

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Enfermagem
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde

Ana Carolina de Sena Avellar

**ALTERAÇÕES DOS COMPONENTES IMUNES PRESENTES NO COLOSTRO
DE MÃES COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Belo Horizonte

2021

Ana Carolina de Sena Avellar

**ALTERAÇÕES DOS COMPONENTES IMUNES PRESENTES NO COLOSTRO
DE MÃES COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Área de Concentração: Nutrição e Saúde

Linha de Pesquisa: Nutrição Clínica e Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Tatiani Uceli Maioli

Co-orientador: Elaine Speziale.

Belo Horizonte

2021

Avellar, Ana Carolina de Sena.

AV949a Alterações dos componentes imunes presentes no Colostro de mães com Diabetes Mellitus Gestacional [manuscrito]. / Ana Carolina de Sena Avellar. - - Belo Horizonte: 2021.

81f.: il.

Orientador (a): Tatiani Uceli Maioli.

Área de concentração: Nutrição e Saúde.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Gestantes. 2. Diabetes Gestacional. 3. Colostro. 4. Sistema Imunitário. 5. Citocinas. 6. Quimiocinas. 7. Dissertação Acadêmica. I. Maioli, Tatiani Uceli. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. III. Título.

NLM: WP 825

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

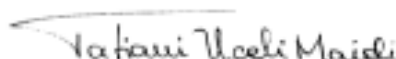
ATA DE NÚMERO 69 (SESSENTA E NOVE) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ANA CAROLINA DE SENA AVELLAR PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 30 (trinta) dias do mês de abril de dois mil e vinte e um, às 09:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "ALTERAÇÕES DOS COMPONENTES IMUNES PRESENTES NO COLOSTRO DE MÃES COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL", da aluna *Ana Carolina de Sena Avellar*, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelas professoras doutoras Tatiani Uceli Maioli, Jacqueline Isaura Alvarez Leite e Adenilda Cristina Honorio França, e pela Dra. Elaine Speziali de Faria, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- APROVADO;**
 APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
 REPROVADO.

O resultado final foi comunicado à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Tatiani Uceli Maioli, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de abril de 2021.

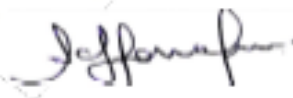
Prof. Dr. Tatiani Uceli Maioli
Presidente (UFMG)



Prof. Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite
(UFMG)



Prof. Dr. Adenilda Cristina Honorio França
(UFMG)



Dr. Elaine Speziali de Faria
(Fiocruz Minas)



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente *a Deus*, pelo dom da vida, por me iluminar, encorajar a lidar com os desafios da vida de mestrandia que em meio a uma pandemia global tornou-se tudo mais difícil, mas com fé nele, acreditei que seria possível tornar o sonho real.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por me incentivarem a sempre buscar meu melhor independente das circunstâncias. Mais uma conquista que devo a vocês!

Ao meu irmão, Lucas, por sempre me proteger, me ensinar tudo sobre a vida pessoal e acadêmica e me apoiar em todas as decisões.

A toda minha família que de alguma forma esteve presente nesse momento comigo me apoiando e incentivando. Em especial, a família da Juninha, que se juntou a nossa e hoje tornamos uma só família.

Agradeço também a *todas as minhas amigas do grupo Gordinhas* que de alguma forma participaram desse desafio, em especial, *Camila Dias*, que sempre esteve ao meu lado para ouvir meus desabafos, me incentivando a ser uma pessoa melhor e a buscar sempre o melhor de mim.

À Natália Lopes, pelas nossas longas conversas sobre tudo, por me ouvir, apoiar e ficar feliz com todas as minhas conquistas. Agradeço também pelas nossas viagens e parcerias. Obrigada por não desistir de mim.

A todas as amigadas que fiz no Hospital Odilon Behrens que durante o primeiro ano estiveram comigo, em especial, *a Lili e Vanessa*, as melhores coordenadoras que já tive e que sempre me ajudaram flexibilizando meus horários para atender as demandas do mestrado e acreditando que eu conseguiria vencer mais essa etapa. Vocês me ensinaram tanto!

Agradeço também a *Rafa Souza*, o que seria de mim sem você? Uma amizade que se iniciou em um time de Handebol da UFMG, perdurou, e hoje ela faz parte de toda essa dissertação. Agradeço também em especial *a Mari Naves* que disponibilizou horas dos seus dias para me auxiliar na coleta e processamento das amostras. Vocês foram peças fundamentais!

Meu agradecimento especial também a toda equipe do Risoleta Neves, em especial, *Nataly, Eloah e a Rosângela* que estavam sempre comigo durante o período da coleta dos dados.

À *minha orientadora Tatiani Maioli* que tanto admiro como pessoa, professora e pesquisadora por me ensinar tanto diariamente, por acreditar e confiar que eu seria capaz desde o início dessa trajetória.

A *minha coorientadora Elaine Speziale* pelo incentivo e auxílio durante o mestrado e a todos os professores da UFMG que de uma forma geral contribuíram muito para minha graduação e pós-graduação, os principais responsáveis pela minha formação durante todos esses anos. Agradeço também *a professora Luana* pelo auxílio durante a graduação, por despertar em mim o gosto pela pesquisa e pelas suas alunas *Taci e Ariene* que me apoiaram tanto e ajudaram durante esse período.

A *Ana Maria Caetano* que me disponibilizou um pedacinho do seu laboratório para realizar as análises e a *todos os alunos do LIB*, em especial, *a Gabi, Carol, Fernanda, Mauro, Marcos e Caixeta* que me ajudaram, incentivaram e deram apoio nos momentos mais difíceis durante esse percurso.

Por fim, agradeço *a todas as pacientes* do Risoleta Neves que se dispuseram a participar da pesquisa e me doaram um pouquinho do seu tempo, sem vocês eu não conseguiria.

Obrigada!

RESUMO

Introdução: O leite materno é considerado um alimento completo e fundamental para o recém-nascido (RN). Até os primeiros 7 dias após o parto aproximadamente, o leite excretado da mama é conhecido como colostro, um fluido de menor volume e rico em compostos imunológicos. Esse leite é responsável por fornecer nutrição ideal para o crescimento e desenvolvimento saudável dos bebês, bem como garantir a proteção e o desenvolvimento adequado do sistema imune do recém-nascido. Entretanto, alguns fatores maternos como a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), pode vir a alterar a concentração de citocinas e quimiocinas presentes no colostro. Nesse contexto, torna-se importante avaliar as alterações nas concentrações desses biomarcadores na presença da doença, uma vez que essas mudanças podem afetar o desenvolvimento do sistema imune do recém-nascido. **Objetivo:** O presente trabalho tem por objetivo avaliar se a ocorrência de DMG modifica a concentração de citocinas e quimiocinas presentes no colostro. **Métodos:** Estudo transversal, realizado com dois grupos de mulheres internadas no pós-parto imediato em uma Maternidade referência em Belo Horizonte. Os grupos foram separados de forma que em um deles todas as participantes apresentaram gestação saudável, e o outro grupo apresentou DMG. Foram coletados dados socioeconômicos, de saúde e antropométricos através da caderneta da gestante e avaliação no pós-parto. Também no pós-parto, foi coletado em ambos os grupos uma média de 2mL de colostro para análise da concentração das citocinas/quimiocinas por imunoenensaio multiplex. **Resultados:** Foram incluídas no estudo 25 mulheres, sendo que 56% delas apresentaram uma gestação de risco habitual e 44% DMG. A média e desvio padrão da idade entre elas foi calculada para o grupo risco habitual e DMG respectivamente (24,86±5,26) e (30,09±6,25). No grupo DMG, observou-se aumento na concentração de IL-10, IFN- γ e IL-15 no colostro. Numa avaliação global, percebeu-se que o colostro das mulheres com DMG apresentam uma concentração mais alta de agentes inflamatórios, e também dos anti-inflamatórios e que há uma correlação positiva entre as citocinas e quimiocinas nesse grupo. **Conclusão:** Nessa perspectiva, os dados obtidos no trabalho suportam a idéia de que a doença leva a alterações imunes no colostro, sugerindo que no grupo DMG há um aumento global de citocinas e quimiocinas.

Palavras-chave: Gestantes, diabetes mellitus gestacional, colostro, sistema imune, e citocinas e quimiocinas.

ABSTRACT

Introduction: Breast milk is considered a complete and essential food for the newborn (NB). Until approximately the first 7 days after delivery, the milk excreted from the breast is known as colostrum, a fluid with less volume and rich in immunological compounds. This kind of milk is responsible for providing optimal nutrition for the healthy growth and development of babies, as well as ensuring the protection and proper development of the newborn's immune system. However, some maternal factors, such as Gestational Diabetes Mellitus (GDM), may change the concentration of cytokines and chemokines present in colostrum. In this context, it is important to evaluate changes variations in the concentrations of these biomarkers in the presence of this disease, since these variations can affect the development of the newborn's immune system. **Objective:** The present study aims to evaluate whether the occurrence of GDM changes the concentration of cytokines and chemokines present in colostrum. **Methods:** Cross-sectional study, carried out with two groups of women hospitalized in the immediate postpartum period at a reference maternity hospital in Belo Horizonte. The groups were separated so that in one of them all the participants had a healthy pregnancy, and the other group had GDM. Socioeconomic, health and anthropometric data were collected through the pregnant woman's handbook and postpartum assessment. Also in the postpartum period, an average of 2mL of colostrum was collected in both groups for analysis of cytokine / chemokine concentration by multiplex immunoassay. **Results:** 25 women were included in the study, 56% of whom had a normal risk pregnancy and 44% GDM. The mean and standard deviation of age between them were calculated for the usual risk and GDM groups, respectively (24.86 ± 5.26) and (30.09 ± 6.25). In the DMG group, an increase in the concentration of IL-10, IFN- γ and IL-15 was observed. In a global assessment, it was noticed that the colostrum of women with GDM has a higher concentration of inflammatory agents, as well as anti-inflammatory agents and that there is a positive correlation between cytokines and chemokines in this group. **Conclusion:** In this perspective, the data obtained in the study supports the idea that this disease leads to immune changes in colostrum, suggesting that there is an overall increase in cytokines and chemokines in the GDM group.

Keywords: Pregnant women, gestational diabetes mellitus, colostrum, immune system, and cytokines and chemokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

DM – Diabetes Mellitus

DMG – Diabetes mellitus gestacional

HMOs – Oligossacarídeos do Leite Humano

HPL – Hormônio Lactogênio Placentário

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucina

Kg - Quilograma

Kg/m² - Quilograma por metro quadrado

LM – Leite materno

MECs – Células Epiteliais Mamárias Secretoras

mg/dL – Miligrama por decilitro

mL – Mililitro

µL – Microlitro

MS – Ministério da Saúde

NK – Natural Killer

OMS – Organização Mundial de Saúde

RN – Recém-nascido

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SPSS – Statistical Package the Social Sciences

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF – Fator de Crescimento

Th – Células T auxiliares

TLR – Receptor Toll Like

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TOTG – Teste de tolerância oral a glicose

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

xg – Aceleração da gravidade (giros por minuto)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da coleta de dados.....	27
Figura 2 - Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias e Th2 no colostro.....	38
Figura 3 - Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias no colostro.....	39
Figura 4 - Gráficos em radar representativo da produção de citocinas e quimiocinas...	40
Figura 5- Gráfico de correlação de Spearman por grupo.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da amostra estratificada por grupos.....	26
Tabela 2 – Ganho de peso adequado durante a gestação.....	28
Tabela 3 – Classificação de IMC adultos.....	28
Tabela 4– Características clínicas e sociodemográficas da população.....	35
Tabela 5– Faixa de valores das citocinas e quimiocinas estratificada por grupo.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Produção e características do leite materno.....	15
2.2	Composição imune do colostro.....	17
2.3	Participação do leite materno na maturação do sistema imune neonatal....	18
2.4	Regulação da captação de glicose na gestação e Diabetes Mellitus Gestacional.....	21
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivo geral.....	24
4.2	Objetivos específicos.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	Local do estudo.....	25
5.2	Delineamento da amostra.....	26
5.3	Dados coletados.....	27
5.3.1	Dados antropométricos.....	27
5.3.2	Dados sociodemográficos.....	28
5.3.3	Dados referentes ao estado de saúde.....	29
5.3.4	Dados referentes à DMG.....	29
5.4	Análise da composição imunológica do colostro.....	29
5.5	Análise estatística.....	31
5.5.1	Gráficos em radar.....	32
5.5.2	Análise de correlação por bioinformática.....	32
6	RESULTADOS	33
7	DISCUSSÃO	42
8	CONCLUSÃO	49
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10	ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

Segundo Organização Mundial de Saúde (OMS) o leite materno (LM) é considerado uma forma inigualável de fornecer nutrição ideal para o crescimento e desenvolvimento saudáveis dos bebês¹. Esse fluído não é visto somente como fonte nutricional, mas também como forma de adaptação do lactente ao ambiente extra-uterino, por esse motivo, sabe-se que a amamentação tem efeitos positivos a curto e longo prazo na saúde infantil que a leva a ser considerada como padrão ouro de alimentação. Por esses e outros fatores benéficos do leite materno, a OMS preconiza que as crianças devem ser amamentadas exclusivamente durante os primeiros seis meses de vida e como complemento da alimentação até os dois anos de idade².

Além de nutrir, o leite materno também confere imunidade ao recém-nascido por ser uma rica fonte de imunoglobulinas, lactoferrina, lisozimas, citocinas e vários outros fatores imunológicos³. A presença de citocinas e imunoglobulinas fornecem proteção passiva, e contribui para a imunidade da criança no início da vida. Em particular, as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN- γ) e TNF- α que tem relação direta com o desenvolvimento dos órgãos imunes secundários^{4,5}. Entretanto, as consequências funcionais de uma superexpressão ou de uma regulação negativa dos constituintes imunomoduladores do leite em neonatos são desconhecidas⁶.

Uma vez iniciada a amamentação um dos principais fatores que regula a produção de leite é a demanda do recém-nascido e adicionalmente a essa demanda, evidências demonstradas em modelos animais experimentais e em mulheres amamentando sugerem que existem vários outros fatores maternos que também podem alterar a produção e composição do leite, como por exemplo, o estado nutricional da mãe⁷. Fujimori e colaboradores⁸, em seu estudo que avaliou o colostro de 68 mulheres, subdivididas através do estado nutricional pré-gestacional em eutróficas, sobrepeso e obesidade, concluiu que as alterações metabólicas características da obesidade podem alterar os parâmetros imunológicos do leite materno, uma vez que as mulheres obesas apresentaram colostro com maiores concentrações de IgA.

Durante a gravidez de risco habitual, a produção de citocinas da gestante é realizada principalmente por linfócitos Th2 e pelas células reguladoras, onde ocorre menor liberação de IFN- γ e IL-2 e maior de IL-4, IL-10 e TGF- β , particularmente no primeiro e segundo trimestres da gestação mediadas por uma complexa interação hormonal⁹.

Entretanto, alguns fatores maternos podem vir a alterar a composição dos biomarcadores imunológicos do colostro como a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e essas alterações causadas no leite materno ocorrem devido às mudanças presentes no metabolismo da glicose no organismo dessas mulheres. A DMG é caracterizada por uma intolerância aos carboidratos de gravidade variável, com início a partir da 20^a semana de gestação. A prevalência está crescendo devido ao aumento das taxas de gravidez em idade avançada e ao aumento da prevalência de obesidade e de sedentarismo materno. Estima-se que a doença está presente entre 3% a 25% das gestações¹⁰. A DMG está associada ao nascimento de crianças grandes para a idade gestacional e com problemas metabólicos além de retardo na lactogênese. Suspeita-se ainda que haja alteração na composição nutricional e dos biomarcadores do colostro e do leite maduro¹¹.

Sendo assim, é importante avaliar se ocorrem alterações nas concentrações das biomoléculas presentes no leite materno em decorrência da DMG. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo investigar qual o impacto da DMG na concentração de citocinas e quimiocinas no colostro materno, visto que esses compostos são fundamentais no crescimento e desenvolvimento adequados do sistema imune dos recém-nascidos (RN).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção e características do leite materno

A produção e secreção láctea são processos fisiológicos decorrentes de fatores hormonais associados ao desenvolvimento da glândula mamária. Essa glândula é um órgão exócrino e pode sofrer ciclos repetidos de crescimento, diferenciação e regressão, relacionados aos processos reprodutivos das mulheres. A glândula passa por diferentes fases de desenvolvimento que se inicia na fase embrionária e termina com a involução da mama após a lactação^{12,13}.

Após a concepção, a gravidez é a responsável por induzir alterações na glândula mamária, como proliferação ductal e posterior desenvolvimento alveolar. No entanto, a glândula mamária só irá atingir a maturidade durante a lactação. Aproximadamente durante a 20^a semana de gestação, por ação da progesterona, da prolactina e do lactogênio placentário, inicia-se a diferenciação da mama em glândula secretora. Assim, a mesma passa de um tecido ramificado não secretor, para um órgão secretor altamente

ativo. Conseqüentemente, as células alveolares aumentam a expressão de genes lactogênicos, o que os diferencia em células epiteliais mamárias secretoras (MECs) ou lactócitos e esse processo é denominado diferenciação secretora^{7,13}.

Após essa diferenciação, com a queda dos hormônios progesterona e estrogênio, associada à liberação de prolactina após o parto, o epitélio diferenciado ganha uma capacidade notável para coordenar a síntese e transporte de vários constituintes do leite para o início da secreção do mesmo, chamada ativação secretória^{7,13}. Essa fase conhecida como a primeira fase da lactação ocorre logo após o parto e o produto inicial da glândula é conhecido como o colostro, considerado como o primeiro leite a ser ejetado, rico em compostos bioativos. Esse fluído torna-se disponível para o bebê em até aproximadamente 72 horas após o nascimento. Já a segunda fase da lactação, acontece em torno de 60 horas após o nascimento (variação entre 24 à 72h), momento em que há uma abundância na secreção de leite materno, o que é chamado de apojadura ou descida do leite¹³.

O leite humano é considerado padrão ouro para a alimentação dos recém-nascidos até os seis meses de vida. Após esse período, o Ministério da Saúde (MS) recomenda o aleitamento materno em associação com a complementação alimentar até os dois anos de idade. Essa consideração se dá devido ao fato de o mesmo possuir em sua composição componentes nutritivos e não nutritivos, necessários para promover o crescimento e desenvolvimento adequados do recém-nascido. Além de possuir compostos bioativos considerados essenciais para a maturação e regulação do sistema imunológico imaturo do bebê^{7,14}.

Esse fluído passa por três fases de mudanças conhecidos como colostro, leite de transição e leite maduro. O colostro apresenta-se mais espesso e em menor quantidade, aproximadamente 30 ml nas primeiras 24 horas de vida, é considerado como a “primeira vacina” do bebê e contém grandes quantidades de Imunoglobulina A secretora (IgA), leucócitos, lactoferrina, além de fatores de crescimento epidérmico e citocinas/quimiocinas. A concentração de lactose, o componente mais osmoticamente ativo do leite materno, é baixa no colostro, o que justifica o baixo volume de colostro secretado, e também indica que a função primária desse fluído é imunológica e não nutricional^{7,13}.

Já o leite de transição perdura durante 7 a 14 dias após o nascimento, período caracterizado pela produção acelerada da glândula mamária e diminuição nas concentrações de imunoglobulina e proteína total. Em contrapartida, há um aumento na concentração de lactose, gordura e energia total. Esse leite já apresenta a função de nutrir o recém-nascido e atende as necessidades nutricionais do mesmo, acarretando recuperação do peso de nascimento¹³.

Após o 15º dia após o parto, o leite torna-se maduro e irá garantir a nutrição adequada ao recém-nascido até o sexto mês de vida. Já nessa fase não há muitas mudanças na composição do mesmo, o que ocorre é uma redução no conteúdo proteico e uma alteração na composição que irá ocorrer durante a lactação. O leite de cada mãe apresenta uma composição diferente e poderá sofrer alterações de acordo com a fase da lactação, a dieta materna, idade gestacional de nascimento do recém-nascido, presença de algumas doenças e estado nutricional materno¹³.

Dentre os fatores que alteram a composição do leite materno, iremos destacar a presença da doença Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), uma vez que as evidências recentes sugerem que a doença é caracterizada não apenas pelo aumento da resistência a insulina e intolerância a glicose, mas também por um estado de inflamação sistêmica de baixo grau e desregulação do sistema imune, induzindo um desequilíbrio entre as células Th1 e Th2 favorecendo uma resposta imune pró-inflamatória. Sifnaios e seus colaboradores¹⁵ confirmaram o exposto após avaliarem o sangue de mulheres com DMG no 3º trimestre de gestação e observarem que esse grupo de mulheres apresentou um perfil de células T significativamente diferente em comparação com mulheres grávidas saudáveis, com maior proporção de Th2, Th17 e Treg. Entretanto, na literatura encontram-se escassos os estudos sobre o perfil das citocinas no colostro de mães que apresentaram a DMG durante a gestação.

2.2 Composição imune do colostro

O colostro é o primeiro leite a ser ejetado da mama e perdura até aproximadamente o 7º dia de vida do bebê, caracterizado também por ser o mais potente estimulador imunológico natural¹⁶. Dentre as funções do colostro, podemos destacar como as principais o fornecimento de componentes nutricionais essenciais, fortalecimento do sistema de defesa natural, modulação da resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, o crescimento e a reparação de diversos tecidos do corpo^{17,18}.

Funcionalmente, é possível distinguir os componentes nutricionais e os bioativos presentes no leite. Em sua composição imune podemos citar as proteínas do complemento, hormônios, células imunocompetentes, fatores de crescimento, além de citocinas e quimiocinas que parecem desempenhar um papel na modulação e no desenvolvimento do sistema imune⁸. Encontram-se também presentes no colostro bactérias comensais e benéficas para o recém-nascido, e descobriu-se também a presença de células-tronco nesse fluido¹⁹.

Entretanto, destaca a concentração das citocinas e quimiocinas presentes no colostro que são substâncias normalmente derivadas de células epiteliais da glândula mamária ou de células imunes presentes nesse fluido. Além disso, elas podem ser divididas em aquelas que promovem a inflamação ou protegem contra infecções e aquelas que diminuem a inflamação^{20,21}. Esses compostos imunes presentes no colostro em grande quantidade são responsáveis por fornecer imunidade passiva e manutenção da função de barreira ao trato gastrointestinal do recém-nascido²².

Os biomarcadores derivados do leite materno passam pelo trato gastrointestinal do recém-nascido, resistindo à proteólise de forma ainda desconhecida e chegam até o intestino onde interagem com seus respectivos receptores, são absorvidos e entram na circulação do bebê. Acredita-se que as citocinas presentes no colostro desempenham um papel fundamental na imunomodulação e na promoção da produção de IgA, mediando as respostas imunes através do crescimento e diferenciação de linfócitos B e estimulando o desenvolvimento da tolerância intestinal. No entanto, o impacto desses fatores imunológicos no crescimento e na composição corporal do bebê na primeira infância é pouco documentado²³.

2.3 Participação do leite materno na maturação do sistema imune neonatal

É através da placenta que ocorrem as primeiras transferências de anticorpos maternos para o feto, que contribuem para a defesa precoce contra microrganismos patogênicos em neonatos. No entanto, essa proteção passiva tem vida curta e se deteriora quando a criança atinge os seis meses de idade²⁴, pois nessa fase, o sistema imune da criança já se encontra formado. No nascimento ocorrem muitos eventos importantes, uma vez que o feto é retirado instantaneamente de um ambiente intra-uterino protegido e quase estéril para o mundo externo carregado de microrganismos, tornando assim o recém-nascido altamente suscetível a infecções^{25,26}. O sistema imune

do recém-nascido se desenvolve rapidamente durante os primeiros três meses de vida e vários fatores irão interferir nesse processo de desenvolvimento^{24,27}.

O desenvolvimento do sistema imune do neonato inicia-se ainda no estágio embrionário. O fígado fetal gera as primeiras células linfóides e mielóides, posteriormente os progenitores de células troncos hematopoiéticas surgem na medula óssea e dão origem aos linfócitos e monócitos, e as células polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Na própria medula algumas interleucinas são capazes de induzir a formação de um grupo de células que vão migrar para a periferia, dentre elas se destacam os linfócitos B, T e outros leucócitos. Os linfócitos B ao migrarem para periferia já saem imunologicamente competentes para secreção de anticorpos e não precisam passar por nenhum outro órgão para que tenha sua função plena no sistema imune^{24,28}.

O grupo de linfócitos T, necessita sofrer diferenciação. Aproximadamente na sétima semana de gestação eles são identificados no fígado, mas ainda não expressam seus receptores. Após a sétima semana da gestação eles expressam os receptores CD34, que auxilia na migração para o timo e se diferenciam em subpopulações de células já maduras expressando receptores de células T (TCR), CD4 ou CD8^{24,28}. O desenvolvimento e a maturação dos linfócitos são altamente regulados por vários fatores incluindo citocinas, células do estroma, fatores de transcrição e componentes da matriz extracelular²⁴.

Após o nascimento, o sistema imune inato é o mais ativo no recém-nascido, e é caracterizado como um sistema conservado evolutivamente entre espécies e que fornece a primeira linha de defesa contra infecções. No entanto, nos primeiros meses de vida ainda se encontra imaturo, acarretando assim em maior risco de infecções²⁹. As deficiências imunológicas ao nascer incluem barreiras físicas e químicas incompletas, função celular efetiva inata insuficiente, produção limitada e atrasada de imunoglobulina A (IgA), função incompleta em cascata do complemento e mecanismos anti-inflamatórios insuficientes dos tratos respiratório e gastrointestinal³⁰.

Dentre os principais componentes da resposta imune inata encontram-se as células epiteliais, o sistema do complemento, os fagócitos e as células Natural Killer (NK). Já os receptores Toll-Like (TLR) também são considerados fatores importantes desta resposta, a qual inclui, ainda, o muco presente nas vias aéreas que previne o recém-

nascido da desidratação e de patógenos, sendo que sua secreção se inicia na 13ª semana de gestação³¹.

O desenvolvimento do sistema imune na criança inclui o amadurecimento da resposta imune inata que irá reconhecer os antígenos de forma rápida, sem desenvolver memória imunológica. A indução da resposta antígeno-específica e memória imunológica aos antígenos não-próprios ocorrem paralelo ao desenvolvimento e à manutenção da tolerância aos antígenos próprios, à microbiota e aos antígenos alimentares^{31,32}.

O sistema imune intestinal do neonatal é constantemente modulado pelo colostro e pelo leite materno, que promovem o desenvolvimento da resposta imune. O mesmo é considerado como essencial para defesa e manutenção da integridade do organismo e tem como a principal função garantir a proteção contra agentes infecciosos e parasitários antes da maturação do sistema imune do neonato. Além disso, irá atuar no desenvolvimento correto do sistema imune da criança, no controle do desenvolvimento de neoplasias malignas, no processo de tolerância imunológica e na homeostase de tecidos e órgãos^{31,33}. Devido à imaturidade do sistema imune do recém-nascido torna-se fundamental o papel do colostro, fluído rico em imunoglobulinas e compostos bioativos para garantir a primeira proteção da criança e o desenvolvimento do seu sistema imune de maneira correta³⁰.

O desenvolvimento saudável da microbiota intestinal do recém-nascido também está relacionado à maturação do sistema imune. Isso depende também do aporte de leite materno que ele recebe. A microbiota do leite humano é modulada por diferentes fatores maternos, e a microbiota do recém-nascido depende da materna. Ambas desempenham um papel fundamental na maturação da barreira intestinal e do sistema imune do recém-nascido. O leite materno exibe um perfil saudável de bactérias que irão favorecer a maturação da mucosa intestinal e do sistema imune a ela associado, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de células B para produção de IgA na mucosa. Além disso, as bactérias presentes no leite materno contribuem para homeostase intestinal, prevenindo infecções e doenças inflamatórias³⁴.

Os oligossacarídeos presentes no leite humano (HMOs) são estruturas de carboidratos à base de lactose, presentes em maior quantidade no colostro se comparado ao leite maduro, e são capazes de exacerbarem as funções das células dendríticas que

desempenham um papel fundamental na regulação e desenvolvimento do sistema imune imaturo em neonatos por meio da diferenciação de células T em células reguladoras funcionais³⁴. Sendo assim, observa-se o papel fundamental do leite materno para o desenvolvimento do sistema imune neonatal.

2.4 Regulação da captação de glicose na gestação e Diabetes Mellitus Gestacional

No início da gravidez há uma redução na glicemia de jejum que se perdura durante toda a gestação. Além disso, a sensibilidade à insulina também diminui com o avanço da gestação para atingir ao final da gestação (34–36 semanas) 50–60% do estado pré-gravídico. Esse fato se dá devido à maior afinidade à glicose presente nas células placentárias. Dessa forma, há a ocorrência de resistência à insulina, as concentrações desse hormônio em jejum aumentam e essas mudanças na sensibilidade estão inversamente relacionadas às alterações na massa gorda corporal materna que ocorre durante esse período³⁵. Diante do exposto, na gestação de risco habitual ocorre um aumento da secreção de insulina em decorrência desse aumento na resistência a insulina nas células maternas.

Essas alterações no metabolismo materno que ocorrem durante a gestação são mediadas por hormônios placentários como o lactogênio placentário humano (hPL), a progesterona e o estrogênio. Além disso, mudanças nos fatores inflamatórios circulantes, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), também podem estar envolvidas na resistência à insulina associada à gravidez. Kirwane colaboradores³⁶ relataram que o nível de TNF- α placentário é um fator determinante da resistência à insulina durante a gravidez, independentemente das alterações de peso corporal³⁵.

Sendo assim, a falta de aumento na secreção de insulina e fatores inflamatórios de baixa intensidade dão origem a DMG. Essa é uma doença metabólica considerada como a principal comorbidade durante o período gestacional, a mesma caracteriza-se por uma intolerância a carboidratos resultando em hiperglicemia de gravidade variável que se inicia durante a gestação atual e não preenche os critérios para diagnóstico dos outros tipos da doença^{37,38}. A incidência tem aumentado em associação com aumento nos índices de obesidade mundial e aparecimento de diabetes do tipo II. Mundialmente, estima-se que entre 3 a 25% das gestações a doença encontra-se presente³⁹.

A idade materna avançada, o sobrepeso ou obesidade, ganho de peso excessivo durante a gestação, histórico de diabetes familiar, hipertensão ou pré-eclampsia,

diabetes gestacional em gestações anteriores, síndrome de ovários policísticos, baixa estatura e hemoglobina glicada maior ou igual a 5,9% no primeiro trimestre da gestação, são considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da mesma^{38,39}.

Os métodos de diagnóstico da doença ainda são bem variados, no Brasil durante o pré-natal, já na primeira consulta o médico deverá solicitar a glicemia de jejum e em casos que o valor da glicemia for $\geq 126\text{mg/dL}$ o diagnóstico a ser feito é de DM prévia à gestação, entretanto, se o valor apresentado for $\geq 92\text{mg/dL}$ e $< 126\text{mg/dL}$ deve-se diagnosticar como DMG, mas em todos os casos citados deve-se confirmar o resultado com um segundo exame a ser realizado. Essa investigação de DMG deve ser realizada em todas as gestantes, independente se a mesma apresentar ou não fator que poderá predispor a doença. Entretanto devido à falta de estudos relacionados à DMG no início da gestação, mulheres que apresentarem o diagnóstico para tal podem ser reavaliadas no segundo trimestre da gestação³⁹.

De acordo com Baz e colaboradores³⁵, durante a gestação saudável há redução gradativa da sensibilidade à insulina ao longo da gestação. Essa sensibilidade está relacionada a fatores placentários e a produção dos hormônios estrógeno e progesterona. A DMG irá ocorrer se as células β pancreáticas apresentarem incapacidade em suprir as demandas aumentadas de insulina durante esse período que logo após a gestação retorna ao normal. Na gestação de risco habitual ocorre um aumento na secreção de insulina que será responsável por manter a homeostase da glicose.

Alguns estudos sugerem que a presença da DMG é caracterizada por um aumento da resistência à insulina e intolerância periférica à glicose, o que acarreta em modificações na resposta imune, ou seja, um desequilíbrio das citocinas e quimiocinas produzidas pelo organismo da mulher favorecendo uma resposta inflamatória. Há um aumento na produção de citocinas inflamatórias o que caracteriza como um processo inflamatório causado pela doença^{15,40,41}. Em especial o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6) estão inversamente relacionados com a sensibilidade à insulina determinada pela doença. Outras citocinas também foram encontradas em maiores proporções se comparada à gestação de risco habitual com a gestação na presença de DMG³⁵.

Em mulheres com DMG há aumento de células TCD4+ e de células Th17 em comparação com mulheres de mesma idade e IMC, sem a doença⁴². Esses achados corroboram os de Sifnaios e colaboradores¹⁵, que encontraram uma proporção de células

TCD3+, TCD4+ e IL-17 (resposta Th17) significativamente maior no sangue de mulheres que apresentaram DMG em comparação com o grupo sem a doença.

Dentre os fatores adversos causados pela doença podemos citar malefícios tanto para a mãe quanto para o bebê. Durante a gestação a mãe com DMG terá maior possibilidade de desenvolver pré-eclampsia, parto prematuro e cesariana. Após a gestação, há risco maior de desenvolver diabetes mellitus tipo II e doenças cardiovasculares. Já para o recém-nascido, os maléficos estão na macrosomia, síndrome do desconforto respiratório e desenvolvimento de obesidade. Além disso, durante a infância e adolescência há uma predisposição maior em desenvolver síndrome metabólica e DM tipo II^{43,44,45}.

Outra consequência da DMG são as possíveis alterações nos compostos imunes presentes no leite que podem ocorrer na presença da doença. França e colaboradores²⁷ ao avaliar o sangue e colostro de mulheres com DMG, descobriram que o colostro de mães diabéticas apresentou níveis mais baixos de IgA e IgG, ou seja, os níveis de anticorpos dessas mulheres apresentam-se reduzidos ao comparar com mulheres sem a doença. Diante disso, pode-se concluir que a hiperglicemia causada pela patologia altera a produção de anticorpos e que a redução na produção dessas proteínas pode estar relacionada às alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, bem como em vários sistemas orgânicos, causadas pelo estado hiperglicêmico da gestante.

No entanto, ainda não foram bem descritas como essas alterações podem prejudicar o sistema imune do recém-nascido. O que se sabe é que o controle glicêmico adequado durante a gestação e a durabilidade do aleitamento materno são fundamentais para garantir a proteção dos recém-nascidos contra patógenos externos⁴⁶.

3. JUSTIFICATIVA

Mesmo já tendo sido descritas algumas consequências do DMG, ainda não está claro como essa doença altera o perfil de citocinas e quimiocinas presentes no leite materno, e se essas modificações podem comprometer a saúde da criança. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de estudos para esclarecer as lacunas que ainda existem sobre a doença e um possível impacto no desenvolvimento da resposta imune futura do recém-nascido e trabalhar em ações que a previnam.

Assim, no presente trabalho estudou-se o perfil de citocinas presentes no colostro de puérperas que apresentaram DMG em comparação com aquelas com risco habitual durante a gestação.

Na literatura poucos trabalhos estudam os compostos bioativos do colostro materno em mães diabéticas e mães saudáveis. Por esse motivo, torna-se relevante a pesquisa uma vez que a mesma poderá identificar alguns riscos para o recém-nascido de uma mãe diabética se comparado aos de uma mãe saudável.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar se a ocorrência de DMG modifica a concentração de citocinas e quimiocinas no colostro.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estado nutricional das puérperas no período pré-gestacional, pós-parto e o ganho de peso durante a gestação;
- Verificar a concentração de citocinas e quimiocinas presentes no colostro materno de mulheres com DMG;
- Identificar se o possível aumento de citocinas e quimiocinas inflamatórias presentes no colostro de mulheres com DMG;
- Verificar uma possível correlação entre as citocinas e quimiocinas avaliadas com o estado nutricional da mãe.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido a partir da coleta de dados realizada na Maternidade pública do Hospital Risoleta Tolentino Neves situado em Belo Horizonte, Minas Gerais. Inaugurada em 30 de julho de 2007, que funciona desde o início com os princípios de uma assistência humanizada em que se valoriza o trabalho em equipe e em ambiente que proporciona a mulher um atendimento diferenciado e com total segurança.

O objetivo principal da instituição é proporcionar um ambiente confortável em que a mulher e a família permaneçam juntas durante todo o trabalho de parto, preservando a privacidade e as condições de segurança para a gestante e o recém-nascido. Os serviços da maternidade em questão estão estruturados pelo acolhimento da gestante realizado em dois consultórios médicos; centro de parto com dois leitos individualizados; centro obstétrico com duas salas totalmente equipadas; alojamento conjunto com capacidade para 26 leitos; unidade de cuidados neonatais composta por cinco leitos e espaço de convivência para os usuários. Com esta estrutura o serviço realiza em média 250 partos/mês, sendo referência para as gestantes do Distrito sanitário de Venda Nova (Belo Horizonte) e região de saúde de Vespasiano.

A equipe multidisciplinar trabalha com foco em iniciativas voltadas para os princípios da humanização do parto e nascimento, que trazem importantes ganhos para a saúde da mãe e do bebê. Existe por parte da equipe um incentivo ao parto normal (através da verticalização do parto), utilização de métodos não farmacológicos de alívio da dor (banho de chuveiro, caminhadas, massagens, uso de bola, entre outros), estímulo ao contato pele a pele logo após o nascimento, amamentação na primeira hora de vida, direito a um acompanhante em tempo integral, assistência de doulas comunitárias e voluntárias, além da alta segura para continuidade do cuidado na Atenção Primária.

O serviço opera sob a gestão do governo de Minas Gerais e Prefeitura de Belo Horizonte, com parceria a Universidade Federal de Minas Gerais e Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa, possibilitando a vivência da comunidade acadêmica por meio de colaboração com atividades como pesquisas e estágios, incluindo a Nutrição. Assim, o local em questão proporciona, além do respeito à fisiologia do parto, o protagonismo da mulher neste momento, seus sentimentos e acolhimento à família, contribuição à formação de profissionais e produção do conhecimento na área da saúde.

5.2 Delineamento da amostra

O estudo possui caráter transversal e a amostragem foi determinada através do método de amostragem por conveniência. O projeto encontra-se aprovado pelo comitê de ética do Hospital Risoleta Tolentino Neves (Anexo 1). O presente estudo foi apresentado inicialmente às mulheres e a participação das mesmas aconteceu de forma voluntária, podendo se retirar do projeto em qualquer momento da entrevista ou da coleta do colostro materno. As participantes receberam e assinaram em duas vias um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), sendo uma cópia para elas e uma para equipe do projeto. Nesse termo consta telefone e e-mail para contato com equipe de pesquisa caso fosse necessário após a coleta.

A amostra foi subdividida em dois grupos 1) Puérperas que apresentaram gestação de risco habitual e eutróficas; 2) Puérperas que foram diagnosticadas com diabetes melittus gestacional (DMG) durante a gravidez de acordo com as informações registradas em prontuário e no cartão da gestante, conforme tabela abaixo:

Tabela 1 – Composição da amostra estratificada por grupos.

Grupos	Número da amostra - n
Risco habitual	14
DMG	11
Total	25

As variáveis avaliadas no estudo foram: estado nutricional materno pré-gestacional e pós-parto, através do peso, altura e cálculo do IMC, ganho de peso durante a gestação e concentração de citocinas e quimiocinas do colostro. Os critérios de inclusão dos grupos foram mulheres internadas no pós-parto imediato (24 a 72 horas), idade acima de 18 anos, bebês em gestação a termo, gestações únicas, mulheres sem a doença e o outro grupo de mulheres que apresentaram apenas a Diabetes mellitus gestacional e não os outros tipos da doença.

Os critérios de exclusão da amostra foram puérperas menores de 18 anos, mulheres que apresentaram doenças infecciosas durante a gestação ou outros tipos de diabetes melittus, uso de antibióticos na gestação, idade gestacional no parto inferior a 36 semanas, gestações gemelares e também aquelas que apresentaram ausência de pelo menos 2mL de colostro na ordenha.

5.3 Dados coletados

Na figura 1 se encontra o fluxograma da coleta de dados realizada. Todas as mulheres que participaram da pesquisa foram convidadas e todos os equipamentos utilizados na avaliação antropométrica e coleta do colostro pertenciam a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

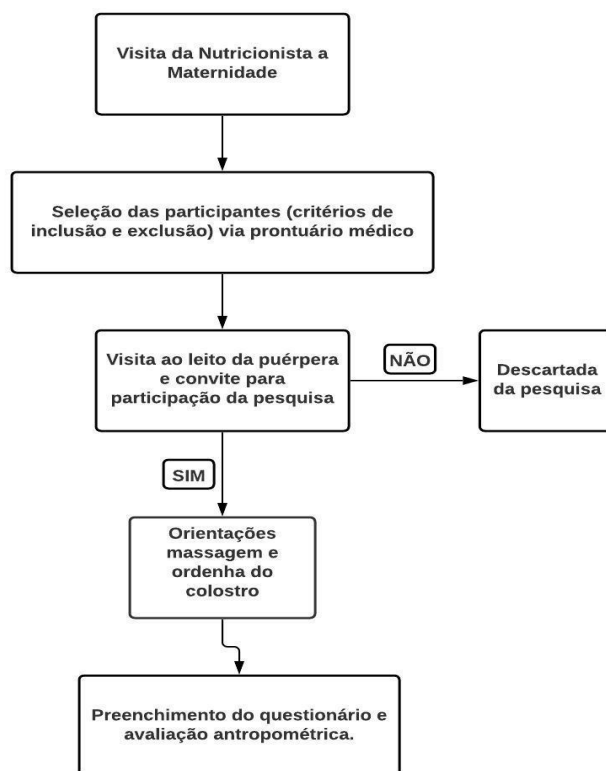


Figura 1: Fluxograma da coleta de dados.

5.3.1 Dados antropométricos

Os dados antropométricos foram coletados com objetivo de avaliar o estado nutricional das participantes antes e após a gestação. Os dados pré-gestacionais foram analisados por meio de anotações presentes nas cadernetas da gestante como o peso pré-gestacional, altura, último peso antes do parto e índice de massa corporal - IMC pré-gestacional. Conseqüentemente, o ganho de peso durante a gestação foi classificado conforme preconizado pelo *Institute of Medicine*, conforme tabela abaixo.

Tabela 2 – Ganho de peso adequado durante a gestação.

Estado nutricional inicial (IMC)	Ganho de peso (kg) total no 1º trimestre	Ganho de peso (kg) semanal médio no 2º e 3º trimestres	Ganho de peso (kg) total na gestação
Baixo Peso (BP)	2,3	0,5	12,5 – 18,0
Adequado (A)	1,6	0,4	11,5 – 16,0
Sobrepeso (S)	0,9	0,3	7,0 – 11,5
Obesidade (O)	-	0,3	7,0

Fonte: INSTITUTE OF MEDICINE. Nutrition during pregnancy. Washington DC. National Academy Press, 1990. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series n. 854. Geneva: WHO, 1995:47.

Já os dados do período pós-parto como o peso e altura foram aferidos com a ajuda de um antropômetro vertical e de uma balança da marca Marte LC200-OS, com capacidade máxima de 200 kg no momento da entrevista. Após aferição das medidas, o IMC foi calculado através da razão entre o peso e o quadrado da altura, sendo o mesmo classificado conforme a classificação de IMC de adultos preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação de IMC adultos.

IMC (kg/m ²)	Classificação
< 18,5	Baixo peso
≥ 18,5 e < 24,9	Eutrofia
>25 e < 29,9	Sobrepeso
≥ 30	Obesidade

5.3.2 Dados sociodemográficos

Através do questionário aplicado (Anexo 3) foram coletadas informações referentes à idade da mulher, escolaridade, estado civil, renda familiar mensal e número de moradores na residência. Os valores de renda *per capita* foram calculados com base no salário-mínimo de R\$948,00, referente ao salário do Brasil no ano de 2019.

5.3.3 Dados referentes ao estado de saúde

Coletou-se também dados referentes ao estado de saúde materna, quantidade de consultas realizadas durante o pré-natal, prática de atividade física, intercorrências de saúde (presença ou não de DMG), utilização de medicamentos e suplementos durante a gestação, tipo de parto, idade gestacional no nascimento, além de peso de nascimento do bebê.

5.3.4 Dados referentes à DMG

Os dados referentes à presença ou não de DMG foram coletados através de diagnóstico médico discriminado no prontuário das puérperas. No Manual de Gestação de Alto Risco elaborado pelo Ministério da Saúde⁴⁸ para diagnóstico da doença recomenda-se o uso de fatores clínicos de risco para DMG, associados a uma glicemia de jejum no início da gravidez (antes de 20 semanas ou tão logo seja possível), para o rastreamento de DMG. Na presença de glicemia de jejum de 85mg/dL a 125 mg/dL ou de qualquer fator de risco clínico as gestantes deveriam realizar o TOTG com 75g de glicose. O diagnóstico de DMG seria estabelecido diante de pelo menos dois valores maiores ou iguais a 95 mg/dL (jejum), 180 mg/dL (1ª hora) e 155 mg/dL (2ª hora). Mulheres que apresentassem duas glicemias de jejum ≥ 126 mg/dL também receberiam o diagnóstico de DMG confirmado, sem necessidade de realizar o teste de sobrecarga de glicose. Caso fosse observado apenas um valor anormal no TOTG com 75 gramas, o teste deveria ser repetido com 34 semanas⁴⁸.

Coletaram-se também informações referentes ao tipo de tratamento realizado durante o período de gestação com objetivo de controle glicêmico. Os dados foram extraídos da caderneta da gestante e por esse motivo não foi possível realizar o acompanhamento das glicemias durante a gestação, dessas mulheres, apenas 3 realizaram o tratamento da doença com insulina enquanto o restante realizou o tratamento com dieta.

5.4 Análise da composição de citocinas e quimiocinas do colostro

Após o preenchimento do questionário as participantes foram orientadas quanto à forma correta de realização da massagem da mama e da ordenha manual do leite materno, em seguida, com auxílio da aluna de mestrado ordenhou-se o colostro de uma das mamas. As amostras obtidas possuíam volume mínimo de 2mL que foram

alíquotadas em tubos cônicos do tipo Falcon de 15ml e identificadas com o número da participante de acordo com número do questionário, data da coleta e em seguida armazenada sob refrigeração em caixa térmica.

Etapa 1: Centrifugação e armazenamento do sobrenadante

Logo após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), local onde foram processadas. A etapa inicial do processamento foi à centrifugação em velocidade de 500G por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após o procedimento, as amostras apresentavam claramente a divisão em três fases, o conteúdo creme (gordura) na parte superior foi desprezado, o sobrenadante retirado, alíquotado em tubo cônico de 1,5mL e armazenado em freezer -80°C para realização das próximas etapas de análises e na terceira fase restou o conteúdo celular que foi realizado a quantificação do número de total de células presentes nas amostras para estudos posteriores

Etapa 2: Medida da concentração de citocinas e quimiocinas - Luminex

A tecnologia de imunoenensaio Luminex permite a quantificação simultânea de até 100 proteínas presentes no soro, plasma, sobrenadante de cultura de tecidos, lisado celular ou leite materno, como no caso deste estudo. Utilizou-se o *kit* da Bio-Rad Laboratories (Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard) para a detecção e quantificação de citocinas e quimiocinas no colostro. Esse kit permite medir vários compostos bioativos simultaneamente através de um imunoenensaio à base de esferas magnéticas cobertas por anticorpos específicos conjugados com fluorocromos. Posteriormente foi realizada a leitura de fluorescência no equipamento Luminex (BioPlex 200, Bio-Rad), seguindo o protocolo padronizado pela Dra. Andrea Teixeira Carvalho do Laboratório de Biomarcadores do Instituto de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Minas Gerais.

Foram descongeladas 25 amostras de colostro em banho-maria a 37°C e depois homogeneizadas em vórtex por 5 segundos. Devido à presença de debris na amostra após o descongelamento, foi necessária filtragem para evitar que partículas influenciassem na detecção e quantificação de citocinas no fluido. Depois, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e centrifugadas a 14.000xg, por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 50µL das amostras na placa para ensaio Luminex contendo 50µL do *pool* de esferas, lavadas duas

vezes com 100µL de tampão de lavagem e incubadas *overnight* a 4°C sob agitação. No dia seguinte, foram adicionados 25µL do anticorpo de detecção em cada poço e as amostras foram incubadas por 30 minutos sob agitação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas com 100µL de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 50µL do conjugado (Estreptavidina) em cada poço e as amostras foram novamente incubadas por 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram novamente lavadas com 100µL de tampão de lavagem, ressuspendidas com 125µL de tampão do ensaio e homogeneizadas por 10 minutos. Por fim, as amostras foram adquiridas no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad) utilizando-se o software Luminexx PONENT versão 3.1.

Na sequência, os dados foram analisados usando o software Bioplex™ (Bio-Rad). O painel de citocinas/quimiocinas detectadas pelo kit consistiu de: eotaxin, IL-1ra, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α, IFN-γ. As concentrações das citocinas e quimiocinas foram calculadas de acordo com a curva padrão para cada uma individualmente. Aquelas amostras que tiveram leitura abaixo no nível de detecção o valor 0 foi usado na análise e o nível de detecção das citocinas e quimiocinas variou para composto.

5.5 Análise estatística

Os dados do questionário aplicado foram tabulados com ajuda do programa Excel 2007 e após foram realizadas análises descritivas uni e multivariadas com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 e também do programa Minitab versão 17. Com auxílio do Minitab foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov com objetivo de avaliar a normalidade ou não das variáveis, tendência central (médias e medianas) e de dispersão (desvio-padrão, valores mínimo e máximo).

Consequentemente foram aplicados os testes de correlação de Qui-quadrado para estimativa de associação entre duas variáveis qualitativas, Test T de Student para comparar duas médias independentes e Mann Whitney para comparar duas medianas independentes. Em seguida foi aplicada a correção de Bonferroni, com objetivo de identificar a significância estatística em algumas variáveis. Foram classificados como resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentassem $p < 0,05$ para todos os testes realizados.

Não foi possível realizar análise de regressão dos dados devido ao pequeno número amostral, após tentativas, pode-se perceber que o modelo de regressão ficaria com valores fracos para explicar o desfecho.

5.5.1 Gráficos em radar

Os gráficos em radar foram realizados para identificar a frequência de amostras consideradas baixas ($<$ mediana global) e altas (\geq mediana global) dos níveis de citocinas e quimiocinas. Utilizou-se a mediana global de cada componente como ponto de corte. Através dessa análise destaca-se o equilíbrio global das citocinas e quimiocinas. Cada eixo dos gráficos representa a porcentagem (%) de voluntárias que possuem alta frequência de citocinas e quimiocinas no colostro. Os valores de cada eixo podem ser conectados para formar uma área poligonal central que representa o equilíbrio global pró-inflamatório versus anti-inflamatório, com um círculo central representando 50% da frequência. O aumento ou diminuição da área poligonal central reflete uma contribuição maior ou menor do perfil pró-inflamatório versus anti-inflamatório. Essa estratégia de análise foi baseada no trabalho de Nunes e colaboradores⁴⁹.

5.5.2 Análise de correlação por bioinformática

Os gráficos de correlação de Spearman foram utilizados para avaliar a associação entre as citocinas e as variáveis numéricas e estimar a força dessa relação⁵⁰. Em dados correlacionados, a mudança na magnitude de uma citocina está associada a uma mudança na magnitude de outra variável, seja na mesma direção (correlação positiva) ou na direção oposta (correlação negativa). Os coeficientes de correlação variam de -1 a +1, no qual o 0 indica que não há associação, enquanto a correlação fica mais positiva conforme se aproxima de +1 e mais negativa conforme se aproxima de -1. Não foi feito um intervalo de confiança para conclusão definitiva sobre a força da relação entre as variáveis. Por isso, avaliou-se para o presente estudo, apenas uma correlação de acordo com a intensidade das cores.

6. RESULTADOS

6.1 Característica da amostra

A amostra foi composta por 25 mulheres que demonstraram interesse em participar do projeto e preencheram todos os critérios de inclusão. Essas participantes foram devidamente divididas em dois grupos sendo um grupo de mulheres que apresentou risco habitual (56%) e um grupo que apresentou diabetes gestacional (44%) durante a gestação. A idade foi uma variável não categorizada e a menor delas foi uma participante de 18 anos, a média e desvio padrão dessa variável foi calculada para o grupo risco habitual e DMG respectivamente ($24,86 \pm 5,26$) e ($30,09 \pm 6,25$), conforme descrito na Tabela 4.

A renda *per capita* foi calculada com base no salário-mínimo real do Brasil referente ao ano de 2019, ou seja, R\$948,00 e categorizada em menor que 1 salário e maior ou igual a 1 salário. Da amostra analisada, 6 mulheres não souberam quantificar a renda mensal familiar e por esse motivo não foi possível calcular a renda *per capita*. Dentre as que relataram a renda mensal, foi possível verificar que 68,4% delas possuíam renda inferior a 1 salário e a maioria delas (64,3%) pertencia ao grupo de risco habitual.

Na mesma Tabela 4 também é descrito a escolaridade das participantes que foi categorizada em ensino fundamental (incompleto ou completo), ensino médio (incompleto ou completo) e ensino superior (incompleto ou completo). Nenhuma dessas mulheres se declarou analfabeta, 12% declararam ter iniciado o ensino o fundamental, 56% o ensino médio e 24% o ensino superior. Já a variável estado civil foi categorizada em casada/união estável e solteira/divorciada, nenhuma das participantes declarou ser viúva e 60% delas declaram ser solteira/divorciada, enquanto 40% declarou casada/união estável.

Também na Tabela 4 encontra-se descrito as variáveis de saúde que foram analisadas, 56% das participantes não praticaram atividade física durante a gestação e 44% praticaram, e dentre as que apresentaram DMG a maioria (63,6%) relatou não praticar, enquanto no grupo de risco habitual metade (50%) praticou. As participantes foram questionadas também quanto ao uso de medicamentos e suplementos durante a gestação e 52% fizeram o uso de algum medicamento e suplemento no período gestacional.

Em relação ao estado nutricional pré-gestacional todas as participantes do grupo risco habitual apresentavam IMC de eutrofia enquanto 54,5% das mulheres com DMG

apresentavam obesidade, 36,4% sobrepeso e apenas 9,1% eutrofia. Dentre as participantes, 36% apresentaram ganho de peso inadequado, 40% adequado e 24% excessivo durante a gestação. Nessas variáveis foi necessário realizar a correção de Bonferroni, pois as mesmas apresentaram mais de duas categorias o que torna necessário aplicar a correção para verificar a significância estatística.

A realização do pré-natal representa papel fundamental em termos de prevenção e/ou detecção precoce de patologias tanto para mãe quanto para o bebê e tem o objetivo de melhorar as condições de saúde da díade. O número de consultas pré-natal realizadas foi categorizado em menor que 6 consultas e maior ou igual a 6 consultas, essa classificação se deu devido ao fato de que o Ministério da Saúde recomenda a gestante realizar no mínimo 6 consultas durante o período gestacional. Da amostra avaliada 100% das mulheres que apresentaram DMG, e 57,1% das mulheres de risco habitual realizaram 6 ou mais consultas durante o pré-natal.

Quanto à idade gestacional no momento do parto, pode-se perceber que as mulheres que apresentaram DMG tiveram uma mediana menor que as de risco habitual, associada a uma menor idade gestacional relatada que foi de 36 semanas, sendo a idade máxima de ambos os grupos iguais. Em relação ao peso de nascimento dos recém-nascidos, em dois casos não foi possível analisar devido à falta de dados na caderneta e a média e desvio padrão foi de $3233,18 \pm 394,40$ e $3132,50 \pm 388$, para os recém-nascidos das mulheres do grupo risco habitual e DMG respectivamente, conforme descrito também na Tabela 4.

Tabela 4 – Características clínicas e sociodemográficas da população (n=25).

Variáveis	Total (n=25)	Risco habitual (n=14)	DMG (n=11)	Valor p ^a
Idade materna	25 (100%)	(30,09±6,25)*	(24,86±5,26)*	0,03 ⁰
Renda per capita				0,32
Menor que 1 salário	13 (68,4%)	9 (64,3%)	4 (36,4%)	
Maior ou igual a 1 salário	6 (31,6%)	2 (14,3%)	4 (36,4%)	
Escolaridade				0,61
Fundamental	5 (12,0%)	2 (14,3%)	3 (27,2%)	
Ensino médio	14 (56,0%)	9 (64,3%)	5 (45,6%)	
Superior	6 (24,0%)	3 (21,4%)	3 (27,2%)	
Estado civil				0,19
Casada/União estável	10 (40,0%)	4 (28,6%)	6 (54,5%)	
Solteira/Divorciada	15 (60,0%)	10 (71,4%)	5 (45,5%)	
Atividade física durante a gestação				0,49
Não	14 (56,0%)	7 (50,0%)	7 (63,6%)	
Sim	11 (44,0%)	7 (50,0%)	4 (36,4%)	
Uso de medicamento durante a gestação				0,82
Não	12 (48,0%)	7 (50,0%)	5 (45,5%)	
Sim	13 (52,0%)	7 (50,0%)	6 (54,5%)	
Suplementação durante a gestação				0,82
Não	12 (48,0%)	7 (50,0%)	5 (45,5%)	
Sim	13 (52,0%)	7 (50,0%)	6 (54,5%)	
Estado nutricional pré-gestacional				<0,001
Eutrofia	15 (60,0%)	14 (100%) ^{a, b}	1 (9,1%) ^{a, b}	
Sobrepeso	4 (16,0%)	0 ^a	4 (36,4%) ^a	
Obesidade	6 (24,0%)	0 ^b	6 (54,5%) ^b	
Ganho de peso gestacional				0,05
Insuficiente	9 (36,0%)	7 (50,0%) ^a	2 (18,1%) ^a	
Adequado	10 (40,0%)	6 (42,9%)	4 (36,4%)	
Excessivo	6 (24,0%)	1 (7,1%) ^a	5 (45,5%) ^a	
Estado nutricional pós-gestacional				0,032
Baixo peso	1 (4,0%)	1 (7,4%)	0 (0%)	
Eutrofia	9 (36%)	9 (64,2%)	0 (0%)	
Sobrepeso	6 (24%)	2 (14,2%)	4 (36,3%)	
Obesidade	9 (36%)	2 (14,2%)	7 (63,7%)	
Número de consultas pré-natal				0,01
< 6 consultas	6 (24,0%)	6 (42,9%)	0 (0%)	
≥ 6 consultas	19 (76,0%)	8 (57,1%)	11 (100%)	
Tipo de parto				0,227
Normal	19 (76%)	11 (78,5%)	8 (72,7%)	
Cesárea	6 (24%)	3 (21,5%)	3 (27,3%)	
Idade gestacional no parto	25 (100%)	40 (37,41)**	39 (36,41)**	0,47 ⁿ
Peso de nascimento do RN	23 (92,0%)	(3233,18±394,40)*	(3132,50±388,40)*	0,54 ⁰

^aTeste qui-quadrado, *Média e desvio padrão; **Mediana, mínimo e máximo; ^bTeste Mann Whitney; ^cT-student simples. Frequências seguidas de letras iguais entre as categorias representam associações estatisticamente significativas pelo teste Bonferroni ($p < 0,05$).

6.2 Concentração de citocinas e quimiocinas presentes no colostro

Os valores das concentrações de citocinas e quimiocinas encontradas no colostro materno estão descritos na Tabela 5, onde observa-se uma coluna com os números de amostras detectáveis, ou seja, que ficaram dentro da curva padrão. Aquelas amostras cuja detecção ficou abaixo da curva padrão, os valores de concentração foram substituídos por zero.

No presente trabalho foram avaliadas 22 citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias e Th2 (alocadas juntamente com as anti-inflamatórias) e inflamatórias, principalmente as Th1. Na tabela 5, observa-se que a IL-10 e a IL-1ra, biomarcadores anti-inflamatórios, apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Nota-se que a IL-10 foi detectada em 9 amostras de ambos os grupos e que apresentou uma maior mediana e maior valor no máximo no grupo DMG. Enquanto a IL-1ra foi detectada em 19 amostras e apresentou uma mediana e um valor máximo maior no grupo das mulheres de risco habitual.

Enquanto isso, dentre as citocinas inflamatórias, o IFN- γ , a IL-6, IL-12 e IL-15 apresentaram diferenças estatística entre os grupos. O IFN- γ foi detectado em 24 amostras sendo que apresentou maior mediana, e valor máximo no grupo DMG, semelhante ao que aconteceu com a IL-6, que foi detectada em 20 amostras de ambos os grupos. Já a IL-12 não foi detectada em nenhuma amostra do grupo de risco habitual, e foi detectada em apenas 3 amostras do grupo DMG. Desta forma, não foi possível realizar uma comparação entre os dois grupos. Em se tratando da IL-15, a mesma foi detectada em 18 amostras de ambos os grupos, apresentando um maior valor máximo e de mediana no grupo DMG.

Tabela 5– Faixa de valores das citocinas e quimiocinas estratificada por grupo.

Citocinas	RISCO HABITUAL			DMG				
	Nº de amostras detectáveis	Mediana (pg/mL)	Min (pg/mL)	Máx (pg/mL)	Nº de amostras detectáveis	Mediana (pg/mL)	Min (pg/mL)	Máx (pg/mL)
Antiinflamatórias								
EOTAX	14	3,6	0,4	149,8	11	9,4	0,6	109,1
IL-2	14	1,4	0,9	8,9	7	3,2	2,6	15,2
IL-4	9	0,2	0,2	0,5	10	0,3	0,1	2,2
IL-5	14	(18,79±6,57)*			11	(17,96±9,60)*		
IL-7	7	14,6	29,2	50,2	7	2,8	2,2	41,7
IL-9	5	0	2144,6	2919,0	7	9,5	8,6	2558,3
IL-10	2	0	3,5	4,8	7	0,7	0,7	9,1
IL-13	1	0	0,1	0,1	4	0	0,1	0,6
IL-1 ra	14	529,7	135,9	749,1	5	0	200,5	641,9
Inflamatórias								
IP-10	7	29,1	58,2	3486,8	7	312,9	238,4	32992,8
MCP-1	6	0	3,8	2609,7	5	0	11,6	775,7
MIP-1a	14	75,0	2,1	1504,4	11	43,4	1,7	3997,7
MIP-1b	13	118,9	14,9	306,7	11	225,8	13,7	2002,5
RANTES	12	8,4	2,1	249,5	9	30,6	6,4	173,2
TNF-a	11	(25,17±20,95)*			10	(32,67±28,80)*		
IFN-γ	14	6,4	0,1	10,4	10	11,0	1,9	82,2
IL-1β	14	1,6	0	87,5	11	0,6	0,6	19,8
IL-6	9	1,8	0,7	6,7	11	11,6	1,6	64,8
IL-8	6	0	5,5	7191,8	5	0	10,9	1507,8
IL-12	0				3	0	0,4	0,7
IL-15	8	35,4	35,4	97,4	10	86,3	35,4	215,4
IL-17	14	18,9	15,2	26,9	11	17,9	4,3	29,8

^aMann-Whitney; ⁰T-student simples, *média e desvio-padrão.

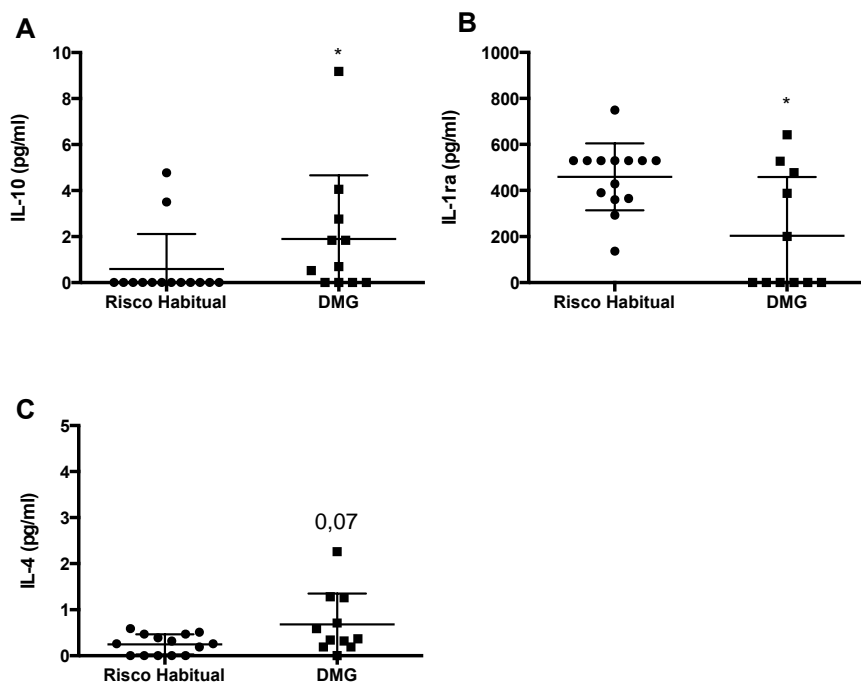


Figura 2: Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias e Th2 no colostro. As concentração de IL-10 (A), IL-1ra (B), e IL-4 (C) no colostro foram medidas por Luminex. Os círculos representam as mulheres classificadas com risco gestacional habitual. Os quadrados representam as mulheres com DMG. Um total de 25 amostras foram incluídas nas análises. Cada figura geométrica representa uma participante. * $p < 0,05$.

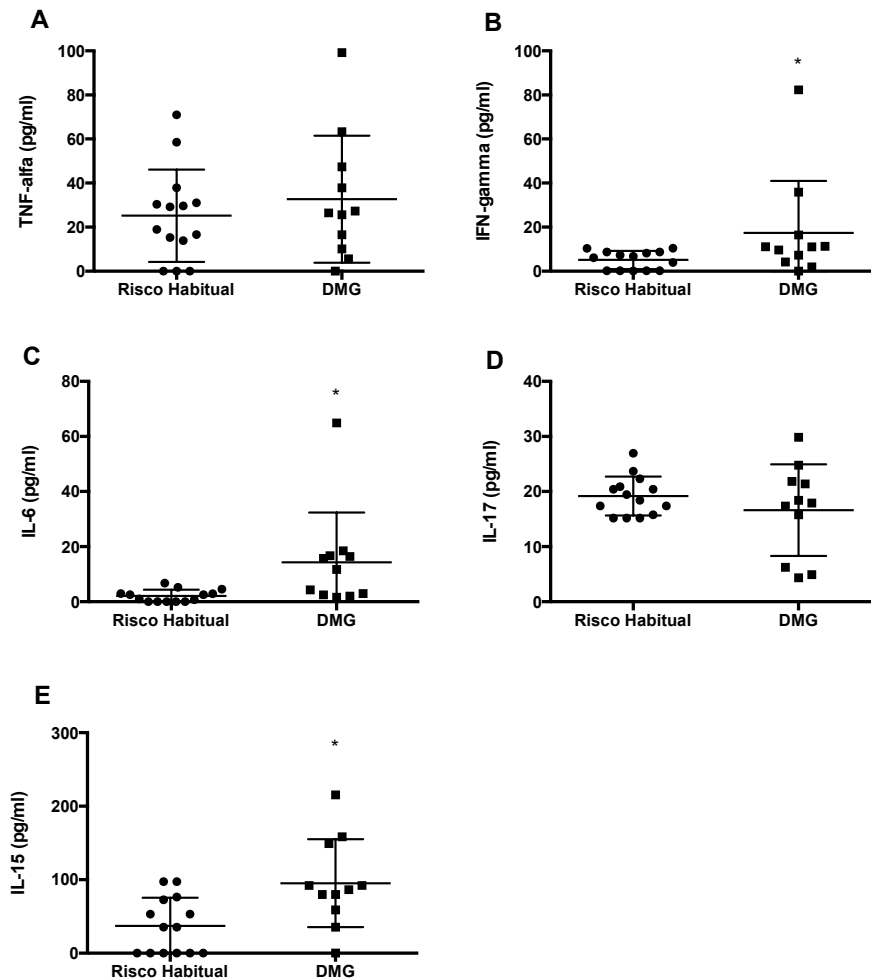


Figura 3: Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias no colostro. As concentrações de TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-17 (D) e IL-15 (E) no colostro foram medidas por Luminex. Os círculos representam as mulheres classificadas com risco gestacional habitual. Os quadrados representam as mulheres com DMG. Um total de 25 amostras foram incluídas nas análises. Cada figura geométrica representa uma participante. * $p < 0,05$.

Para melhor critério de comparação das concentrações de citocinas que apresentaram diferença significativa entre os grupos e análise daquelas que são importantes marcadores de DMG, alguns gráficos foram criados. Na Figura 2, pode-se observar que as mulheres classificadas com DMG apresentaram maior concentração de IL-10 (Figura 2A) no colostro. Com relação a IL-4, observa-se uma média de produção um pouco maior no colostro de mulheres com DMG (Figura 2C). Apesar de não ter diferença estatisticamente significativa. Já o IL-1ra, apresenta-se reduzido no colostro de mulheres com DMG (Figura 2B). Na Figura 3 é válido destacar que tanto o IFN- γ (Figura 3B), quanto a IL-6 (Figura 3C), estão aumentadas no colostro de mulheres com DMG, bom como a IL-15 (Figura 3E).

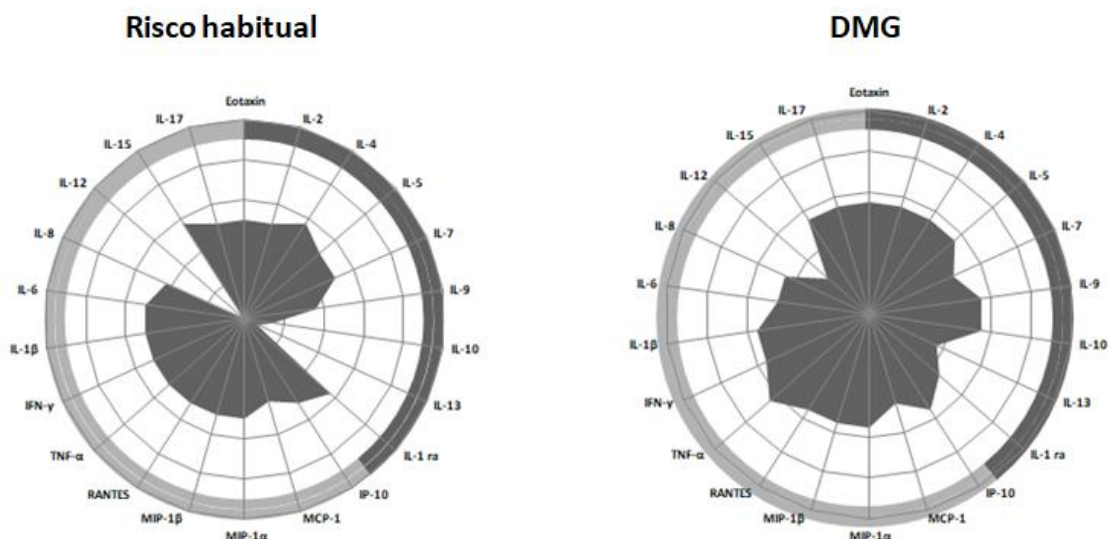


Figura 4: Perfil global de citocinas/quimiocinas no colostro de puérperas, segundo classificação de risco durante a gestação. O gráfico em radar mostra a frequência de alta produtoras de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e Th2, e a contribuição de cada uma nas diferentes categorizações (risco habitual e DMG).

Para identificar de forma global as citocinas e quimiocinas avaliadas no colostro foram construídos os gráficos de radar. Esses gráficos representam a frequência de mulheres que apresentaram a concentração de citocinas e quimiocinas acima da mediana global. Os eixos em cinzas escuros representam a alta frequência de citocinas anti-inflamatórias e Th2, enquanto os eixos em cinza claro representam a frequência de citocinas inflamatórias. Os valores de cada eixo podem ser unidos para formar a área poligonal central que representa o equilíbrio geral de citocinas anti-inflamatórias-Th2/inflamatórias. Aumentar ou diminuir as áreas do polígono central reflete a contribuição maior ou menor do equilíbrio dessas citocinas. Desta maneira, observa-se que as mulheres com DMG apresentam maior frequência de produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e Th2 no colostro.

Para verificar a correlação entre os 22 biomarcadores imunológicos e as variáveis numéricas, foi realizada a correlação de Spearman. Uma correlação maior entre as variáveis foi observada particularmente no grupo de mulheres que apresentaram DMG, através da intensidade das cores (azul mais intenso = correlação forte). Além disso, observa-se uma correlação maior entre os próprios biomarcadores se comparados com as outras variáveis, enquanto no grupo de risco habitual as cores estão menos intensas e mais dispersas (Figura 5).

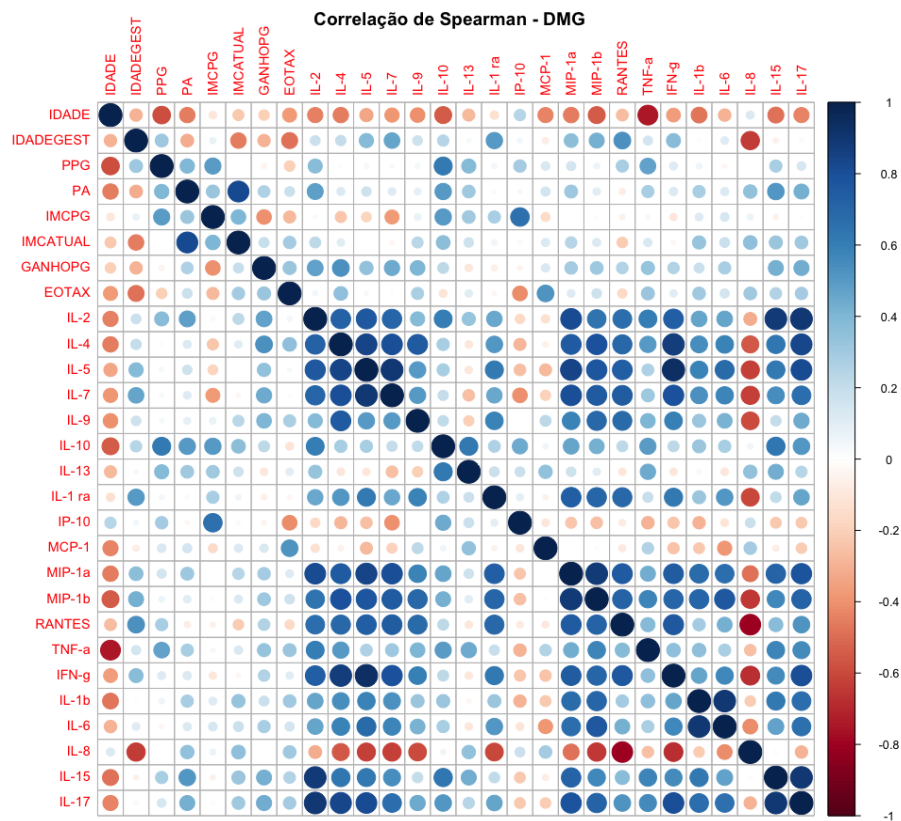
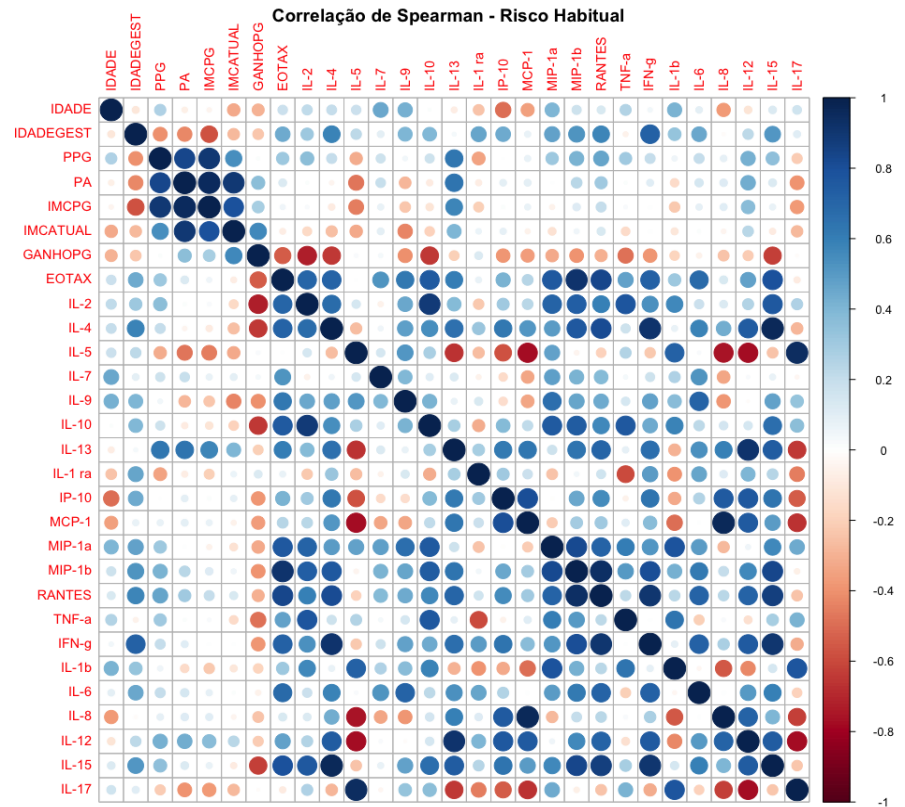


Figura 5: Gráfico de correlação de Spearman por grupo. A força da correlação entre as citocinas e outras variáveis é representada pela cor do círculo na interseção dessas variáveis. As cores variam de azul

mais intenso (correlação positiva forte = 1,0) a vermelho mais intenso (correlação negativa forte = - 1,0). Os resultados não foram eliminados quando $p > 0,05$.

7- DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a presença da DMG compromete a concentração de componentes bioativos, citocinas e quimiocinas no colostro e se essas alterações se correlacionam com o estado nutricional materno. A população do estudo foi composta por 56% de puérperas que apresentaram gestação de risco habitual e 44% de puérperas que apresentaram DMG durante a gestação. A maior parte das mulheres avaliadas relatou ter uma renda *per capita* menor que um salário mínimo, iniciado o ensino médio, ser solteira/divorciada, não ter praticado atividade física durante a gestação e IMC pré-gestacional de eutrofia.

O cuidado pré-natal foi amplamente implementado como um meio de melhorar os resultados de saúde para mães e bebês que apresentam ou não doenças pregressas e/ou durante a gestação⁵¹. Em 2010 o Ministério da Saúde (MS)⁴⁸ publicou a caderneta da gestação de alto risco recomendando que para uma boa evolução da gestação é necessário a realização de pelo menos 6 consultas pré-natal. Dentre as participantes avaliadas, todas realizaram o pré-natal, sendo que as gestantes que possuíram DMG e 76% do total da amostra realizaram 6 ou mais consultas médicas durante a gestação. Nota-se que gestantes de alto risco realizam 6 ou mais consultas durante o pré-natal de acordo com a recomendação do MS⁵².

Em se tratando do estado nutricional, 60% da população do estudo apresentou IMC pré-gestacional de eutrofia, 40% ganho de peso adequado e 24% ganho de peso excessivo durante a gestação. Em relação ao estado nutricional pré-gestacional percebe-se que 100% das mulheres de risco habitual eram eutróficas, enquanto 90,9% das mulheres com DMG apresentavam sobrepeso ou obesidade antes da gestação, podendo assim confirmar os achados de estudos já realizados de que mulheres com sobrepeso ou obesidade antes da gravidez apresentam risco aumentado para desenvolver a DMG e devem reduzir o IMC antes de engravidar e/ou controlar o ganho de peso durante a gestação a fim de evitar o aparecimento de doenças⁵³.

O recém-nascido logo ao nascer é transferido de um ambiente quase estéril para ambiente externo colonizado por microrganismos, entretanto, a natureza desenvolveu um suplemento imune conhecido como colostro que é caracterizado por ser o leite materno rico em fatores de defesa que irá auxiliar na maturação do sistema imune da

criança a partir desse momento. Esse fluído contém uma variedade de citocinas e quimiocinas e a principal fonte desses compostos são as células que migram para a glândula mamária e essas citocinas e quimiocinas chegam até o intestino de uma forma ainda desconhecida²⁷. Acredita-se ainda que haja uma dificuldade na avaliação do papel de cada citocina no sistema imune do bebê, uma vez que as concentrações desses compostos variam muito, o que se sabe é que a ingestão das mesmas através do leite materno influencia a maturação e o desenvolvimento das células desse sistema nos recém-nascidos²⁹.

Diante do exposto, Sifnaois e colaboradores¹⁵ sugerem que a composição imune do leite materno sofra alterações na presença da DMG, doença reconhecida como uma pandemia global caracterizada não apenas pelo aumento da resistência à insulina e intolerância à glicose, mas também por um estado de inflamação sistêmica de baixo grau e desregulação do sistema imune que induz um desequilíbrio entre células Th1 e Th2 favorecendo as respostas inflamatórias. Devido às alterações no metabolismo da glicose, os componentes do leite que essas mulheres produzem também são alterados.

Dentre as citocinas estudadas, a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória e imunorreguladora que está sendo bastante discutida, uma vez que a mesma ao ser avaliada no colostro tem sido descrita em concentrações extremamente divergentes, desde não detectável até valores bastante elevados, o que dificulta a interpretação do seu papel no leite materno^{16,54}. Acredita-se que a mesma é uma potente citocina que resulta na ativação das células Th2 que foi originalmente marcada como fator inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células T auxiliar (Th1)⁵⁵.

Essa citocina parece ser chave na manutenção da gravidez, pois a mesma possui um efeito protetor na unidade anti-fetal-placentária, e inibe a secreção de outras citocinas inflamatórias, tais como a IL-6, o TNF- α e o IFN- γ , enquanto estimula a liberação de IL-1ra. Juntamente com IL-4 e IL-13, a IL-10 tende a modular invasão de trofoblastos favorecendo o desenvolvimento da placenta. A mesma está negativamente correlacionada com IMC e níveis de glicemia de jejum. Baixos níveis de IL-10, está associado à síndrome metabólica e à Diabetes mellitus tipo II em mulheres e em crianças⁵⁶.

No estudo em questão a IL-10 foi detectada em apenas 9 amostras, sendo 7 delas do grupo DMG o que corrobora com os achado de Castellote e seus colaboradores⁵⁷ que

ao compararem a presença dessa citocina no leite de mulheres que tiveram filhos prematuros e a termo observaram que a mesma foi encontrada em concentrações muito baixas e indetectáveis em algumas amostras. Além disso, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa dessa citocina entre os grupos, nota-se também que no grupo que apresentou a DMG há uma maior mediana e maior valor máximo dessa citocina o que significa que o aumento da mesma está relacionado com a inflamação causada pela DMG, uma vez que a IL-10 é conhecida por suprimir a inflamação e a autoimunidade⁵⁵. Resultado esse que também foi confirmado com o gráfico de correlação em que a citocina apresenta uma correlação positiva com o peso pré-gestacional, ou seja, com as mulheres que apresentaram sobrepeso e obesidade inicialmente a gestação.

Alguns estudos demonstraram que os níveis plasmáticos de IL-10 em pacientes com DMG são significativamente menores do que em controles saudáveis, e que níveis baixos de IL-10 e excesso de resistência à insulina em pacientes com DMG estão negativamente correlacionados, sugerindo que níveis baixos de IL-10 podem aumentar a resistência à insulina nesses pacientes⁵⁸. No entanto, no presente estudo a concentração de IL-10 foi avaliada no colostro e não no sangue, sendo assim, pode-se sugerir que o aumento da IL-10 pode estar relacionado à tentativa do organismo em controlar a ação das citocinas inflamatórias também aumentadas no contexto do DMG.

Já a IL-1ra é um membro da família da IL-1 também conhecida como uma citocina anti-inflamatória que age de forma antagonista ao receptor de IL-1 presente na superfície celular (IL-1R), o mesmo receptor que se liga à IL-1, evitando que a mesma envie um sinal para essa célula. Além disso, essa citocina é conhecida por ser um inibidor natural do efeito pró-inflamatório de IL-1 α e IL-1 β e modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas a IL-1⁵⁹. De acordo com os dados apresentados pelo estudo, observa-se que mulheres com DMG secretaram menor concentração IL-1ra no colostro, isso pode confirmar o perfil mais inflamatório das citocinas presentes no colostro de mães que tiveram DMG.

Em seus estudos, Charles e colaboradores⁵⁶ descrevem que a IL-1ra não induz diretamente uma resposta anti-inflamatória, mas se liga ao receptor da IL-1 na superfície celular e inibe os efeitos inflamatórios dessa citocina, ou seja, neutraliza os efeitos causados pela IL-1. Portanto, pode-se concluir que os níveis de IL-1ra são uma medida indireta da atividade da IL-1. Acredita-se que a IL-1 está aumentada em

pacientes com diabetes mellitus e que a mesma é responsável por promover a destruição das células beta e alterar a sensibilidade à insulina⁶⁰. Além disso, Charles e colaboradores⁵⁶ definem que a IL-1ra encontra-se correlacionada positivamente com o IMC e com a resistência à insulina o que corrobora com os nossos achados apresentados no gráfico de correlação de Spearman por grupo. No gráfico de mulheres com DMG observa-se uma correlação mais forte entre o IMC pré-gestacional e a IL-1ra, já no grupo de risco habitual essa correlação apresenta-se de forma negativa.

Dentre as citocinas inflamatórias, o IFN- γ é o responsável por ativar monócitos e macrófagos, sendo característica da resposta Th1²⁰. Os resultados mostram que o IFN- γ aparece com maior mediana, valor mínimo e máximo no grupo DMG em comparação ao grupo de risco habitual, ou seja, parece que o colostro reflete a inflamação causada pela DMG. Esses dados espelham o que ocorre na circulação de mulheres com DMG, onde observa-se aumento dos níveis circulatórios de IFN- γ , que tem relação com a inflamação desencadeada pela doença¹⁵.

Sabe-se que algumas citocinas presentes no leite materno como a IL-6 e TNF- α estão associadas à regulação do desenvolvimento e funções da glândula mamária¹⁶. Estudos recentes mostraram que as duas são consideradas como fatores pró-inflamatórios e desempenham papéis importantes no desenvolvimento da resistência à insulina e do DMG⁵⁸. A IL-6 é uma das principais citocinas do leite humano e é secretada por vários tecidos, incluindo músculo esquelético, leucócitos, hepatócitos e tecido adiposo. Apresenta-se em maior concentração nos indivíduos obesos em comparação com os não obesos, ou seja, ela está relacionada com o aumento do IMC e do percentual de gordura⁵⁶. No caso do DMG, a IL-6 tem sido estudada como marcador de diagnóstico por aparecer aumentada no sangue⁶¹. Os resultados apresentados demonstram que a IL-6 possui maior mediana e maior valor máximo no colostro de mulheres com DMG se comparada ao grupo de mulheres saudáveis, adicionalmente, no gráfico de correlação apresenta-se uma correlação positiva com o ganho de peso gestacional e IMC atual no pós-parto.

Em se tratando da IL-12 sabe-se que ela é conhecida por ser uma citocina pró-inflamatória e também por estar envolvida na condução da autoimunidade e na inflamação associada⁶². Quanto à presença da mesma no colostro a literatura é escassa e nas amostras avaliadas no grupo de risco habitual não foi detectada a presença da citocina, enquanto no grupo DMG apenas em 3 amostras foram detectadas. Esses

resultados corroboram os achados de Munblit e colaboradores² que avaliaram no colostro materno e no leite maduro a presença da IL-12. Esta citocina foi detectada em apenas 18% das amostras coletadas.

Outra citocina que apresentou diferença estatisticamente significativa no trabalho foi a IL-15, que também pode ser considerada como uma citocina inflamatória. A concentração de IL-15 no colostro apresentou maior número de amostras detectáveis, maior valor de mediana e valor máximo no grupo que de mulheres com DMG em relação ao grupo de risco habitual. Além disso, a IL-15 teve associação positiva com o peso atual e ganho de peso gestacional nas mulheres com DMG, diferente das mulheres de risco habitual. Esses dados podem sugerir que a citocina IL-15 também tem relação positiva com a DMG.

Os biomarcadores IL-4, TNF- α e IL-17 não apresentaram resultados significativos no trabalho em questão, mas alguns estudos trazem essas citocinas como importantes no DMG. Neste trabalho, a IL-4 não apresentou resultado significativo quando comparado ambos os grupos, porém apresentou maior concentração no grupo DMG. Em seu estudo com animais Yessoufou e colaboradores⁶³, também demonstraram que os níveis plasmáticos de IL-4 estão inalterados ou aumentados no grupo DMG em comparação com a gravidez normal.

O TNF- α é sem dúvidas, uma das citocinas mais discutida em relação à inflamação e ao desenvolvimento da resistência a insulina na obesidade e DMG. Alguns estudos sugerem que essa citocina é um preditor independente para o desenvolvimento da doença, independente do IMC⁶². Trabalhos reportam que o aumento da resistência a insulina está associado à supressão de leptina e adiponectina e ao aumento da resistina e de TNF- α , o que sugere seu envolvimento com a DMG⁶⁵. O estudo de Zhang e colaboradores⁶⁶, mostraram que a presença de TNF- α em mulheres com DMG foi maior que em mulheres com gestação saudável. Também nos dados do trabalho em questão, não obtivemos resultados estatisticamente significativos quanto a essa citocina, porém observa-se associação positiva com o peso atual e o ganho de peso na gestação no grupo DMG.

Sabe-se que as células Th17 são as responsáveis por induzir à liberação de mediadores pró-inflamatórios e ativar a migração de neutrófilos. A IL-17 está reduzida na gravidez saudável, entretanto, nos estudos de Sifnaios e colaboradores¹⁵ que

comparou o sangue de mulheres com e sem DMG no terceiro trimestre de gravidez, houve aumento significativo na proporção de células produtoras de IL-17 no grupo DMG, o que pode ser justificado pelo estado pró-inflamatório caracterizado na gravidez com a doença. No caso do nosso trabalho a concentração de IL-17 não foi diferente entre as amostras de colostro de mulheres com ou sem DMG. Porém, é possível que essas mulheres tivessem aumento na frequência de células Th17 no sangue.

A análise do perfil global das citocinas e quimiocinas representadas pelos gráficos em radar compara a contribuição de todas as citocinas e quimiocinas simultaneamente, e a representatividade de cada uma delas no perfil global. Essa análise se difere dos outros tipos de gráficos, pois é uma análise visual que permite avaliar uma maior contribuição relativa de cada citocina comparada com as demais, segundo a categorização dos grupos. Após examinar esses gráficos, foi possível observar que no grupo de mulheres com DMG a maioria das citocinas pró-inflamatórias (IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IFN- γ , IL-1 β e IL-17) e anti-inflamatórias-Th2 (Eotaxin, IL-2, IL-4, IL-5, IL9 e IL-10) estão em alta concentração em mais de 50% das amostras. Em contrapartida, no grupo de risco habitual, nota-se que esses biomarcadores apresentam um perfil mais irregular e que apenas a IL-4 e IL-1ra (Th2 e anti-inflamatórias) e IL-15 (pró-inflamatória) tiveram a concentração alta em mais de 50% das amostras.

Entretanto, no grupo DMG o gráfico sugere que há um aumento tanto de biomarcadores anti-inflamatórios quanto inflamatórios. Existem relatos que a DMG aumenta a produção de citocinas apenas inflamatórias no sangue¹⁵. Porém, alguns autores também mostraram o aumento de ambos os grupos de citocinas durante o DMG⁶⁹. Essa dicotomia pode estar relacionada à tentativa do organismo em promover equilíbrio entre as diferentes citocinas e quimiocinas de modo a favorecer a homeostase. De acordo com Diaz e colaboradores²⁰ no leite materno de mulheres saudáveis observam-se maior concentração de citocinas anti-inflamatórias se comparada com as inflamatórias. Sendo que os níveis dessas citocinas reduzem ao longo da lactação e de acordo com o momento do nascimento, se o bebê é a termo ou pré-termo. Entretanto, na DMG a concentração dessas citocinas ainda é discutível.

Adicionalmente, foi realizada uma avaliação complementar do perfil de citocinas e quimiocinas por uma análise de correlação de Spearman entre os biomarcadores e as variáveis numéricas. Após essa análise, foi possível verificar que o grupo de mulheres com DMG apresentou um gráfico com maior intensidade da cor azul,

ou seja, nota-se que existe uma forte correlação positiva entre os biomarcadores e as variáveis numéricas, como o peso, ganho de peso e IMC. Enquanto no grupo de mulheres de risco habitual, o gráfico encontra-se mais dispersos com maior número de correlações negativas se comparado ao grupo com DMG. Outra análise possível após interpretação dos gráficos é que no grupo DMG há uma correlação positiva entre as citocinas no geral, sendo uma correlação mais forte entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias do que entre as citocinas com a mesma característica o que corrobora com o gráfico em radar que nos mostra um aumento de ambos os tipos de citocinas e quimiocinas.

Os estudos sobre imunologia do colostro, em especial na DMG, ainda encontram-se escassos na literatura. Os trabalhos que realizaram análise de perfil imune em mulheres com DMG, avaliaram em sua maioria o sangue das mulheres e não o leite. Os dados apresentados no geral corroboram os dados de Fujimori e colaboradores⁸ que sustentam a hipótese de que as alterações no organismo induzidas pela DMG são capazes de alterar a composição imune do colostro, entretanto, não há dúvidas quando ao benefício do aleitamento materno para a díade. Adicionalmente, o aleitamento deve ser incentivado mesmo em situações de comorbidades onde não há prejuízo à saúde da criança.

O que se sabe é que a rica nutrição transferida através do leite materno traz benefícios em longo prazo ao metabolismo, crescimento, desenvolvimento e ao sistema imune da criança. O mais importante é realizar um controle glicêmico adequado durante a gestação com objetivo de garantir que as necessidades nutricionais e a imunidade transferida à criança sejam adequadas. Portanto, o controle das doenças, como a DMG, deve ser favorecido para não prejudicar o aleitamento materno¹¹.

A presente pesquisa apresentou como limitação o número de participantes do projeto, uma vez que a mesma foi realizada em uma Maternidade que não é considerada de alto risco. O número de mulheres que são atendidas com DMG é pequeno, dificultando assim a coleta dos dados. Outra limitação apresentada foi o fato de a coleta do colostro ser realizada sempre no período da tarde, horário em que a mulher possui menor produção e por esse motivo algumas participantes foram excluídas da coleta devido ao fato de não conseguirem retirar pelo menos 2mL do fluído. Alguns estudos citados realizaram a coleta do colostro no período da manhã logo quando a mãe desperta, o que facilita a retirada de maior volume. Um ponto importante e limitador

também foi a ausência dos valores de glicemia registrados em prontuários. Além disso, não foi possível realizar coleta de informações tempos depois do parto, para verificar se houve equilíbrio das citocinas e quimiocinas presentes no leite materno e como esses biomarcadores puderam interferir no desenvolvimento e na ocorrência de doenças na criança.

Um estudo com maior número de participantes que apresentaram DMG durante a gestação seria necessário para verificar os efeitos da doença no comportamento das citocinas e quimiocinas no colostro materno. Mas, vale salientar que este estudo tem importância na investigação da influência da DMG na composição imune do leite materno, visto que mediu vários dos biomarcadores que não haviam sido identificados no leite materno até o momento, em especial em mães que tiveram DMG.

Outros estudos analisando a concentração dessas citocinas no sangue dos recém-nascidos de mães que apresentaram a DMG devem ser considerados uma vez que os estudos são escassos quando se trata da DMG e colostro materno e também por não se ter o desfecho de como será o comportamento dessas citocinas no sangue bebê.

8. CONCLUSÃO

Nosso estudo confirma a hipótese de que a presença de DMG acarreta em mudanças nas concentrações de citocinas e quimiocinas no colostro materno, com aumento tanto de citocinas e quimiocinas inflamatórias, quanto anti-inflamatórias. Apesar dessas alterações encontradas, sabe-se que o aleitamento materno ainda é, sem dúvidas, a melhor forma de nutrição e proteção ao recém-nascido. Sendo assim, tornam-se necessários mais estudos dando continuidade à nossa pesquisa com objetivo de avaliar maior número de mulheres, gerando assim uma amostra representativa para que se torne possível realizar intervenções nutricionais de forma preventiva a fim de minimizar os índices da doença.

9. REFERÊNCIAS

1. Chang YS, Glaria AA, Davies P, Beaker S, Bick D. Breastfeeding experiences and support for women who are overweight or obese: A mixed-methods systematic review. *Matern. Child. Nutr.* 2020;16:128-65.
2. Munblit D, Treneva M, Peroni DG, Colicino S, Show L, Dissanayeke S, et al. Colostrum and mature human milk of women from London, Moscow, and Verona: Determinants of immune composition. *Nutrients.* 2016;8(11):695.
3. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2013;60(1):49–74.
4. Donovan SM, Comstock SS. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity. *Ann. Nutr. Metab.* 2016;69(2):42-51.
5. Nolan LS, Parks OB, Good M. A Review of the Immunomodulating components of maternal breast milk and protection against necrotizing enterocolitis. *Nutrients.* 2020;12(1):14.
6. Zenardo V, Golin R, Amato M, Trevisnuto D, Favaro F, Faggian D, et al., Cytokines in human colostrum and neonatal jaundice. *Pediatric research.* 2007;62:191–194.
7. Lee S, Kelleher SL. Biological underpinnings of breast feeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016;311(2):405-422.
8. Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, França ACH, Abreu LC. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy and Child birth.* 2015;166(15).
9. Pereira AC, Jesus NR, Lage LV, Levy RA. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lupus erythematosus (SLE). *Rev. Bras. Reumatol.* 2005;45(3):134-40.
10. Farrar D. Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management challenges. *Int J Womens Health.* 2016;8:519-527.
11. Peila C, Gazzolo D, Bertino E, Cresi F, Coscia A. Influence of diabetes during pregnancy on human milk composition. *Nutrients.* 2020;12(1):185.

12. Truchet S, Honvo-Houéto E. Physiology of milk secretion. *Best Practice & research clinical endoc. metabolism.* 2017;31(4):367-384.
13. Pahn Q, Patel P, Baban B, Yu J, Bhatia J. Factors affecting the composition of expressed fresh human milk. *Breastfeeding medicine.* 2020;15(9):551-559.
14. Zambruni M, Villalobos A, Somasunderam A, Westergaard S, Nigalye M, Turin CG, et al. Maternal and pregnancy-related factors affecting human milk cytokines among Peruvian mothers bearing low-birth-weight neonates. *Reprod. Immunol.* 2017;120:20-26.
15. Sifnaios E, Mastorakos G, Psarra K, Panagoupolos ND, Panoulis K, Vitoratos K, et al. Gestational diabetes and T-cell (Th1/Th2/Th17/Treg) Immune profile. *In Vivo.* 2019;33(1):31-40.
16. Palmeira P, Sampaio MC. Immunology of breast milk. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2016;62(6):584-593.
17. Munblit D, Abrol P, Sheth S, Chow LY, Khaleva E, Asmanov A, et al. Levels of growth factor and IgA in the colostrum of women from Burundi and Italy. *Nutrients.* 2018;10(9):1216.
18. Menchetti L, Traina G, Tomasello G, Proietti PC, Leonardi L, Barbato O. Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. *Front. Biosci.* 2016;8:331-51.
19. Zimny MW, Hassan EK. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. BiolLett.* 2017;22:11.
20. Diaz AG, Arribas SM, Algara A, Cabrejas MAM, Pablo ALL, Pipaon MS, et al. A Review of bioactive factors in human breast milk: A focus on prematurity. *Nutrients.* 2019;11(6):1307.
21. Dawod B, Marshall JS. Cytokines and soluble receptors in breast milk as enhancers of oral tolerance development. *Front. Immunol.* 2019;10:16.
22. Trend S, Strunk T, Lloyd ML, Kok CH, Metcalfe J, Geddes DT, et al. Levels of innate immune factors in preterm and term mother's breast milk during the 1st month postpartum. *British Journal of Nutrition.* 2016;115:1178-1193.
23. Saso A, Blyuss O, Munblit D, Faal A, Moore SE, Dooare KL. Breast Milk Cytokines and Early Growth in Gambian Infants. *Front Pediatr.* 2018;6:414.
24. Basha S, Surendran N, Pchichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014;10(9):1171-1184.

25. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, Davidson B, Silva E, Salles L, et al. Innate immunity of neonates and infants. *Frontiers immunology*. 2018;9:1759.
26. Tomicic S, Johansson G, Voor T, Bjorkstén B, Botcher MF, Jenmalm MC. Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers – relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatric Research*. 2010;68:330-334.
27. França EL, Calderon IMP, Vieira EL, Morceli G, Honório-França ACH. Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers. *Clin. Dev. Immunol*. 2012;2012:9281-87.
28. Diniz LMO, Figueiredo BCG. The newborn's immune system. *Rev. Med. Minas Gerais*. 2014;24(2):227-233.
29. Field CJ. The Immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *Natural sciences and Engineering Council of Canada*. 2005.
30. Cacho NT, Lawrence RM. Innate immunity and breast milk. *Front. Immunol*. 2017;8:584.
31. Rizzoni D. The Newborn's immune system with fetal and maternal aspects. *Rev Ped*. 2011;12(1):12-15.
32. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshmikanth T, Pou C, Mikes J, et al., Stereotypic immune system development in newborn children. *Cell*. 2018;174(5):1277-1992.
33. Doare KL, Bellis K, Faal A, Birt J, Munblit D, Humphries H. SIgA, TGF- β 1, IL-10, and TNF α in Colostrum are associated with infant group B *Streptococcus* colonization. *Front. Immunol*. 2017;8:1269.
34. Caar LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matzael KS, Elolimy AA. Role of Human milk bioactives on infants' gut and immune health. *Front Immunol*. 2021;12:1-17.
35. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. Endocrinology of pregnancy: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Journal of Endocrinology*. 2016;174(2):43-51.
36. Kirwan JP, Mouzon SHD, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, et al. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetic*. 2002;1(7):2207-13.

37. Farrar D. Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management challenges. *Int. J. Womens Health*. 2016;8:519–527.
38. Dugan JA, MPH, DHSc, PA-C, Julianna Ma-Crawford, MPH, PA-C. Managing gestational diabetes. *Journal of the American Academy of physician assistants*. 2019;32(9):21-25.
39. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>
40. Honorio AC, Rudge MVC, Oliveira SL, Ramos MD, Calderon IMP. Avaliação da resposta imune materna e fetal de camundongos diabéticas. *Rev.Bras. Ginecol. Obstet*. 1996;18:233-8.
41. Gomes CP, Torloni MG, Silva BYG, Alexandre SM, Mattar R e Daher S. Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: A systematic review of the literature. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2013;69:545-557.
42. Sheu A, Chan Y, Ferguson A, Bakhtiari MB, Hawke W, Chan YF, et al. A proinflammatory CD4+T cell phenotype in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2018;61:1633.
43. Bolognani CV, Souza SS, Calderon IMP. Gestational diabetes mellitus - focus on new diagnostic criteria. *Com. Ciências Saúde*. 2011;22(1):31-42.
44. Wojcik M, Zieleniak A, Zurawska-Klis M, Cypryk K, Wozniak LA. Increased expression of immune-related genes in leukocytes of patients with diagnosed gestational diabetes mellitus (GDM). *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2016;241(5):457–465.
45. Dugan JA, MA-Crawford J. Managing gestational diabetes. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2019;32(9):21-25.
46. Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Rudge MVC, Calderon IMP, Honorio-França AC. The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. *Clin. Dev. Immunol*. 2013;2013:590190.
47. Institute of medicine. Nutrition during pregnancy. Washington DC. National Academy Press, 1990. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO.

- Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technicalreport series n. 854. Geneva:WHO,1995.
48. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010;302.*
 49. Nunes GS, Speziali E, Carvalho AT, Avelar DMV, Avelar RS, Soares TC, et al. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune cells from Brazilian individuals. *Immunity & Ageing.* 2017;14(2).
 50. Spearman, C. (1904). The Proofand Measurement of Association between Two Things. *Int J Epidemiol.* 2010;39(5):1137-50.
 51. Byerley BM, Hass DM. A systematic overview of the literature regarding group prenatal care for high-risk pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17:329.
 52. Medeiros FF, Santos IDL, Ferrari RAP, Serafim D, Maciel SM, Cardelli AAM. Prenatal follow-up of high-risk pregnancy in the public service. *Rev.Bras. Enferm.* 2019;72(3):204-11.
 53. Yasuda S, Luchi T, Goto A, Katanoda K, Lida S, Oikawa Y, et al. Weight control before and during pregnancy for patients with gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2019;10(4):1075-1082.
 54. Santiago LTC. Perfil de citocinas no colostro em função da idade gestacional e do crescimento fetal [Dissertação de mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2016.
 55. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immuno regulatory cytokine thathas been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine.* 2015;74(1):27-34.
 56. Charles BA, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Chen G, Shriner D. The roles of IL-6, IL-10, and IL-1RA in obesity and insulin resistance in African-Americans. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(12):2018-2022.
 57. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Péreza-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of nutrition.* 2011;141(6):1181-1187.

58. Wei, Chen X, Chen H. Association of single nucleotide polymorphisms of the IL-6, IL-10, and TNF- α genes with susceptibility to gestational diabetes Mellitus. *Genetics and molecular biomarkers*. 2020;24(7).
59. Anzaghe M, Resch T, Schaser E, Kronhart S, Diez C, Niles MA, et al., Organ-specific expression of IL-1 receptor results in severe liver injury in type I interferon receptor deficient mice. *Front. Immunol*. 2019;10:1-11.
60. Feve B, Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009;5:305-3011.
61. Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting gestational diabetes mellitus. *Obstet. Gynecol. Sci*. 2020;63(4):407-416.
62. Schurich A, Raine C, Morris V, Ciurtin C. The role of IL-12/23 in T cell-related chronic inflammation: implications of immunodeficiency and therapeutic blockade. *Rheumatology*. 2018;57:246-254.
63. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA. Peroxisome proliferator-activated receptor α deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of the cell differentiation. *Endocrinology*. 2006;147(9):4410-4418.
64. Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breastmilk and infant adiposity. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(6):1213-1221.
65. Noureldeen AFH, Qusti SY, Al-seeni MN, Bagais MH. Maternal leptin, adiponectin, resistin, cisfatin and tumor necrosis factor-alpha in normal and gestational diabetes. *Indian J. Clin. Biochem*. 2014;29(4):462-470.
66. Zhang J, Chi H, Xiao H, Tian X, Wang Y, Yun X, et al. Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) single nucleotide polymorphisms (SNPs), inflammation and metabolism in gestational diabetes mellitus in inner mongolia. *Med. Sci. Monit*. 2017;23:4149-4157.
67. Fagundes DLG, França EL, Fernandes RTS, Hara CCP, Morceli G, França ACH, et al. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, Cord blood and colostrum of diabetic mothers. 2015;998-1004.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer de Projeto de Pesquisa Hospital Risoleta Tolentino Neves



Parecer de Projeto de Pesquisa

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2017.

PROCESSO Nº 33/2017

Título do Projeto: Associação do Estado Nutricional e Consumo Alimentar Materno-Infantil à composição do leite humano e saúde no pós-parto.

Pesquisadores: Luana Caroline dos Santos, Tatiani Uceli Maioli, Taciana Maia de Sousa, Larissa Bueno Ferreira, Crislianny Miranda e Silva e Marliana Naves Silve de Oliveira.

Descrição/Objetivos:

Trata-se de um projeto que tem como objetivo investigar a associação do padrão alimentar materno ao perfil de ácidos graxos e componentes imunológicos no LH, marcadores bioquímicos no sangue da mulher, estado nutricional da criança e a alimentação complementar até o segundo ano de vida e avaliar a efetividade de uma intervenção com ômega-3 em puérperas associados com os sintomas depressivos, prática do AM e crescimento infantil.

Relevância:

Até o momento não há conhecimento sobre trabalhos brasileiros que avaliem a influência do padrão alimentar no pós-parto associado a composição de ácidos graxos no LH, ao estado nutricional infantil e a formação do hábito alimentar da criança ao longo do primeiro ano de vida.

Metodologia:

A pesquisa será desenvolvida em dois serviços de referência materno-infantil no HRTN e no HC -UFMG, possuindo delineamento misto:

Delineamento transversal: Avaliação de mulheres no puerpério imediato e duas respectivas crianças, com coleta de Leite Materno.

Ensaio Clínico: Avaliação dos efeitos de suplementação de ômega-3 na retenção de peso pós-parto e sintomas depressivos, em subamostra de puérperas.

Hospital Risoleta Tolentino Neves – Rua das Gabirobas, 01 - Bairro Vila Clóris – BH-MG

Cep:31.744-012 – Tel.: (31) 3459-3266

www.hrtb.fundep.ufmg.br

RQU-NGO Ver. 03/2014



HOSPITAL
RISOLETA TOLENTINO NEVES

Estudo prospectivo (coorte): Avaliação da necessidade energética, composição de AG no LH no período de 1 ano, marcadores bioquímicos no sangue da mulher, avaliação do estado nutricional do binômio mãe-filho.

No delineamento transversal, a amostra será composta por mulheres no puerpério imediato, adultas (18 a 40 anos), em no mínimo 24 horas pós-parto, que serão avaliadas por meio de um questionário estruturado, que apresentem bom estado geral de saúde com crianças nascidas vivas, a termo e que estejam dispostas a participar do estudo. Serão excluídas as mulheres em gestação múltipla ou que referirem histórico de diabetes melitus gestacional, pré-eclâmpsia ou complicações na sua saúde ou de seus filhos que demandem cuidados médicos no período do estudo ou permanente. A amostra será constituída por 462 puérperas, sendo 231 atendidas em cada local de pesquisa. A estimativa amostral foi efetuada por meio do software Epi Info™7, adotando-se intervalo de confiança (IC) de 95%, erro de 5% e fórmula para fins descritivos e população finita, acrescidas de 30% de possíveis perdas no decorrer do estudo (HULLEY et al., 2001). Essas mulheres serão recrutadas para o estudo prospectivo (estudo de coorte).

Para o ensaio clínico, será selecionada uma subamostra de 80 mulheres, distribuídas em grupo controle (n=40) e grupo intervenção (n=40). Essa subamostra será proveniente do local B, tendo em vista que o seguimento acontecerá próximo ao local, no laboratório de Nutrição da UFMG. A estimativa amostral foi efetuada por meio do software Epi Info™7, com poder estatístico de 95%, nível de significância de 5%, fórmula para medidas pareadas e acréscimo de 50% para compensar prováveis perdas no decorrer da intervenção (HULLEY et al., 2001).

Equipe de Pesquisadores:

A equipe de pesquisadores é formada por duas professoras do departamento de Nutrição da Escola de Enfermagem da UFMG, por uma aluna de Doutorado e três mestrandas.

- Professora: Luana Caroline dos Santos e Tatiani Uceli Maioli.
- Doutoranda: Taciana Mala de Souza.
- Mestrandas: Larissa Bueno Ferreira, Crislianny Miranda e Silva e Mariana Naves Silva de Oliveira.
- A nutricionista Ana Luiza Soares, do HRTN, colaborará com o Projeto.

Financiamento/Custos:

O projeto conta com financiamento aprovado pelo Edital Universal do CNPq(R\$ 37.192,00) com previsão de liberação de recursos em 2017. Não haverá ônus para o HRTN.

Aspectos Éticos:

O estudo não envolve intervenção, com exceção da coleta de sangue, que será realizada pós-alta do HRTN. O Termo de Consentimento encontra-se anexado, adequado ao trabalho proposto e será objeto de análise pelo COEP-UFMG.

Hospital Risoleta Tolentino Neves – Rua das Gabrobas, 01 - Bairro Vila Cléria - BH-MG

Cep: 31.744-012 - Tel.: (31) 3459-3266

www.hrtn.fundap.ufmg.br

RQU NGQ Ver. 03/2014

**Parecer:**

O Colegiado do NEPE posiciona-se favorável à realização da pesquisa nas dependências do HRTN.

O Colegiado do Nepe informa que não é permitida a impressão de prontuários e demais documentos necessários para a pesquisa nas impressoras do HRTN.



Colegiado do Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão - NEPE/HRTN

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: ASSOCIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E CONSUMO ALIMENTAR MATERNO-INFANTIL À COMPOSIÇÃO DO LEITE HUMANO E SAÚDE NO PÓS PARTO.

Pesquisadores Responsáveis: Tatiani Uceli Maioli e Luana Caroline dos Santos.

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Telefone para contato: (31) 3409-8036

Nome do voluntário: _____ DN: ___/___/___

A Sra. está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa, de responsabilidade das pesquisadoras Tatiani Uceli Maioli e Luana Caroline dos Santos.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o estado nutricional e o consumo alimentar de puérperas do Hospital Risoleta Tolentino Neves de Belo Horizonte – Minas Gerais e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, dentro do período de 48 horas pós-parto. Para tal, serão aplicados questionários para avaliação do consumo alimentar (Questionário de Frequência Alimentar) e medidas serão aferidas (peso, altura e circunferência do braço). A presença de edema (acúmulo de líquido no corpo) será averiguada por meio de observação. Informações adicionais serão coletadas nos prontuários médicos e cartão nutricional da gestante. Para uma sub amostra das participantes, serão coletadas amostras de leite materno para posteriores análises.

Sua participação nesse projeto não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Destacamos que sua recusa não acarretará em nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Os dados obtidos serão analisados estatisticamente para construção de trabalho científico e todas as informações pessoais obtidas são confidenciais e não serão divulgadas, garantindo sua privacidade. A participação no projeto apresenta nenhum tipo de risco para sua saúde. Caso exista qualquer dúvida, os responsáveis poderão ser contatados nos telefones citados acima, inclusive com ligações a cobrar.

Eu, _____, RG
nº _____, declaro ter sido informada e concordo em participar, como voluntária, do projeto de pesquisa acima descrito.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 201____

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º andar, *Campus Pampulha* – Belo

Horizonte – MG – Brasil, CEP: 31.270-901.

Telefone/FAX:3409-4592 – Email: coep@prpq.ufmg.br

Anexo 3 – Questionário aplicado

PROTOCOLO DE COLETA DE DADO

Data da entrevista: ___/___/___ nº do questionário: _____

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS DA MÃE

Nome:				
Endereço:			Telefone:	
Data de nascimento: ___/___/___	Idade:		Ocupação profissional: (0) remunerado (1) não remunerado	
Nº Gestações:	Nº Partos:	Nº Abortos:	Nº moradores/domicílio:	Renda familiar/mês:
Escolaridade: (0) não alfabetizada (1) apenas alfabetizada Fundamental: (2) incompleto (3) completo Médio: (4) incompleto (5) completo Superior: (6) incompleto (7) completo				
Estado Civil: (0) solteira (1) casada ou união estável (2) separada ou divorciada (3) viúva				
Comorbidades prévias a gestação:				
DM () HAS () DCV () Obesidade () Neoplasia () Dislipidemias () () Outros : _____ Há quanto tempo? _____				

PRÉ-NATAL, PARTO E RECÉM-NASCIDO

Nº consultas pré-natal:	Data do parto: ___/___/___	Idade Gestacional (semanas):		
Intercorrências na gestação: (0) não (1) sim Quais:				
Intercorrências no parto: (0) não (1) sim Quais:				
Parto: (0) normal (1) cesárea (1) fórceps		Idade do RN (dias):	Apgar:	
Circ. cefálica nascimento (cm):	Peso ao nascer do RN (g):	Comprimento ao Nascer (cm):		
Intercorrências ao nascer: (0) não (1) sim Quais:			Peso atual do RN (g):	

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Altura (m):	Peso pré-gestacional (kg):	Peso atual (kg):	CB (cm):	
Ganho de peso gestacional (kg):		Edema atual: (0) não (1) sim	Grau de edema: (0) + (1) ++ (2) +++ (3) ++++	
IMC pré (Kg/m ²):		IMC atual (Kg/m ²):		
Atividade física (gestação): (0) não (1) sim		Modalidade:		
Frequência/semana		Duração por atividade		

USO DE MEDICAMENTOS / SUPLEMENTOS

Uso de medicamentos durante a gestação: (0) não (1) sim Quantos? _____				
Nome: _____	Nome: _____	Nome: _____	Nome: _____	
Dosagem: _____	Dosagem: _____	Dosagem: _____	Dosagem: _____	
Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____	
Uso de suplementos nutricionais na gestação: (0) não (1) sim Quantos? _____				

Nome: _____	Nome: _____	Nome: _____	Nome: _____
Dosagem: _____	Dosagem: _____	Dosagem: _____	Dosagem: _____
Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____	Tempo de uso: _____

DADOS SOBRE DIABETES

Possui diabetes? () Sim () Não
Se sim, qual tipo? Tipo I () Tipo II () Gestacional ()
Medicamentos utilizados:

CONSUMO ALIMENTAR (ÚLTIMO MÊS):

Quantas pessoas utilizam o sal, açúcar e óleo consumidos no mês? _____ pessoas.
Quantos quilos de sal foram utilizados no último mês na sua casa? _____ () Não sabe.
Quantos quilos de açúcar foram utilizados no último mês na sua casa? _____ () Não sabe.

	a) Frutas	b) Verduras	c) Legumes
Com que frequência você comeu:	____ Número de vezes (1)Diário (2)Semanal (3)Mensal (4)Raro (5)Nunca	____ Número de vezes (1)Diário (2)Semanal (3)Mensal (4)Raro (5)Nunca	____ Número de vezes (1)Diário (2)Semanal (3)Mensal (4)Raro (5)Nunca
Disponível por:	____ dias/semana	____ dias/semana	____ dias/semana

Leite Tipo: ()Integral ()Desnatado ()Semi desnatado ()Zero Lactose	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca Quantos copos de leite você toma por dia? _____ mL (copo duplo: 250 mL – copo americano: 150 mL)
Derivados (queijo, iogurte, etc.) Tipo: (1)Integral (2)Desnatado	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Carnes em geral	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Frango	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Peixe	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Embutidos (salsicha, salame, etc.)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Biscoitos salgados e doces	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Biscoitos recheados	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Sorvete (exceto picolé)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Frituras	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Salgados (empada, pastel, etc.)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Salgadinhos tipo “chips”	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Sanduíches (hambúrguer, etc.)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Molhos (maionese, salada, etc.)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Banha de porco	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Óleo vegetal (soja/oliva)	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Suco artificial e/ou refrigerantes	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca
Temperos industrializados	()Número vezes (1)Dia (2)Semana (3)Mês (4)Raro (5)Nunca

1 **Anexo 4 - Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**
2 **(RBSMI) – Qualis B1.**

3 **Alterações dos componentes imunes presentes no**
4 **colostró de mães com diabetes mellitus gestacional**

5 **Ana Carolina de Sena Avellar¹, Mariana Naves de Oliveira^{1,2}, Felipe Caixeta³,**
6 **Gabriela Silveira-Nunes⁴, Rafaela Souza⁵ Elaine Speziali⁶, Andréa Teixeira⁶, Ana**
7 **Maria Caetano de Faria⁷ e Tatiani Uceli Maioli^{1*}.**

8 1- Departamento de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde,
9 Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

10 2- Hospital Sofia Feldman, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

11 3- Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal
12 de Minas Gerais, Brasil.

13 4- Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus governador Valadares, Minas Gerais,
14 Brasil.

15 5- Departamento de Medicina, Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do
16 Adolescente, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

17 6- Instituto de Pesquisa Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Brasil.

18 7- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais,
19 Brasil.

20

21 ***Autor Correspondente:**

22 **Tatiani Uceli Maioli**

23 **Email:** tatianimaioli@gmail.com

24 **Telefone:** 31 34099858/ 31 34092630

25

26

RESUMO

27

28 **Introdução:** O leite materno é considerado um alimento completo para o bebê. Até 7
29 dias pós-parto é conhecido como colostro, rico em compostos imunológicos,
30 responsável por fornecer nutrição e garantir a proteção imune. Entretanto, alguns fatores
31 maternos como a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) pode vir a alterar a
32 concentração de biomarcadores imunológicos presentes no colostro e podem afetar o
33 desenvolvimento do sistema imune dos bebês. **Objetivo:** O presente trabalho avaliou se
34 a ocorrência de DMG modifica a concentração de biomarcadores no colostro. **Métodos:**
35 Estudo transversal, realizado com dois grupos 1) Puérperas que apresentaram gestação
36 de risco habitual; 2) Puérperas que foram diagnosticadas com DMG. Foram coletados
37 dados socioeconômicos, de saúde e antropométricos e coletado colostro para análise da
38 concentração das citocinas/quimiocinas. **Resultados:** Amostra composta de 25
39 mulheres, sendo 56% de risco habitual e 44% DMG. A média e desvio padrão da idade
40 entre elas para o grupo risco habitual e DMG foram respectivamente (24,86±5,26)
41 (30,09±6,25). Os achados sugerem que há mudanças nas concentrações dos compostos,
42 sugerindo que no grupo DMG há um aumento tanto dos biomarcadores inflamatórios
43 quanto anti-inflamatórios. **Conclusão:** Nessa perspectiva, os dados obtidos suportam a
44 idéia de que a doença leva a alterações imunes no colostro, entretanto, o leite materno
45 ainda é considerado como a melhor fonte alimentar.

46 **Palavras-chave:** Gestantes, diabetes mellitus gestacional, colostro, sistema imune e
47 citocinas/quimiocinas.

48

ABSTRACT

49 **Introduction:** Breast milk is considered a complete food for the baby. Up to 7 days
50 postpartum it is known as colostrum, rich in immunological compounds, responsible for
51 providing nutrition and ensuring immune protection. However, some maternal factors
52 such as Gestational Diabetes Mellitus (DMG) can change the concentration of
53 immunological biomarkers present in colostrum and can affect the development of
54 baby's immune systems. **Objective:** The present study evaluated whether the
55 occurrence of DMG changes the concentration of biomarkers in colostrum. **Methods:**
56 Cross-sectional study, carried out with two groups 1) Postpartum women who had usual
57 risk pregnancies; 2) Postpartum women who have been diagnosed with GDM.
58 Socioeconomic, health and anthropometric data were collected and colostrum was

59 collected for analysis of cytokine / chemokine concentration. **Results:** Sample
60 composed of 25 women, 56% of whom were at normal risk and 44% DMG. The mean
61 and standard deviation of age between them for the usual risk and GDM group were
62 respectively (24.86 ± 5.26) (30.09 ± 6.25). The findings suggest that there are changes
63 in the concentrations of the compounds, suggesting that in the DMG group there is an
64 increase in both inflammatory and anti-inflammatory biomarkers. **Conclusion:** In this
65 perspective, the data obtained support the idea that the disease leads to immune changes
66 in colostrum, however, breast milk is still considered as the best food source.

67 **Keywords:** Pregnant women, gestational diabetes mellitus, colostrum, immune system
68 and cytokines / chemokines.

69 INTRODUÇÃO

70 Segundo Organização Mundial de Saúde (OMS) o leite materno (LM) é considerado
71 uma forma inigualável de fornecer nutrição ideal para o crescimento e desenvolvimento
72 saudáveis dos bebês¹. Esse fluído não é visto somente como fonte nutricional, mas
73 também como forma de adaptação do lactente ao ambiente extra-uterino, por esse
74 motivo, sabe-se que a amamentação tem efeitos positivos a curto e longo prazo na saúde
75 infantil².

76 Além de nutrir, o leite materno confere imunidade ao recém-nascido por ser uma
77 rica fonte de imunoglobulinas, lactoferrina, lisozimas, citocinas e vários outros fatores
78 imunes³. A presença de citocinas e imunoglobulinas fornecem proteção passiva e
79 contribui para a imunidade da criança no início da vida. Em particular, as citocinas IL-1,
80 IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN- γ) e TNF- α que tem relação direta com o
81 desenvolvimento dos órgãos imunes secundários⁴.

82 Durante a gravidez de risco habitual, a produção de citocinas da gestante é realizada
83 principalmente por linfócitos Th2 e pelas células reguladoras, onde ocorre menor
84 liberação de IFN- γ e IL-2 e mais de IL-4, IL-10 e TGF- β , particularmente no primeiro e
85 segundo trimestres da gestação mediadas por uma complexa interação hormonal⁵.
86 Entretanto, alguns fatores maternos podem vir a alterar a composição dos
87 biomarcadores imunológicos do colostro como a Diabetes Mellitus Gestacional (DMG),
88 caracterizada por uma intolerância aos carboidratos, com início a partir da 20^a semana
89 de gestação. A prevalência da doença está crescendo devido ao aumento das taxas de

90 gravidez em idade avançada e ao aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo
91 materno⁶. A DMG está associada ao nascimento de crianças grandes para a idade
92 gestacional e com problemas metabólicos além de retardo na lactogênese. Suspeita-se
93 ainda que haja alteração na composição nutricional e dos biomarcadores do colostro e
94 do leite maduro⁷.

95 Sendo assim, torna-se necessário avaliar se ocorrem alterações nas concentrações
96 das biomoléculas presentes no leite materno em decorrência da DMG. Portanto, o
97 presente trabalho tem por objetivo investigar qual o impacto da DMG na concentração
98 de citocinas no colostro materno, visto que as citocinas são fundamentais no
99 crescimento e desenvolvimento adequados do sistema imune dos recém-nascidos (RN)
100 e que na literatura encontram-se poucos trabalhos que estudam as diferenças dos
101 compostos bioativos do colostro de mulheres com DMG e mulheres saudáveis.

102 **MÉTODOS**

103 O estudo possui caráter transversal e foi desenvolvido a partir da coleta de dados
104 realizada na Maternidade pública do Hospital Risoleta Tolentino Neves situado em Belo
105 Horizonte, Minas Gerais. O projeto encontra-se aprovado pelo comitê de ética do
106 Hospital Risoleta Tolentino Neves.

107 O presente trabalho foi apresentado inicialmente às mulheres e a participação das
108 mesmas aconteceu de forma voluntária, podendo se retirar do projeto em qualquer
109 momento. As participantes receberam e assinaram em duas vias um termo de
110 consentimento livre e esclarecido.

111 A amostra foi composta por 25 mulheres subdividida em dois grupos 1) Puérperas
112 que apresentaram gestação de risco habitual e eutróficas (n=14); 2) Puérperas que foram
113 diagnosticadas com diabetes melittus gestacional (DMG) durante a gravidez (n=11) de
114 acordo com as informações registradas em prontuário. Além da coleta do colostro foi
115 realizado com as puérperas o preenchimento de um questionário estruturado que
116 contemplava os dados sociodemográficos, antropométricos no estado pré e pós-
117 gestacional e a presença da DMG durante a gestação.

118 As variáveis avaliadas no estudo foram: estado nutricional pré-gestacional e pós-
119 parto, através do peso, altura e cálculo do IMC, ganho de peso durante a gestação e
120 concentração de citocinas/quimiocinas do colostro. Os critérios de exclusão da amostra

121 foram puérperas menores de 18 anos, mulheres que apresentaram doenças infecciosas
122 durante a gestação ou outros tipos de diabetes, uso de antibióticos na gestação, idade
123 gestacional no parto inferior a 36 semanas, gestações gemelares e também aquelas que
124 apresentaram ausência de pelo menos 2mL de colostro.

125 Após o preenchimento do questionário extraiu-se o colostro de uma das mamas das
126 mulheres e as amostras obtidas possuíam volume mínimo de 2mL que foram
127 alíquotadas em tubos cônicos do tipo Falcon de 15ml e identificadas com o número da
128 participante de acordo com número do questionário, data da coleta e em seguida
129 armazenadas sob refrigeração em caixa térmica.

130 ***Etapa 1: Centrifugação e armazenamento do sobrenadante***

131 Logo após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório de Imunobiologia
132 da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), local onde foram processadas. A
133 etapa inicial do processamento foi à centrifugação em velocidade de 500g por 10
134 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após o procedimento, as amostras
135 apresentavam claramente a divisão em três fases, o conteúdo creme na parte superior foi
136 desprezado, o sobrenadante retirado, alíquotado em tudo cônico de 1,5mL e armazenado
137 em freezer -80°C para realização das próximas etapas de análises e na terceira fase
138 restou o conteúdo celular que foi realizado a quantificação do número de total de células
139 para estudos posteriores.

140 ***Etapa 2: Medida da concentração de citocinas e quimiocinas - Luminex***

141 A tecnologia de imunoensaio Luminex permite a quantificação simultânea de até
142 100 proteínas presentes no soro, plasma, sobrenadante de cultura de tecidos, lisado
143 celular ou leite materno, como no caso deste estudo. Utilizou-se *okit* da Bio-
144 RadLaboratories (Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard) para a detecção e
145 quantificação de citocinas e quimiocinas no colostro. Posteriormente foi realizada a
146 leitura de fluorescência no equipamento Luminex (BioPlex 200, Bio-Rad).

147 Foram descongeladas 25 amostras de colostro em banho-maria a 37°C e depois
148 homogeneizadas em vórtex por 5 segundos. Devido à presença de debris na amostra
149 após o descongelamento, foi necessária filtragem para evitar que partículas
150 influenciassem na detecção e quantificação de citocinas no fluido. Depois, as amostras
151 foram novamente homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e centrifugadas a

152 14.000xg, por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 50µL das
153 amostras na placa para ensaio Luminex contendo 50µL do *pool* de esferas, lavadas duas
154 vezes com 100µL de tampão de lavagem e incubadas *overnight* a 4°C sob agitação. No
155 dia seguinte, foram adicionados 25µL do anticorpo de detecção em cada poço e as
156 amostras foram incubadas por 30 minutos sob agitação, em temperatura ambiente e ao
157 abrigo da luz. As amostras foram lavadas com 100µL de tampão de lavagem. Em
158 seguida, foram adicionados 50µL do conjugado (Estreptavidina) em cada poço e as
159 amostras foram novamente incubadas por 30 minutos sob agitação em temperatura
160 ambiente e ao abrigo da luz. Foram novamente lavadas com 100µL de tampão de
161 lavagem, ressuspensas com 125µL de tampão do ensaio e homogeneizadas por 10
162 minutos. Por fim, as amostras foram adquiridas no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-
163 Rad) utilizando-se o software LuminexXPONENT versão 3.1.

164 Na sequência, os dados foram analisados usando o software Bioplex™ (Bio-Rad).
165 O painel de citocinas e quimiocinas detectadas pelo kit consistiu de: eotaxin, IL-1ra, IL-
166 1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10,
167 MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α, IFN-γ. As concentrações das citocinas e
168 quimiocinas foram calculadas de acordo com a curva padrão para cada uma
169 individualmente. Aquelas amostras que tiveram leitura abaixo no nível de detecção o
170 valor 0 foi usado na análise.

171 **Análise estatística**

172 Os dados do questionário aplicado foram tabulados com ajuda do programa Excel
173 2007 e após foram realizadas análises descritivas uni e multivariadas com auxílio do
174 programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 onde foi
175 realizado o teste Kolmogorov-Smirnov com objetivo de avaliar a normalidade ou não
176 das variáveis, tendência central (médias e medianas) e de dispersão (desvio-padrão,
177 valores mínimo e máximo).

178 Consequentemente foram aplicados os testes de correlação de Qui-quadrado para
179 estimativa de associação entre duas variáveis qualitativas, Test T de Student para
180 comparar duas médias independentes e Mann Whitney para comparar duas medianas
181 independentes. Em seguida foi aplicada a correção de Bonferroni, com objetivo de
182 identificar a significância estatística em algumas variáveis. Foram classificados como

183 resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentassem $p < 0,05$ para todos
184 os testes realizados.

185 **Gráficos em radar**

186 Os gráficos em radar foram realizados para identificar a frequência de amostras
187 consideradas baixas ($<$ mediana global) e altas (\geq mediana global) dos níveis de
188 citocinas e quimiocinas. Utilizou-se a mediana global de cada componente como ponto
189 de corte. Através dessa análise destaca-se o equilíbrio global das citocinas e
190 quimiocinas. Cada eixo dos gráficos representa a porcentagem (%) de voluntárias que
191 possuem alta frequência de citocinas e quimiocinas no colostro. Os valores de cada eixo
192 podem ser conectados para formar uma área poligonal central que representa o
193 equilíbrio global pró-inflamatório versus anti-inflamatório, com um círculo central
194 representando 50% da frequência. O aumento ou diminuição da área poligonal central
195 reflete uma contribuição maior ou menor do perfil pró-inflamatório versus anti-
196 inflamatório⁸.

197

198 **RESULTADOS**

199 A amostra foi composta por 25 mulheres que preencheram todos os critérios de
200 inclusão. Essas participantes foram divididas em dois grupos sendo um grupo de
201 mulheres que apresentou risco habitual (56%) e um grupo que apresentou diabetes
202 gestacional (44%). A idade foi uma variável não categorizada e a menor delas foi uma
203 participante de 18 anos, a média e desvio padrão dessa variável foi calculada para o
204 grupo risco habitual e DMG respectivamente ($24,86 \pm 5,26$) e ($30,09 \pm 6,25$), conforme
205 descrito na Tabela 1.

206 A renda *per capita* foi calculada com base no salário-mínimo real do Brasil
207 referente ao ano de 2019 e categorizada em menor que 1 salário e maior ou igual a 1
208 salário. Da amostra analisada, 6 mulheres não souberam quantificar a renda mensal
209 familiar e por esse motivo não foi possível calcular a renda *per capita*. Dentre as que
210 relataram a renda mensal, foi possível verificar que 68,4% delas possuíam renda inferior
211 a 1 salário e a maioria delas (64,3%) pertencia ao grupo de risco habitual.

212 Na mesma Tabela 1 também é descrito a escolaridade das participantes que foi
213 categorizada em ensino fundamental (incompleto ou completo), ensino médio
214 (incompleto ou completo) e ensino superior (incompleto ou completo). Nenhuma dessas
215 mulheres se declarou analfabeta, 12% declararam ter iniciado o ensino o fundamental,

216 56% o ensino médio e 24% o ensino superior. Já a variável estado civil foi categorizada
 217 em casada/união estável e solteira/divorciada, nenhuma das participantes declarou ser
 218 viúva e 60% delas declaram ser solteira/divorciada, enquanto 40% declarou
 219 casada/união estável.

220 Em relação ao estado nutricional pré-gestacional todas as participantes do grupo
 221 risco habitual apresentavam IMC de eutrofia enquanto 54,5% das mulheres com DMG
 222 apresentavam obesidade, 36,4% sobrepeso e apenas 9,1% eutrofia. Dentre as
 223 participantes, 36% apresentaram ganho de peso inadequado, 40% adequado e 24%
 224 excessivo durante a gestação. Nessas variáveis foi necessário realizar a correção de
 225 Bonferroni, pois as mesmas apresentaram mais de duas categorias o que torna
 226 necessário aplicar a correção para verificar a significância estatística.

227 O número de consultas pré-natal realizadas foi categorizado em menor que 6
 228 consultas e maior ou igual a 6 consultas, essa classificação se deu devido ao fato de que
 229 o Ministério da Saúde recomenda a gestante realizar no mínimo 6 consultas durante o
 230 período gestacional. Da amostra avaliada 100% das mulheres que apresentaram DMG, e
 231 57,1% das mulheres de risco habitual realizaram 6 ou mais consultas durante o pré-
 232 natal.

233 Quanto à idade gestacional no momento do parto, pode-se perceber que as
 234 mulheres que apresentaram DMG tiveram uma mediana menor que as de risco habitual,
 235 associada a uma menor idade gestacional relatada que foi de 36 semanas, sendo a idade
 236 máxima de ambos os grupos iguais, conforme descrito também na Tabela 1.

237

238 **Tabela 1** – Características clínicas e sociodemográficas da população (n=25).

Variáveis	Total (n=25)	Risco habitual (n=14)	DMG (n=11)	Valor p ^a
Idade materna	25 (100%)	(30,09±6,25)*	(24,86±5,26)*	0,03 ^b
Renda per capita				0,32
Menor que 1 salário	13 (68,4%)	9 (64,3%)	4 (36,4%)	
Maior ou igual a 1 salário	6 (31,6%)	2 (14,3%)	4 (36,4%)	0,61
Escolaridade				
Fundamental	5 (12,0%)	2 (14,3%)	3 (27,2%)	
Ensino médio	14 (56,0%)	9 (64,3%)	5 (45,6%)	
Superior	6 (24,0%)	3 (21,4%)	3 (27,2%)	
Estado civil				0,19
Casada/União estável	10 (40,0%)	4 (28,6%)	6 (54,5%)	
Solteira/Divorciada	15 (60,0%)	10 (71,4%)	5 (45,5%)	

Atividade física durante a gestação				0,49
Não	14 (56,0%)	7 (50,0%)	7 (63,6%)	
Sim	11 (44,0%)	7 (50,0%)	4 (36,4%)	
Uso de medicamento durante a gestação				0,82
Não	12 (48,0%)	7 (50,0%)	5 (45,5%)	
Sim	13 (52,0%)	7 (50,0%)	6 (54,5%)	
Suplementação durante a gestação				0,82
Não	12 (48,0%)	7 (50,0%)	5 (45,5%)	
Sim	13 (52,0%)	7 (50,0%)	6 (54,5%)	
Estado nutricional pré-gestacional				<0,001
Eutrofia	15 (60,0%)	14 (100%) ^{a, b}	1 (9,1%) ^{a, b}	
Sobrepeso	4 (16,0%)	0 ^a	4 (36,4%) ^a	
Obesidade	6 (24,0%)	0 ^b	6 (54,5%) ^b	
Ganho de peso gestacional				0,05
Insuficiente	9 (36,0%)	7 (50,0%) ^a	2 (18,1%) ^a	
Adequado	10 (40,0%)	6 (42,9%)	4 (36,4%)	
Excessivo	6 (24,0%)	1 (7,1%) ^a	5 (45,5%) ^a	
Estado nutricional pós-gestacional				0,032
Baixo peso	1 (4,0%)	1 (7,4%)	0 (0%)	
Eutrofia	9 (36%)	9 (64,2%)	0 (0%)	
Sobrepeso	6 (24%)	2 (14,2%)	4 (36,3%)	
Obesidade	9 (36%)	2 (14,2%)	7 (63,7%)	
Número de consultas pré-natal				0,01
< 6 consultas	6 (24,0%)	6 (42,9%)	0 (0%)	
≥ 6 consultas	19 (76,0%)	8 (57,1%)	11 (100%)	
Tipo de parto				0,227
Normal	19 (76%)	11 (78,5%)	8 (72,7%)	
Cesárea	6 (24%)	3 (21,5%)	3 (27,3%)	
Idade gestacional no parto	25 (100%)	40 (37,41)**	39 (36,41)**	0,47 ⁿ
Peso de nascimento do RN	23 (92,0%)	(3233,18±394,40)*	(3132,50±388,40)*	0,54 ^o

239

240

241

242

^aTeste qui-quadrado, *Média e desvio padrão; **Mediana, mínimo e máximo; ⁿTeste Mann Whitney; ^oT-student simples. Frequências seguidas de letras iguais entre as categorias representam associações estatisticamente significativas pelo teste Bonferroni (p<0,05).

243

Concentração de citocinas/quimiocinas presentes no colostro

244

245

246

Os valores das concentrações de citocinas e quimiocinas encontradas no colostro materno estão descritos na Tabela 2, onde observa-se uma coluna com os números de amostras detectáveis, ou seja, que ficaram dentro da curva padrão.

247

248

249

No presente trabalho foram avaliadas 22 citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias e Th2 (alocadas juntamente com as anti-inflamatórias) e inflamatórias, principalmente as Th1. Na tabela 2, observa-se que a IL-10 e a IL-1ra, biomarcadores anti-inflamatórios,

250 apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Nota-se que a IL-10 foi
 251 detectada em 9 amostras de ambos os grupos e que apresentou uma maior mediana e
 252 maior valor no máximo no grupo DMG. Enquanto a IL-1ra foi detectada em 19
 253 amostras e apresentou uma mediana e um valor máximo maior no grupo das mulheres
 254 de risco habitual.

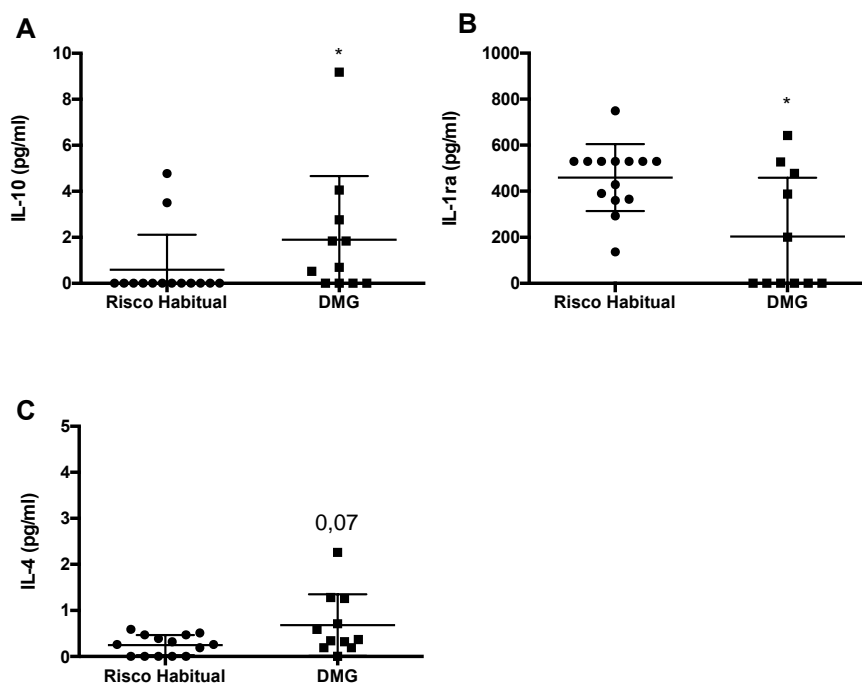
255 Enquanto isso, dentre as citocinas inflamatórias, o IFN- γ , a IL-6, IL-12 e IL-15
 256 apresentaram diferenças estatística entre os grupos. O IFN- γ foi detectado em 24
 257 amostras sendo que apresentou maior mediana, e valor máximo no grupo DMG,
 258 semelhante ao que aconteceu com a IL-6, que foi detectada em 20 amostras de ambos os
 259 grupos. Já a IL-12 não foi detectada em nenhuma amostra do grupo de risco habitual, e
 260 foi detectada em apenas 3 amostras do grupo DMG. Desta forma, não foi possível
 261 realizar uma comparação entre os dois grupos. Em se tratando da IL-15, a mesma foi
 262 detectada em 18 amostras de ambos os grupos, apresentando um maior valor máximo e
 263 de mediana no grupo DMG.

264 **Tabela 2** – Faixa de valores das citocinas e quimiocinas estratificada por grupo.

Citocinas	RISCO HABITUAL				DMG				Valor p ^a
	Nº de amostras detectáveis	Mediana (pg/mL)	Min (pg/mL)	Máx (pg/mL)	Nº de amostras detectáveis	Mediana (pg/mL)	Min (pg/mL)	Máx (pg/mL)	
Antiinflamatórias									
EOTAX	14	3,6	0,4	149,8	11	9,4	0,6	109,1	0,29
IL-2	14	1,4	0,9	8,9	7	3,2	2,6	15,2	0,85
IL-4	9	0,2	0,2	0,5	10	0,3	0,1	2,2	0,07
IL-5	14	(18,79±6,57)*			11	(17,96±9,60)*			0,80 ^b
IL-7	7	14,6	29,2	50,2	7	2,8	2,2	41,7	0,55
IL-9	5	0	2144,6	2919,0	7	9,5	8,6	2558,3	0,60
IL-10	2	0	3,5	4,8	7	0,7	0,7	9,1	0,03
IL-13	1	0	0,1	0,1	4	0	0,1	0,6	0,06
IL-1 ra	14	529,7	135,9	749,1	5	0	200,5	641,9	0,01
Inflamatórias									
IP-10	7	29,1	58,2	3486,8	7	312,9	238,4	32992,8	0,30
MCP-1	6	0	3,8	2609,7	5	0	11,6	775,7	0,90
MIP-1a	14	75,0	2,1	1504,4	11	43,4	1,7	3997,7	0,91
MIP-1b	13	118,9	14,9	306,7	11	225,8	13,7	2002,5	0,06
RANTES	12	8,4	2,1	249,5	9	30,6	6,4	173,2	0,35
TNF-a	11	(25,17±20,95)*			10	(32,67±28,80)*			0,46 ^b
IFN- γ	14	6,4	0,1	10,4	10	11,0	1,9	82,2	0,04
IL-1 β	14	1,6	0	87,5	11	0,6	0,6	19,8	0,70
IL-6	9	1,8	0,7	6,7	11	11,6	1,6	64,8	0,01
IL-8	6	0	5,5	7191,8	5	0	10,9	1507,8	0,99
IL-12	0				3	0	0,4	0,7	0,04

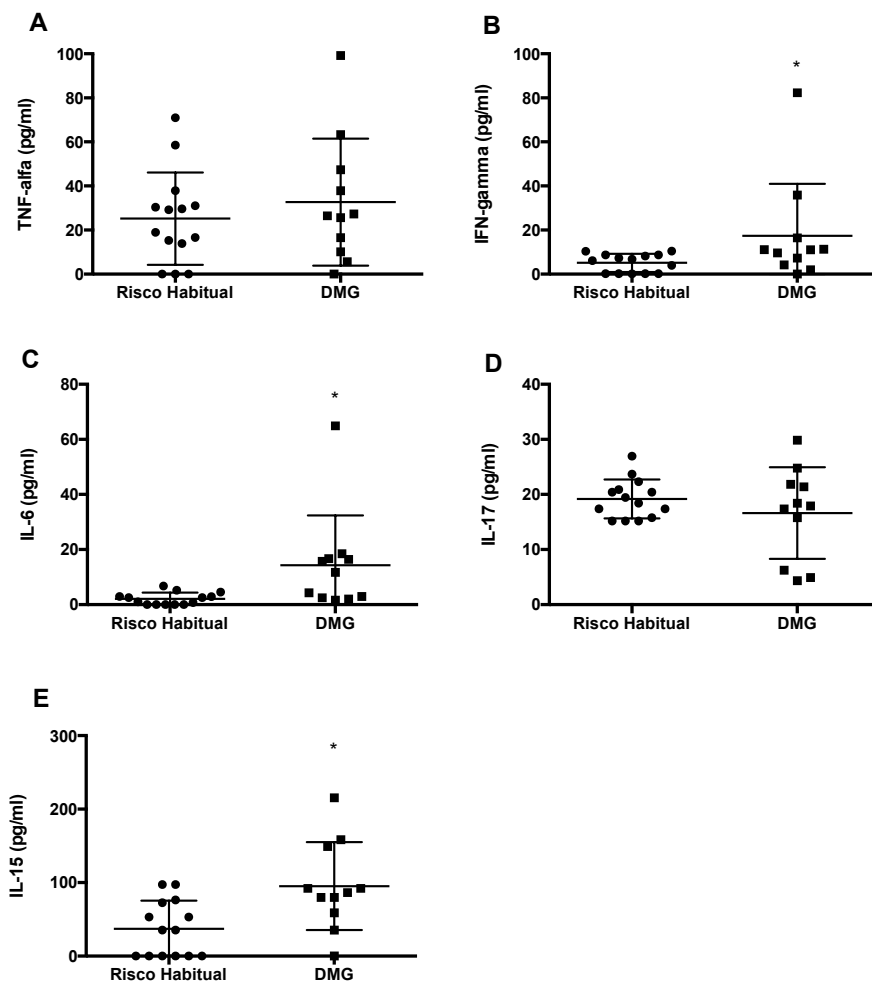
IL-15	8	35,4	35,4	97,4	10	86,3	35,4	215,4	0,01
IL-17	14	18,9	15,2	26,9	11	17,9	4,3	29,8	0,70

265 ^aMann-Whitney; ^oT-student simples, *média e desvio-padrão.



266

267 **Figura 1:** Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias e Th2 no colostro. As concentrações de IL-10
 268 (A), IL-1ra (B), e IL-4 (C) no colostro foram medidas por Luminex. Os círculos representam as mulheres
 269 classificadas com risco gestacional habitual. Os quadrados representam as mulheres com DMG. Um total
 270 de 25 amostras foram incluídas nas análises. Cada figura geométrica representa uma participante.
 271 * $p < 0,05$.

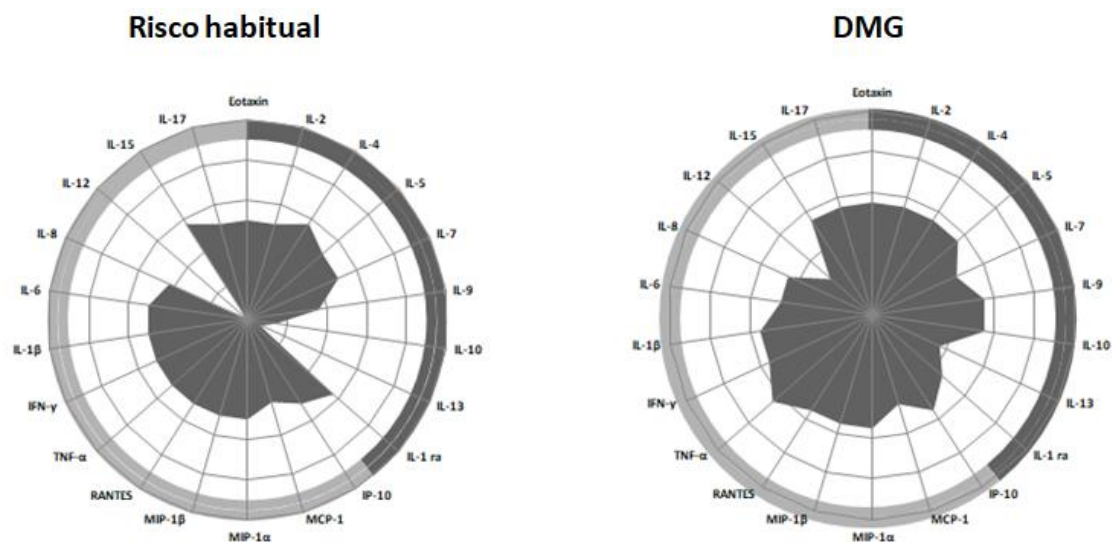


272

273 **Figura 2:** Comparação dos níveis de citocinas inflamatórias no colostro. As concentrações de TNF-a (A),
 274 IFN-gamma (B), IL-6 (C), IL-17 (D) IL-15 (E) no colostro foram medidas por Luminex. Os círculos
 275 representam as mulheres classificadas com risco gestacional habitual. Os quadrados representam as
 276 mulheres com DMG. Um total de 25 amostras foram incluídas nas análises. Cada figura geométrica
 277 representa uma participante. * $p < 0,05$.

278 Para melhor critério de comparação das concentrações de citocinas que
 279 apresentaram diferença significativa entre os grupos e análise daquelas que são
 280 importantes marcadores de DMG, alguns gráficos foram criados. Na Figura 1, pode-se
 281 observar que as mulheres classificadas com DMG apresentaram maior concentração de
 282 IL-10 (Figura 1A) e IL-15 (Figura 1C) no colostro. Com relação a IL-4, observa-se uma
 283 média de produção um pouco maior no colostro de mulheres com DMG (Figura 1D).
 284 Apesar de não ter diferença estatisticamente significativa. Já o IL-1ra, apresenta-se
 285 reduzido no colostro de mulheres com DMG (Figura 1B). Na Figura 2 é válido destacar
 286 que tanto o IFN-g (Figura 2B), quanto a IL-6 (Figura 2C), estão aumentadas no colostro
 287 de mulheres com DMG.

288



289 **Figura 3:** Perfil global de citocinas/quimiocinas no colostro de puérperas, segundo classificação de risco
 290 durante a gestação. O gráfico em radar mostra à frequência de alta produtoras dos níveis de citocinas
 291 inflamatórias e anti-inflamatórias e Th2, e a contribuição de cada uma nas diferentes categorizações (risco
 292 habitual e DMG).
 293

294 Para identificar de forma global as citocinas e quimiocinas avaliadas no colostro
 295 foram construídos os gráficos de radar. Esses gráficos representam a frequência de
 296 mulheres que apresentaram a concentração de citocinase quimiocinas acima da mediana
 297 global. Os eixos em cinzas escuros representam à alta frequência de citocinas anti-
 298 inflamatórias e Th2, enquanto os eixos em cinza claro representam a frequência de
 299 citocinas inflamatórias. Os valores de cada eixo podem ser unidos para formar a área
 300 poligonal central que representa o equilíbrio geral de citocinas anti-inflamatórias-
 301 Th2/inflamatórias. Aumentar ou diminuir as áreas do polígono central reflete a
 302 contribuição maior ou menor do equilíbrio dessas citocinas. Desta maneira, observa-se
 303 que as mulheres com DMG apresentam maior frequência de produção de citocinas e
 304 quimiocinas inflamatórias e Th2 no colostro.

305 DISCUSSÃO

306 O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a presença da DMG compromete a
 307 concentração de componentes bioativos no colostro e se essas alterações se
 308 correlacionam com o estado nutricional materno. A população do estudo foi composta
 309 por 56% de puérperas que apresentaram gestação de risco habitual e 44% de puérperas
 310 que apresentaram DMG na gestação.

311 O leite materno é considerado o alimento ideal até os 6 meses de vida por ser o
 312 responsável por fornecer nutrição e fatores de defesa para maturação do sistema imune

313 do recém-nascido. Esse fluido contém uma variedade de citocinas e quimiocinas,
314 entretanto, como se dá a sobrevivência dessas citocinas e quimiocinas na passagem pelo
315 estômago do bebê ainda é desconhecida, alguns trabalhos sugerem que elas podem ser
316 sequestradas até atingir o intestino⁹.

317 Diante do exposto, Sifnaois e colaboradores¹⁰ sugerem que a composição imune
318 do leite materno sofra alterações na presença da DMG devido às mudanças no
319 metabolismo da glicose. Doença que é caracterizada por um estado de inflamação
320 sistêmica de baixo grau e desregulação do sistema imune que induz um desequilíbrio
321 entre células Th1 e Th2 favorecendo as respostas inflamatórias.

322 Dentre as citocinas estudadas, a IL-10 é uma importante citocina anti-
323 inflamatória e imunorreguladora que está sendo bastante discutida, uma vez que a
324 mesma ao ser avaliada no colostro tem sido descrita em concentrações extremamente
325 divergentes, desde não detectável até valores bastante elevados, o que dificulta a
326 interpretação do seu papel no leite materno^{11;12}. Acredita-se que a mesma é uma potente
327 citocina que resulta na ativação das células Th2 que foi originalmente marcada como
328 fator inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células T auxiliar (Th1)¹³.

329 No estudo em questão a IL-10 foi detectada em apenas 9 amostras, o que
330 corrobora com os achados de Castellote e seus colaboradores¹⁴ que ao avaliarem a
331 presença dessa citocina no leite observaram que a mesma foi encontrada em
332 concentrações muito baixas e indetectáveis em algumas amostras. Além disso, foi
333 possível observar uma diferença estatisticamente significativa dessa citocina entre os
334 grupos, nota-se também que no grupo que apresentou a DMG há uma maior mediana e
335 maior valor máximo dessa citocina o que significa que o aumento da mesma está
336 relacionado com a inflamação causada pela DMG, uma vez que a IL-10 é conhecida por
337 suprimir a inflamação¹³. No entanto, no presente estudo a concentração de IL-10 foi
338 avaliada no colostro e não no sangue, sendo assim, sugere-se que o aumento da IL-10
339 pode estar relacionado à tentativa do organismo em controlar a ação das citocinas
340 inflamatórias também aumentadas no contexto do DMG.

341 Já a IL-1ra é um membro da família da IL-1 também conhecida como uma
342 citocina anti-inflamatória que age de forma antagonista ao receptor de IL-1 presente na
343 superfície celular (IL-1R), o mesmo receptor que se liga à IL-1, evitando que a mesma
344 envie um sinal para essa célula. Além disso, essa citocina é conhecida por ser um

345 inibidor natural do efeito pró-inflamatório de IL-1 α e IL-1 β e modula uma variedade de
346 respostas imunes e inflamatórias relacionadas a IL-1¹⁵. De acordo com os dados
347 apresentados pelo estudo, observa-se que mulheres com DMG secretaram menor
348 concentração IL-1ra no colostro, isso pode confirmar o perfil mais inflamatório das
349 citocinas presentes no colostro de mães que tiveram DMG.

350 Em seus estudos, Charles e colaboradores¹⁶ descrevem que a IL-1ra não induz
351 diretamente uma resposta anti-inflamatória, mas se liga ao receptor da IL-1 na
352 superfície celular e inibe os efeitos inflamatórios dessa citocina, ou seja, neutraliza os
353 efeitos causados pela IL-1. Acredita-se que a IL-1 está aumentada em pacientes com
354 diabetes mellitus e que a mesma é responsável por promover a destruição das células
355 beta e alterar a sensibilidade à insulina¹⁷.

356 Dentre as citocinas inflamatórias, o IFN- γ é o responsável por ativar monócitos e
357 macrófagos, sendo característica da resposta Th1¹⁸. Os resultados mostram que o IFN- γ
358 aparece com maior mediana, valor mínimo e máximo no grupo DMG em comparação
359 ao grupo de risco habitual, ou seja, parece que o colostro reflete a inflamação causada
360 pela DMG. Esses dados espelham o que ocorre na circulação de mulheres com DMG,
361 onde observa-se aumento dos níveis circulatórios de IFN- γ , que tem relação com a
362 inflamação desencadeada pela doença¹⁰.

363 Sabe-se que algumas citocinas presentes no leite materno como a IL-6 e TNF- α
364 estão associadas à regulação do desenvolvimento e funções da glândula mamária¹¹.
365 Estudos recentes mostraram que as duas são consideradas como fatores pró-
366 inflamatórios e desempenham papéis importantes no desenvolvimento da resistência à
367 insulina e do DMG¹⁹. A IL-6 é uma das principais citocinas do leite humano e é
368 secretada por vários tecidos. Apresenta-se em maior concentração nos indivíduos
369 obesos em comparação com os não obesos, ou seja, ela está relacionada com o aumento
370 do IMC e do percentual de gordura¹⁶. No caso do DMG, a IL-6 tem sido estudada como
371 marcador de diagnóstico por aparecer aumentada no sangue²⁰. Como no sangue
372 periférico, os resultados apresentados demonstram que a IL-6 possui maior mediana e
373 maior valor máximo no colostro de mulheres com DMG se comparada ao grupo de
374 mulheres saudáveis.

375 Outra citocina que apresentou diferença estatisticamente significativa no
376 trabalho foi a IL-15, que também pode ser considerada como uma citocina inflamatória.

377 A concentração de IL-15 no colostro apresentou maior número de amostras detectáveis,
378 maior valor de mediana e valor máximo no grupo que de mulheres com DMG em
379 relação ao grupo de risco habitual. Esses dados podem sugerir que a citocina IL-15
380 também tem relação positiva com a DMG.

381 A análise do perfil global das citocinas e quimiocinas representadas pelos
382 gráficos em radar compara a contribuição de todas as citocinas/quimiocinas
383 simultaneamente, e a representatividade de cada uma delas no perfil global. Essa análise
384 se difere dos outros tipos de gráficos, pois é uma análise visual que permite avaliar uma
385 maior contribuição relativa de cada citocina comparada com as demais, segundo a
386 categorização dos grupos. Após examinar esses gráficos, foi possível observar que no
387 grupo de mulheres com DMG a maioria das citocinas pró-inflamatórias (IP-10, MIP-1 α ,
388 MIP-1 β , RANTES, IFN- γ , IL-1 β e IL-17) e anti-inflamatórias-Th2 (Eotaxin, IL-2, IL-4,
389 IL-5, IL9 e IL-10) estão em alta concentração em mais de 50% das amostras. Em
390 contrapartida, no grupo de risco habitual, nota-se que esses biomarcadores apresentam
391 um perfil mais irregular em que apenas a IL-4 e IL-1ra (Th2 e anti-inflamatórias) e IL-
392 15 (pró-inflamatória) tiveram a concentração alta em mais de 50% das amostras.

393 Entretanto, no grupo DMG o gráfico sugere que há um aumento tanto de
394 biomarcadores anti-inflamatórios quanto inflamatórios. Existem relatos que a DMG
395 aumenta a produção de citocinas apenas inflamatórias no sangue¹⁰. Porém, alguns
396 autores também mostraram o aumento de ambos os grupos de citocinas durante o
397 DMG²¹. Essa dicotomia pode estar relacionada à tentativa do organismo em promover
398 equilíbrio em as diferentes citocinas e quimiocinas de modo a favorecer a homeostase.

399 Os estudos sobre imunologia do colostro, em especial na DMG, ainda
400 encontram-se escassos na literatura. Os trabalhos que realizaram análise de perfil imune
401 em mulheres com DMG, avaliaram em sua maioria o sangue das mulheres, não o leite,
402 como no nosso trabalho. Os dados apresentados corroboram com os dados de Fujimori e
403 colaboradores²² que sustentam a hipótese de que as mudanças no organismo induzidas
404 pela DMG são capazes de alterar a composição imune do colostro, entretanto não há
405 dúvidas quando ao benefício do aleitamento materno para a díade. Adicionalmente, o
406 aleitamento deve ser incentivado mesmo em situações de comorbidades onde não há
407 prejuízo à saúde da criança.

408 A presente pesquisa apresentou como limitação o número de participantes do
409 projeto. Um estudo com maior número de participantes que apresentaram DMG durante
410 a gestação seria necessário para verificar os efeitos da doença no comportamento das
411 citocinas/quimiocinas no colostro. Mas, vale salientar que este estudo tem importância
412 na investigação da influência do DMG na composição imune desse fluido, visto que
413 mediu vários dos biomarcadores que não haviam sido identificados no colostro até o
414 momento, em especial em mães que tiveram DMG.

415 **CONCLUSÃO**

416 Nosso estudo confirma a hipótese de que a presença de DMG acarreta em
417 mudanças nas concentrações de citocinas e quimiocinas no colostro materno, com
418 aumento de ambos os tipos delas. Apesar dessas alterações encontradas, sabe-se que o
419 aleitamento materno ainda é, sem dúvidas, a melhor forma de nutrição e proteção ao
420 bebê. Sendo assim, tornam-se necessários mais estudos dando continuidade à nossa
421 pesquisa com objetivo de avaliar maior número de mulheres, para que se torne possível
422 realizar intervenções nutricionais de forma preventiva a fim de minimizar os índices da
423 doença.

424

425 **REFERÊNCIAS**

- 426 1. Chang YS, Glaria AA, Davies P, Beaker S, Bick D. Breastfeeding
427 experiences and support for women who are overweight or obese: A
428 mixed-methods systematic review. *Matern. Child. Nutr.* 2020;16:128-65.
- 429 2. Munblit D, Treneva M, Peroni DG, Colicino S, Show L, Dissanayake S, et
430 al. Colostrum and mature human milk of women from London, Moscow,
431 and Verona: Determinants of immune composition. *Nutrients.*
432 2016;8(11):695.
- 433 3. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and bioactive
434 factors. *Pediatr Clin. North. Am.* 2013;60(1):49–74.
- 435 4. Nolan LS, Parks OB, Good M. A Review of the Immunomodulating
436 components of maternal breast milk and protection against necrotizing
437 enterocolitis. *Nutrients.* 2020;12(1):14.

- 438 5. Pereira AC, Jesus NR, Lage LV, Levy RA. Immunity in the normal
439 pregnancy and in the patient with systemic lúpus erythematosus (SLE).
440 Rev.Bras. Reumatol. 2005;45(3):134-40.
- 441 6. Farrar D. Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management
442 challenges. Int J Womens Health. 2016;8:519-527.
- 443 7. Peila C, Gazzolo D, Bertino E, Cresi F, Coscia A. Influence of diabetes
444 during pregnancy on human milk composition. Nutrients. 2020;12(1):185.
- 445 8. Nunes GS, Speziali E, Carvalho AT, Avelar DMV, Avelar RS, Soares TC, et
446 al. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune
447 cells from Brazilian individuals. Immunity & Ageing. 2017;14(2).
- 448 9. França EL, Calderon IMP, Vieira EL, Morceli G, Honório-França ACH.
449 Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers. Clin. Dev.
450 Immunol. 2012;2012:9281-87.
- 451 10. Sifnaios E, Mastorakos G, Psarra K, Panagoupolos ND, Panoulis K,
452 Vitoratos K, et al. Gestational diabetes and T-cell (Th1/Th2/Th17/Treg)
453 Immune profile. In Vivo. 2019;33(1):31-40.
- 454 11. Palmeira P, Sampaio MC. Immunology of breast milk. Rev. Assoc. Med.
455 Bras. 2016;62(6):584-593.
- 456 12. Santiago LTC. Perfil de citocinas no colostro em função da idade gestacional
457 e do crescimento fetal [Dissertação de mestrado]. Botucatu: Universidade
458 Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2016.
- 459 13. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA.
460 Interleukin-10 paradox: A potent immuno regulatory cytokine that has been
461 difficult to harness for immunotherapy. Cytokine. 2015;74(1):27-34.
- 462 14. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M,
463 Moretones MG, et al. Premature delivery influences the immunological
464 composition of colostrum and transitional and mature human milk. The
465 Journal of nutrition. 2011;141(6):1181-1187.
- 466 15. Anzaghe M, Resch T, Schaser E, Kronhart S, Diez C, Niles MA, et al.,
467 Organ-specific expression of IL-1 receptor results in severe liver injury in
468 type I interferon receptor deficient mice. Front. Immunol. 2019;10:1-11.

- 469 16. Charles BA, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Chen G, Shriner D. The roles
470 of IL-6, IL-10, and IL-1RA in obesity and insulin resistance in African-
471 Americans. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(12):2018-2022.
- 472 17. Feve B, Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2
473 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology.* 2009;5:305-3011.
- 474 18. Diaz AG, Arribas SM, Algara A, Cabrejas MAM, Pablo ALL, Pipaon MS, et
475 al. A Review of bioactive factors in human breast milk: A focus on
476 prematurity. *Nutrients.* 2019;11(6):1307.
- 477 19. Wei, Chen X, Chen H. Association of single nucleotide polymorphisms of
478 the IL-6, IL-10, and TNF- α genes with susceptibility to gestational diabetes
479 Mellitus. *Genetic testing and molecular biomarkers.* 2020;24(7).
- 480 20. Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting
481 gestational diabetes mellitus. *Obstet. Gynecol. Sci.* 2020;63(4):407-416.
- 482 21. Fagundes DLG, França EL, Fernandes RTS, Hara CCP, Morceli G, França
483 ACH, et al. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal
484 blood, Cord blood and colostrum of diabetic mothers. 2015;998-1004.
- 485 22. Fujimori M, França EL, Fiorin V, Morais TC, França ACH, Abreu LC.
486 Changes in the biochemical and immunological components of serum and
487 colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy and Child
488 birth.* 2015;166(15).

489