

MARCELA PATRICIA MACÊDO BELO FORT

**IMPLICAÇÕES DA DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
COLOSTRO E DO SANGUE MATERNO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Saúde da Universidade Federal de Maranhão,
como requisito para obtenção do título de Doutora em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

Co-orientadora: Profa. Dra. Eremita Val Rafael

São Luís/MA
2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Belo Fort, Marcela Patrícia Macêdo.

IMPLICAÇÕES DA DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS PARAMETROS
IMUNOLOGICOS E BIOQUÍMICOS DO COLOSTRO E DO SANGUE MATERNO
/ Marcela Patrícia Macêdo Belo Fort. - 2020.
107 f.

Coorientador(a): Eremita Val Rafael.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2020.

1. Colostro. 2. Diabetes. 3. IgA. I. Guerra, Rosane
Nassar Meireles. II. Rafael, Eremita Val. III. Título.

MARCELA PATRICIA MACÊDO BELO FORT

**IMPLICAÇÕES DA DIABETES GESTACIONAL SOBRE OS
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO
COLOSTRO E DO SANGUE MATERNO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência da Saúde, da Universidade Federal de Maranhão,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Ciências da Saúde.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

(1º Examinador)

(2º Examinador)

(3º Examinador)

Prof.^a Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Eremita Val Rafael (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão

"Por onde for o teu passo, que lá esteja o teu coração"
Pe Fábio de Melo

Deus, que me deu a força e coragem necessárias para concluir esta etapa.

A minha família, que sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

À minha filha, Maria Luiza, que me acompanha nesta jornada, inspira-me, enche-me de luz e alegria.

AGRADECIMENTOS

Sempre a Deus, por estar sempre comigo ao longo da minha caminhada e nos momentos que mais preciso.

Ao meu melhor amigo e esposo, Marcos César Fort, pelo apoio e compreensão sempre.

À luz da minha vida, Maria Luiza, que mesmo sem saber, acompanha-me em minha jornada científica, enchendo os meus dias de ternura e do mais puro amor, ela me deu a força que eu precisava para dar cada passo até aqui.

A minha irmã, quase gêmea, Mércia, que sempre foi meu ponto de apoio, por toda minha vida e minha referência de força na Terra.

Aos meus pais, Márcia e Nonato, e à irmã mais nova, Marcília que mesmo de longe, deram-me incentivo e apoio emocional para continuar na minha trajetória.

Ao Dr. Jailson de Barros Correia, que fez a pergunta que me trouxe até aqui... “Quem de vocês quer ser um pesquisador, quem de vocês pretende fazer doutorado no futuro?”. Eu, ainda, aluna da iniciação, levantei minha mão com orgulho naquele dia, agora, aqui estou realizando um sonho em minha vida.

À Prof.^a Dra. Maria de Fátima Costa Caminha, enfermeira, pesquisadora, responsável por ter me inspirado na vida acadêmica e na ciência, para mim, uma honra ter sido sua primeira aluna de iniciação científica, guardo eternas saudades e gratidão por tudo.

Aos meus professores e amigos do Laboratório de Imunofisiologia, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA): Cláudia Regina Silva dos Santos Cunha, Monica Virginia Viegas Lima-Aragão, Mayara Cristina Pinto da Silva.

À Profa. Dra. Eremita Val Rafael, pela valiosa contribuição e por ter dividido sua *expertise* comigo na construção deste trabalho.

A minha querida, Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra, minha orientadora, pela confiança, por ter me adotado ao longo desses anos, guiando-me na difícil jornada e ter permitido a continuidade de um projeto de vida agora em São Luís do Maranhão para onde o destino me trouxe e onde eu tive a sorte de conhecê-la. Obrigada pelo grande desafio da minha vida, por ter acreditado que era possível, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa experimental.

À Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e ao Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes, coordenadores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS/UFMA), durante esses anos. E a todos os professores e técnicos do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA), instituição que me acolheu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), agência financiadora deste trabalho.

Às pacientes do Alojamento Conjunto do Hospital Universitário Materno-Infantil (HUMI/UFMA) que participaram desta pesquisa.

Ao banco de leite humano e laboratório de análises clínicas do HUMI/UFMA, pelo apoio técnico e logístico para que este trabalho fosse possível.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado e amadurecimento pessoal, profissional e científico. Muito obrigada!

Os dados deste trabalho foram obtidos no Alojamento Conjunto no Hospital Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão.

As avaliações bioquímicas e imunológicas foram realizadas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Capítulo 1: Repercussão da diabetes gestacional na concentração de IgA total, IgA anti-insulina e citocinas presentes no colostro e no soro das mães.....	31
4.2 Capítulo 2: Aspectos imunológicos do colostro de puérperas com diabetes antes e durante a pandemia da COVID-19: Revisão sistemática.....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES.....	79
Apêndice 1: Capítulo de livro, Editora Atena.....	80
Apêndice 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa Análise imunológica do colostro e do sangue de mães diabéticas.....	95
Apêndice 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa Análise imunológica do colostro e do sangue de mães diabéticas (menores).....	97
Apêndice 4: Instrumento coleta de dados.....	99
ANEXOS.....	102
Anexo A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	103
Anexo B: Carta de aceite do artigo submetido a Atena editora.....	108
Anexo C: Comprovante de submissão do artigo a Revista Jornal de Pediatria	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
BALT	Tecido Linfoide Associado à Mucosa do Sistema Respiratório
COVID-19	Doença Causada Pelo Coronavirus em 2019
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
GALT	Tecido Linfoide Associado ao Sistema Gastrointestinal
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
OMS	Organização Mundial da Saúde
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavirus 2
SigA	Imunoglobulina A Secretora
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		Pág.
Tabela 1	Distribuição e frequência das características sociodemográficas de mães com diabetes gestacional e normoglicêmicas.....	37
Tabela 2	Distribuição de frequência das características obstétricas e dos recém-nascidos.....	38
Tabela 3	Avaliação do soro e do colostro de mães diabéticas que usaram insulina, ou não.....	39
Tabela 4	Avaliação dos parâmetros bioquímicos no colostro e no sangue de mulheres com diabetes gestacional em comparação às não diabéticas.....	40
Tabela 5	Correlação entre a concentração de IgA anti-insulina, citocinas e parâmetros bioquímicos de mães com diabetes gestacional (n=36) e dos recém-nascidos.....	43
Capítulo 2		
Tabela 1	Resultados da busca nas bases de dados para análises dos registros encontrados em artigos.....	59
Tabela 2	Características gerais dos artigos incluídos sobre concentração de IgA e citocinas no colostro/leite de mulheres que tiveram diabetes na gravidez.....	61
Tabela 3	Concentração média e desvio padrão de IgA e citocinas do colostro/leite de mães normoglicêmicas e diabéticas, conforme resultados descritos nos estudos.....	63

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico		Pág.
Figura 1	Transporte de IgA através das células epiteliais e aquisição da peça secretória que confere proteção a ação de enzimas proteolíticas presentes na saliva e no trato digestório dos bebês.....	21
Capítulo 1		
Figura 1	Concentração de IgA no colostro e no soro de mães diabéticas e não diabéticas.....	41
Figura 2	Concentração de IgA anti-insulina no colostro e no soro de mães diabéticas e não diabéticas.....	41
Figura 3	Concentração de citocinas no colostro e no soro de mães diabéticas e não diabéticas.....	42
Capítulo 2		
Figura 1	Fluxo do processo de seleção dos estudos para revisão sistemática, conforme recomendação PRISMA.....	60

RESUMO

O leite materno proporciona além de nutrientes, proteção contra infecções respiratórias, diarreia, alergias e doenças carenciais. Apesar de todo conhecimento sobre o tema, pouco se sabe sobre a sua composição imunológica e bioquímica especificamente em mães diabéticas. O objetivo do estudo foi avaliar a composição do colostro e do sangue de mães diabéticas, e, em decorrência da pandemia causada pelo vírus SARS-Cov-2, realizamos uma revisão sistemática para estudar os aspectos imunológicos do colostro de puérperas durante a pandemia da COVID-19. Para o primeiro objetivo, avaliamos no colostro e no sangue de 36 mães com diabetes gestacional e 36 mães não diabéticas, internadas no Alojamento conjunto do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, unidade Materno Infantil os seguintes parâmetros: concentração de anticorpos IgA total e IgA anti-insulina, por ensaio imunoenzimático (ELISA); concentração das citocinas IL-10, TNF- α , INF- γ , TGF- β pela técnica de microesferas (*Cytometric Bead Array* – CBA) e a concentração de cálcio, glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais por ensaio colorimétrico. Para comparação das concentrações médias entre os dois grupos foi utilizado o teste t Student. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi usado para explorar as correlações entre as concentrações de anticorpos e citocinas e variáveis independentes. Para todos os testes, adotou-se o nível de significância estatística valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi feita a partir do programa *GraphPad Prism 7.0*. Encontramos que a concentração do anticorpo IgA anti-insulina foi sempre maior no sangue e no colostro das mães diabéticas, quando comparadas as não diabéticas ($p < 0,001$). Observou-se, também, que o uso de insulina exógena ao longo do tratamento da diabetes não interferiu em nenhum dos parâmetros entre as mães com diabetes gestacional. A avaliação das concentrações de citocinas das mães diabéticas mostraram significativo aumento de TGF- β no soro ($p = 0,03$) e de TNF- α no colostro ($p = 0,007$) comparadas as normoglicêmicas, na avaliação bioquímica, a concentração de glicose sérica foi significativamente maior nas mães com diabetes mellitus gestacional ($p = 0,03$). Quanto ao segundo objetivo, realizou-se revisão sistemática a partir da seguinte pergunta condutora: a hiperglicemia materna associada ou não à COVID-19 influencia a composição imunológica do colostro? Foram utilizadas as seguintes bases de dados: MEDLINE/PUBMED, LILACS, SCOPUS e *Google Scholar*. Encontraram-se sete estudos, sendo seis do tipo transversal e um relato de caso. Os estudos encontrados apontaram que há menor concentração de anticorpo IgA tanto no colostro, quanto no soro de mães diabéticas, e as evidências apontam para a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no leite materno em mulheres que apresentaram a infecção pelo vírus durante a gestação. Concluimos que a diabetes gestacional pode influenciar a concentração de anticorpos anti-insulina e citocinas no colostro e no soro materno, e as evidências, após revisão sistemática sobre o tema, apontam para a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no leite materno em mulheres que apresentaram a infecção pelo vírus durante a gestação.

Palavras-chave: Diabetes; Colostro; Leite humano; IgA; Citocinas; Anti-insulina; COVID-19.

ABSTRACT

In addition to nutrients, breast milk provides protection against respiratory infections, diarrhea, allergies and deficiency diseases. Despite all the knowledge on the subject, little is known about its immunological and biochemical composition specifically in diabetic mothers. The aim of the study was to evaluate the composition of colostrum and blood of diabetic mothers, and, due to the pandemic caused by the SARS-Cov-2 virus, we carried out a systematic review to study the immunological aspects of the colostrum of puerperal women during the COVID-19 pandemic. For the first objective, we evaluated in the colostrum and blood of 36 mothers with gestational diabetes and 36 non-diabetic mothers, hospitalized in the Joint Accommodation of the University Hospital of the Federal University of Maranhão - UFMA, Maternal and Child Unit, the following parameters: concentration of total IgA antibodies and anti-insulin IgA, by immunoenzymatic assay (ELISA); concentration of cytokines IL-10, TNF- α , INF- γ , TGF- β by the microsphere technique (Cytometric Bead Array - CBA) and the concentration of calcium, glucose, total cholesterol, triglycerides, total proteins by colorimetric assay. Student t test was used to compare average concentrations between the two groups. Pearson's correlation coefficient was used to explore the correlations between the concentrations of antibodies and cytokines and independent variables. For all tests, a level of statistical significance of $p < 0,05$ was adopted. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0 program. We found that the concentration of IgA anti-insulin antibody was always higher in the blood and colostrum of diabetic mothers, when compared to non-diabetic mothers ($p < 0.001$). It was also observed that the use of exogenous insulin during the treatment of diabetes did not interfere in any of the parameters among mothers with gestational diabetes. The evaluation of the cytokine concentrations of diabetic mothers showed a significant increase in TGF- β in serum ($p = 0.030$) and TNF- α in colostrum ($p = 0.007$) compared to normoglycemic ones, in the biochemical evaluation, the serum glucose concentration was significantly higher in mothers with gestational diabetes mellitus ($p = 0.03$). As for the second objective, a systematic review was carried out based on the following guiding question: does maternal hyperglycemia associated or not with COVID-19 influence the immunological composition of colostrum? The following databases were used: MEDLINE / PUBMED, LILACS, SCOPUS and Google Scholar. Seven studies were found, six of which were cross-sectional and one case report. The studies found pointed out that there is a lower concentration of anti-IgA antibodies both in colostrum and in the serum of diabetic mothers, and the evidence points to the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in breast milk in women who had been infected by the virus during pregnancy. We conclude that gestational diabetes can influence the concentration of anti-insulin antibodies and cytokines in colostrum and maternal serum, and the evidence, after a systematic review on the subject, points to the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in breast milk in women who had the virus infection during pregnancy.

Keywords: Diabetes; Colostrum; Human milk; IgA; Cytokines; Anti-insulin, COVID-19.