

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – Unesp
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOLÓGICA
DAS PLACENTAS DE RATAS COM DIABETE
DE INTENSIDADE MODERADA**

Yuri Karen Sinzato

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

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Sinzato, Yuri Karen.

Análise morfológica e imunológica das placentas de ratas com diabete de intensidade moderada / Yuri Karen Sinzato. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Débora Cristina Damasceno

Assunto CAPES: 40101150

1. Diabetes na gravidez - Aspectos imunológicos - Estudos experimentais

CDD 616.462

Palavras chave: Diabete; IL-10; Placenta; Prenhez; Streptozotocin (STZ); TNF- α .

Índice

Capítulo 1	
<i>Resumo</i>	03
<i>Abstract</i>	04
<i>Lay Summary</i>	05
<i>Introdução</i>	06
<i>Materiais e Métodos</i>	08
<i>Resultados</i>	12
<i>Discussão</i>	14
<i>Referências Bibliográficas</i>	20
 Capítulo 2	
<i>Resumo</i>	36
<i>Abstract</i>	37
<i>Introdução</i>	38
<i>Materiais e Métodos</i>	41
<i>Resultados</i>	46
<i>Discussão</i>	48
<i>Referências</i>	54
 Anexo	67

Capítulo 1

Repercussões materno-placentário-fetais do diabetes moderado em ratas

Yuri Karen Sinzato^a, Ana Paula Machado Spada^a, Paula Helena Ortiz Lima^a,
Iracema de Mattos Paranhos Calderon^a, Marilza Vieira Cunha Rudge^a, Débora
Cristina Damasceno^a

Diabetes moderado e prenhez

^aLaboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia,
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de
Botucatu – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Estado de São Paulo,
Brasil

Correspondência para: Yuri Karen Sinzato
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP: 18618-000 Botucatu – Estado de São Paulo
Tel: 55 – 14 - 3811- 6181
E-mail: yuri_sinzato@yahoo.com.br

Este capítulo da tese foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista
Reproductive BioMedicine online, para a qual será submetido.

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos do diabetes moderado nos parâmetros reprodutivos maternos e no desenvolvimento placentário-fetal em ratas Wistar. Metodologia: No dia do nascimento, 147 ratas Wistar foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo não-diabético (Controle, n=45) - recebeu o veículo; Grupo diabético (STZ, n=102) - recebeu 100 mg streptozotocin/kg. Na fase adulta, as ratas foram acasaladas e, no dia 0 de prenhez, foram incluídas ratas controle que apresentassem glicemia abaixo de 120 mg/dL e, para o grupo diabetes moderado, glicemia entre 120 e 300 mg/dL. Em diferentes momentos da prenhez, glicemia e peso corpóreo foram verificados. No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas para coleta de sangue para dosagem de insulina e, em seguida, foi realizada laparotomia para retirada e pesagem dos fetos e placentas. Os dados maternos e fetais foram analisados por Two-way ANOVA seguida do Teste t. Os recém-nascidos (RN) foram classificados em pequenos, adequados e grandes para idade de prenhez e as comparações entre os grupos foram realizadas segundo o Teste de Qui-quadrado. As ratas STZ apresentaram glicemias maiores nos dias 0 e 14 de prenhez, menor número médio de fetos vivos, implantações e de corpos lúteos, aumento nas taxas de perdas embrionárias pós-implantação, no peso placentário e na proporção de RN pequenos (PIP) e grandes (GIP) para idade de prenhez, redução de RN AIP e inalteração nas concentrações de insulina. Portanto, o diabetes de intensidade moderada alterou a glicemia materna no início da prenhez, que deflagrou alterações no organismo materno e/ou no desenvolvimento inicial do embrião, afetando sua implantação e futuro desenvolvimento placentário e fetal.

Palavras-chave: desempenho reprodutivo, diabetes, streptozotocin (STZ), prenhez, feto, placenta.

Abstract

Aim: To evaluate the mild diabetes effects on the maternal reproductive outcome and placental-fetal development in female Wistar rats. **Methodology:** At the birth day, 147 female rats were randomly distributed in two experimental groups: 1) Non-diabetic Group (Control, n=45) - received the vehicle; 2) Diabetic Group (STZ, n=102) - received 100 mg streptozotocin/kg. At the adult phase, the female rats were mated and, at the day 0 of pregnancy, they were included in the control group when presented glycemia below 120 mg/dL and, in the group STZ when showed glycemia between 120 and 300 mg/dL. In different moments of the pregnancy, glycemia and body weight were verified. At day 21 of pregnancy, the rats were anaesthetized to collect blood samples for insulin determination and, soon afterwards, the laparotomy was carried out to withdraw and weigh the fetuses and placentas. The maternal and fetal dates were analyzed by Two-way ANOVA followed by t Test. The newborns (NB) were classified in small, appropriate and large for gestational age and the comparisons between the groups were accomplished according to Qui-square Test. Rats STZ presented higher glycemia at days 0 and 14 of pregnancy, lower numbers of alive fetuses; implantations and corpora lutea; increased rate of embryonic losses, placental weight and proportion of small NB (SGA) and large (LGA); reduced rate of AGA NB and unaltered insulin concentrations. Therefore, the mild diabetes altered the maternal glycemia in the early pregnancy, which caused changes in the maternal organism and/or in the early development of the embryo, impairing its implantation and future placental and fetal development.

Key-words: reproductive outcome, diabetes, streptozotocin (STZ), pregnancy, fetus, placenta.

Lay Summary

Women with disorders of glucose tolerance are associated with increased maternal and perinatal morbidity, as spontaneous abortions, neonatal morbidity and mortality. There are several experimental models to reproduce Diabetes mellitus type 2 and gestational state. To reproduce these diabetes types, the animals should present a mild diabetes (glycemia between 120 and 300 mg/dL). However, the obtained results are divergent such as glycemic levels, presence of macrosomic fetus and placental weights. Besides, studies on the repercussions of the mild diabetes on the maternal reproductive outcome and placental-fetal development are required. Then, this investigation aimed to evaluate the effects of the mild diabetes on the maternal reproductive outcome and on the placental-fetal development in female rats. At birth day, 147 female rats were randomly distributed in two experimental groups: 1) Non-diabetic Group (Control, n=45) - received no diabetogenic agent; 2) Diabetic Group (STZ, n=102) - received diabetogenic chemical (streptozotocin). In the adult phase, the female rats were mated. At day 0 of pregnancy, the rats presenting glycemia below 120 mg/dL were considered as control and, for the Diabetic group, glycemia between 120 and 300 mg/dL. At final of the pregnancy, the female rats were anesthetized for blood collection for insulin determination and for obtaining of the fetuses (NB) and placentas. Rats STZ presented higher glycemia at days 0 and 14 of pregnancy, lower number of NB, implantations and corpora lutea, increased placental weight, higher rates of embryonic losses after implantation and of proportion of small NB and large NB for gestational age, lower proportion of large NB and unaltered insulin concentrations. Therefore, the mild diabetes model altered the maternal glycemia at early pregnancy, which altered the maternal organism and/or the early embryonic development, impairing its implantation and future placental and fetal development.

1. Introdução

O prejuízo no desempenho reprodutivo é uma consequência conhecida da síndrome diabética em muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos. Dependendo da severidade da condição diabética, a gestação é freqüentemente prejudicada. Anovulação, alteração do padrão do ciclo estral, recrutamento folicular diminuído, insensibilidade à terapia com gonadotrofina exógena, depressão da esteroidogênese e atrofia ovariana ocorrem em associação com o estado diabético (Chieri et al., 1969; Kirchick et al., 1978; Vomachka & Johnson, 1982; Garris et al., 1986).

Mulheres com desordens de tolerância à glicose são associadas com aumento da morbidade materna e perinatal (Pfarrer et al., 1999), como abortos espontâneos, morbidade e mortalidade neonatais (Freinkel, 1980; Eriksson, 1984; Sadler et al., 1988). A melhora do controle glicêmico durante a gestação diminui a incidência de abortos espontâneos e malformações congênitas em crianças de mulheres diabéticas (Doblado & Moley, 2007). No entanto, estudos clínicos têm demonstrado que, apesar disso, essas mulheres continuam apresentando complicações três a cinco vezes mais durante a gestação comparadas às gestantes sem a patologia (Reece & Eriksson, 1996; Casson et al., 1997; Baccetti et al., 2002; Ivanisevic et al., 1999; Greene, 1999; El-Sayed & Lyell, 2001). Isto sugere que o diabetes materno tem efeito permanente e irreversível sobre a reprodução (Doblado & Moley, 2007).

Na espécie humana e nos roedores, a implantação embrionária e a formação da placenta funcional são etapas essenciais para o estabelecimento da gestação e sobrevivência do embrião/feto no ambiente intra-uterino. A

disfunção placentária contribui para o aumento da frequência de complicações fetais nas gestações diabéticas (Daskalakis et al., 2008).

Modelos animais têm sido desenvolvidos para melhor entendimento do diagnóstico, patologia e tratamento do diabetes. Para mimetizar o quadro clínico do diabetes tipo 1 mal-controlado, são utilizados modelos experimentais para obtenção do diabetes grave (glicemia > 300 mg/dL) (Damasceno et al., 2002; Eriksson et al., 2000, 2003; Rudge et al., 2007; Volpato et al., 2008). As complicações que afetam mãe e feto decorrentes deste tipo de diabetes são bem conhecidas. Além disso, existem outros modelos que foram desenvolvidos para mimetizar o estado do diabetes tipo 2 e gestacional. Em animais de laboratório, estes tipos de diabetes são classificados como diabetes moderado (glicemia entre 120 e 300 mg/dL). Dentre esses modelos, ressalta-se a administração de diferentes doses de streptozotocin durante o período neonatal (Portha et al., 1974; Bonner-Weir et al., 1981; Triadou et al., 1982; Portha & Kergoat 1985; Tsuji et al., 1988) ou a injeção de streptozotocin durante a prenhez (Oh et al., 1988, 1991; Gelardi et al., 1990; Merzouk et al., 2000, 2001, 2002; Lopez-Soldado & Herrera, 2003; Caluwaerts et al., 2003; Soulimane-Mokhtari et al., 2005). No entanto, os resultados obtidos são divergentes no que se refere à glicemia, presença de macrosomia fetal e pesos das placentas. Além disso, não existem estudos sobre as repercussões do diabetes moderado no desempenho reprodutivo e desenvolvimento placentário e fetal. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do diabetes moderado nos parâmetros reprodutivos maternos e no desenvolvimento placentário-fetal em ratas Wistar.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas ratas recém-nascidas da linhagem Wistar, fornecidas e mantidas no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp) sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h), com água filtrada e ração *ad libitum*. No dia do nascimento, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: não-diabético (Controle) e diabético (STZ). Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo comitê de ética local (Protocolo Número 543).

2.2 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido no 1º dia de vida por administração subcutânea de streptozotocin (STZ - SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), na dose de 100 mg/kg de peso corporal diluído em 0,1 mol/l de tampão citrato (pH 4,5) (Portha et al., 1974 e Tsuji et al., 1988 modificados). As ratas do grupo Controle receberam volume do veículo (tampão citrato) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica. Após a indução, as ratas foram mantidas com suas mães (máximo de oito fêmeas) até o término do período de amamentação (21 dias). Ao final deste período, as mães foram mortas por inalação de dióxido de carbono e as descendentes foram mantidas no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia sob condições controladas.

2.3 Período de acasalamento

Durante a vida adulta dos animais (110 dias de vida), foi iniciada a fase de acasalamento com duração máxima de 15 dias. A presença de espermatozóides e diagnóstico da fase estro do ciclo estral foi considerado dia zero (0) de prenhez. Foram incluídas no estudo somente as ratas do grupo STZ que apresentaram valores glicêmicos entre 120 mg/dL e 300 mg/dL (diabete moderado) (Calderon et al., 1999; Merzouk et al., 2000) e ratas do grupo Controle com glicemia < 120 mg/dL no dia 0 de prenhez.

2.4 Período de prenhez

2.4.1 Glicemia

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Nas manhãs dos dias 0, 7, 14 e 21, a glicemia das ratas foi determinada em glicosímetro específico (*One Touch Ultra* – Johnson & Johnson®) e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

2.4.2 Insulina plasmática e desempenho reprodutivo materno

No dia 0 e no 21º dia de prenhez, as ratas foram pesadas para cálculo do ganho de peso materno (peso final – peso inicial). Após pesagem, no 21º dia de prenhez, os animais foram anestesiados letalmente com tiopental sódico (*Tiopentax*®) e, em seguida, foi realizado dessangramento para coleta de sangue materno em tubos heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 g a 4°C por 10 minutos para obtenção de plasma e estocado em freezer a -80°C para dosagem de insulina (Mercodia–Rat Insulin

cód.: 10-1124-01). Um total de 15 ratas (n=7 para o grupo Controle; n=8 para o grupo STZ) foi sorteado para a realização das dosagens pelo método de ELISA segundo protocolo do fabricante. Após obtenção do sangue, foi realizada laparotomia com exposição dos cornos uterinos para retirada e posterior pesagem da ninhada. Os ovários também foram retirados e os corpos lúteos foram contados e analisados em estereomicroscópio. Em seguida, foi feita contagem dos números de implantações, reabsorções (mortes embrionárias), fetos vivos e mortos. A taxa de perda pré-implantação foi calculada pela seguinte fórmula: $\frac{\text{número de corpos lúteos} - \text{número de implantações} \times 100}{\text{número de corpos lúteos}}$. A taxa de perda pós-implantação foi calculada pela seguinte fórmula: $\frac{\text{número de implantações} - \text{número de fetos vivos} \times 100}{\text{número de implantações}}$ (Damasceno et al., 2008).

2.4.3 Obtenção dos fetos e das placentas e classificação dos pesos dos recém-nascidos.

As placentas e os fetos a termo foram retirados e pesados e o índice placentário foi calculado pela razão entre peso placentário e fetal. A classificação dos pesos dos recém-nascidos foi realizada de acordo com a média $\pm$ desvio-padrão (DP) dos pesos corporais obtidos do grupo controle, que determinou três classes diferentes de recém-nascidos dentro dos grupos estudados: pequeno para idade de prenhez (PIP), cujo peso era inferior à média $- 1,7 \times DP$; adequado para idade de prenhez (AIP), cujo peso era compreendido entre a média $\pm 1,7 \times DP$ e grande para a idade de prenhez (GIP), cujo peso era maior que a média $+ 1,7 \times DP$ (Merzouk et al., 2000).

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP) e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se Two-way ANOVA seguida do Teste t. Para a comparação de proporções, foi utilizado o teste de Qui-quadrado. O limite mínimo de significância estatística adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Glicemia, concentrações de insulina e desempenho reprodutivo materno

Nos dias 0 e 14 de prenhez, foram observados aumentos significativos nas médias glicêmicas das ratas STZ em relação às das ratas Controle. No 7º e 21º dias de prenhez, não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados (Figura 1). Não foi verificada diferença nas concentrações de insulina entre os grupos experimentais ao término da prenhez (Tabela 1).

Foi observada redução estatisticamente significativa no ganho de peso materno e peso da ninhada no grupo STZ em relação ao grupo Controle (Figura 2).

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao número total de ratas utilizadas desde o início do experimento e taxa de sucesso para a obtenção de ratas com prenhez a termo segundo o critério de inclusão.

Houve diminuição estatisticamente significativa do número médio de fetos vivos, corpos lúteos e de implantações e aumento significativo das taxas de perdas pré e pós-implantação no grupo STZ em relação ao grupo Controle (Tabela 3).

3.2 Peso fetal e placentário e índice placentário

As ratas do grupo STZ apresentaram aumento do peso das placentas e dos índices placentários quando comparadas às ratas do grupo Controle. O peso dos fetos obtidos de ratas STZ não diferiu estatisticamente dos do grupo Controle (Tabela 3).

3.3 Classificação dos pesos dos recém-nascidos

O grupo STZ apresentou aumento significativo da proporção de recém-nascidos classificados como PIP e GIP e redução significativa de AIP em relação ao grupo Controle (Figura 3).

4. Discussão

No presente estudo, as ratas com diabetes moderado apresentaram aumento nas médias glicêmicas no início e na metade da prenhez. O aumento da glicemia no 14º dia de prenhez foi acompanhado de intolerância à glicose e resistência à insulina, confirmadas respectivamente pelos testes oral de tolerância à glicose e de tolerância à insulina (dados não mostrados). De forma similar, Muñoz et al. (1995) demonstraram que, no início da terceira semana da prenhez normal de ratas, a tolerância à glicose apresentava-se reduzida e acentuava-se no 18º dia de prenhez. Por essa razão, podemos dizer que as alterações encontradas em nossas ratas Controle no teste oral de tolerância à glicose no período analisado são compatíveis às alterações fisiológicas observadas por Muñoz et al., mostrando assim que as ratas com diabetes moderado apresentaram um quadro mais acentuado de intolerância à glicose. Além disso, cabe ressaltar que esse período analisado equivale ao período de diagnóstico positivo do diabetes gestacional em mulheres. Embora o grupo de ratas diabéticas apresentasse média glicêmica superior ao grupo controle no 14º dia de prenhez, aquele grupo teve diminuição da média glicêmica da metade para o final da prenhez. Também foi observado que as concentrações de insulina plasmática entre os dois grupos foram similares ao final da prenhez, corroborando com resultados encontrados por Triadou et al. (1982).

A exposição ao meio intra-uterino hiperglicêmico, nas condições experimentais do presente trabalho, causou redução no ganho de peso das ratas diabéticas e diminuição do peso da ninhada quando observado ao final da prenhez. Estes resultados poderiam ser justificados pelo fato das ratas com diabetes moderado terem apresentado menor número médio de fetos vivos,

implantações e corpos lúteos e aumento nas taxas de perdas embrionárias após a implantação. Embora a média glicêmica das ratas com diabetes moderado fosse menor em relação à de ratas com diabetes grave, ambos os grupos apresentam redução do número médio de fetos vivos e elevação na taxa de perda pós-implantação embrionária (Souza et al., 2008), confirmando que diferentes intensidades glicêmicas podem interferir no desenvolvimento embriofetal.

Sugere-se que o aumento da glicemia existente antes da prenhez ou a elevação desta no início da prenhez, confirmada em nosso estudo, podem estar relacionados com a diminuição no número de corpos lúteos nos animais diabéticos. Durante o desenvolvimento dos oócitos, as células da granulosa ao seu redor sustentam seu crescimento e fornecem suplementação hormonal. O estado diabético influencia a comunicação intercelular das células da granulosa, alterando a maturação dos oócitos devido à pobre comunicação parácrina (Chang et al., 2005), o que justificaria a redução do número de oócitos ovocitados no modelo de diabetes moderado (Jawerbaum et al., 1996). O desenvolvimento folicular e a ovocitação são dependentes de mudanças na diferenciação e proliferação das células da granulosa e células da teca, as quais promovem a esteroidogênese através da estimulação de gonadotrofinas e citocinas intraovarianas (Chabrolle et al., 2008). Em muitos modelos experimentais de diabetes, a ovocitação é prejudicada tanto por alterações ovarianas como hipotalâmico-hipofisárias (Kirchick et al., 1978; Garris et al., 1986). Além das alterações nos ovários, a oscilação na concentração de glicose também pode interferir nas tubas e no fluido uterino, influenciando no desenvolvimento do futuro embrião ao longo do trato reprodutor feminino. O

retardo na maturação do oócito altera o desenvolvimento normal do zigoto (Fraser et al., 2007). Isto pode ter contribuído para o aumento da taxa de perda pré-implantação e redução no número de embriões implantados no presente estudo.

Duas hipóteses poderiam ser aventadas para justificar a alta porcentagem de perda antes da implantação embrionária; a primeira seria o fato do insulto hiperglicêmico alterar as células totipotentes do zigoto a ponto de não haver restauração destas, inviabilizando o desenvolvimento embrionário. A segunda seriam as alterações na decídua, o que impossibilitaria o sincronismo entre a receptividade da decídua e o desenvolvimento do blastocisto. Há evidência de que zigotos obtidos de camundongos hiperglicêmicos que apresentaram desenvolvimento retardado no estágio de dois blastômeros (Diamond et al., 1989) tiveram o desenvolvimento do blastocisto afetado de forma definitiva (Colton et al., 2002 e 2003). Ratas que receberam streptozotocin no 2º dia de vida neonatal (modelo de indução do diabetes moderado) apresentaram diminuição da contratilidade uterina e anormalidades metabólicas durante a prenhez e menor número de embriões implantados (Jawerbaum et al., 1994 e 1996), o que corrobora também com nossos resultados, embora a indução do diabetes em nosso modelo experimental ocorresse no dia do nascimento.

Nosso estudo revelou maior número de ratas diabéticas (76%) com presença de mortes embrionárias em relação ao grupo Controle (39%). A hiperglicemia materna durante os estágios iniciais do desenvolvimento pode ser suficiente para programar mudanças na fisiologia e metabolismo que se manifestam mais tarde como resultados adversos na gestação diabética

(Doblado & Moley, 2007). Desta forma, cabe ressaltar que o controle glicêmico desde o início da gestação é importante para o desenvolvimento placentário e embrio-fetal. O panorama reprodutivo para mulheres portadoras de diabetes na era pré-insulina não difere daquele dos animais de laboratório, pois os abortos no diabetes humano não-controlado (Rudge, 1988; Reece et al., 2004) equivalem às mortes embrionárias (reabsorções) em ratas com diabetes grave (Volpato et al., 1999, 2001; Sinzato et al., 2006; Souza et al., 2008). Além dos abortos, a literatura demonstra que, mulheres com diabetes não controlado, freqüentemente apresentam problemas reprodutivos, morbidade e mortalidade neonatais (Freinkel, 1980; Eriksson, 1984; Sadler et al., 1988). O alto índice de abortos está correlacionado à toxicidade da glicose em altas concentrações causando impacto à viabilidade fetal (Jovanovic et al., 2005).

Apesar da média do peso fetal nas ratas com diabetes moderado não diferir do grupo Controle, a análise da classificação do peso dos recém-nascidos mostrou aumento na proporção de fetos pequenos (PIP) e grandes (GIP) para idade de prenhez. O aumento da proporção de fetos PIP não era esperado, pois a literatura sobre os modelos experimentais de indução do diabetes moderado (glicemia entre 120 e 300 mg/dL) aponta para o aumento na taxa de fetos macrossômicos (GIP) (Oh et al., 1991; Gelardi et al., 1990; Merzouk et al., 2000, 2001, 2002) em função da presença de uma hiperglicemia materna menos intensa comparada ao diabetes grave (glicemia superior a 300 mg/dL). O aumento na proporção de recém-nascidos PIP em nossa investigação pode estar relacionado à diferença de sensibilidade genética existente entre os animais utilizados e os da literatura ou à

metodologia adotada para a indução do diabetes moderado (indução neonatal x indução na prenhez).

As placentas humanas em gestações complicadas pelo diabetes são caracterizadas por diversas alterações, que estão diretamente relacionadas ao nível de hiperglicemia intra-útero, refletindo redução da circulação feto-placentária e trocas materno-fetais (Del Nero et al., 2000; Calderon et al., 2003). No presente estudo, as ratas diabéticas tiveram placentas com pesos maiores. Similarmente, ratas com diabetes grave induzido pela administração de streptozotocin também tiveram placentomegalia (Calderon et al., 1999; Volpato et al., 2001, Sinzato et al., 2006; Souza et al., 2008). O aumento da placenta seria um mecanismo compensatório na tentativa de garantir as trocas materno-fetais e o suprimento nutricional ao feto em desenvolvimento (Calderon et al., 1999). Entretanto, este aumento placentário foi insuficiente, como evidenciado pelos maiores valores do índice placentário, o qual reflete insuficiência do órgão na nutrição e desenvolvimento fetal. Este fato também pode ser confirmado pelo menor valor da relação inversa do índice placentário na presença de diabetes, conforme demonstrado por Daskalakis et al. (2008). Há evidência de que as alterações placentárias seriam um dos fatores envolvidos nas complicações para o desenvolvimento embrio-fetal nas gestações diabéticas.

Desta forma, podemos concluir que o diabetes de intensidade moderada alterou a glicemia materna no início da prenhez, que deflagrou alterações no organismo materno e/ou no desenvolvimento inicial do embrião, afetando sua implantação e futuro desenvolvimento placentário e fetal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fernanda Pereira Lima, técnica do biotério do laboratório de pesquisa experimental de Ginecologia e Obstetrícia, pelo auxílio técnico; à Isabela L. Lessi e Aline Bueno, alunas de Iniciação Científica, pela manutenção dos animais; ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), pela contribuição no delineamento do estudo e análise estatística, à CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido (Processo No. 2006/03768-3) sob coordenação da Profa. Dra. Débora C. Damasceno.

Referências Bibliográficas

- Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V, 2002. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction* **17**, 2673–2677.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC, 1981. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* **30**(1), 64-69.
- Calderon IM, Damasceno DC, Amorim RL, Costa RA, Brasil MA, Rudge MV, 2007. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Research Clinical Practice* **78**(1), 65-71.
- Calderon IMP, Rudge MVC, Ramos MD, Peraçoli JC, 1999. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabética-relação com a macrossomia e o retardo de crescimento intrauterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* **21**, 91-98.
- Caluwaerts S, Holemans K, Van Bree R, Verhaeghe J, Van Assche A, 2003. Is low-dose Streptozotocin in rats adequate model for gestational Diabetes mellitus? *Journal of the Society for Gynecology Investigation* **10**, 216-221.
- Casson IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah PO, Platt MJ, Stanisstreet M, van Velszen D, Walkinshaw S, 1997. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *British Medical Journal* **315**, 275–278.
- Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Ramé C, Dupont J, 2008. Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reproduction Biology Endocrinology* **19**, 6-11.

- Chang AS, Dale AN, Moley KH, 2005. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* **146**(5):2445–2453.
- Chieri RA, Pivetta OH, Folgia VG, 1969. Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertility and Sterility* **20**, 661-666.
- Colton SA, Humpherson PG, Leese HJ, Downs SM, 2003. Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biology of Reproduction* **69**, 761–770.
- Colton SA, Pieper GM, Downs SM, 2002. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biology of Reproduction* **67**, 220–231.
- Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consoni M, Rudge MVC, Paumgartten FJR. *Anomalias Congênicas: Estudos Experimentais*, first ed. Coopmed, Belo Horizonte, 2008.
- Damasceno DC, Volpato GT, Calderon IMP, Rudge MVC, 2002. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. *Animal Reproduction Science* **72**(3-4), 235-244.
- Daskalakis G, Marinopoulos S, Krielesi V, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A, 2008. Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **87**(4):403-407.
- Del Nero U, Rudge MVC, Calderon IMP, 2000. Mecanismos de adaptação placentária facilitadores da nutrição fetal. *Femina* **28**, 91-93.
- Diamond MP, Moley KH, Pellicer A, Vaughn WK, DeCherney AH, 1989. Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse

- follicular and early embryo development. *Journal of Reproduction and Fertility* **86**, 1-10.
- Doblado M, Moley KH, 2007. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **14**, 488–493.
- El-Sayed Y, Lyell D, 2001. New therapies for the pregnant patient with diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics* **3**, 635–640.
- Eriksson UJ, 1984. Congenital malformation in diabetic animal models—a review. *Diabetes Research* **1**, 57–66.
- Eriksson UJ, Borg LA, Cederberg J, Nordstrand H, Simán CM, Wentzel C, Wentzel P, 2000. Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Upsala Journal of Medical Sciences* **105**(2), 53-84.
- Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P, 2003. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers - Animal and human studies. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **4**(1), 79-93.
- Fraser RB, Waite SL, Wood KA, Martin KL, 2007. Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. *Human Reproduction* **22**(12), 3059–3068.
- Freinkel N, 1980. Of pregnancy and progeny. Banting Lecture. *Diabetes* **29**, 1023–1035.
- Garris DR, West RL, Pekala PH, 1986. Ultrastructural and metabolic changes associated with reproductive tract atrophy and adiposity in diabetic female mice. *The Anatomical Record* **216**, 359-366.
- Gelardi NL, Cha CJM, Oh W, 1990. Glucose metabolism in adipocytes of obese offspring of mild hyperglycemic rats. *Pediatric Research* **28**, 641-645.

- Greene MF, 1999. Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus. *Seminars in Reproductive Endocrinology* **17**, 127–136.
- Ivanisevic M, Bukovic D, Starcevic V, Djelmis J, Pfeifer D, 1999. Influence of hyperglycemia on early embryonal growth in IDDM pregnant women. *Collegium Antropologicum* **23**, 183–188.
- Jawerbaum A, Catafau J, Gonzalez ET, Novaro V, Gomez G, Gelpi E, Gimeno AL, Gimeno MAF, 1994. Glucose metabolism, triglyceride and glycogen levels, as well as eicosanoid production in isolated uterine strips and in embryos in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus during pregnancy. *Prostaglandins* **47**, 81-95.
- Jawerbaum A, Catafau J, Gonzalez ET, Novaro V, Gomez G, Gelpi E, Gimeno MAF, 1996. Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy. *Prostaglandins* **51**(5), 307-320.
- Jawerbaum A, Gonzalez ET, Faletti Z, Novaro V, Vitullo A, Gimeno MAF, 1996. Altered prostanoid production by cumulus-oocyte complexes in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Prostaglandins* **52**, 209-219.
- Jovanovic L, Knopp RH, Kim H, Cefalu WT, Zhu XD, Lee YJ, Simpson JL, Mills JL, 2005. Elevated pregnancy losses at high and low extremes of maternal glucose in early normal and diabetic pregnancy. *Diabetes Care* **28**, 1113-1117.
- Kirchick HJ, Keyes PL, Frye BE, 1978. Etiology of anovulation in the immature alloxan-diabetic rat treated with PMSG: Absence of the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* **109**, 316-318.

- Lopez-Soldado I, Herrera E, 2003. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diabetes Research* **4**, 107-118.
- Merzouk H, Madane S, Boualga A Prost J, Bouchenak M, Belleville J, 2001. Age-related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Lipid Research* **42**, 1152-1159.
- Merzouk H, Madane S, Chabani Sari D, Prost J, Bouchenak M, Belleville J, 2000. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science (London)* **98**, 21-30.
- Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Montairou K, Belleville J, 2002. Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring streptozotocin-induced rats. *Lipids* **37**, 773-781.
- Muñoz C, López-Luna P, Herrera E, 1995. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biology of Neonate* **68**(4), 282-291.
- Oh W, Gelardi NL, Cha CJM, 1988. Maternal hyperglycemia in pregnant rats: its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring. *Metabolism: Clinical and Experimental* **37**, 1146-1151.
- Oh W, Gelardi NL, Cha CJM, 1991. The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatric Research* **29**, 606-610.
- Pfarrer C, Macara L, Leiser R, Kingdom J, 1999. Adaptive angiogenesis in placentas of heavy smokers. *Lancet* **354**(9175), 303.

- Portha B, Kergoat M, 1985. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozotocin diabetes induced in the newborn rat. *Diabetes* **34**(6), 574-579.
- Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G, 1974. Diabetogenic effect of streptozotocin on the rat during the perinatal period. *Diabetes* **23**(11), 888-895.
- Reece EA, Coustan DR, Gabbe SG. *Diabetes in women: Adolescence, Pregnancy and menopause*. New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- Reece EA, Eriksson UJ, 1996. The pathogenesis of diabetes-associated congenital malformations. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* **23**, 29–45.
- Rudge MVC, 1988. Diabete e gestação. *Femina* **16**, 125-48.
- Rudge MVC, Damasceno DC, Volpato GT, Almeida FCG, Calderon IMP, Lemonica IP, 2007. Effect of *Ginkgo biloba* on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **40**(8), 1095-1099.
- Sadler TW, Hunter ES III, Balkan W, Horton WE, 1988. Effects of maternal diabetes on embryogenesis. *American Journal of Perinatology* **5**, 319–326.
- Sinzato S, Calderon IMP, Damasceno DC, Volpato GT Campos KE, Lima PHO, Lima CRG, Sinzato YK, Rudge MVC, 2006. Tratamento de ratas diabéticas prenhes com extrato de *Morus nigrum*: Repercussões sobre a hiperglicemia e o sistema antioxidante maternos e as malformações

fetais. Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia **49**
(Suplemento 1): S188.

Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, Merzouk H, Khan NA, 2005. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. Clinical Science (London) **109**, 287-295.

Souza MSS, Lima PHO, Sinzato YK, Rudge MVC, Pereira OCM, Damasceno DC, 2008. Effects of cigarette smoke exposure on pregnancy outcome of diabetic rats and on their offspring. Reproductive Bio Medicine Online, (prelo).

Triadou N, Portha B, Picon L, Rosselin G, 1982. Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat. Diabetes **31**, 75-79.

Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, Fukumoto H, Koh G, Kurose T, Yamada Y, Yano H, Seino Y, Imura H, 1988. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. Metabolism **37**(11), 1040-1044.

Volpato GT Repercussões maternas, reprodutivas e perinatais do tratamento com o extrato aquoso de folhas de *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca) na prenhez de ratas não-diabéticas e diabéticas (dissertação). Botucatu (SP): Univ. Estadual Paulista; 2001.

Volpato GT, Damasceno DC, Calderon IMP, Rudge MVC, 1999. Estudo do extrato de *Bauhinia forficata* L. sobre o diabete em ratas prenhes. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais **2**, 49-55.

Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MVC, Padovani CR, Calderon IMP, 2008. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome

and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats.

Journal of Ethnopharmacology **116**(1), 131–137.

Vomachka MS, Johnson DC, 1982. Ovulation, ovarian 17 alpha-hydroxylase activity, and serum concentrations of luteinizing hormone, estradiol, and progesterone in immature rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **171**, 207-213.

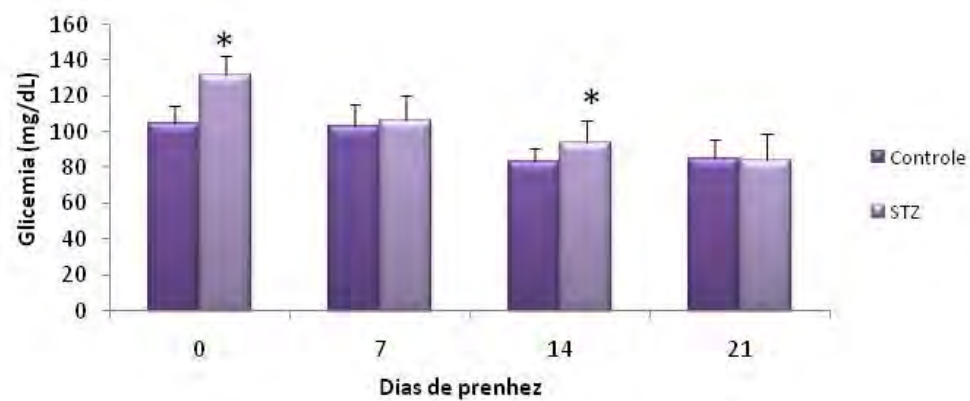


Figura 1. Evolução glicêmica de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

* $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (Teste t).

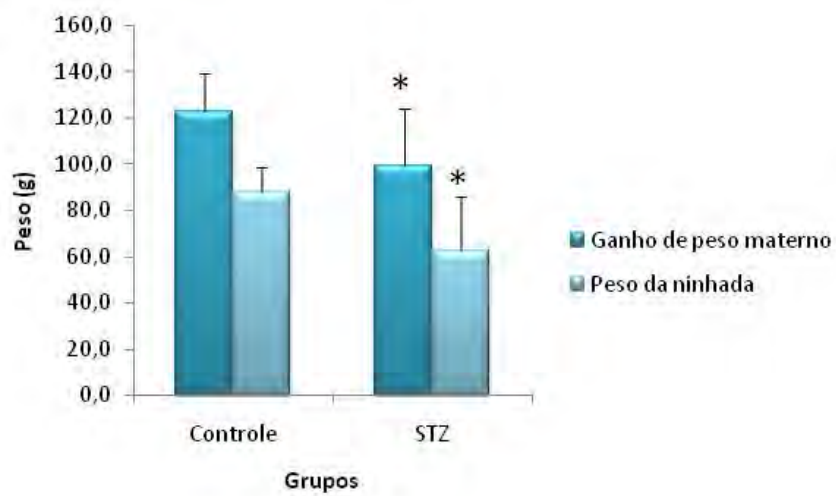


Figura 2. Ganho de peso materno e peso da ninhada de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

* $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (Teste t).



Figura 3. Proporção (%) de recém-nascidos pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes para idade de prenhez (GIP) ao término da prenhez de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

* $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (Teste de Qui-quadrado).

Tabela 1. Concentração de insulina plasmática em ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

Insulina ($\mu\text{U/L}$)	GRUPOS	
	Controle (n=7)	STZ (n =8)
	0,56 $\pm$ 0,51	0,71 $\pm$ 0,50

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

p>0,05 – não significativa

Tabela 2. Número total de ratas utilizadas desde o início do experimento e taxa de sucesso para a obtenção de ratas com prenhez a termo segundo o critério de inclusão.

	GRUPOS	
	Controle	STZ
Total de ratas utilizadas	45	102
Total de ratas vivas após a indução do diabetes (%)	45 (100%)	82 (80%)
Ratas acasaladas (%)	45 (100%)	82 (80%)
Ratas Prenhes (%)	37 (82%)	76 (72%)
Glicemia < 120 mg/dL (%)	30 (67%)	39 (38%)
Glicemia ≥ 120 mg/dL e ≤ 300 mg/dL (%)	7 (16%)	37 (36%)
Prenhez a termo (%)	28 (62%)	28 (27%)

(%) proporção de ratas em relação ao total de ratas utilizadas no início do experimento

Tabela 3. Desempenho reprodutivo materno, peso fetal e placentário e índice placentário de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

	GRUPOS	
	Controle (n = 28)	STZ (n = 28)
Corpo lúteo		
Total (N)	398	359
Média $\pm$ SD	14,2 $\pm$ 1,6	12,4 $\pm$ 1,9*
Implantação		
Total (N)	374	303
Média $\pm$ SD	13,4 $\pm$ 1,4	10,4 $\pm$ 2,8*
Fetos vivos		
Total (N)	359	250
Média $\pm$ SD	12,8 $\pm$ 1,6	8,7 $\pm$ 3,4*
Perda pré-implantação (%)	5,7	16,1*
Perda pós-implantação (%)	4,0	21,3*
Peso Fetal (g)	5,40 $\pm$ 0,27	5,36 $\pm$ 0,46
Peso Placenta (g)	0,42 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,08*
Índice Placentário	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01*

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

*p<0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (Teste t).

Capítulo 2

Associação entre concentrações de IL-10 e TNF- α no sangue materno e
imunolocalização na placenta de ratas com diabetes moderado

Yuri Karen Sinzato^a, Renée Laufer Amorim^b, Marcela Marcondes Pinto
Rodrigues^b, Marilza Vieira Cunha Rudge^a, Marie Oshiiwa^c, Débora Cristina
Damasceno^a

^a Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual
Paulista (Unesp) – Estado de São Paulo, Brasil, ^b Departamento de Clínica Veterinária-
Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu –
Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Estado de São Paulo, Brasil, ^c Centro Estadual
de Educação Tecnológica Paula Souza – FATEC de Marília - Estado de São Paulo, Brasil.

Running Title: IL-10 e TNF- α na prenhez diabética

Número de Caracteres: 21917; Número de Figuras: 6

Correspondência para Yuri Karen Sinzato
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP: 18618-000 Botucatu – Estado de São Paulo
Tel: 55 – 14 - 3811- 6181
E-mail: yuri_sinzato@yahoo.com.br

Este capítulo da tese foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista **Placenta**,
para a qual será submetido.

Resumo

Para uma gestação sem complicações, é necessário que ocorra o balanço entre as citocinas Th1 e Th2. O objetivo do estudo foi verificar os efeitos do diabetes moderado sobre a morfometria placentária, imunolocalização de IL-10 e TNF- α no tecido placentário e suas respectivas concentrações no plasma materno na prenhez de ratas Wistar. Metodologia: No dia do nascimento, 147 ratas Wistar foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: Não-diabético (Controle, n=45) - recebeu o veículo; Diabético (STZ, n=102) - recebeu 100mg streptozotocin/kg. Na fase adulta, as ratas foram acasaladas e, no dia 0 de prenhez, foram incluídas no estudo ratas controle que apresentassem glicemia <120 mg/dL e, para o grupo diabetes moderado, glicemia entre 120 e 300 mg/dL. Nos dias 11 e 21 de prenhez, as ratas foram anestesiadas para coleta de sangue para dosagem de IL-10 e TNF- α . No 21º dia de prenhez, as placentas foram retiradas e processadas para imunoistoquímica e análise morfométrica. 30 blocos placentários foram destinados ao estudo. As ratas STZ apresentaram glicemias maiores nos dias 0 e 14 de prenhez. Houve redução das concentrações de IL-10 em ambos os períodos analisados nas ratas STZ e diminuição da área de decídua. As dosagens de TNF- α e as análises imunoistoquímicas não apresentaram diferenças entre os grupos. Assim, o diabetes moderado reduziu IL-10 no plasma de ratas prenhes, causando prejuízo ao desenvolvimento placentário-fetal. Além disso, essas ratas apresentaram intensa marcação para IL-10 e TNF- α na decídua. Portanto, a dosagem de IL-10 pode ser utilizada como marcador de alterações na prenhez diabética.

Palavras-chave: diabetes, streptozotocin (STZ), prenhez, IL-10, TNF- α , placenta.

Abstract

In the gestation without complications, a balance between type Th1 and Th2 cytokines is very important. The aim of this study was to verify the effects of neonally induced mild diabetes on placental morphometry, IL-10 and TNF- α placental immunodetection and their maternal plasmatic concentrations from Wistar rats. At the birth day, female rats were distributed into: non-diabetic Group (control) and Diabetic Group (given 100 mg of streptozotocin/kg bw). These adult female rats were mated and, at the day 0 of pregnancy, they were included in the control group when presented glycemia below 120 mg/dL and, in the group STZ when showed glycemia between 120 and 300 mg/dL. In different moments of the pregnancy, glycemia was verified. At day 11 and 21 of pregnancy, the rats were anaesthetized to collect blood samples for IL-10 and TNF- α determination and, the placentas were withdrawn only at day 21 for morphometric and immunohistochemistry analysis. Rats STZ presented higher glycemia at days 0 and 14 of pregnancy. IL-10 concentrations were lower in rats STZ in both moments. In diabetic rats, decidual area was reduced. TNF- α dosage and immunohistochemistry analysis presented no differ between groups. Then, mild diabetes reduced plasma IL-10 in pregnant rats, impairing placental-fetal development. Besides, these rats presented high detection for IL-10 and TNF- α in decidua. Thus, IL-10 dosage might be used as marker of complication in diabetic pregnancy.

Keywords: diabetes, streptozotocin (STZ), pregnancy, IL-10, TNF- α , placenta.

Introdução

Na espécie humana e nos roedores, a implantação embrionária e a formação da placenta funcional são etapas essenciais para o estabelecimento da gestação e sobrevivência do embrião no ambiente uterino materno. Cada uma dessas etapas requer interação entre o conceito e o endométrio materno. O sucesso da implantação depende do crescimento adequado do trofoblasto e de sua proliferação finamente orquestrada dentro do endométrio para fornecer suprimento sanguíneo ao futuro embrião [1].

Citocinas são pequenos mediadores multifuncionais de glicoproteína, cuja função biológica é mediada por receptores específicos locais. Estão envolvidas em diversos processos biológicos no organismo porque podem modular a resposta imune local [2], inclusive o processo de implantação embrionária. Uma grande variedade de citocinas é expressa no útero, especialmente nas células do estroma endometrial, epitelial ou decidual e nas células trofoblásticas [3].

Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que pertence à subpopulação dos linfócitos T *helper* 2 (Th2). Parece ser a citocina chave para a manutenção da prenhez por exercer efeito protetor na unidade feto-placentária inibindo a secreção de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) [4]. Juntamente com a IL-4 e a IL-13, parece modular a invasão trofoblástica e favorecer o desenvolvimento da placenta. Uma gravidez bem sucedida resulta do balanço entre as citocinas tipo Th1 e Th2 para promover o crescimento e o desenvolvimento do conceito [5]. Foi demonstrado que o decréscimo de IL-10

está associado à restrição de crescimento fetal e abortamento em camundongos [6].

As citocinas e os fatores de crescimento agem no desenvolvimento embrionário e estão entre os fatores que determinam a sensibilidade dos embriões aos estímulos nocivos externos e internos, incluindo o diabetes [7]. O TNF- α (Th1) biologicamente ativo é sintetizado e liberado pelos tecidos gestacionais e, mulheres com diabetes gestacional, liberam grandes quantidades dessa citocina em resposta ao aumento de glicose [8]. Fein et al. [9] verificaram que o aumento das taxas de TNF α possivelmente está envolvido nos mecanismos das malformações associadas ao diabetes. A normalização dessa citocina, por potencializar o sistema imune materno, pode estar envolvida no efeito protetor contra os insultos embriotóxicos decorrentes do diabetes.

Alterações morfológicas na placenta indicam função placentária inadequada. Para que haja uma gestação sem intercorrências, o balanço entre as citocinas tipo Th1 e Th2, fatores de crescimento e fatores de transcrição são muito importantes. A presença do IL-10 (ao longo da gestação) em determinados tipos celulares é necessária para o desenvolvimento integrado entre o organismo materno-fetal e placentário, enquanto que o TNF- α é um tipo de citocina que interfere negativamente no desenvolvimento embrionário e fetal de mulheres diabéticas. Apesar da importância destes marcadores, não existem estudos mostrando a existência de relação entre morfologia placentária e avaliação das citocinas IL-10 e TNF- α em modelos de ratas com diabetes. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar a morfometria das regiões placentárias, o padrão de imunolocalização de IL-10 e TNF- α no tecido

placentário e suas respectivas concentrações no plasma materno na prenhez de ratas com diabetes moderado, para verificar se algum destes marcadores biológicos pode ser utilizado como fator preditivo para detecção de alterações no organismo embriofetal e no desenvolvimento placentário.

Materiais e métodos

Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas ratas recém-nascidas da linhagem Wistar, fornecidas e mantidas no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp) sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h), com água filtrada e ração *ad libitum*. No dia do nascimento, as ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: não-diabético (Controle) e diabético (STZ). Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo comitê de ética local (Protocolo Número 543).

Indução do diabetes

O diabetes foi induzido no 1º dia de vida por administração subcutânea de streptozotocin (STZ - SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), na dose de 100 mg/kg de peso corporal diluído em 0,1 mol/l de tampão citrato (pH 4,5) [10,11 modificados]. As ratas do grupo Controle receberam volume do veículo (tampão citrato) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica. Após a indução, as ratas foram mantidas com suas mães (máximo de oito fêmeas) até o término do período de amamentação (21 dias). Ao final deste período, as mães foram mortas por inalação de dióxido de carbono e as descendentes foram mantidas no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia sob condições controladas.

Período de acasalamento

Durante a vida adulta dos animais (110 dias de vida), foi iniciada a fase de acasalamento com duração máxima de 15 dias. A presença de espermatozóides e diagnóstico da fase estro do ciclo estral foi considerado dia zero (0) de prenhez. Foram incluídas no estudo somente as ratas do grupo STZ que apresentaram valores glicêmicos entre 120 mg/dL e 300 mg/dL (diabete moderado) [12,13] e ratas do grupo Controle com glicemia < 120 mg/dL no dia 0 de prenhez.

Período de prenhez

Glicemia

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Nas manhãs dos dias 0, 7, 14 e 21, a glicemia das ratas foi determinada em glicosímetro específico (*One Touch Ultra* – Johnson & Johnson®) e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

Obtenção do plasma materno e placentas

No 21º dia de prenhez, os animais foram anestesiados letalmente com tiopental sódico (Tiopentax®) e foi realizado dessangramento para coleta de amostras do sangue materno em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado a 2500 g a 4°C por 10 minutos para obtenção do plasma. Em seguida, as amostras sangüíneas foram estocadas em freezer a -80°C para dosagem de IL-10 (R&D Systems-Rat cód.: R1000) e TNF- α (R&D Systems-Rat cód.: RTA00) pelo método de ELISA segundo protocolo do kit. Para

avaliarmos as variações das concentrações de IL-10 e TNF- α plasmáticos em diferentes momentos da prenhez, foram incluídas no experimento mais 30 ratas prenhes (controle, n=15; diabetes moderado; n=15) mortas no 11º dia prenhez, as quais foram submetidas a procedimento similar aos das ratas mortas no 21º dia para coleta de amostras de sangue para determinação das citocinas citadas.

Após obtenção das amostras de sangue no 21º dia de prenhez, foi realizada laparotomia com exposição dos cornos uterinos. As placentas e fetos a termo foram retirados e pesados e o índice placentário foi calculado pela razão entre o peso placentário pelo peso fetal. As placentas foram cortadas na porção médio-sagital (da face materna até a face fetal). As amostras de tecido foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e embebidas em parafina para a obtenção dos blocos destinados à análise morfométrica.

Morfometria placentária

Um total de 30 blocos placentários (15 blocos/grupo; 1 bloco/rata), destinados ao estudo morfométrico, foi seccionado no sentido longitudinal em cortes de 5 μ m de espessura, montados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em aumento 2,5X para a medida da área labiríntica e de 10X para a medida das áreas da zona juncional e decídua. Foram analisados seis campos por lâmina evitando-se as áreas de infarto e artefatos histológicos. As análises morfométricas foram realizadas em sistema computadorizado de imagem acoplada a fotomicroscópio (DM 2500, Leica®) utilizando-se software da Leica QWIN versão 3.3.0. As áreas médias de cada zona placentária foram avaliadas em milímetro quadrado (mm²).

Imunoistoquímica

Um total de 30 blocos placentários (15 blocos/grupo; 1 bloco/rata) foi destinado à imunoistoquímica para cada citocina. Secções de tecido de 5µm foram desparafinizadas e reidratadas por meio de banhos em soluções de gradientes decrescentes de etanol. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica do tecido com solução de EDTA (pH 8,0) em banho Maria a 96°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação com bloqueador universal (Dako - Dual Endogenous Enzyme Block cód.: S2003) e, em seguida, a ligação com proteínas inespecíficas foi bloqueada com leite desnatado a 3% (Molico[®]). A marcação do tecido foi realizada utilizando-se como anticorpos primários anti IL-10 (Polyclonal Goat anti-rat, R&D Systems, cód: AF-519) e anti TNF- α (Polyclonal Goat anti-rat, R&D Systems, cód: AF-510-NA) com diluição de 1:100. Após incubação *overnight* a 4°C, seguiu-se a incubação com anticorpo secundário (Polyclonal Rabbit anti-goat biotinilado, Dako, cód.: E0466) por 30 minutos à temperatura de 37°C seguida pela incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase por 30 minutos à 37°C. Para revelação da peroxidase foi utilizado o DAB (3,3-diaminobenzidina) como substrato cromógeno. As amostras foram então contra-coradas com hematoxilina e montadas em resina. Como controle negativo foram utilizadas amostras dos dois grupos, substituindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário por BSA (Albumina Sérica Bovina) a 1%.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP) e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se Two-way

ANOVA seguida do Teste t. Para análise de prevalência, foi utilizado o teste de Friedman seguido do teste de Qui-quadrado. Os resultados da imunoistoquímica foram expressos como a média dos escores dados da seguinte maneira: (1) ausente, (2) fraca marcação, (3) moderada marcação, (4) forte marcação. O limite mínimo de significância estatística estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

Glicemias maternas

As médias glicêmicas das ratas STZ apresentaram aumento significativo nos dias 0 e 14 de prenhez quando comparadas às médias glicêmicas das ratas Controle. No 7º e 21º dias de prenhez, as médias glicêmicas não diferiram de forma significativa entre os grupos analisados (Tabela 1).

Concentrações de IL-10 e TNF- α plasmáticas

Durante o experimento, 28 ratas foram utilizadas, mas 15 ratas foram sorteadas para obtenção de amostras plasmáticas e de placenta.

No 11º e no 21º dias de prenhez, as concentrações de IL-10 plasmáticas no grupo STZ foram estatisticamente menores em relação aos respectivos grupos Controle. Fixando-se o grupo experimental, quando as concentrações de IL-10 foram comparadas entre os momentos, o grupo Controle apresentou aumento significativo na concentração de IL-10 da metade para o final da prenhez. No grupo STZ, as concentrações de IL-10 permaneceram inalteradas com o decorrer da prenhez. Não houve alteração nas concentrações de TNF- α entre os grupos ou entre os diferentes momentos analisados (Tabela 2).

Morfometria placentária

A área média da decídua das placentas de ratas STZ foi reduzida comparada à mesma área do grupo controle. As áreas médias da zona juncional e labirinto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 3).

Imunoistoquímica

IL-10 e TNF- α placentários

Tanto o IL10 quanto o TNF- α apresentaram imunolocalização nas regiões de decídua, zona juncional e labirinto em todas as amostras de ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre a média dos escores quanto à intensidade da imunolocalização para IL-10 e TNF- α entre os grupos em nenhuma das regiões estudadas (Tabela 4).

No grupo Controle, não foi possível determinar a prevalência de intensidade de marcação do IL-10 em nenhuma das regiões analisadas. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as marcações das citocinas nos dois grupos, cabe destacar que houve prevalência de marcação forte para IL-10 na decídua em oito ratas STZ dentre os 14 analisados e nove animais apresentaram marcação moderada nas células gigantes e espongiotrofoblasto. Com relação à imunolocalização para o TNF- α , houve prevalência de intensidade moderada (10/13 animais) na decídua e no espongiotrofoblasto (7/13) e de intensidade moderada (6/13) e fraca (6/13) nas células gigantes do grupo Controle. No grupo STZ, houve prevalência de intensidade forte (7/15) e moderada (6/15) na região da decídua e de intensidade moderada (7/15) no espongiotrofoblasto. Não foi possível identificar estatisticamente a prevalência de intensidade nas células gigantes (Tabela 5 e Figura 1).

A análise de correlação entre as concentrações de IL-10 e TNF- α plasmáticas e a intensidade da expressão (imunolocalização) dessas citocinas no tecido placentário não mostrou significância estatística (dados não mostrados).

Discussão

No presente estudo, foi evidenciado que ratas com diabetes moderado apresentaram médias glicêmicas maiores no início e na metade da prenhez. O aumento da glicemia no 14º dia de prenhez foi acompanhado de intolerância à glicose e resistência à insulina, confirmadas respectivamente pelo teste oral de tolerância à glicose, corroborando com os achados de Muñoz et al. [14], e pelo teste de tolerância à insulina (dados não mostrados).

Em gestações complicadas pelo diabetes, as placentas humanas são caracterizadas por diversas alterações, que estão diretamente relacionadas ao nível de hiperglicemia intra-útero, refletindo redução da circulação feto-placentária e trocas materno-fetais [15,16]. Em nosso modelo de diabetes moderado, o aumento da média glicêmica materna observada nos dias 0 e 14 de prenhez não foi suficiente para causar alterações na zona juncional e na área labiríntica (região de trocas materno-fetais), como evidenciado no labirinto das placentas de ratas com diabetes grave [17]. No entanto, as ratas STZ apresentaram alterações morfométricas na decídua (redução da área média analisada), a qual parece estar relacionada ao tempo de exposição das ratas à hiperglicemia e não à intensidade desta. Além disso, a alteração morfométrica da decídua pode estar relacionada à redução no número de implantações e aumento na taxa de perdas embrionárias no grupo de ratas com diabetes moderado observado em nosso laboratório (dados não mostrados). Isto porque o desenvolvimento fetal é altamente dependente do fornecimento eficiente de nutrientes pela placenta, especialmente da decídua, o componente de sustentação materno da placenta, que é influenciado pelo meio diabético [18].

A importância da função nutritiva da decídua deve-se ao fato dos vasos deciduais entregarem sangue arterial materno na lacuna da zona basal placentária [19].

Durante a gestação normal, as citocinas Th1 estão sub-reguladas, enquanto que as citocinas Th2 estão supra-reguladas [20]. Além disso, uma troca entre o fenótipo Th1 e Th2 tem sido mostrada durante a gestação para estimular a produção vigorosa de anticorpos que não somente combatem infecções, mas também oferecem imunidade passiva ao feto [21]. A literatura aponta que há maior produção de IL-10 em gestações com sucesso quando comparadas às gestações com patologias, como na presença de abortos espontâneos e pré-eclâmpsia [22-28], sustentando o papel do IL-10 para manutenção da gestação normal.

No presente trabalho, verificou-se que as concentrações de IL-10 plasmáticas na metade (11º dia de prenhez) e no final da prenhez (21º dia de prenhez) estavam diminuídas nas ratas com diabetes moderado. A diminuição da concentração de IL-10 na prenhez a termo corrobora com os resultados encontrados por Kuzmicki et al. [29] em mulheres com diabetes gestacional. Contrariamente, Atégbo et al. [30] verificaram elevação de IL-10 em gestantes diabéticas.

Além disso, verificamos que o grupo Controle apresentou aumento significativo na concentração de IL-10 plasmática da metade para o final da prenhez, enquanto que, no grupo STZ, a concentração desta citocina não diferiu do valor encontrado no 11º dia de prenhez. Há resultados divergentes com relação às concentrações de IL-10 ao longo da gestação normal, Kurse et al. [31] e Power et al. [32] relatam que há aumento dos níveis plasmáticos de

IL-10 de acordo com a duração da gestação, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo. Já, Vassiliadis et al. [33] reportam que as concentrações de IL-10 não sofreram modificações. Holmes et al. [34] propõem que as possíveis explicações para a diferença de resultados encontrados seja o pequeno número de estudos e o emprego de uma metodologia de estudo não apropriada. No entanto, não há relatos na literatura sobre as concentrações dessas citocinas no decorrer da gestação diabética.

O aumento de TNF- α em condições diabéticas pode ser resultado de estresse oxidativo e mudanças inflamatórias causadas pela hiperglicemia [35]. Nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos analisados com relação às concentrações plasmáticas de TNF- α . Estudos com gestantes diabéticas mostram que os níveis séricos de TNF- α foram elevados em relação às gestantes saudáveis [30,36-38]. Desta forma, estes resultados não corroboram com nossos achados. Os resultados divergentes entre nosso estudo e os descritos na literatura poderiam ser explicadas pelo fato das dosagens de TNF- α terem sido realizadas no plasma e o anticoagulante utilizado a heparina, sugerindo menor sensibilidade em relação às dosagens feitas em soro e o uso de anticoagulante EDTA (Etilenodiaminotetracético). Além disso, as concentrações séricas de TNF- α têm mostrado ligação com resistência à insulina fisiológica presente na gestação [38]. No entanto, apesar da inalteração do TNF- α entre os grupos, foi verificado em nosso laboratório que ratas com diabetes moderado, induzido no período neonatal, apresentaram resistência à insulina (dados não mostrados). A indução de resistência à insulina por TNF- α pode ser devida à diminuição da fosforilação do receptor de insulina tirosina-quinase por substituição da tirosina

em resíduos de serina [39]. Kirwan et al. [40] afirmam que as concentrações circulantes de TNF- α são inversamente proporcionais à sensibilidade à insulina quando medida por clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Assim, em nosso modelo, o TNF- α não foi um bom marcador de sensibilidade à insulina. Entretanto, cabe ressaltar que o estudo de Kirwan et al. [40] foi realizado com gestantes diabéticas obesas, sendo a obesidade por si só um fator desencadeante de resistência à insulina.

Na gestação, as citocinas e os fatores de crescimento medeiam a interação entre sistema imune e sistema endócrino materno, fetal e placentário. O aumento ou o suprimento inadequado desses fatores tem efeitos deletérios para o sucesso da gestação e da saúde dos descendentes [41]. A placenta também sintetiza uma variedade de citocinas, aumentando ainda mais o nível de complexidade existente entre as interações imuno-metabólicas em gestantes [42]. Em nosso estudo, a avaliação da imunolocalização de IL-10 e TNF- α mostrou que ambos apresentaram expressão, distribuída de forma ampla, em todas as regiões (decídua, zona juncional e labirinto) das placentas a termo. A análise da intensidade de marcação destas citocinas, quando avaliada pela média dos escores, não mostrou diferenças significativas entre as placentas das ratas. Embora a análise estatística dos resultados sobre a prevalência das marcações para as citocinas não mostrasse diferenças significativas entre os grupos, chama a atenção a forte marcação de IL-10 e TNF- α na decídua de ratas com diabetes moderado e marcação moderada de IL-10 na decídua de ratas Controle e no espongiotrofoblasto e células gigantes de ratas diabéticas. Sugere-se que a forte marcação de IL-10 e TNF- α na decídua possa estar relacionada à presença de processo inflamatório,

comprometendo o desenvolvimento da decídua, contribuindo também para redução de sua área média. Richardson e Carpenter [43] afirmam que o diabetes gestacional reflete alteração crônica no metabolismo de carboidrato, contribuindo ainda mais para o quadro de resistência à insulina induzida na gestação. A fisiopatologia da resistência à insulina nestas grávidas provavelmente é devida à desregulação metabólica e imune, sendo que ambas influenciam a homeostase glicêmica por mediadores inflamatórios. Radaelli et al. [44] confirmaram, em 2003, esse resultados, mostrando que o diabetes gestacional provoca alterações na expressão de genes placentários com acentuado aumento de marcadores e mediadores da inflamação.

Não houve correlação significativa entre a imunolocalização de IL-10 e TNF- α no tecido placentário e suas concentrações plasmáticas. Frente à tendência de marcação forte para IL-10 nas ratas diabéticas e redução da concentração desta citocina no plasma, era esperada uma correlação negativa ou ausência de correlação. Desta forma, podemos inferir que tanto o IL-10 quanto o TNF- α atuaram localmente na placenta, não causando efeito sistêmico no organismo materno. Isto foi confirmado por Lepercq et al. [45], que evidenciaram que o TNF- α é pobremente liberado pela placenta e, por isso, é mais provável que exerça efeitos parácrinos e não sistêmicos. Além disso, faltam investigações em animais de laboratório sobre a expressão de IL-10 placentário por imunistoquímica e existe um único trabalho que mostra a expressão de TNF- α placentário na prenhez de ratas com diabetes grave, no entanto, a análise deste trabalho foi realizada do início ao 9º dia de prenhez [9].

Podemos concluir que o diabetes moderado levou à redução das concentrações plasmáticas de IL-10 nas ratas prenhes, causando prejuízo para

o desenvolvimento placentário e fetal. Além disso, as ratas prenhes diabéticas apresentaram intensa imunolocalização para IL-10 e TNF- α na região de decídua, embora sem correlação com as concentrações plasmáticas destas citocinas no organismo materno. Desta forma, podemos afirmar que a concentração de IL-10 plasmático pode ser utilizado como marcador de alterações na prenhez diabética.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fernanda Pereira Lima, técnica do biotério do laboratório de pesquisa experimental de Ginecologia e Obstetrícia, pelo auxílio técnico; à Ana Paula Machado Spada, aluna de Pós-Graduação, à Isabela L. Lessi e Aline Bueno, alunas de Iniciação Científica, pela manutenção dos animais; à CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido (Processo No. 2006/003768-3) sob coordenação da Profa. Dra. Débora C. Damasceno.

Referências Bibliográficas

- [1] Kennedy TG, Gillio-Meina C and Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 2007; 134:635–43.
- [2] Orsi NM and Tribe RM. Cytokine Networks and the Regulation of Uterine Function in Pregnancy and Parturition. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:462–9.
- [3] Robertson SA. Cytokines. In Knobil, E and Neil, J (eds) *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press, San Diego, CA 1998; pp.809-22.
- [4] Mosmann TR and Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989; 46:111-47.
- [5] Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC and 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(5):305-10.
- [6] Rivera DL, Olistier SM, Liu X, Thompson JH, Zhang XJ, Pennline K, Azuero R Clark DA and Miller MJ. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. *FASEB J* 1998; 12:189-97.
- [7] Fein A, Magid N, Savion S, Orenstein H, Shepshelovich J, Ornoy A, Torchinsky A and Toder V. Diabetes teratogenicity in mice is accompanied with distorted expression of TGF-beta in the uterus. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22(3):235-6.
- [8] Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JMH and Rice GE. Glucose-induced release of tumor necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2001; 18:921-7.

- [9] Fein A, Kostina E, Savion S, Orenstein H, Shepshelovich J, Ornoy A, Torchinsky A and Toder V. Expression of tumor necrosis factor-alpha in the pregnant uterus of diabetic mice: effect of maternal immunopotential. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46(2):161-8.
- [10] Portha B, Levacher C, Picon L and Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin on the rat during the perinatal period. *Diabetes* 1974; 23(11):888-95.
- [11] Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, Fukumoto H, Koh G, Kurose T, Yamada Y, Yano H, Seino Y and Imura H. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism* 1988; 37(11):1040-4.
- [12] Calderon IMP, Rudge MVC, Ramos MD and Peraçoli JC. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabética-relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intrauterino. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1999; 21:91-8.
- [13] Merzouk H, Madane S, Chabani Sari D, Prost J, Bouchenak M and Belleville J. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98:21-30.
- [14] Muñoz C, López-Luna P and Herrera E. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol Neonat* 1995; 68(4):282-91.
- [15] Del Nero U, Rudge MVC and Calderon IMP. Mecanismos de adaptação placentária facilitadores da nutrição fetal. *Femina* 2000; 28: 91-3.
- [16] Calderon IMP, Damasceno DC, Amorim RL, Costa RA, Brasil MA and Rudge MV. Morphometric study of placental villi and vessels in women

with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diab Res Clin Pract* 2007; 78(1):65-71.

- [17] Sinzato YK, Souza MSS, Lima PHO, Rudge MVC, Calderon IMP, Bevilacqua E and Damasceno DC. Fetal growth restriction and placental morphometry from diabetic rats exposed to cigarette smoke. (submetido)
- [18] Caluwaerts S, Pijnenborg R, Luyten C and Van Assche FA. Growth characteristics of diabetic rat ectoplacental cones in vivo and in vitro. *Diabetologia* 2000; 43:939-45.
- [19] Czekaj P, Pałasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, Kamiński M. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75(Suppl):S27-S35.
- [20] Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001; 13:219–327.
- [21] Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P and Ruecker AV . Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:933–8.
- [22] Marzi M, Vigano D, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E and Clerici M. Characterization of type1 and type2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996; 106:127–33.
- [23] Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N and Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2000; 15:2011–7.

- [24] Wu MY, Chen HF, Chen SU, Chao KH, Yang YS and Ho HN. Increase in production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46:386–92.
- [25] Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA and Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 1999; 163:3491–5.
- [26] Chaouat G, Menu E, de Smedt D, Khrihnan L, Hui L, Assal, Meliani A, Martal J, Raghupathy R and Wegmann TG. The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35:325–9.
- [27] Hill JA, Polgar K and Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 28:1958–9.
- [28] Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M and Al-Shamali E. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999; 196:122–30.
- [29] Kuzmicki M, Telejko B, Zonenberg A, Szamatowicz J, Kretowski A, Nikolajuk A, Laudanski P and Gorska M. Circulating pro- and anti-inflammatory cytokines in Polish women with gestational diabetes. *Horm Metab Res* 2008; 40(8):556-60.
- [30] Atégbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z and Khan NA. Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10):4137–43.
- [31] Kurse N, Greif M, Moriabadi NF, Marx L, Toyka KV and Rieckmann P. Variation in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 2000; 119:317–22.

- [32] Power LL, Popplewell EJ, Holloway JA, Diaper ND, Warner JO and Jones CA. Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth. *J Reprod Immunol* 2002; 56:19–28.
- [33] Vassiliadis S, Ranella A, Papadimitriou L, Makrygiannakis A and Athanassakis I. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators Inflamm* 1998; 7:69–72.
- [34] Holmes VA, Wallace JMW, Gilmore WS, McFaul P and Alexander HD. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine* 2003; 21:265–9.
- [35] Sternberg EM. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 1992; 117:854–66.
- [36] Altinova AE, Toruner F, Bozkurt N, Bukan N, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N and Arslan M. Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol.* 2007; 23(3):161-5.
- [37] Wang SL, Liu PQ, Ding Y, Peng W and Qu X. Maternal serum tumor necrosis factor-alpha concentration and correlation with insulin resistance in gestational diabetes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004; 39(11):737-40.
- [38] Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajós P, Salamon F, Turi Z, Kovács M, Vargha P and Karádi I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diab Res Clin Pract* 56 (2002) 93–9.

- [39] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF and Spiegelman BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665–8.
- [40] Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC and Catalano PM. TNF-alpha Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. *Diabetes* 2002; 51:2207-13.
- [41] Raghupathy R and Tangri S. Immunodystrophism, T cells, cytokines, and pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol* 1996 ; 35(4):291-6. Review.
- [42] Desoye G and Hauguel-de Mouzon S. The Human Placenta in Gestational Diabetes Mellitus - The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2007; 30(Supplement 2):S120-S126.
- [43] Richardson AC, Carpenter MW. Inflammatory mediators in Gestational Diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 2007; 34:213-224.
- [44] Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 2003; 52:2951–2958.
- [45] Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H, and Hauguel-de Mouzon S. Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2409–13.

Tabela 1. Evolução glicêmica em ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

Dias de Prenhez	Glicemia (mg/dL)	
	Controle	STZ
	(n=28)	(n=28)
0	105,0 ± 10,0	132,1 ± 10,0*
7	102,8 ± 12,2	106,6 ± 13,8
14	83,1 ± 8,0	93,6 ± 12,9*
21	85,3 ± 10,6	84,1 ± 14,7

Valores expressos como média ± desvio padrão.

*p<0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Teste t).

Tabela 2. Concentrações de IL-10 e TNF- α plasmáticos de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle) no 11º e 21º dias de prenhez.

	GRUPOS	
	Controle	STZ
IL-10 (pg/mL)		
11º dia de prenhez (n=15)	14,45 $\pm$ 8,92	4,60 $\pm$ 6,61*
21º dia de prenhez (n=15)	20,90 $\pm$ 8,06 [#]	7,55 $\pm$ 4,49*
TNF- α (pg/mL)		
11º dia de prenhez (n=15)	2,30 $\pm$ 0,85	2,28 $\pm$ 0,90
21º dia de prenhez (n=15)	3,06 $\pm$ 1,70	2,73 $\pm$ 0,92

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão.

*p<0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle do mesmo momento (Teste t).

[#]p<0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao 11º dia de prenhez do mesmo grupo experimental (Teste t).

Tabela 3. Áreas médias da decídua, zona juncional e labirinto de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle).

	GRUPOS	
	Controle	STZ
	(n=15)	(n=15)
Decídua (mm ²)	0,087 ± 0,036	0,078 ± 0,028*
Zona juncional (mm ²)	0,281 ± 0,061	0,297 ± 0,106
Labirinto (mm ²)	7,506 ± 0,997	7,725 ± 1,196

Valores expressos como média ± desvio padrão.

*p<0,05 – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Teste t).

Tabela 4. Imunolocalização de IL-10 e TNF- α na decídua, células gigantes e espongiotrofoblasto nas placentas de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle) no 21º dia de prenhez.

	Decídua	Células Gigantes	Espongiotrofoblasto
IL-10			
Controle (n=14)	3,21 $\pm$ 0,80	2,79 $\pm$ 0,80	2,93 $\pm$ 0,83
STZ (n=14)	3,50 $\pm$ 0,65	2,93 $\pm$ 0,62	3,07 $\pm$ 0,62
TNF-α			
Controle (n=13)	2,92 $\pm$ 0,49	2,62 $\pm$ 0,65	2,69 $\pm$ 0,63
STZ (n=15)	3,33 $\pm$ 0,72	3,00 $\pm$ 0,85	3,00 $\pm$ 0,76

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão em função de escores (1= ausente, 2=fraca, 3=moderada, 4=forte) para intensidade da imunolocalização.

p>0,05 – diferença não significativa

Tabela 5. Prevalência (%) da intensidade (escores) da imunolocalização para IL-10 e TNF- α nas placentas de ratas com diabetes moderado (STZ) e não-diabéticas (Controle) no 21º dia de prenhez.

	Decídua		Células Gigantes		Espongiotrofoblasto	
	Controle	STZ	Controle	STZ	Controle	STZ
IL-10						
Ausente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fraca	21,4%	7,1%	42,9%	21,4%	35,7%	14,3%
Moderada	35,7%	35,7%	35,7%	64,3% ^a	35,7%	64,3% ^a
Forte	42,9%	57,1% ^a	21,4%	14,3%	28,6%	21,4%
TNF-α						
Ausente	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fraca	15,4%	13,3%	46,2% ^a	33,3%	38,5%	26,7%
Moderada	76,9% ^a	40,0% ^a	46,2% ^a	33,3%	53,8% ^a	46,7% ^a
Forte	7,7%	46,7% ^a	7,7%	33,3%	7,7%	26,7%

^a p<0,05 – prevalência de intensidade da imunolocalização na região analisada fixando o grupo experimental (Teste de Qui-quadrado).

Anexo



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.

CEP: 13.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143

e-mail: secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituição de Medicina Animal da Portaria do Diretor nº 33 de 25/04/05



Comitê de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 543 sobre o Projeto de Pesquisa "Análise morfológica e imunológica de placentas de ratas com diabetes de intensidade moderada", sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Débora Cristina Damasceno, com a participação de Yuri Karen Sinzato, Paula Helena Ortiz Lima, Ana Carolina Inhasz Kiss, esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 28 de junho de 2006

Prof.ª Dr.ª Norma Sueli P. Modolo
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA