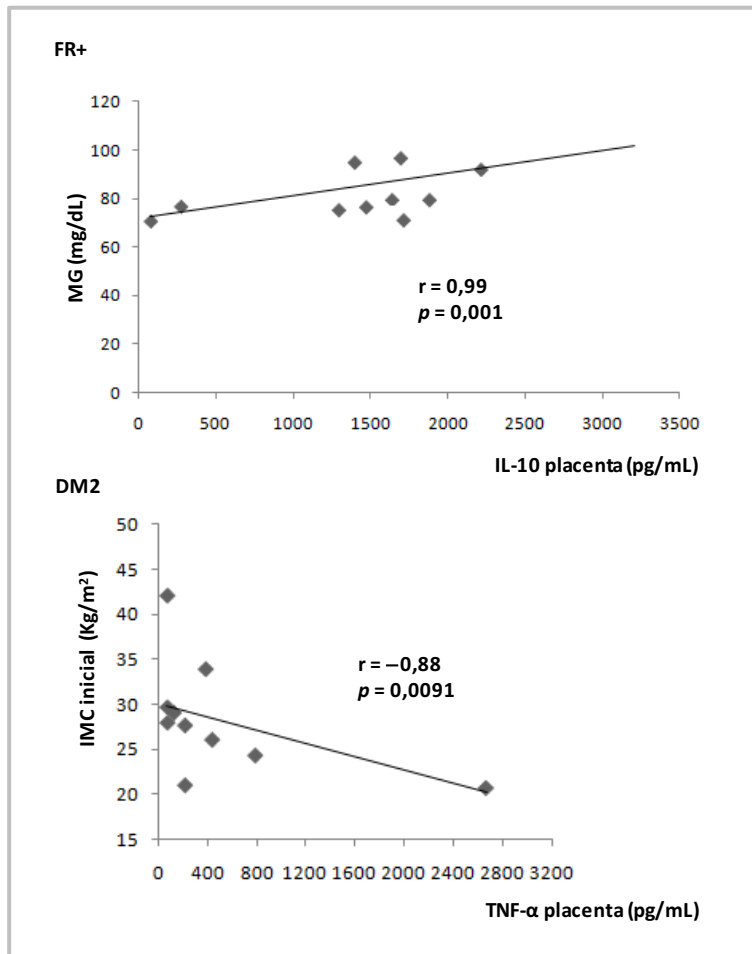


Figura 2 – Correlações significativas nos grupos FR+ e DM2

*Artigo II – Influência da hiperglicemia materna na produção de IL-10 e
TNF- α – relação com resultados perinatais*

INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA MATERNA NA PRODUÇÃO DE IL-10 E TNF- α
– RELAÇÃO COM RESULTADOS PERINATAIS*

Influence of maternal hyperglycemia in the IL-10 and TNF- α production
– relationship with perinatal results

Jusciele Brogin Moreli, Glilciane Morceli, Ana Karina C De Luca, Claudia G Magalhães, Roberto AA Costa,
Débora Cristina Damasceno, Marilza Vieira Cunha Rudge, Iracema Mattos Paranhos Calderon

*Programa de PG em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia / Faculdade de Medicina de Botucatu/Univ.
Estadual Paulista_UNESP, São Paulo, Brasil*

Correspondência: Iracema MP Calderon

Rua Atílio Losi, 226 / Jd. Paraíso / Botucatu – CEP:18610-260

São Paulo – Brasil/ email: calderon@fmb.unesp.br

Contato: (+55) (14) 38116227

*Artigo padronizado segundo as normas da revista ***Journal of Perinatal Medicine***

Resumo

Objetivo – Avaliar as concentrações maternas e placentárias de IL-10 e TNF- α e correlacioná-las com resultados perinatais em gestações complicadas por hiperglicemia, ou com risco para desenvolvê-la, diferenciadas pela média glicêmica (MG < ou \geq 100mg/dL). **Método** – Foram incluídas 186 gestantes distribuídas nos grupos MG < 100 mg/dL e MG \geq 100 mg/dL. Avaliou-se a média glicêmica (MG), os níveis de HbA1c, as concentrações maternas e placentárias de IL-10 e TNF- α e a correlação das citocinas placentárias com os resultados perinatais. **Resultados** – No sangue materno, as menores concentrações de IL-10 ($1,01 \pm 0,87$ vs $3,08 \pm 5,57$ pg/mL; $p = 0,0019$) e de TNF- α ($3,33 \pm 0,17$ vs $5,67 \pm 0,15$ pg/mL; $p = 0,0185$) foram observadas no grupo MG \geq 100 mg/dL. As placentas deste grupo tiveram maiores concentrações de TNF- α ($307,42 \pm 784,60$ vs $108,59 \pm 109,92$ pg/mL; $p = 0,0385$). A IL-10 placentária se correlacionou diretamente com os níveis de hemoglobina ($r = 0,63$; $p = 0,02$) e insulina ($r = 0,78$; $p = 0,01$) do cordão umbilical e com os índices de Apgar 1 ($r = 0,53$; $p = 0,0095$) e Apgar 5 ($r = 0,69$; $p = 0,0003$). O TNF- α placentário mostrou tendência à correlação inversa com o peso fetal ($r = -0,41$; $p = 0,05$). **Conclusão** – A MG \geq 100mg/dL se associou à queda dos níveis maternos de IL-10 e TNF- α e aumento na produção placentária de TNF- α . IL-10 placentária foi semelhante nos dois grupos e se correlacionou diretamente com hemoglobina e insulina do cordão umbilical e com os índices de Apgar de 1º. e 5º. minutos. TNF- α placentário mostrou tendência à correlação inversa com o peso dos recém-nascidos.

Palavras chave: citocinas, diabetes, hiperglicemia gestacional leve, placenta, resultados perinatais.

Abstract

Objective – At evaluating the IL-10 and TNF- α production in maternal blood and placenta and correlate them with perinatal outcomes in pregnancies complicated by hyperglycemia, or with risk to developing it, differentiated by the glycemc mean (GM < or \geq 100mg/dL). **Method**– 186 pregnant women were distributed into groups GM < 100 mg/dL and GM \geq 100 mg/dL. We evaluated the GM, HbA1c levels, maternal and placental IL-10 and TNF- α and the correlation between placental cytokines and perinatal outcomes. **Results** – In maternal blood, the lower concentrations of IL-10 (1.01 ± 0.87 vs. 3.08 ± 5.57 pg / mL, $p = 0.0019$) and TNF- α (3.33 ± 0.17 vs 5.67 ± 0.15 pg / mL, $p = 0.0185$) were observed in GM \geq 100 mg / dL group. The placentas in this group had higher concentrations of TNF- α (307.42 ± 784.60 vs 108.59 ± 109.92 pg / mL, $p = 0.0385$). Placental IL-10 was directly correlated with hemoglobin levels ($r = 0.63$, $p = 0.02$) and insulin ($r = 0.78$, $p = 0.01$) from umbilical cord and with Apgar scores 1 ($r = 0.53$, $p = 0.0095$) and Apgar 5 ($r = 0.69$, $p = 0.0003$). Placental TNF- α showed a tendency toward inverse correlation with fetal weight ($r = - 0.41$, $p = 0.05$). **Conclusion** – GM \geq 100mg/dL was associated with decreased of maternal IL-10 and TNF- α and increased placental TNF- α . Placental IL-10 was similar in both groups and correlated directly with hemoglobin and insulin and with Apgar scores of 1st. and 5th. minutes. Placental TNF- α showed a inverse tendency toward correlation with newborns weigh.

Key words: cytokines, diabetes, mild gestational hyperglycemia, placenta, perinatal outcomes.

Introdução

Diabetes melito (DM) é doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, decorrente de defeito na ação e/ou produção de insulina [1]. Na gestação, a hiperglicemia representa risco para a saúde materna, fetal e perinatal [2-6]. Classicamente, os recém nascidos (RN) de mães com hiperglicemia apresentam risco aumentado de malformações, macrossomia, hipóxia e morte perinatal, associado a hipoglicemia e hiperbilirrubinemia, hiperinsulinismo, hiperleptinemia e hipertrofia das células beta-pancreáticas [6,7]. Estas alterações metabólicas favorecem a obesidade e a resistência à insulina, com decorrente risco cardiovascular na vida pós-natal [8,9].

A literatura atual reconhece a hiperglicemia materna, e seu conseqüente risco gestacional, em situações nas quais, apesar do risco, os critérios diagnósticos para diabete melito gestacional (DMG) ainda não foram alcançados. Estes casos são classificados como hiperglicemia gestacional leve (HGL) e, pelo risco gestacional já confirmado, devem ser tratados à semelhança do DMG [10,11]. As gestantes portadoras de HGL já foram identificadas por Rudge desde 1990 [12], quando associou o teste oral de tolerância à glicose de 100g (TTG-100g) e o perfil glicêmico (PG), aplicados em paralelo, em todas as gestantes com fator de risco positivo (FR+) para o DMG. As respostas a estes dois testes diferenciaram o DM gestacional e/ou pré-gestacional (TTG-100g e PG alterados, prévio ou na gestação), a HGL (TTG-100g normal e PG alterado) e as mulheres com FR+ e não diabéticas (TTG-100g e PG normais). No grupo HGL a mortalidade perinatal é 10 vezes maior que nas gestantes não diabéticas e a incidência de recém-nascidos macrossômicos ou grandes para idade gestacional é estatisticamente semelhante à observada nas gestantes diabéticas [2,12]. O risco atribuível de morte perinatal neste grupo é de 4,16%, comparável ao identificado nos grupos com DMG e DM pré-gestacional (6,12%) [4]. Diante desses achados, os autores passaram a orientar a inclusão deste grupo de gestantes no mesmo protocolo de tratamento das gestantes diabéticas.

A placenta constitui a interface entre o meio materno e fetal, desempenhando papel importante na manutenção e proteção do feto em desenvolvimento. É órgão temporário e exclusivo da gestação e desempenha funções múltiplas – atua como barreira de proteção contra agentes patogênicos e anticorpos maternos; tem função endócrina ativa, capaz de sintetizar e secretar hormônios, fatores de crescimento e citocinas, e tem metabolismo próprio e dependente dos níveis de glicose do meio intrauterino. A glicose materna tem receptores específicos na membrana placentária, que facilitam o seu transporte e o aporte exagerado para o meio intrauterino. Esta condição de hiperglicemia interfere com a formação, a função e o desenvolvimento da placenta e com o resultado da gestação [13-15].

Resultados anteriores do nosso grupo já demonstraram alterações na proliferação vascular, e em seus biomarcadores (VEGF), na apoptose (Caspase 3) em placentas de gestações complicadas pela hiperglicemia materna [15-18]. Alguns desses resultados confirmaram que a média glicêmica (MG) materna, nos limites de 100 a 120mg/dL, já seria fator determinante para alterações na angiogênese e vascularização placentária, com repercussões nas funções de nutrição e oxigenação do feto em desenvolvimento. Clinicamente, a incapacidade da placenta em garantir a nutrição e a oxigenação, aumentaria o risco de desvios no crescimento fetal, de hipóxia e morte intrauterina nas gestações complicadas pelo diabetes materno [2,7].

Na gestação normal, a placenta produz citocinas inflamatórias, classicamente da subpopulação de linfócitos Th1, e antiinflamatórias, da subpopulação Th2. De interesse nesse estudo, a produção placentária do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 10 (IL-10) está envolvida no balanço Th1–Th2, condição importante para evolução normal da gestação [19]. Estudo *in vitro* demonstrou que a placenta aumenta a produção de TNF- α em resposta à hiperglicemia [20]. Esta citocina inflamatória também é reconhecida como fator diabetogênico adicional, por incrementar a resistência à insulina na gestação [20,21]. De modo contrário, a citocina IL-10, antiinflamatória, tem sido postulada como mediadora chave na produção das citocinas inflamatórias da gestação [19,22].

Independentemente do tipo de diabetes e/ou hiperglicemia, os riscos perinatais dos filhos de mães diabéticas podem ser prevenidos com o controle dos níveis glicêmicos maternos [2,4,23,24]. Isto deve acontecer, também, em relação à atividade regulatória da placenta no balanço das citocinas Th1–Th2 e em outras funções placentárias, favorecendo o prognóstico da gestação. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as concentrações maternas e placentárias de IL-10 e TNF- α e correlacioná-las com resultados perinatais em gestações complicadas por hiperglicemia, ou com risco para desenvolvê-la, diferenciadas pela MG (< ou \geq 100mg/dL).

Método

Este estudo foi realizado no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP, Brasil, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (anexo 1).

Desenho e Sujeitos do Estudo

Estudo de corte transversal, que avaliou as concentrações de IL-10 e TNF- α , no sangue materno e placenta, de 186 gestações associadas à hiperglicemia ou ao risco para desenvolvê-la, diferenciadas pela MG (< \geq 100mg/dL). As gestantes portadoras de DM2 foram referenciadas para o Serviço com o diagnóstico já confirmado. As outras gestantes identificadas com risco para desenvolver diabetes na gestação foram submetidas ao TTG-100g e ao PG, aplicados em paralelo, entre a 24^a. e a 28^a. semanas de gestação e as respostas aos dois testes foram consideradas para determinar o tipo de hiperglicemia associada à gestação. Assim, de acordo com os resultados do TTG-100g e do PG, as 186 gestantes foram classificadas como fator de risco presente (FR+) (n = 70; TTG-100g e PG normais), HGL (n = 43; TTG-100g normal e PG alterado) DMG (n = 58; TTG-100g e PG alterados na gestação) e DM2 (n = 15; TTG 100g alterado prévio à gestação) [2,12].

Acompanhamento dos sujeitos

As gestantes FR+ não foram tratadas. Para o controle da hiperglicemia das mães com DM2, DMG ou HGL seguiu-se o protocolo do Serviço, utilizando-se o PG, com níveis glicêmicos de jejum, pré e pós prandiais avaliados por 24 horas, em intervalos de duas semanas até a 32ª semana e, semanalmente, desta idade gestacional ao parto. As gestantes com HGL e DMG foram tratadas com dieta, indicada por nutricionista, associada a exercício e, quando necessário, iniciou-se a terapia insulínica. As mulheres com DM2 foram tratadas com dieta, exercício e terapia insulínica desde o início da gestação [1,2,15].

Critérios de inclusão e exclusão e caracterização dos sujeitos

Os critérios de inclusão foram definidos por (a) ser classificada nos grupos de estudo; (b) idade gestacional máxima de entrada no protocolo de tratamento de 30 semanas para as portadoras de HGL e DMG e de 20 semanas para as gestantes DM2; (c) realizar assistência pré-natal e parto no Serviço; (d) assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídas as gestações múltiplas, as com malformações fetais e aquelas com parto antes da 34ª semana.

A população de gestantes foi caracterizada por idade gestacional no parto, hábito de tabagismo e presença de hipertensão arterial, peso e índice de massa corporal, iniciais e finais, e níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) no terceiro trimestre da gestação. Para as gestantes classificadas como DM2, DMG e HGL, a MG foi calculada pela média aritmética das glicemias plasmáticas avaliadas em todos os PG realizados para controle de tratamento. Para as gestantes FR+, a MG foi calculada pelas glicemias avaliadas no PG de diagnóstico. A glicose plasmática foi avaliada pelo método da glicose oxidase (Glucose – analyzer II Beckman, Fullerton, CA, USA[®]) e, a HbA1c, por cromatografia (*High-performance liquid chromatography - D10TM Hemoglobin Testing System, BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA[®]*).

Ao final da gestação, após a realização de todos os PG (diagnóstico e tratamento), as gestantes foram distribuídas nos grupos de estudo, de acordo com o resultado da MG. Os limites de MG, inferior a 100mg/dL ($MG < 100\text{mg/dL}$) e igual ou superior a 100mg/dL ($MG \geq 100\text{mg/dL}$) [15,18], definiram os grupos de estudo. Assim, 130 pares de mães e recém-nascidos (RN) foram incluídos no grupo $MG < 100\text{mg/dL}$ e, os 56 restantes, no grupo $MG \geq 100\text{mg/dL}$.

Coleta e análise do sangue materno

A partir da 34ª. semana de gestação e antes do início do trabalho de parto, amostras de sangue materno (5 a 10mL) foram coletadas em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Uma alíquota desta amostra foi separada e imediatamente encaminhada para dosagem dos níveis de HbA1c. A amostra restante foi centrifugada a 4 °C, por 15 minutos, a 1000g, e o plasma foi armazenado a -80 °C até a dosagem das citocinas.

As concentrações plasmáticas de IL-10 e TNF- α foram determinadas por ensaio imunoenzimático (Human IL-10 Quantikine ELISA kit e Human TNF- α Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA[®]), de acordo com as especificações do fabricante. Para o cálculo das concentrações de cada sujeito utilizou-se a curva padrão do produto, construída durante o ensaio.

Coleta e análise de tecido placentário

As placentas de todas as gestantes do estudo foram coletadas no momento do parto, imediatamente lavadas com solução salina e, após isso, retirada uma amostra da região vilosa, respeitando-se uma margem mínima de 2 cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária [15]. Estes fragmentos foram armazenados em nitrogênio líquido e, posteriormente, processados para as dosagens de IL-10 e TNF- α . Para estas avaliações, 10 amostras de tecido placentário de cada grupo (FR+, HGL, DMG e DM2) foram selecionadas por randomização eletrônica (*computer-generated randomization*).

Os fragmentos congelados de placenta foram macerados em tampão com *cocktail* de inibidores de proteases. Após o preparo do macerado placentário foi realizada a dosagem proteica das amostras e, em seguida, o ensaio imunoenzimático (Human IL-10 Quantikine ELISA kit e Human TNF- α Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA[®]), de acordo com as especificações do fabricante. Para o cálculo das concentrações de cada sujeito utilizou-se a curva padrão do produto, construída durante o ensaio.

Avaliação dos resultados perinatais

Os RN foram avaliados em relação às condições de oxigenação e nutrição intrauterinas. Os marcadores de oxigenação foram definidos pelos resultados de pH, hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e bilirrubina total, avaliados no sangue do cordão umbilical, e pelos índices de Apgar de primeiro (Apgar 1) e quinto (Apgar 5) minutos. As condições de nutrição foram avaliadas pelos resultados de glicemia e insulina no sangue de cordão, peso e índice ponderal (relação entre o peso / comprimento³), peso e índice placentário (relação peso placenta / peso fetal), proporção (%) de RN macrossômicos (peso RN > 4000g) e percentual de RN classificados em pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional (relação peso / idade gestacional), conforme protocolo do Serviço

O sangue do cordão (10mL) foi coletado intraparto, logo após o clampeamento, em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA[®]). O pH de cordão umbilical foi avaliado, em sangue total, imediatamente após a coleta através de eletrodo acoplado ao equipamento de gasometria arterial (Cobas B 121 Roche, Headquartered, Switzerland[®]). A determinação dos parâmetros hematológicos (hematócrito e hemoglobina) foi realizada em amostras de sangue total inseridas no equipamento específico para essas dosagens (modelo Sysmex KX-21N, Roche, Headquartered, Switzerland[®]). Após a avaliação do pH e dos parâmetros hematológicos, alíquotas de amostras de sangue total foram centrifugadas (4 °C, por 15 minutos, a 1000 g) para obtenção do plasma e a realização das análises restantes. A concentração de bilirrubina foi avaliada pelo método colorimétrico através de lâminas Bubb

(VITROS Chemistry products, Johnson & John, Rochester, NY, USA[®]), a dosagem de insulina foi realizada através de imunoensaio quimioluminescente por micropartículas (ARCHITECT insulina, Abbot laboratórios, São Paulo, SP, Brasil[®]) e a glicemia foi avaliada pelo método da glicose oxidase (Glucose –analyzer II Beckman, Fullerton, CA, USA[®])

Análise estatística

Para as variáveis quantitativas com distribuição normal foram empregados análise de variância e teste de comparações múltiplas de Tukey. Para as variáveis quantitativas com distribuição anormal foram utilizados o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gama e função de ligação log e o *LSMeans Test* para as comparações múltiplas. Para o estudo das associações, utilizou-se a correlação de Spearman para as variáveis quantitativas com distribuição anormal e o teste de qui-quadrado de Pearson para as variáveis quantitativas com distribuição normal. As análises foram realizadas no software SAS, versão 9.1, considerando-se o limite de significância estatística de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

Características maternas

No grupo $MG \geq 100$ mg/dL 75% do total de gestantes eram portadoras de DMG (60,71%) e DM2 (14,29%). No grupo $MG < 100$ mg/dL, observou-se predomínio de gestantes FR+ (51,5%) e HGL (24,62%) ($p < 0,0001$) e maior ocorrência de cesárea (39,89 vs 24,04%; $p = 0,0120$). As características metabólicas maternas também foram diferentes entre os grupos avaliados. No grupo $MG \geq 100$ mg/dL foram observados os maiores valores de IMC inicial ($34,16 \pm 8,99$ vs $30,94 \pm 7,667$ Kg/m²; $p = 0,0162$), com tendência a aumento no final da gestação ($37,23 \pm 8,67$ vs $34,23 \pm 6,87$ Kg/m²; $p = 0,0505$), e níveis de HbA1c mais elevados no terceiro trimestre de gestação ($6,59 \pm 0,96$ vs $5,65 \pm 0,63$ %; $p < 0,0001$), comprovando controle glicêmico de menor qualidade neste grupo. A associação com tabagismo e hipertensão arterial não diferenciou os

grupos avaliados. Apesar de todos os partos terem ocorrido após a 37^a. semana, a IG ao nascimento foi menor no grupo MG < 100 mg/dL ($37,41 \pm 0,17$ vs $38,45 \pm 1,55$; $p < 0,0001$) (Tabela 1).

Concentrações de IL-10 e TNF- α no sangue materno e placenta

No sangue materno, as menores concentrações de IL-10 ($1,01 \pm 0,87$ vs $3,08 \pm 5,57$ pg/mL; $p = 0,0019$) e de TNF- α ($3,33 \pm 0,17$ vs $5,67 \pm 0,15$ pg/mL; $p = 0,0185$) foram observadas no grupo MG \geq 100 mg/dL. De modo contrário, as placentas deste grupo tiveram maiores concentrações de TNF- α ($307,42 \pm 784,60$ vs $307,42 \pm 109,92$ pg/mL; $p = 0,0385$). A IL-10 placentária não diferenciou os grupos (Figura 1).

Resultados perinatais

Em relação à oxigenação intrauterina, os RN de gestantes com MG \geq 100 mg/dL apresentaram maiores valores de Ht ($52,57 \pm 5,39$ vs $48,73 \pm 5,61$ %; $p = 0,0002$) e Hb ($16,91 \pm 1,77$ vs $16,00 \pm 2,09$ mg/dL; $p = 0,0154$). Em relação aos marcadores da nutrição, os níveis de glicose de cordão não diferenciaram os grupos, mas observou-se maiores valores de insulina ($11,11 \pm 10,95$ vs $6,44 \pm 8,24$ μ U/mL; $p = 0,0113$) no grupo de mães com MG \geq 100 mg/dL. Neste grupo foram assinalados, também, o maior percentual de RN macrossômicos ($19,64$ vs $7,26$ %; $p = 0,0122$) e tendência à maior proporção de RN-GIG ($17,86$ vs $6,45$ %; $p = 0,0637$). As características das placentas (peso e índice placentário) não diferenciaram os grupos avaliados (Tabela 2).

Correlações entre IL-10 e TNF- α placentários e marcadores de oxigenação e nutrição fetal

A IL-10 correlacionou-se de forma direta com os níveis de hemoglobina ($r = 0,63$; $p = 0,02$), hematócrito ($r = 0,53$; $p = 0,07$ – tendência), Apgar 1 ($r = 0,53$; $p = 0,0095$), Apgar 5 ($r = 0,69$; $p = 0,0003$) e insulina fetal ($r = 0,78$; $p = 0,01$). O TNF- α apresentou tendência à correlação indireta com o peso ao nascer do RN ($r = -0,41$; $p = 0,05$) (Tabela 3).

Discussão

Os resultados desse estudo demonstraram que a $MG \geq 100$ mg/dL no terceiro trimestre da gestação se associou à menor concentração de IL-10 e TNF- α no sangue materno e ao desequilíbrio na produção placentária destas citocinas, com predomínio de TNF- α sobre IL-10.

Em relação à concentração materna de IL-10 e TNF- α , seria esperado que as mães do grupo $MG \geq 100$ mg/dL apresentassem aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α e queda correspondente de IL-10, o que não se confirmou. Além da ação moduladora da IL-10, outros fatores podem influenciar na produção materna de TNF- α , entre eles, o tipo do diabetes, a intensidade da hiperglicemia e a quantidade de tecido adiposo, aferida indiretamente pelo IMC materno [19,20,22,25,26]. Em nosso estudo, o controle glicêmico materno adequado, confirmado pelos níveis de HbA1c ($6,59 \pm 0,96\%$) e o IMC final, comparável ao grupo $MG < 100$ mg/dL, devem ter antagonizado os efeitos pró-inflamatórios do tipo de diabetes prevalente (DMG e DM2) neste grupo de gestantes.

A maior produção placentária de TNF- α no grupo $MG \geq 100$ mg/dL e a produção equivalente de IL-10 nos dois grupos avaliados caracterizaram ambiente inflamatório intrauterino no grupo $MG \geq 100$ mg/dL. Ainda que em níveis considerados adequados [2,4], a diferença entre as MG maternas dos dois grupos de gestantes deve ter interferido na produção placentária de TNF- α . Estudos *in vitro* demonstraram que a produção desta citocina aumenta de forma proporcional à concentração de glicose [20]. Além do nível de hiperglicemia intrauterina, a produção placentária de IL-10 foi semelhante entre os grupos e deve ter sido insuficiente para modular a produção de TNF- α no grupo $MG \geq 100$ mg/dL [19,22].

O ambiente inflamatório intrauterino nas mães com $MG \geq 100$ mg/dL refletiu, de maneira adversa, nas condições de oxigenação e nutrição fetal e nos resultados perinatais. Neste grupo, os níveis de Ht e Hb do cordão umbilical estavam aumentados e os RN apresentaram hiperinsulinismo, macrossomia e tendência a maior ocorrência de RN-GIG.

A macrosomia e o crescimento fetal exagerado são as complicações mais comuns dos filhos de mães diabéticas e refletem em graves repercussões a curto e longo prazo, com risco de obesidade, hipertensão arterial, resistência à insulina, hiperglicemia ou diabetes melito tipo 2 e doença cardiovascular na vida adulta [23,27,28]. A hiperglicemia materna se associa a maiores níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) que, pela maior afinidade ao oxigênio, favorece a hipóxia intrauterina. O feto responde à hipóxia com maior produção de glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, poliglobulia, com níveis aumentados de Ht e Hb de cordão e decorrente risco de icterícia neonatal [2,4,6]. Os nossos resultados perinatais reproduziram a teoria da hiperglicemia-hiperinsulinemia fetal, postulada por Pedersen em 1952. Entretanto, merece destaque o fato de que estes desfechos ocorreram apesar dos níveis maternos de HbA1c serem compatíveis com o controle glicêmico adequado no final da gestação [2,4]. Na prática, os períodos de início e manutenção do controle da hiperglicemia materna não foram uniformes entre as gestantes e isto deve ter influenciado na capacidade de oxigenação e nutrição fetal e na produção placentária de citocinas. Estas observações reforçam a necessidade do controle rígido e precoce da hiperglicemia materna, individualizado para cada gestante [2,4,10,11].

Independentemente dos grupos definidos pelos valores de MG $< \text{ou} \geq 100$ mg/dL, os níveis de Hb, Ht (tendência) e insulina de cordão umbilical e os índices de Apgar de 1º e 5º minutos foram diretamente correlacionados à produção placentária de IL-10. Na placenta, esta citocina induz a angiogênese dos vasos vilositários, constituindo mecanismo de prevenção da hipóxia intrauterina [19]. No diabetes, a hiperglicemia induz à hipóxia intrauterina e a placenta responde com incremento da angiogênese vilositária [29], na dependência da intensidade da hiperglicemia materna e do correspondente nível de hipóxia intrauterina [15,17,30]. Assim, nossos resultados sugerem que a hipóxia intrauterina, decorrente da hiperglicemia materna, estimulou respostas do feto e da placenta. O feto incrementou sua produção de glóbulos vermelhos, confirmado pelo aumento dos níveis de Ht, Hb no cordão umbilical. A placenta

incrementou a angiogênese e, para isso, a produção aumentada de IL-10 teve papel fundamental. Os resultados finais destes mecanismos compensatórios foram os índices de Apgar, superiores a 7 nos primeiros minutos de vida.

Da mesma maneira, a IL-10 se relacionou diretamente com os valores de insulina de cordão umbilical. Considerando a angiogênese como resposta vicariante da placenta à hipóxia [29]; na placenta da gestante diabética [15,17,30], nossos resultados indicam que a proliferação vascular, decorrente da hipóxia e da ação angiogênica da IL-10, favoreceu o aporte de glicose e, conseqüentemente, o hiperinsulinismo fetal. Classicamente, a glicose é o substrato [31] e a insulina é o hormônio de crescimento do feto [32]. O resultado deste hiperinsulinismo foi a maior ocorrência de macrossomia e a tendência à maior proporção de RN-GIG.

Além da hiperglicemia intrauterina, os resultados de nosso estudo sugerem que outros fatores possam estar envolvidos nestes mecanismos. A hipertensão arterial e, em especial, a PE são complicações indutoras da hipóxia intrauterina e de estímulo para a produção de TNF- α [33,34], de ação antagônica ao papel modulador da IL-10 [19,22]. Independentemente do grupo, a ação simultânea de IL-10 e TNF- α e a associação de PE em aproximadamente 40% dos casos, dificultam a definição destes resultados. Isto deverá ser melhor explorado em futuros projetos, específicos para responder a estas questões.

Nesse estudo também foi encontrada tendência à correlação inversa entre o TNF- α e peso fetal. A literatura aponta a relação entre o aumento de TNF- α placentário e a restrição de crescimento intrauterino [35,36]. Outros resultados da literatura também associaram aumento de TNF- α em gestações complicadas por PE, proporcional à gravidade do quadro clínico materno [34]. Nossos resultados indicam que, apesar da maior produção de TNF- α nas placentas de mães com M \geq 100mg/ dL, este grupo foi caracterizado por macrossomia e tendência ao aumento de RN-GIG. Os efeitos da hiperglicemia associado ao hiperinsulinismo fetal devem ter anulado a ação adversa do TNF- α no crescimento intrauterino.

Em síntese, os resultados deste estudo associaram o desequilíbrio na produção materna e placentária de IL-10 e TNF- α à presença de hiperglicemia no meio intrauterino. Esta condição resultou em repercussões no ambiente intrauterino e nos resultados perinatais. Estes resultados, inéditos em relação à produção placentária dessas citocinas no diabetes e/ou hiperglicemia, confirmam a importância do controle, precoce e rigoroso, da hiperglicemia materna [2,4,10,11].

Conclusão

Comparada à MG < 100 mg/dL, a ~~MG~~100 mg/dL se associou a queda na concentração materna de IL-10 e de TNF- α e aumento na produção placentária de TNF- α . A produção placentária de IL-10 foi semelhante nos dois grupos.

A produção de IL-10 na placenta se correlacionou diretamente com os resultados de hemoglobina e insulina do cordão umbilical e com os índices de Apgar de 1^o. e 5^o. minutos de vida. A produção placentária de TNF- α mostrou correlação inversa com o peso dos recém-nascidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro e ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP, pelo suporte técnico na análise estatística.

Declaração de interesses

Não existe conflito de interesse

Referências

- [1] 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; 33:676-682.
- [2] 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;50:108-112.
- [3] Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers - animal and human studies. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003;4:79-93.
- [4] Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Brasil MAM, Rugolo LMSS, Bossolan G, et al. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27:691-697.
- [5] Yang J, Cummings EA, O'Connell C, Jangaard K. Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol*. 2006;108:644-650.
- [6] Calderon IMP, Kerche LTRL, Damasceno DC, Rudge MVC. Diabetes and Pregnancy: an Update of the Problem. *ARBS*. 2007;9:1-11.
- [7] Macintosh MC, Fleming KM, Bailey JA, Doyle P, Modder J, Acolet D, et al. 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;333:1-6.
- [8] Hod M, Haroush AB, Yogev Y. Pathogenesis of gestational diabetes mellitus. In: Hod M., Jovanovic L, Leiva GCRA, Langer O, editors. *Textbook of diabetes and pregnancy*. London: Informa healthcare; 2003. p.39-49.

[9]Vela-Huerta MM, San Vicente-Santoscoy EU, Guizar-Mendoza JM, Amador-Licona N, Aldana-Valenzuela C, Hernandez J. Leptin, insulin, and glucose serum levels in large for-gestational-age infants of diabetic and non-diabetic mothers. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;21:17-22.

[10]International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy.*Diabetes Care.* 2010;33:676-682.

[11]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.

[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]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;63:37-43.

[14]Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, Cetin I. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. *Placenta.* 2003;24:343-347.

[15]Calderon IM, Damasceno DC, Amorin 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;78:65-71.

[16]Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MAM, Costa E, Calderon IMP, Gonçalves CR, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;73:143-149.

[17]Pietro L, Daher S, Rudge MV, Calderon IM, Damasceno DC, Sinzato YK, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta* 2010;3:7707-80.

[18]Carvalho Silva SAL. 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]. Faculdade de medicina (Botucatu): Universidade Estadual Paulista; 2010.

[19]Thaxton JE, Sharma S. Inteleukin -10: A multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:482-491.

[20]Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JM, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001;18:921-927.

[21]Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes.* 2002;51:2207-2213.

[22]Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.*1989;46:111-147.

[23]Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Calderon Ide M, Geloneze B, Dias A, et al. Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24:324-30.

- [24]Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Maestá I, Souza LMS, Peraçoli JC. Perspectiva perinatal decorrentes do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelodiabete. Rev Bras Ginec Obstet. 1995;17:26-32.
- [25]Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Trends Endocrinol Metab. 2000;11:212-217.
- [26]Montazeri S, Nalliah S, Radhakrishnan AK. Is there a genetic variation association in the IL-10 and TNF alpha promoter gene with gestational diabetes mellitus? Hereditas. 2010;147:94-102.
- [27]Wroblewska-Seniuk K, Wender-Ozegowska E, Szczapa J. Long-term effects of diabetes during pregnancy on the offspring. Pediatr Diabetes. 2009;10:432-440.
- [28]Reece EA. The fetal and maternal consequences of gestational diabetes mellitus. J Matern Fetal Neonatal Med. 2010;23:199-203.
- [29]Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. Diabetes Care. 2007;30:S121-126.
- [30]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. 2011 (*submitted*).
- [31]Knopp RH, Ruder HJ, Herrera E, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VII. Insulin tolerance during late pregnancy in the fed and fasted rat. Acta Endocrinol (Copenh) 1970;65:352-360.
- [32]Naeye RL. infants of diabetic mothers: a quantitative, morphologic study. Pediatrics. 1965;35:980-988.
- [33]Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. J Reprod Immunol 2003; 59:161–173.

[34]Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57:177-185.

[35]Holcberg G, Huleihel M, Sapir O, Katz M, Tsadkin M, Furman B, et al. Increased production of tumor necrosis factor-alpha TNF-alpha by IUGR human placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94:69-72.

[36]Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP, Wei W. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. *Toxicol Lett.* 2006;163:20-29.

Tabela 1 – Características das gestantes dos grupos MG < 100 mg/dL e MG ≥ 100 mg/dL

	MG <100 mg/dL n = 130	MG ≥100 mg/dL n = 56	
	n (%)	n (%)	p
Tipos hiperglicemia			< 0,0001
FR + ^(*)	67 (51,51)	3 (5,36)	
HGL	32 (24,62)	11 (19,64)	
DMG	24 (18,46)	34 (60,71)	
DM2	7 (5,38)	8 (14,29)	
Tabagismo	22 (16,92)	14 (25)	0,7999
Cesárea	77 (39,89)	44 (24,04)	0,0120
HA total	47 (36,15)	26 (46,42)	0,7843
Tipos HA:			0,09
HAC	28 (21,53)	22 (39,29)	
HG + PE	19 (14,62)	4 (7,14)	
HA: hipertensão arterial; HAC: hipertensão arterial crônica; HG: hipertensão gestacional; PE: pré-eclâmpsia.			
^(*) Média das glicemias do perfil glicêmico no diagnóstico			
	m (dp)	m (dp)	p
Idade (anos)	30,22 (6,55)	31,76 (5,98)	0,1086
IMC inicial (Kg/m ²)	30,94 (7,67)	34,16 (8,99)	0,0162
IMC final (Kg/m ²)	34,23 (6,87)	37,23 (8,67)	0,0505
IG total (semanas)	38,45 (1,55)	37,41 (0,17)	<0,0001
HbA1c (%)	5,65 (0,63)	6,59 (0,96)	<0,0001
IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional no parto; HbA1c: hemoglobina glicada do terceiro trimestre			

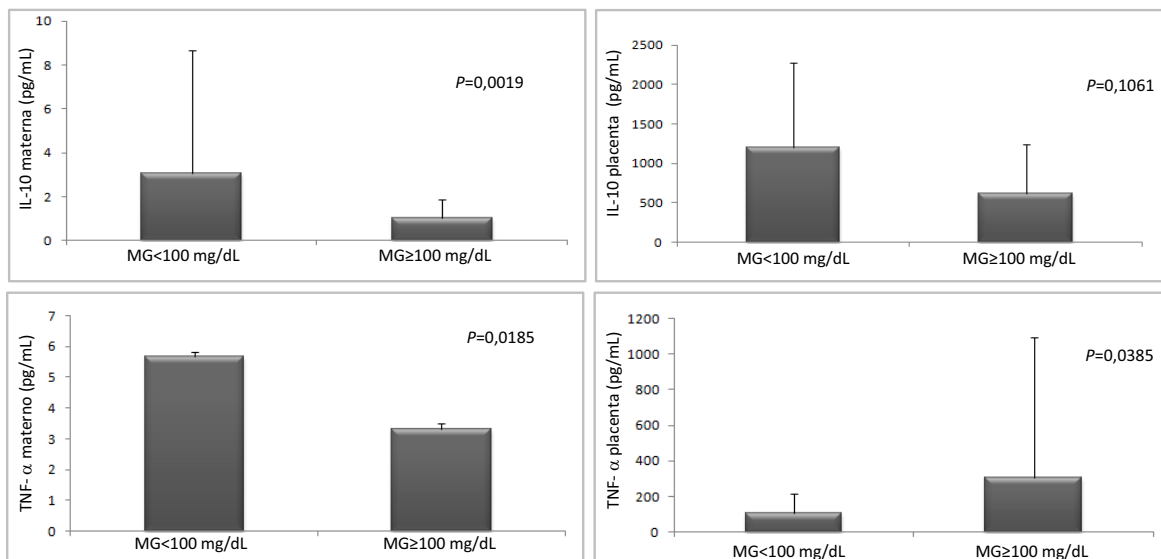


Figura 1 – Concentrações de IL-10 e TNF-α no sangue e placentas das gestantes nos grupos MG<100mg/dL e MG≥100mg/dL

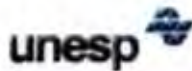
Tabela 2 – Marcadores da oxigenação e da nutrição intrauterina nos recém nascidos (RN) dos grupos de mães com MG < 100 mg/dL e MG ≥ 100 mg/dL

	(MG <100 mg/dL) n = 124*	(MG ≥100 mg/dL) n = 56	
	m (dp)*	m (dp)	p
Marcadores Oxigenação			
Hematócrito (%)	48,73 (5,61)	52,57 (5,39)	0,0002
Hemoglobina(mg/dL)	16,00 (2,09)	16,91 (1,77)	0,0154
pH cordão	7,28 (0,10)	7,27 (0,08)	0,7753
Bilirrubina(mg/dL)	2,12 (0,70)	2,03 (1,02)	0,5016
Apgar 1	7,97 (1,68)	7,77 (1,82)	0,4660
Apgar5	9,15 (1,01)	9,25 (0,74)	0,5335
Marcadores Nutrição			
Glicemia (mg/dL)	66,18 (20,57)	70,00 (29,52)	0,4798
Insulina (μU/mL)	6,44 (8,24)	11,11 (10,95)	0,0113
Peso nascer (g)	3270,80 (480,50)	3398,42 (634,54)	0,1353
Índice Ponderal (g/cm ³)	0,029 (0,002)	0,029 (0,002)	0,5517
Peso Placenta (g)	592,42 (138,66)	637,06 (162,34)	0,0720
Índice Placentário	0,182 (0,039)	0,189 (0,037)	0,3209
	n (%)	n (%)	p
Macrossomia	9 (7,26)	11 (19,64)	0,0122
Classes RN			
PIG	7 (5,65)	2 (3,57)	
AIG	109 (87,90)	44 (78,57)	
GIG	8 (6,45)	10 (17,86)	
PIG: pequeno; AIG: adequado; GIG: grande para idade gestacional (relação peso RN / IG no parto)			
*excluídos 06 casos por perda de dados no parto (horário incompatível com coleta e processamento das amostras de sangue e placenta)			

Tabela 3 – Correlações entre IL-10 e TNF- α placentários e marcadores da oxigenação e nutrição intrauterina

	IL-10 placenta		TNF- α placenta	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Hematócrito (%)	0,53	0,07	0,21	0,52
Hemoglobina (mg/dL)	0,63	0,02	0,08	0,81
pH cordão	0,01	0,96	-0,01	0,96
Bilirrubina(mg/dL)	0,01	0,97	-0,03	0,92
Apgar 1	0,53	0,0095	0,18	0,42
Apgar5	0,69	0,0003	0,11	0,61
Glicose (mg/dL)	-0,16	0,62	0,29	0,38
Insulina (μ U/mL)	0,78	0,01	0,21	0,59
Peso nascer (g)	0,24	0,28	-0,41	0,05
Índice Ponderal (g/cm ³)	-0,20	0,39	0,15	0,51
Peso Placenta (g)	-0,01	0,96	-0,19	0,38
Índice Placentário	-0,20	0,38	-0,12	0,59

Anexo



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
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de setembro de 2008

Of. 359/08-CEP

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

Prezada Drª Iracema,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "IL-10 e TNF-alfa no sangue materno e nas placentas de gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve - Correlação com controle glicêmico e resultados perinatais", a ser conduzido por Juscielle Brogin Moreli, orientada por Vossa Senhoria, com a participação das Profas Drªs Renée Laufer Amarin e Débora Cristina Damasceno, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/09/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP