DOUGLAS BERNAL TIAGO

**Fatores clínicos, laboratoriais e expressão
placentária de transportadores de glicose no
diabetes melito gestacional: associação com a
ocorrência de recém-nascido grande para idade
gestacional**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira
Francisco

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tiago, Douglas Bernal

Fatores clínicos, laboratoriais e expressão placentária de transportadores de glicose no diabetes melito gestacional : associação com a ocorrência de recém-nascido grande para idade gestacional / Douglas Bernal Tiago. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Rossana Pulcineli Vieira Francisco.

Descritores: 1.Diabetes gestacional/diagnóstico 2.Peso fetal/fisiologia
3.Macrossomia fetal/metabolismo 4.Recém-nascido/crescimento &
desenvolvimento 5.Fatores de risco 6.Proteínas de transporte de sódio-glucose
7.Estudos de casos e controles 8.Índice de massa corporal

USP/FM/DBD-159/13

Dedico essa tese a:

Aos meus filhos, Bruno e Pedro, provas vivas da materialidade do milagre da existência de Deus, responsáveis pela energia do não desistir nunca e do meu crescimento como ser humano. Aos meus amores a gratidão por esse contínuo aprendizado pela vida.

A minha esposa Márcia, a essência da minha existência, ser humano de grande força e ao mesmo tempo de uma docilidade imensurável. Parceira de todas as horas, mãe exemplar, profissional competente e fiel escudeira dos bons e maus momentos. Obrigado por tudo.

Ao meu querido pai, meu exemplo, que saudades sua ausência provoca e minha querida mãe Anita sempre presente e acolhedora.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib** pela cordialidade e acolhida nesses anos, ícone da obstetrícia moderna, líder inato e dotado de uma energia inesgotável na luta de um ensino médico ético e de qualidade.

A **Profª Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco** representante do desejo maior de todo professor “Que seu aluno suplante o mestre”. Amiga, incentivadora, acredito muito em nossa cumplicidade e num futuro ainda cheio de realizações. Muito obrigado pelo sempre.

Aos **Professores Dr. Seizo Miyadahira, Dr. Silvio Martinelli e Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon** pelo zelo e contribuições durante o exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Bussamara Neme** pelo exemplo e amor dedicado ao ensino da obstetrícia.

AGRADECIMENTOS

A **Dra. Regina Schultz**, pela maneira zelosa do cuidado do acervo de material da anatomia patológica e pela pronta disponibilidade na participação desse projeto.

A **Dra. Mara Sandra Hoshida** pela disciplina, dedicação e elaboração das análises laboratoriais do estudo.

A **Profª Dra. Roseli Nomura** pela amizade e constantes palavras de incentivo.

As **Dra. Eliane Aparecida Alves e Dra Maria Rita Bortolotto** pela acolhida carinhosa no serviço.

Aos **Prof. Dr. Soubhi Kahhale e Prof. Dr. Roberto Eduardo Bittar** pela admiração de suas carreiras acadêmicas.

As **Dra Karen Cristine Abrão e Dra Andréia David Sapienza** pela ajuda e dicas no Ambulatório de Endocrinopatias Clínica Obstétrica do HC-FMUSP.

Aos **professores e médicos assistentes** da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP responsáveis pela grandiosidade e excelência do serviço.

Ao pessoal **do Lim – 57 de Fisiologia Obstétrica** peça fundamental na preparação e execução do material placentário analisado.

Ao **Alan Garcia** pela constante ajuda no banco de dados e anjos da guarda nos assuntos de informática.

À secretária da pós – graduação **Adriana Regina Festa**, pela constante orientação no seguimento do doutorado.

A todo corpo de **funcionários administrativos e equipe de enfermagem** da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP pelo trabalho dedicado ao serviço.

Aos **médicos residentes** pelo adequado zelo na inserção das informações no banco dos dados fundamental para realização do estudo.

Essa dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

DMG	Diabetes Melito Gestacional
ADA	American Diabetes Association
IADPSG	International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups
HC FM-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
AGA	Large Gestational Age
LGA	Large Gestational Age
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
AIG	Adequado para Idade Gestacional
GIG	Grande para Idade Gestacional
TTGO-100gr.	Teste de Tolerância a Glicose Oral de 100 gramas
TTGO-75gr.	Teste de Tolerância a Glicose Oral de 75 gramas
HC-FMUSP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
100 g OGTT	Oral glucose Tolerance Test
GLUT1	Glucose Transporters Type 1
GLUT3	Glucose Transporters Type 3
GLUT4	Glucose Transporters Type 4
LIM57	Laboratório de Fisiologia Obstétrica
IMC	Índice de Massa Corporal
RN	Recém - Nascido(s)
TMA	Tissue MicroArray
g.	Gramas
HA	Hipertensão Arterial

RESUMO

Tiago DB. Fatores clínicos, laboratoriais e expressão placentária de transportadores de glicose no diabetes melito gestacional: associação com a ocorrência de recém-nascido grande para idade gestacional [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O diabetes melito gestacional (DMG) está relacionado ao crescimento fetal exagerado. Entender a influência de fatores relacionados ao crescimento fetal auxilia na identificação dos fetos com maior risco de desvios da normalidade. **Objetivo:** comparar fatores clínicos, laboratoriais e a expressão placentária de transportadores de glicose segundo o crescimento fetal em pacientes com DMG. **Método:** Para análise dos fatores clínicos e laboratoriais foi realizado um estudo retrospectivo com 425 gestantes com DMG do Setor de Endocrinopatias da Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FM-USP) no período de janeiro de 2003 a novembro de 2009. Para a análise da expressão placentária dos transportadores de glicose dos tipos 1 (GLUT1), 3 (GLUT3) e 4 (GLUT4) foram selecionados todos os casos de recém-nascidos grandes para idade gestacional (RNGIG) pareados com um caso controle de recém-nascido adequado para idade gestacional (RNAIG). Foram incluídas apenas gestações únicas e com DMG diagnosticado pelo teste de tolerância à glicose oral de 100 gramas, sem malformações fetais e com idade gestacional definida e confiável. Todas as gestantes realizaram dieta para diabetes, controle glicêmico diário e uso de insulina quando necessário. Os critérios de seguimento e tratamento seguiram rigorosamente as normas do Protocolo de Condutas do Setor de Endocrinopatias da Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP. As gestantes foram divididas para análise dos dados em dois grupos: Fatores clínicos e laboratoriais com: 376 RNAIG e 49 RNGIG num total de 425 DMG. Expressão Placentária dos Transportadores de Glicose: 50 RNAIG e 44 RNGIG. Foram realizados testes de associação e médias das variáveis e relacionadas com os grupos de RNAIG e RNGIG. **Resultados:** Na análise univariada, dos fatores clínicos e laboratoriais, não houve diferenças entre os grupos quanto a: idade materna, antecedente familiar de diabetes, antecedente pessoal de hipertensão arterial, número de gestações, valores de glicemia de jejum e 1 hora no TTGO-100g, idade gestacional no parto, sexo do RN, tipo de parto e índice de Apgar no 1º e 5º minutos. Houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto a: índice de massa corpórea pré-gestacional ($p < 0,02$); uso de insulina ($p < 0,041$); macrossomia anterior ($p < 0,001$); idade gestacional do diagnóstico do DMG ($p < 0,001$); glicemias de duas e três horas no TTGO-100g respectivamente com ($p < 0,003$) e ($p < 0,026$). Na análise de regressão logística foram considerados preditores independentes da ocorrência de RNGIG: o índice de massa corpórea pré - gestacional, a macrossomia anterior, idade gestacional do diagnóstico do DMG e a glicemia de duas horas após

sobrecarga de 100 gramas. Em relação a expressão dos transportadores de glicose não diferiram entre os grupos em relação a expressão de GLUT1 na decídua, GLUT3 na decídua e vilosidades e GLUT4 na decídua e vilosidades. Houve diferença entre os grupos quanto à: a expressão do GLUT1 nas vilosidades. **Conclusões:** O índice de massa corpórea pré - gestacional, a macrosomia anterior, a idade gestacional do diagnóstico do DMG e a glicemia de duas horas após sobrecarga de 100 gramas foram preditores da ocorrência de RNGIG. A expressão de GLUT1 nas vilosidades coriônicas teve relação com a ocorrência de RNGIG.

Descritores: 1. Diabetes gestacional / diagnóstico 2. Peso fetal / fisiologia 3. Macrosomia fetal / metabolismo 4. Recém-nascido / crescimento & desenvolvimento 5. Fatores de risco 6. Proteínas de transporte de sódio-glucose 7. Estudos de casos e controles 8. Índice de massa corporal

SUMMARY

Tiago DB. Clinical factors, laboratory and placental expression of glucose transporters in gestational diabetes mellitus: association with the occurrence of newborn large for gestational age [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Gestational diabetes mellitus (GDM) is related to excessive fetal growth. Knowing the influence of factors related to fetal growth assists in the identification of fetuses at high risk of deviations from normality. Objective: To compare clinical and laboratory tests and the placental expression of glucose transporters according to fetal growth in patients with GDM. Method: A retrospective study of clinical and laboratory factors related with large for gestational age newborns, included 425 pregnant women with GDM was carried out at Sector Endocrine Clinic of Obstetrics Hospital of the School of Medicine, University of São Paulo (HC-FMUSP), between January 2003 to November 2009. For the analysis of placental expression of glucose transporters types 1 (GLUT1), 3 (GLUT3) and 4 (GLUT4) were selected all cases of newborns large for gestational age (LGA) paired with a case control newly born appropriate for gestational age (AGA). We included only patients with singleton pregnancies and GDM diagnosed by OGTT-100g, with newborns without malformations and birth weight classified as adequate or large for gestational age. All pregnant women received diet for diabetes, daily glycemic control and insulin when necessary. The criteria for monitoring and treatment followed strictly the standards of Conduct Protocol Endocrine Obstetric Clinic of the Clinic Hospital, School of Medicine, University of São Paulo. The pregnancies were divided for analysis into two groups: 376 cases of newborns AGA and 49 cases of newborns LGA. Data were analyzed and considered the probability value $p < 0.05$. Results: In the univariate analysis of clinical and laboratory factors, there were no differences between the groups regarding maternal age, family history of diabetes, personal history of hypertension, number of pregnancies, blood fasting glucose and 1 hour in-OGTT 100g, gestational age at delivery, gender of the newborn, type of delivery, Apgar score at 1st and 5th minutes. There were statistically significant differences between the groups regarding: body mass index before pregnancy ($p < 0.02$), insulin ($p < 0.041$), previous macrosomia ($p < 0.001$), gestational age at diagnosis of GDM ($p < 0.001$), blood glucose levels two and three hours at 100 g OGTT, respectively, with ($p < 0.003$) ($p < 0.026$). In logistic regression analysis were considered independent predictors of the occurrence of LGA: body mass index before pregnancy, previous macrosomia gestational age at diagnosis of GDM and two hours after glucose overload 100 grams. Regarding the expression of glucose transporters, the groups did not differ regarding the expression of GLUT1 in the decidua, GLUT3 in the decidua and villi and GLUT4 in the decidua and villi. There were differences between the groups regarding the expression of GLUT1 in the villi.

Conclusions: The body mass index before pregnancy, previous macrosomia, gestational age of diagnosis of GDM and two hours after glucose overload 100 grams were predictors of the occurrence of LGA. The expression of GLUT1 in chorionic villi was related to the occurrence of LGA newborn.

Key-words 1. Diabetes, gestational / diagnosis 2. Fetal weight / physiology 3. Fetal macrosomia / metabolism 4. Sodium-glucose transport proteins 5. Infant, newborn / growth & development 6. Risk factors 7. Case-control studies 8. Body mass index

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	17
3.1. Casuística.....	17
3.1.1. Seleção das Pacientes.....	18
3.1.1.1. Critérios de Inclusão.....	18
3.2. Método.....	19
3.2.1. Coleta de Dados das Gestantes.....	19
3.2.2. Diagnóstico do Diabetes Melito Gestacional.....	20
3.2.3. Seguimento Pré-Natal.....	20
3.2.4. Avaliação Placentária.....	22
3.2.4.1 Análise de Expressão dos Marcadores	23
3.3. Análise Estatística.....	30

3.3.1. Constituição dos Grupos.....	31
3.3.2. Tamanho Amostral.....	32
3.4. Classificação e Definição das Variáveis.....	35
3.5. Análise Estatística dos Resultados.....	38
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Relação entre Fatores Clínicos e Laboratoriais	41
4.1.1. Análise Univariada.....	41
4.1.1.1 Idade e IMC.....	41
4.1.1.2 Antecedentes Pessoais e Familiares.....	42
4.1.1.3 Antecedentes Obstétricos.....	44
4.1.1.4 Teste de Tolerância Oral a Glicose.....	45
4.1.1.5 Resultados Perinatais e Parto.....	47
4.1.2. Análise Multivariada.....	49
4.2. Análise dos Marcadores Placentários.....	52
4.2.1. Caracterização dos Grupos.....	52
4.2.2. Análise da Placenta.....	55
4.2.3. Análise dos Transportadores de Glicose.....	56

5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	82
7. ANEXOS.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

O diabetes melito gestacional (DMG) apresenta-se como uma das mais frequentes intercorrências clínicas no ciclo gravídico puerperal. Sua prevalência é variável de acordo com critérios utilizados para seu diagnóstico e com a população estudada.

Segundo a American Diabetes Association (ADA) a incidência de DMG varia de 1 a 14% dependendo da raça, do risco genético e da exposição ambiental [1]. No Brasil estima-se que 7,6% das gestantes tenham DMG [2].

Porém, com os novos critérios diagnósticos propostos pela International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) publicados em 2010, o número de casos de DMG diagnosticado aumentou consideravelmente [3]. Estudo realizado nos Estados Unidos utilizando os novos critérios propostos para diagnóstico de DMG encontrou incidência de 24,1% de DMG em 10.459 mulheres [4].

Devido à importância do DMG no cenário clínico-obstétrico, muitas facetas dessa doença vêm sendo estudadas ao longo das últimas décadas e, embora muito já se tenha desvendado, ainda restam dúvidas relacionadas aos desfechos neonatais principalmente em relação aos desvios do crescimento fetal e à ocorrência de complicações perinatais e doenças futuras.

Os desvios do crescimento fetal podem ser definidos quando o recém-nascido é classificado como grande (GIG) ou pequeno (PIG) para determinada idade gestacional. São considerados GIG os recém-nascidos com peso no nascimento superior ao percentil 90. Já, os recém-nascidos denominados PIG são aqueles que apresentam peso no nascimento abaixo do percentil 10 segundo a idade gestacional [5].

Em casos de DMG, as intercorrências médicas, nos recém-nascidos com desvios de peso fetal, não estão limitadas apenas ao período perinatal. Esses indivíduos apresentam durante toda sua vida futura maior risco para obesidade e graus variados de intolerância a glicose e suas repercussões clínicas [6-8].

Repercussões do DMG no peso fetal

Sabe-se que o DMG associa-se ao crescimento fetal exacerbado e que seu tratamento influencia muito esse resultado neonatal. Bener et al., no Qatar, analisando 2056 grávidas, entre janeiro de 2010 a abril de 2011, demonstraram que o risco de ocorrência de fetos GIG foi de 10,3% nas gestações com DMG comparado a 5,9% nas gravidezes sem DMG [2].

Langer et al., em 2005, demonstraram que o risco relativo de ocorrência de fetos macrossômicos é duas a três vezes maior em gestantes com DMG não tratadas quando comparadas a gestantes com DMG tratadas. [9].

A associação entre o controle glicêmico e o crescimento fetal é bastante evidente. Observa-se que episódios frequentes de hiperglicemias maternas, estão relacionados com a macrossomia fetal. [10, 11]. Coorte coordenada pelo Kaiser Northern California com a participação de 14 estados americanos, envolvendo 89141 gestações únicas de mulheres com diagnóstico de DMG, associou os níveis elevados de glicemia materna de gestantes com DMG ao aumento de nascimentos de recém-nascidos classificados como grandes para a idade gestacional. [12].

Independentemente do tratamento medicamentoso empregado, as gestantes que tem controle mais difícil são, portanto, aquelas que apresentam maior risco para ocorrência de desvios de crescimento fetal [13-15].

Por outro lado, conhece-se o fato que as anormalidades do crescimento fetal são influenciadas não só pelos níveis glicêmicos maternos, mas também por outros fatores clínicos, com a obesidade. [16].

Estudo que incluiu 2454 casos de DMG no qual foram analisados fatores relacionados ao crescimento fetal observou-se associação entre a modalidade de tratamento dieta ou insulina, a adequação do controle glicêmico e o índice de massa corpórea pré - gestacional com esse desfecho [17].

Fatores clínicos associados à ocorrência de RN GIG

Obesidade e ganho de peso materno

Dentre os fatores clínicos relacionados à ocorrência de crescimento fetal aumentado, destaca-se a obesidade materna detectada pelo Índice de Massa Corpórea (IMC). O ganho excessivo de peso na gestação também é associado ao risco três vezes maior para ocorrência de fetos macrossômicos [18, 19].

Na tentativa de evitar o crescimento fetal exagerado, são utilizadas recomendações de estudos internacionais para mulheres que apresentam obesidade na gravidez. Como exemplo, temos o National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos que estabelece limite máximo diferenciado de ganho de peso nessas gestações. O próprio NIH relata aumento na frequência de fetos com peso maior que 4300 gramas e de cesarianas em gestantes obesas [18].

Por fim, o DMG quando associado à obesidade não apresenta risco somente em relação à ocorrência de RN GIG. Existem evidências que a obesidade materna associada ao diabetes também apresenta implicações futuras como aumento do risco de obesidade nos filhos dessas mães entre dois e cinco anos de idade [20].

Antecedente de macrossomia

Outro fator que tem se destacado é o antecedente obstétrico de macrossomia, apontado como preditor de RN GIG [19]. Em estudos sobre diabetes e gestação, o antecedente pessoal de macrossomia fetal apresentou um *odds ratio* de 2,37 para ocorrência de recém-nascido grande para idade gestacional [21].

Influência do gênero fetal

Os desvios do crescimento fetal também se relacionam ao gênero do RN. Em alguns estudos como de Bao et al., que entre 2001 e 2005, analisou 13711 gestações únicas, na cidade de Harbin (China), observa-se maior incidência de fetos macrossômicos em recém nascidos do sexo masculino [22].

Por sua vez, os recém-nascidos do sexo feminino nascidos de mães com obesidade ou diabetes apresentam maior risco de tornarem-se obesas, desenvolver diabetes gestacional e como consequência apresentar maior risco que seus filhos sejam macrossômicos. Dessa forma, um efeito em cascata torna comum a ocorrência de doenças como a obesidade, diabetes e o nascimento de filhos macrossômicos em uma mesma família [23].

Resultados Perinatal

O manejo inadequado do DMG guarda uma relação direta com as complicações advindas da assistência ao parto, principalmente nos fetos GIG, com significativo aumento de indicações de cesárea e de distócias de biacromial. Alguns estudos comparando pacientes com diagnóstico de DMG e comparando grupos de mulheres tratadas e não tratadas, a ocorrência distócia de biacromial durante o trabalho de parto é quatro vezes mais frequente no grupo não tratado [24].

O aumento das complicações neonatais relacionadas ao sofrimento e óbito fetal apresenta uma relação com o feto GIG em mulheres com DMG e seguimento inadequado [25].

Fatores laboratoriais associados à ocorrência de GIG

Muitos são os métodos e os critérios adotados para o diagnóstico do DMG. A idade gestacional de realização do teste diagnóstico e a interpretação dos seus resultados são dois fatores importantes em relação ao aumento do número de RN GIG.

O atraso na realização do diagnóstico do DMG apresenta relação direta com a evolução da gravidez e com as repercussões pós-natais que incluem o nascimento de RN GIG, hipoglicemia e outras complicações. Diagnósticos tardios aumentam a probabilidade do uso de insulina na gestação, bem como, estão associados à maior risco da permanência de intolerância à glicose após término da gestação [26, 27].

Independente dos valores de glicemia adotados como critérios, no diagnóstico e seguimento do DMG, valores considerados discretamente aumentados de glicemia, em relação aos valores de referência, apresentam associação com resultados perinatais desfavoráveis [28].

O estudo multicêntrico HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome), envolvendo 15 centros mundiais, com o total de 23.927 mulheres, submetidas ao TTGO-75g, demonstra claramente a relação positiva, estatisticamente significativa, entre os valores da glicemia nos diferentes momentos do TTGO e a frequência de RN macrossômico [3].

Sabe-se também, que a alteração de apenas um dos valores do TTOG-100g ou 75g estaria associada ao aumento de eventos perinatais adversos aumentando a probabilidade dos nascimentos de recém – nascidos grandes para idade gestacionais [29].

Apesar da evidência de que os fatores clínicos e laboratoriais se associam ao nascimento de RN GIG, em algumas situações, não se pode imputar a eles a fisiopatologia do crescimento fetal exagerado.

Esses achados foram determinantes para que se procurassem, na interface materno-fetal, justificativas ou explicações para esse crescimento inadequado. Dentro os fatores estudados, podemos destacar os transportadores de glicose.

Transportadores de glicose

O crescimento fetal é dependente do aporte de glicose ao qual o feto é submetido, que por sua vez depende do transporte adequado desse nutriente pela placenta. Vários transportadores de glicose (GLUT) estão envolvidos no complexo sistema regulatório de nutrientes na placenta, o que contribui, de forma direta, para a ocorrência dos desvios de crescimento fetal. O conhecimento do sistema regulatório dos transportadores de glicose na placenta pode facilitar o entendimento da fisiopatologia dos desvios de crescimento fetal, propiciando novas estratégias de intervenção para essas gestações.

Os transportadores de glicose são proteínas plasmáticas que facilitam o transporte de glicose nas membranas plasmáticas de vários tecidos celulares por meio de difusão facilitada. Esses transportadores apresentam características específicas em relação aos mecanismos de transporte e à especificidade de ação em cada tecido [30].

Atualmente estão identificados 14 tipos de isoformas de GLUTs, as primeiras quatro variantes descritas parecem ser as principais, sendo o foco atual de estudos para caracterização dos fluxos de glicose nos tecidos.

Os GLUTS 1, 3 e 4 têm sido mais avaliados em relação ao ciclo gestacional. [31]. Sugere-se que os transportadores de glicose (GLUT) desempenhem importante papel no desenvolvimento do feto e que sua desregulação incapacitaria o organismo de proteger o feto quanto à hiperglicemia e hiperinsulinemia com impacto no peso fetal [30].

O GLUT1 é a isoforma mais envolvida no metabolismo celular e transporte da glicose. Descrito pela primeira vez na placenta por Bell et al., em 1990, está presente em vários tecidos como músculo, tecido adiposo, cérebro e endotélio vascular. Particularmente na placenta apresenta-se expresso na membrana basal, vilosidades do sinciciotrofoblasto e células endoteliais [32].

O GLUT1 tem uma expressão elevada e, é considerado o principal transportador de glicose na placenta humana [33-35]. Sua concentração parece aumentar com a evolução da idade gestacional sendo implicado no crescimento fetal, principalmente no terceiro trimestre [35]. Sugere-se que a expressão do GLUT1 na membrana basal da placenta seja aumentada em gestações complicadas pelo diabetes [36].

O GLUT3 esta presente nos neurônios e na placenta e possui alta afinidade pela glicose mesmo em níveis baixos de glicemia. Por apresentar uma afinidade superior aos níveis de glicose que o GLUT1, situações de hipoglicemia desencadeiam sua ativação, em especial nas células neuronais e placentárias, facilitando o transporte de glicose e, assim, protegendo o feto. (Burton GJ) Alguns autores referem que o GLUT3 está presente na membrana sincicial das vilosidades placentárias apresentando maior concentração no início da gestação [37, 38].

Por fim, GLUT4 presente no tecido adiposo e muscular é um transportador de glicose insulino - sensível. A expressão do GLUT4 esta fortemente relacionada à presença de síndromes metabólicas e obesidade devido ao seu desempenho no mecanismo de resistência insulínica. Sua concentração no tecido adiposo é responsável pela normalização da resposta glicêmica contribuindo para o controle metabólico. Na placenta humana, o GLUT4 está presente no estroma intraviloso. [39, 40] A expressão diminuída do GLUT4 é observada na obesidade e no diabetes gestacional e, pode traduzir diferentes graus de resistência insulínica [41].

Considerações finais

Há evidências de que alterações ou desvios do peso fetal ao nascimento trazem prejuízos ao RN e também aumentam a probabilidade de que esses indivíduos venham a desenvolver doenças na vida adulta. São exemplos as maiores ocorrências de diabetes, hipertensão arterial e obesidade em indivíduos adultos que apresentaram macrossomia ao nascer [42-46]. Esses estudos têm motivado o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a esse tema.

Na prática médica, o conhecimento da relação entre os fatores clínicos e laboratoriais e o crescimento fetal é extremamente importante pela possibilidade de utilização rápida e simples dessas características e como isso instituir monitoramento mais detalhado desses casos. Há necessidade de estudos específicos em cada população, visto que, as diferenças relacionadas às características desses indivíduos podem interferir nos resultados obtidos.

Se isso facilita a prática médica, a análise desses fatores não tem fornecido aos pesquisadores subsídios suficientes para que se possa entender de forma clara a ocorrência de RN GIG. O envolvimento da placenta e dos transportadores de glicose na gênese das alterações do crescimento fetal tem sido apontado como uma possibilidade de se elucidar melhor a fisiopatologia do crescimento fetal exacerbado em casos de DMG.

Ainda não se encontra estabelecida na literatura o real papel desses transportadores nos desvios do crescimento fetal demonstrando que se por um lado precisamos confirmar quais os fatores clínicos são preditores da ocorrência de GIG, na população brasileira de gestantes com DMG, por outro precisamos também investigar a associação entre transportadores de glicose e a adequação do peso no nascimento.

O presente estudo vem de encontro a essas perspectivas ao buscar em gestantes com DMG, fatores de risco que possam predizer quais gestantes terão maior risco de apresentarem RN GIG e também avaliar a expressão placentária dos GLUT nesses casos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo, que avaliou gestações com DMG visou identificar fatores relacionados com a ocorrência de RN GIG, estudando:

1. Fatores Clínicos: idade materna, índice de massa corpórea, antecedente familiar de diabetes melito, antecedente pessoal de hipertensão, tabagismo, uso de insulina, número de gestações, partos e abortos, idade gestacional do nascimento, antecedente pessoal de GIG ou PIG, resultados perinatais.

2. Fatores Laboratoriais: idade gestacional da realização do TTGO-100g, valores da glicemia no jejum, uma, duas e três horas após a sobrecarga de glicose.

3. Marcadores Placentários: expressão dos GLUT1, GLUT3 e GLUT4 na decídua e nas vilosidades coriônicas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

Trata-se de estudo do tipo caso-controle, previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) (Anexo 1).

3.1. CASUÍSTICA

Foram avaliados, de forma retrospectiva, dados clínicos e laboratoriais de 425 gestantes com diagnóstico de DMG, que realizaram seguimento pré-natal no setor de Endocrinopatias e Gestação da Divisão de Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de 01 de janeiro de 2003 a 30 de novembro de 2009.

Para avaliação da expressão dos GLUT na placenta, do grupo inicial foram selecionados todos os casos de RN GIG (caso) pareados com o primeiro caso temporalmente sequencial de RN AIG (controle).

3.1.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionadas pacientes que atenderam aos seguintes critérios de inclusão.

3.1.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados critérios de inclusão para o estudo de marcadores clínicos e laboratoriais:

- Diagnóstico de DMG realizado por meio do TTGO-100g;
- Seguimento pré-natal, do momento do diagnóstico até o parto, no setor de Endocrinopatias e Gestação da Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP;
- Parto de recém-nascido vivo, realizado no HC-FMUSP;
- Recém-nascido único sem mal formações fetais à ultrassonografia e/ou exame pós-natal;

- Idade gestacional definida e confiável, pela concordância entre a data da última menstruação e exame ultrassonográfico; ou determinada por ultrassonografia de primeiro trimestre;

- Gestações nas quais o RN foi classificado como AIG ou GIG;

- Disponibilidade completa dos dados pertinentes ao estudo nos sistemas de informática ou prontuário da paciente.

Para análise da expressão dos transportadores de glicose na placenta, além dos critérios acima citados houve necessidade de:

- Estado adequado de conservação dos blocos parafinados de placenta.

3.2. MÉTODO

3.2.1. COLETA DE DADOS DAS GESTANTES

Os dados do presente estudo foram coletados por meio de consulta ao banco de dados do setor de Endocrinopatias e Gestação da Divisão de Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP, cujas informações são armazenadas de forma prospectiva desde Janeiro de 2003.

Outras informações das gestantes foram obtidas no sistema de informática da enfermagem da Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP. O sistema de informática do Laboratório Central do HC-FMUSP foi consultado para acesso aos resultados dos exames laboratoriais disponibilizados online pelo site www.phcnet.usp.br. Os prontuários das pacientes selecionadas foram avaliados para coleta de informações quando necessário.

3.2.2. DIAGNÓSTICO DE DMG

As pacientes incluídas nesse estudo tiveram o diagnóstico de DMG realizado por meio do teste de tolerância à glicose oral com sobrecarga de 100g (TTGO-100g). Foram consideradas portadoras de DMG as pacientes que apresentaram dois ou mais valores de glicemia iguais ou superiores aos valores de referência [35, 47].

3.2.3. PROTOCOLO DE SEGUIMENTO PRÉ-NATAL

O seguimento pré-natal foi realizado no setor de Endocrinopatias e Gestação da Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP. Na primeira consulta, as pacientes são cadastradas e dão início ao seguimento obedecendo ao protocolo do setor de Endocrinopatias e Gestação. Orientações multidisciplinares, que englobam aspectos dietéticos (nutricionista), atividade física, monitorização glicêmica (enfermagem) e consultas médicas, são realizadas pela equipe do setor.

A dieta, orientada por nutricionista, consiste de forma genérica, em 25 a 35 Kcal/Kg de peso ideal/dia, divididas em seis refeições, a saber: café da manhã, lanche matinal, almoço, lanche da tarde, jantar e ceia. Os macros nutrientes são distribuídos em: 45 a 55% de carboidratos, 15 a 20% de proteínas e 30 a 35% de lipídeos [48].

É proposta a realização de exercícios físicos com frequência de três a quatro vezes por semana, com duração média de 30 a 40 minutos. Os exercícios recomendados são para o trabalho aeróbico, como caminhadas ou hidroginástica.

As pacientes são orientadas a realizar perfil glicêmico com medidas de glicemia capilar de ponta de dedo, conforme normas técnicas editadas nos Protocolos Assistenciais da Divisão de Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, editados em 2003 e ratificados em nova publicação em 2012 [49]. Os retornos para consultas de pré-natal são semanais, até o controle clínico glicêmico adequado.

A terapêutica insulínica preconizada pelo setor de Endocrinopatias e Gestação da Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP é baseada em esquema de múltiplas doses, pelo melhor controle glicêmico e, por se aproximar mais da secreção fisiológica de insulina. Inicia-se a terapêutica com insulina humana NPH na dose total aproximada de 0,4 - 0,5 UI/Kg de peso/dia.

A avaliação fetal segue o protocolo de vitalidade fetal e normas técnicas editadas nos protocolos assistenciais da Divisão de Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo editados em 2003 e ratificados em nova publicação em 2012 [49].

O momento e tipo de parto foram individualizados caso a caso. [49]. A avaliação dos recém-nascidos foi realizada por meio da aferição do índice de Apgar e classificação do peso do RN segundo a idade gestacional de acordo com a curva de Alexander et al., 1996 [5].

3.2.4. AVALIAÇÃO PLACENTÁRIA

A avaliação macroscópica e microscópica das placentas foi realizada segundo técnica padrão pré-estabelecida pela Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia – HCFMUSP [50]. Segundo essa técnica, a placenta é fixada em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas, sendo então examinada externamente. Na análise macroscópica, a placenta fixada é pesada após a retirada das membranas e cordão umbilical, tendo sido este o parâmetro de peso considerado para fins analíticos. Após isso, são feitos cortes verticais paralelos em toda a sua extensão, para a identificação de eventuais lesões macroscópicas. São retirados fragmentos, para análise histológica, de três áreas consideradas normais e das lesões identificadas. Também são retirados dois fragmentos do cordão e da região

da membrana próxima à rotura. Os fragmentos são processados com realização de blocos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

3.2.4.1. Análise da expressão dos marcadores transporte de glicose (GLUT1, GLUT3 e GLUT4)

Para a análise da expressão de GLUT1, GLUT3 e GLUT4 foram realizadas reações de imunoistoquímica em cortes histológicos de fragmentos de placenta de gestantes dos grupos estudados. Para cada caso foram realizados cortes histológicos em duas áreas da placenta: a decídua e as vilosidades coriônicas.

A figura 1 demonstra os cortes das regiões estudadas para análise imunoistoquímica dos transportadores de glicose do tipo GLUT1, GLUT3 e GLUT4.

Figura 1: Corte histológico representativo do TMA. A) Decídua (d) e vilosidade (v); B) Vilosidade coriônica; C) Observar na decídua as células do citotrofoblasto extraviloso (evt). Hematoxilina-eosina.

Após a seleção dos casos (todos os casos de GIG) e controles (1 controle para cada caso selecionado), as respectivas lâminas histológicas foram analisadas por um única patologista (Dra. Regina Schultz) e assim foram demarcadas as áreas representativas das regiões de vilosidades coriônicas e de decídua para a composição de um TMA (Tissue MicroArray).

Por comparação visual, as áreas de interesse foram marcadas nos blocos doadores de parafina de cada espécime selecionado. As áreas selecionadas foram extraídas dos blocos doadores com agulha de 1,0 mm de diâmetro utilizando-se o instrumento Tissue Arrayer MTA-1 (Beecher Instruments - Sun Prairie, Wisconsin - EUA). De cada área selecionada no bloco doador foram colhidos dois fragmentos, os quais foram arranjados em um bloco receptor. Neste trabalho, foi feita distribuição dos cilindros em 16 colunas e 13 linhas.

A montagem do bloco receptor de TMA foi realizada no Setor Multiusuário do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM/14), do Serviço de Patologia Hepática do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Foram construídos três blocos de TMA com representação de 44 casos (GIG) e 50 controles (AIG). Em cinco casos (10,2%), os blocos parafinizados de placenta não apresentavam condições adequadas não sendo possível sua avaliação imunoistoquímica. A figura 2 demonstra a execução do processo de montagem dos blocos doador e receptor no TMA.

Figura 2: Construção do *tissue microarray* (TMA). A) visão do equipamento MTA-1; B) Preparação do bloco receptor; C) Introdução do fragmento no bloco receptor; D) Bloco receptor parcialmente montado; E) Bloco receptor finalizado; F) Lâmina do TMA corado pela HE.

De cada bloco de TMA foram obtidos 50 cortes histológicos de 5 μ m de espessura, colhidos em lâminas de vidro previamente tratadas com solução adesiva de organo-Silano a 2% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EUA). Três lâminas nos níveis inicial, médio e final de cada TMA foram coradas pela hematoxilina-eosina para identificar os níveis mais representativos.

Após a identificação das sequências de cortes em que houve a menor perda tecidual, estes foram submetidos às reações imunoistoquímicas.

A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol a 60°C, por 30 minutos, seguido por dois banhos de xilol a temperatura ambiente por 30 minutos e hidratados em uma série de concentrações decrescentes de etanol, água corrente e água destilada.

Após serem lavadas em tampão Tris-salina (TBS 20 mM), pH 7,4 as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo:

1. Resgate dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) por imersão das lâminas em tampão Tris-EDTA (10 mM/1 mM, pH 9,0) por 40 minutos, após o aquecimento do tampão a 95°C.
2. Inibição da enzima fosfatase alcalina endógena por incubação em ácido acético a 5% em TBS por 10 min.

3. Bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido por incubação em solução tampão bloqueadora (Protein Block Serum Free, Dako North América Inc, Carpinteria, Califórnia, EUA) por 30 min a 37°C.
4. Incubação com os anticorpos primários (30 min a 37°C e 18 h a 4°C): anticorpo policlonal IgG de coelho anti-GLUT-1; anticorpo policlonal IgG de coelho anti-GLUT-3; anticorpo policlonal IgG de coelho anti-GLUT-4, procedentes da Abcam Inc. (Cambridge, MA, EUA). A diluição utilizada para todos os anticorpos foi de 1:100, realizada em solução Dako (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako North América Inc, Carpinteria, CA, EUA).
5. Incubação com o anticorpo secundário biotilado (1 h, a 37°C): IgG de cabra anti - coelho e IgG de coelho anti - camundongo (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, EUA).
6. Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina-fosfatase alcalina (VectaStain ABC kit, , Burlingame, CA, EUA) (por 45 min, a 37°C) e revelação da atividade da fosfatase alcalina foi visualizada pelo cromógeno Fast-red TR e substrato Naftol ASMX (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA).

7. Controles negativos foram obtidos por meio de incubação com o diluente do anticorpo DAKO em substituição ao anticorpo primário.

Após cada etapa de incubação (acima mencionadas) as amostras foram lavadas em solução tampão TBS 20 mM, pH 7,4.

Ao final da reação as lâminas foram lavadas em água destilada e rapidamente coradas com hematoxilina de Mayer e diferenciadas em água amoniacal. Após secas, as lâminas foram montadas com lamínula e óleo mineral e seladas com esmalte.

As amostras foram observadas ao microscópio de luz convencional (Axio Observer, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e as imagens capturadas com o auxílio de uma câmera digital (AxioCam ERc5S, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

A leitura do material foi realizada com o software AxioVision LE (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A análise foi qualitativa, considerando-se a positividade como uma expressão de pelo menos 25% da amostra representada.

Os padrões de imuno-marcações foram de marcação presente e de modo difuso ou se as células mostravam-se marcadas. Os grupos de controle negativo seguiram o protocolo acima, porém, a incubação com o anticorpo primário será substituída por incubação em BSA ou soro não imune. As amostras foram fotografadas e analisadas com microscopia de luz convencional (Zeiss Axioskop, Alemanha).

A figura 3 as marcações dos diferentes transportadores de glicose avaliados: GLUT1, GLUT3 e GLUT4 e controle negativo.

Figura 3: Placentas a termo. As figuras mostram imagens representativas de imuno marcação GLUT-1 (A), GLUT-3 (B), GLUT-4 (C), citoqueratina-7 (D) e controle negativo (E). Nota-se marcação presente no sinciciotrofoblasto (setas) em todos os grupos, citotrofoblasto extraviloso (evt) na decídua em B e C, vasos vilosos (vv) em A e vasos maternos (vm) em B e C.

Os padrões de imuno-marcações foram graduados de acordo com uma escala gradativa de intensidade crescente com valores expressos em +, ++ e +++. A figura 4 mostra a expressão semiquantitativa dividida em +, ++ e +++ para as reações imunoistoquímicas dos transportadores de glicose.

Figura 4: Análise qualitativa das marcações para as reações de imunoistoquímicas A) +; B) ++; C) +++. Imunoistoquímica revelação fostatase alcalina, contra coloração Hematoxilina de Mayer.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os casos foram analisados nos diferentes grupos pré-estabelecidos comparando-se os resultados da avaliação clínica, laboratorial e dos marcadores de transporte de glicose entre os grupos, por meio de análise univariada e multivariada.

3.3.1. CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

Foram constituídos dois grupos de pacientes, com diagnóstico de DMG, segundo a classificação dos RN segundo o peso no nascimento [5].

- **GRUPO CONTROLE:** Grupo de recém-nascidos classificados como adequados para idade gestacional (AIG): formado pelas gestantes diabéticas que tiveram RN com crescimento adequado, peso ao nascimento entre o percentil 10 e o percentil 90 para a idade gestacional (4).

- **GRUPO DE CASOS:** Grupo de Recém-nascidos classificados como grandes para idade gestacional (GIG): formado pelas gestantes diabéticas que tiveram RN peso ao nascimento acima do percentil 90 para a idade gestacional (4)

3.3.2. TAMANHO AMOSTRAL

Optou-se por amostra de conveniência na qual foram incluídos todos os casos disponíveis no período do estudo, posteriormente verificou-se ainda se o número de casos disponíveis era suficiente para os objetivos do estudo.

Em consulta ao banco de dados do setor de endocrinopatias da gestação no período de 01 de janeiro de 2003 a 30 de novembro de 2009 existem cadastradas 732 pacientes diabéticas gestacionais;

Não foi possível incluir 307 pacientes (41,9 %) no estudo. Os motivos de não inclusão foram: gestação múltipla, malformação fetal, utilização de outro teste para diagnóstico do DMG, uso de metformina no tratamento do diabetes gestacional e classificação do peso do recém - nascido como pequeno para idade gestacional segundo a curva de Alexander et al. 1996 [5].

Dessa forma, o número total de casos da amostra foi de 425 casos de DMG divididos em dois grupos de acordo com a classificação do peso do RN: 376 casos de recém - nascidos AIG e 49 casos de recém-nascidos GIG.

Para verificar se a amostra seria adequada aos objetivos do presente estudo foi considerado:

Para análise de fatores clínicos e laboratoriais preditores da ocorrência de RN grande para idade gestacional:

- Mínimo de sete eventos para cada variável incluída no modelo de regressão logística multivariada;
- Inclusão de no máximo seis variáveis no modelo de regressão

Figura 5: Constituição da amostra final – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Assim seriam necessários no mínimo 42 casos de DMG com RN GIG.
Em consulta ao banco de dados do setor observamos que há 49 casos de DMG que resultaram em RN GIG e 376 que resultaram em RN AIG.

3.4. CLASSIFICAÇÃO E DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS A SEREM ANALISADAS:

A. QUANTO ÀS CARACTERÍSTICAS MATERNAS

- **Idade materna** – em anos completos;
- **Índice de massa corporal (IMC) Pré Gestacional** – calculado pela relação peso/altura^2 anterior a gravidez;
- **Antecedentes de Familiar de Diabetes** - considerados os familiares de primeiro grau;
- **Hipertensão arterial**- presença (sim) ou ausência (não) independente do tipo de síndrome hipertensiva;
- **Tabagismo** - confirmação (sim) ou negativa (não) do hábito de fumar, independente do número de cigarros por dia;
- **Uso de insulina** – uso (sim) ou não uso (não).

B. QUANTO AOS ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS:

- **Gestações** – número total de gestações;
- **Paridade** – número de partos;
- **Abortos** - número de abortos;
- **Antecedentes de RN com peso $\geq 4000\text{g}$** – categorias (sim) ou (não);
- **Antecedente de RN com peso $< 2500\text{g}$** – categorias (sim) ou (não).

C. ACHADOS LABORATORIAIS:

- **Idade Gestacional no TTGO-100g** – idade gestacional na data da realização do teste para o diagnóstico do diabetes gestacional;
- **TTGO - 100g – Jejum** – valor da glicemia de jejum no momento da realização do teste de tolerância à glicose oral;
- **TTGO - 100g – 1ª hora** – valor da glicemia da 1ª hora após a realização do teste de tolerância à glicose oral;
- **TTGO - 100g – 2ª hora** – valor da glicemia da 2ª hora após a realização do teste de tolerância à glicose oral.
- **TTGO - 100g – 3ª hora** – valor da glicemia da 3ª hora após a realização do teste de tolerância à glicose oral.

D. RESULTADOS NEONATAIS E DO PARTO:

- **Idade Gestacional no Parto** – idade gestacional no momento do nascimento;
- **Índice de Apgar no 1º, 5º minuto** - em duas categorias (< 7 , ≥ 7);
- **Peso ao nascimento (g)** – peso do RN expressos em gramas;
- **Sexo do recém-nascido** – dividido em gênero masculino e feminino.

E. AVALIAÇÃO PLACENTÁRIA:

- **Peso da placenta (g)** – peso da placenta em gramas;
- **Espessura da placenta (cm)** – espessura da placenta em centímetros;
- **Espessura do cordão umbilical (cm)** – espessura do cordão umbilical em centímetros;
- **GLUT1** – transportador de glicose do tipo 1; expresso em cruces;
- **GLUT 3** – transportador de glicose do tipo 3; expresso em cruces;
- **GLUT 4** – transportador de glicose do tipo 4; expresso em cruces.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para responder aos objetivos do estudo, foram descritas as características qualitativas com uso de frequências relativas e absolutas segundo classificação (AIG e GIG) e verificada a existência de associação dessas medidas com o desfecho por meio de testes de qui - quadrado ou do teste da razão de verossimilhanças quando a amostra foi insuficiente para aplicação do teste qui - quadrado [51].

As medidas quantitativas foram descritas segundo classificação (AIG e GIG) com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mínimo, máximo) e realizadas as comparações das medidas entre os grupos por meio de testes t-Student ou de testes Mann-Whitney [52].

As variáveis que apresentaram significância estatística na análise univariada e que apresentam relevância clínica reconhecida na literatura médica foram selecionadas para o ajuste do modelo de Regressão Logística (com intervalo de confiança de 95% e cálculo de "odds ratio" - ou razão de riscos), segundo HOSMER & LEMESHOW, a fim de identificar quais fatores podem prever a probabilidade de ocorrência de RN GIG em gestações que cursaram com DMG [53, 54].

As medidas que apresentaram nível de significância estatística na análise univariada para o desfecho de interesse foram testadas conjuntamente, no modelo de regressão logística múltipla [55]. Permaneceram no modelo final apenas as variáveis estatisticamente significativas. A adequação do modelo final foi verificada com uso do teste de Hosmer e Lemeshow e análises de resíduos e distâncias de Cook [55].

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. RELAÇÃO ENTRE FATORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS E A OCORRÊNCIA DE RN GIG

Para avaliar a relação entre fatores clínicos e laboratoriais e ocorrência de RN GIG foram analisados 425 casos, distribuídos em dois grupos segundo a classificação do peso segundo a idade gestacional de nascimento [5].

Grupo AIG: 376 casos

Grupo GIG: 49 casos

4.1.1. ANÁLISE UNIVARIADA

4.1.1.1. IDADE E IMC

Em relação às características maternas, na Tabela 1 observa-se que a média do IMC difere estatisticamente entre as gestantes que tiveram RN AIG e GIG, sendo mais elevada no grupo de RN GIG ($p=0,020$). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos em relação à idade materna ($p=0,782$).

Tabela 1. Descrição das variáveis quantitativas maternas (Índice de Massa Corpórea e Idade Materna) nos diferentes grupos (AIG, GIG) – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso do RN	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Idade (anos)	AIG	32,61	5,93	33,0	13,0	46,0	376	0,782
	GIG	32,86	5,71	34,0	20,0	42,0	49	
	Total	32,64	5,90	33,0	13,0	46,0	425	
IMC (Kg/m2)	AIG	27,51	5,49	26,7	17,1	45,2	376	0,020
	GIG	29,44	5,30	29,9	19,1	40,6	49	
	Total	27,73	5,49	27,0	17,1	45,2	425	

RN: recém-nascido; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional, IMC: índice de Massa Corporal.

4.1.1.2 ANTECEDENTES PESSOAIS E FAMILIARES

Não houve diferença entre os grupos de RN AIG e GIG, quando avaliados o antecedente familiar de diabetes melito e o antecedente pessoal de hipertensão arterial (Tabela 2).

Com relação ao hábito de fumar, esse foi mais frequentemente observado no grupo de RN AIG (14,6%) (p=0,014) (Tabela 2).

No grupo de gestações que resultaram em RN GIG, foi necessária a utilização de insulina em 48,9% das gestantes o que foi estatisticamente diferente do grupo AIG (34,9%) ($p=0,041$) (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição das características nominais segundo os grupos de estudos e os resultados dos testes de associação com tabagismo, antecedente familiar de diabetes melito e antecedentes pessoais de hipertensão arterial e uso de insulina. – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do Peso do Recém - Nascido						p
	AIG		GIG		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Tabagismo							0,014
Não	321	85,4	48	98,0	369	86,8	
Sim	55	14,6	1	2,0	56	13,2	
Antecedente familiar DM							0,259
Não	145	38,6	23	46,9	168	39,5	
Sim	231	61,4	26	53,1	257	60,5	
HAS							0,712
Não	251	66,8	34	69,4	285	67,1	
Sim	125	33,2	15	30,6	140	32,9	
Uso de Insulina							0,041
Não	245	65,1	25	50,1	270	63,5	
Sim	131	34,9	24	48,9	155	36,5	

DM: diabete melito, HAS: hipertensão arterial, AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional.

4.1.1.3. ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

O número de gestações, partos e abortamentos não apresentou diferença estatisticamente significativa à comparação dos dois grupos analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição das variáveis quantitativas e resultado dos testes de comparação com relação à análise dos antecedentes obstétricos nos diferentes grupos (AIG, GIG). – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso do RN	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Gestações	AIG	2,90	1,85	2,0	1,0	12,0	376	0,182#
	GIG	3,08	1,53	3,0	1,0	6,0	49	
	Total	2,92	1,82	3,0	1,0	12,0	425	
Partos	AIG	1,26	1,36	1,0	0,0	8,0	376	0,055#
	GIG	1,49	1,10	1,0	0,0	4,0	49	
	Total	1,29	1,34	1,0	0,0	8,0	425	
Abortos	AIG	0,59	1,10	0,0	0,0	7,0	376	0,846#
	GIG	0,47	0,74	0,0	0,0	3,0	49	
	Total	0,58	1,06	0,0	0,0	7,0	425	

RN: recém-nascido; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional.

Quanto ao peso dos recém-nascidos anteriores, classificado em $\geq 4000\text{g}$, observou-se que a frequência desse resultado foi estatisticamente maior no grupo GIG (28,6%). Não foi identificada diferença entre os grupos em relação à frequência de recém-nascidos anteriores com peso classificado como $\leq 2500\text{g}$. (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição das características nominais segundo os grupos estudados (AIG e GIG) e os resultados dos testes de associação com classificação do peso de recém - nascido anterior categorizado em dois grupos: ≥ 4000 gramas e ≤ 2.500 gramas – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Antecedente Obstétrico	Classificação do peso do recém-nascido						p
	AIG		GIG		Total		
	n	%	n	%	n	%	
RN anterior $\geq 4000g$							0,001
Não	333	88,6	35	71,4	368	86,6	
Sim	43	11,4	14	28,6	57	13,4	
RN anterior $\leq 2500g$							0,446
Não	314	83,5	43	87,8	357	84,0	
Sim	62	16,5	6	12,2	68	16,0	

RN: recém-nascido; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional; RN: recém-nascido.

4.1.1.4. AVALIAÇÃO LABORATORIAL: TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL COM SOBRECARGA DE 100 GRAMAS DE GLICOSE (TTGO-100G)

A idade gestacional no momento do TTGO-100g e os valores de glicemia de duas e três horas após sobrecarga de 100g de glicose diferiram estatisticamente entre os grupos, sendo mais elevados no grupo de RN GIG. Os valores da glicemia de jejum e uma hora após sobrecarga de 100g de

glicose não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição das variáveis quantitativas segundo os diferentes grupos de RN AIG e GIG e os resultados dos testes de comparação com a idade gestacional de realização do teste TTGO-100g e valores das glicemias de jejum, 1, 2 e 3 horas após a sobrecarga de 100gramas de glicose – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso do RN	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
IG no teste (semanas)	AIG	29,30	3,34	29,3	16,8	39,3	376	0,001
	GIG	31,09	3,85	31,0	17,1	37,4	49	
	Total	29,50	3,44	29,4	16,8	39,3	425	
Glicemia jejum	AIG	93,75	14,52	92,5	66,0	161,0	376	0,051
	GIG	98,04	13,79	99,0	64,0	132,0	49	
	Total	94,25	14,49	93,0	64,0	161,0	425	
Glicemia 1h	AIG	189,85	33,03	191,0	79,0	278,0	376	0,943
	GIG	189,49	34,40	186,0	103,0	265,0	49	
	Total	189,81	33,15	191,0	79,0	278,0	425	
Glicemia 2h	AIG	181,22	29,83	174,5	109,0	311,0	376	0,003
	GIG	195,06	32,50	188,0	135,0	268,0	49	
	Total	182,82	30,43	176,0	109,0	311,0	425	
Glicemia 3h	AIG	146,53	31,62	148,0	52,0	271,0	376	0,026
	GIG	157,39	34,10	153,0	85,0	244,0	49	
	Total	147,78	32,06	149,0	52,0	271,0	425	

RN: recém-nascido; TTGO-100g: teste de tolerância à glicose oral com sobrecarga de 100 gramas de glicose; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional, IG: idade gestacional

4.1.1.5. RESULTADOS PERINATAIS E PARTO

A média da idade gestacional no momento do parto não diferiu estatisticamente entre os grupos de RN AIG e GIG. Obviamente, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RN AIG e GIG em relação ao peso de nascimento que foi de 3226,66 e 4134,00 gramas, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição das variáveis quantitativas segundo os diferentes grupos de RN AIG e GIG e os resultados dos testes de comparação com a idade gestacional no momento do parto e peso médio do recém - nascido – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso do RN	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
IG Parto (semanas)	AIG	38,43	1,49	38,9	33,3	40,9	376	0,622
	GIG	38,54	2,06	39,0	26,7	40,3	49	
	Total	38,44	1,56	38,9	26,7	40,9	425	
Peso RN (g)	AIG	3226,66	379,63	3265,0	2080,0	3990,0	376	<0,001#
	GIG	4134,00	266,02	4130,0	3330,0	5080,0	49	
	Total	3331,27	468,67	3320,0	2080,0	5080,0	425	

Resultado do teste t-Student

Resultado do teste Mann-Whitney

RN: recém-nascido; AIG: adequado para idade gestacional; GIG: grande para idade gestacional; IG: idade gestacional; RN: recém-nascido; g: gramas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tipo de parto realizado, sexo do RN e índices de Apgar (Tabela 7).

Tabela 7. Descrição das características nominais segundo os grupos estudados (AIG e GIG) e os resultados dos testes de associação com gênero do RN (sexo), índices de Apgar e tipo de parto realizado – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Classificação do Peso do Recém - Nascido							
Variável	AIG		GIG		Total		p
	n	%	n	%	n	%	
Sexo do RN^a							0,551
Feminino	188	50,4	22	45,8	210	49,9	
Masculino	185	49,6	26	54,2	211	50,1	
APGAR 1º minuto							0,509
< 7	51	13,6	5	10,2	56	13,2	
≥ 7	324	86,4	44	89,8	368	86,8	
APGAR 5º minuto							0,058*
< 7	26	6,9	0	0,0	26	6,1	
≥ 7	350	93,1	49	100,0	399	93,9	
Tipo de parto							0,081
Normal	96	25,5	6	12,2	102	24,0	
Fórcipe	47	12,5	5	10,2	52	12,2	
Cesárea	233	62,0	38	77,6	271	63,8	
Total	376	100	49	100	425	100	

Resultado dos testes qui-quadrado / * Resultado do teste exato de Fisher
a - Nem todos possuíam as informações

4.1.2. ANÁLISE MULTIVARIADA: MODELO REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA

As variáveis estatisticamente significativas e com relevância clínica foram selecionadas para compor o modelo de regressão múltipla, a saber:

- a) IMC;
- b) Histórico de RN macrossômico anterior;
- c) Idade gestacional no TTGO-100g;
- d) Valor da glicemia duas horas após sobrecarga de 100g de glicose;
- e) Valor da glicemia três horas após sobrecarga de 100g de glicose.

Após o procedimento de análise de regressão logística multivariada observa-se que o valor do IMC, a idade gestacional no TTGO-100g, o valor da glicemia duas horas após a sobrecarga de 100g e o antecedente obstétrico de RN macrossômicos (peso $\geq 4000\text{g}$) foram identificados como preditores independentes da ocorrência de RN GIG (Tabela 8).

Tabela 8- Resultado do modelo de regressão logística multivariada para predição da ocorrência de RN GIG em gestações com diabetes gestacional – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Fator	Coeficiente	Erro Padrão	Estatística de Wald	OR	IC (95%)		p
					Inferior	Superior	
IMC	0,059	0,028	4,56	1,06	1,01	1,12	0,033
IG no TTGO-100g	0,164	0,048	11,60	1,18	1,07	1,29	0,001
Glicemia 2h	0,011	0,005	5,22	1,01	1,01	1,02	0,022
Macrossomia anterior							
Não				1,00			
Sim	1,121	0,380	8,70	3,07	1,46	6,46	0,003
Constante	-10,89	1,918	32,25				<0,001

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Observe-se que gestantes com IMC mais elevado apresentam maior chance de RN GIG, sendo que a cada 1 Kg/m² a mais no IMC há aumento de 6% na chance do RN ser GIG.

Quanto mais tarde é feito o teste durante a gestação maior é a chance do RN ser GIG. Assim a cada aumento de 1mg/dL no valor da glicemia duas horas após a sobrecarga de glicose de 100g, existe aumento de 1% na chance do RN ser GIG.

Gestantes, com histórico de RN anterior macrossômico, apresentam chance de RN GIG 2,07 vezes maior que gestantes sem histórico.

O resultado do teste de Hosmer e Lemeshow apresentou adequação do modelo estimado ($p = 0,729$) e os resíduos não apresentaram fuga das suposições do modelo [55].

Foi ainda possível determinar uma fórmula para prever a probabilidade de ocorrência de RN GIG em gestações de mulheres portadoras de DMG, a saber:

$$\text{Prob(GIG)} = \frac{\exp(-10,89 + 0,059 \times \text{IMC} + 0,164 \times \text{IG teste} + 0,011 \times \text{Glicemia 2h} + 1,121 \text{ se tem histórico de GIG})}{1 + \exp(-10,89 + 0,059 \times \text{IMC} + 0,164 \times \text{IG teste} + 0,011 \times \text{Glicemia 2h} + 1,121 \text{ se tem histórico de GIG})}$$

4.2. ANÁLISE DE MARCADORES PLACENTÁRIOS

Para análise dos transportadores de glicose foram constituídos dois grupos:

Grupo AIG: 50 casos;

Grupo GIG: 44 casos.

Os 44/49 (89,79%) casos do Grupo GIG correspondem à totalidade de casos do grupo GIG que apresentavam blocos de parafina adequados para análise imunoistoquímica.

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Para verificar se o grupo selecionado por pareamento apresentava as mesmas características do grupo original (425 casos) foi realizada análise univariada com comparação entre os grupos AIG e GIG.

Observa-se que os casos selecionados para análise de transportadores de glicose exibem características semelhantes daquelas do grupo original. (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Descrição das características nominais segundo os grupos de estudo e resultado dos testes de associação – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso ao nascimento						p
	AIG		GIG		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Tabagismo							0,063*
Não	43	86,0	43	97,7	86	91,5	
Sim	7	14,0	1	2,3	8	8,5	
Antecedente familiar DM							0,319
Não	21	42,0	23	52,3	44	46,8	
Sim	29	58,0	21	47,7	50	53,2	
RN anterior ≥ 4000g							0,035
Não	44	88,0	31	70,5	75	79,8	
Sim	6	12,0	13	29,5	19	20,2	
RN anterior < 2500g							0,088
Não	39	78,0	40	90,9	79	84,0	
Sim	11	22,0	4	9,1	15	16,0	
HA							0,985
Não	34	68,0	30	68,2	64	68,1	
Sim	16	32,0	14	31,8	30	31,9	
Insulina^a							0,269
Não	29	58,0	20	46,5	49	52,7	
Sim	21	42,0	23	53,5	44	47,3	
Sexo Rn^a							0,989
Feminino	21	42,0	18	41,9	39	41,9	
Masculino	29	58,0	25	58,1	54	58,1	
APGAR 1							0,171
< 7	11	22,0	5	11,4	16	17,0	
≥ 7	39	78,0	39	88,6	78	83,0	
APGAR 5							0,058*
< 7	5	10,0	0	0,0	5	5,3	
≥ 7	45	90,0	44	100,0	89	94,7	
Tipo de parto							0,239#
Normal	8	16,0	6	13,6	14	14,9	
Fórcipe	7	14,0	2	4,5	9	9,6	
Cesárea	35	70,0	36	81,8	71	75,5	

Resultado dos testes qui-quadrado; * Resultado do teste exato de Fisher; a Nem todos possuem as informações; HA: hipertensão arterial

Tabela 10. Descrição das variáveis quantitativas maternas segundo os grupos de estudo e os resultados dos testes de comparação – HC-FMUSP-2003 a 2009.

Variável	Classificação do peso ao nascimento	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Idade (anos)	AIG	33,20	5,70	35,0	21,0	44,0	50	0,888
	GIG	33,36	5,46	35,0	21,0	42,0	44	
	Total	33,28	5,56	35,0	21,0	44,0	94	
IMC (Kg/m ²)	AIG	27,08	4,50	26,1	19,6	38,2	50	0,035
	GIG	29,21	5,14	29,6	19,1	40,6	44	
	Total	28,07	4,90	27,7	19,1	40,6	94	
IG no teste (semanas)	AIG	28,86	3,79	29,1	18,1	36,3	50	0,003
	GIG	31,25	3,66	30,7	17,1	37,4	44	
	Total	29,98	3,90	29,8	17,1	37,4	94	
Glicemia jejum	AIG	93,22	16,78	92,0	69,0	133,0	50	0,104
	GIG	98,55	14,33	100,0	64,0	132,0	44	
	Total	95,71	15,82	93,5	64,0	133,0	94	
Glicemia 1h	AIG	196,94	30,44	199,0	123,0	273,0	50	0,651
	GIG	193,95	33,27	193,0	103,0	265,0	44	
	Total	195,54	31,66	197,5	103,0	273,0	94	
Glicemia 2h	AIG	181,44	32,99	173,0	117,0	311,0	50	0,014
	GIG	198,39	32,24	196,0	135,0	268,0	44	
	Total	189,37	33,56	181,5	117,0	311,0	94	
Glicemia 3h	AIG	141,06	37,27	145,5	57,0	269,0	50	0,013
	GIG	159,89	34,73	156,0	85,0	244,0	44	
	Total	149,87	37,13	150,0	57,0	269,0	94	
Gestações	AIG	2,88	2,14	2,0	1,0	11,0	50	0,177#
	GIG	3,02	1,44	3,0	1,0	6,0	44	
	Total	2,95	1,84	3,0	1,0	11,0	94	
Partos	AIG	1,28	1,43	1,0	0,0	7,0	50	0,185#
	GIG	1,50	1,13	1,0	0,0	4,0	44	
	Total	1,38	1,30	1,0	0,0	7,0	94	
Abortos	AIG	0,51	1,02	0,0	0,0	5,0	49	0,643#
	GIG	0,43	0,66	0,0	0,0	3,0	44	
	Total	0,47	0,87	0,0	0,0	5,0	93	
IG Parto (semanas)	AIG	38,56	1,38	38,9	34,0	40,7	50	0,879
	GIG	38,50	2,16	39,0	26,7	40,3	44	
	Total	38,53	1,78	38,9	26,7	40,7	94	
Peso RN (g)	AIG	3228,40	394,52	3265,0	2340,0	3990,0	50	<0,001
	GIG	4132,86	280,28	4125,0	3330,0	5080,0	44	
	Total	3651,77	569,38	3650,0	2340,0	5080,0	94	

Resultado do teste t-Student; # Resultado do teste Mann-Whitney; RN: recém-nascido.

4.2.2. ANÁLISE DA PLACENTA

As características da placenta foram analisadas nos dois grupos e pudemos perceber que no grupo de gestações que resultaram em RN GIG, o peso da placenta e a espessura da placenta são em média maiores ($p < 0,001$ e $p = 0,019$ respectivamente) (Tabela 11).

Tabela 11. Descrição das medidas placentárias segundo os grupos estudados e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação Peso RN	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Peso placenta (g)	AIG	490,10	108,49	485,00	285	860	50	<0,001
	GIG	595,00	116,14	587,50	360	840	44	
	Total	539,20	123,32	532,50	285	860	94	
Espessura placenta (mm)	AIG	2,97	0,74	3,00	2	5	50	0,019
	GIG	3,39	0,96	3,35	2	6	44	
	Total	3,16	0,87	3,00	2	6	94	
Área (mm ²)	AIG	301,58	63,82	294,25	189	475	50	0,183
	GIG	320,13	70,28	292,75	210	520	44	
	Total	310,26	67,20	294,25	189	520	94	
Espessura cordão (mm)	AIG	1,36	0,44	1,30	0,9	3	50	0,860
	GIG	1,38	0,38	1,30	1	2,3	44	
	Total	1,37	0,41	1,30	0,9	3	94	

Resultado do teste t-Student

4.2.3. ANÁLISE DOS TRANSPORTADORES DE GLICOSE

Tabela 12. Descrição da expressão dos marcadores segundo classificação do peso do RN, e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Classificação Peso do RN				Total		p
	AIG		GIG				
	n	%	n	%	n	%	
GLUT1 Decídua							0,178
+	44	89,8	35	79,5	79	84,9	
++	4	8,2	8	18,2	12	12,9	
+++	1	2,0	1	2,3	2	2,2	
GLUT1 Vilosidade							0,034
+	43	86,0	30	68,2	73	77,7	
++	6	12,0	10	22,7	16	17,0	
+++	1	2,0	4	9,1	5	5,3	
GLUT3 Decídua							0,728
+	32	64,0	26	65,0	58	64,4	
++	13	26,0	13	32,5	26	28,9	
+++	5	10,0	1	2,5	6	6,7	
GLUT3 Vilosidade							0,159
+	45	90,0	39	97,5	84	93,3	
++	5	10,0	1	2,5	6	6,7	
GLUT4 Decídua							0,582
+	18	36,7	16	38,1	34	37,4	
++	20	40,8	20	47,6	40	44,0	
+++	11	22,4	6	14,3	17	18,7	
GLUT4 Vilosidade							0,375
+	20	40,0	11	25,0	31	33,0	
++	21	42,0	27	61,4	48	51,1	
+++	9	18,0	6	13,6	15	16,0	

Resultado do teste Mann-Whitney

Na tabela 12 podemos observar que a expressão de Glut1 nas vilosidades coriônicas foi estatisticamente maior nas placentas de RN GIG (p = 0,034). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais transportadores de glicose.

Tabela 13. Descrição da expressão dos marcadores segundo insulinoterapia e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Variável	Insulinoterapia				Total		p
	Não		Sim				
	N	%	N	%	N	%	
GLUT1 Decídua	0		1				0,108
+	38	79,2	40	90,9	78	84,8	
++	8	16,7	4	9,1	12	13,0	
+++	2	4,2	0	0,0	2	2,2	
GLUT1 Vilosidade							0,635
+	37	75,5	35	79,5	72	77,4	
++	9	18,4	7	15,9	16	17,2	
+++	3	6,1	2	4,5	5	5,4	
GLUT3 Decídua							0,559
+	33	68,8	25	61,0	58	65,2	
++	11	22,9	14	34,1	25	28,1	
+++	4	8,3	2	4,9	6	6,7	
GLUT3 Vilosidade							0,231
+	44	91,7	40	97,6	84	94,4	
++	4	8,3	1	2,4	5	5,6	
GLUT4 Decídua							0,336
+	19	39,6	14	33,3	33	36,7	
++	22	45,8	18	42,9	40	44,4	
+++	7	14,6	10	23,8	17	18,9	
GLUT4 Vilosidade							0,057
+	19	38,8	12	27,3	31	33,3	
++	26	53,1	21	47,7	47	50,5	
+++	4	8,2	11	25,0	15	16,1	

Resultado do teste Mann-Whitney

Avaliou-se ainda a relação entre uso de insulina e expressão de transportadores de glicose. Observou-se tendência à maior expressão de GLUT4 nas vilosidades coriônicas no grupo que utilizou insulina como tratamento (Tabela 13).

5. DISCUSSÃO

Os desvios do crescimento fetal representam fator de risco importante na ocorrência de complicações no período perinatal como; prematuridade, distúrbios metabólicos, cardiovasculares e até morte fetal [56, 57]. Na vida adulta, os fetos submetidos aos devidos de crescimento, sejam PIG ou GIG, apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de doenças metabólicas como diabetes, obesidade e complicações cardiovasculares [58-62].

Quando avaliamos as gestações que resultaram em RN GIG, são descritas maiores frequências de complicações gestacionais nesses fetos, especialmente os macrossômicos, como: rotura prematura de membranas, prematuridade, tocotraumatismos e asfixia neonatal [63]. As repercussões maternas dessas gestações são a maior ocorrência de partos cesárea, distúrbios hemorrágicos do puerpério e síndromes hipertensivas [64].

Na vida adulta os fetos macrossômicos apresentam maiores riscos de desenvolver distúrbios metabólicos e cardiovasculares (Grassi A.). A análise de 493 gestantes de origem afro-americana das quais 7,1% apresentavam DMG, demonstrou haver relação significativamente estatística entre a obesidade infantil (de 2 a 5 anos de vida) e ocorrência de diabetes gestacional [65].

Sabe-se que o diabetes gestacional é um dos principais fatores de risco para a ocorrência de RN GIG e que o controle glicêmico adequado durante o pré-natal é fundamental para garantir que o ciclo fisiopatológico imposto por essa condição clínica seja quebrado evitando-se assim que novos casos de obesidade e de diabetes se instalem [24].

Considerando-se todas essas complicações que são observadas de forma mais proeminente em casos de RN GIG, nosso objetivo foi analisar os fatores de risco clínicos e laboratoriais maternos capazes de prever a ocorrência de RN GIG e avançar no estudo da expressão dos marcadores de transporte de glicose do tipo GLUT1, GLUT3 e GLUT4 nas placentas dos RN AIG e GIG, em mulheres com diagnóstico de DMG.

ANÁLISE DE ASPECTOS METODOLÓGICOS DO ESTUDO

Embora a análise dos dados, de mulheres com DMG, que realizaram seguimento de pré-natal e parto na Divisão de Divisão de Clínica Obstétrica do HC-FMUSP, tenha sido feita de forma retrospectiva, é importante salientar que esses dados foram coletados prospectivamente de forma informatizada desde 2002. O rigor no seguimento do protocolo de condutas realizado no setor assegura a veracidade e a uniformidade dos dados colhidos. Observe-se também que os protocolos seguidos durante o período de estudo, 2003 a 2009, foram mantidos no que se refere à assistência pré-natal dessas gestantes [66].

Para análise dos fatores clínicos e laboratoriais associados à ocorrência de RN GIG o número total de casos foi mantido permitindo adequada aplicação do modelo de regressão logística e dessa forma possibilitou a identificação dos fatores preditores da ocorrência de RN GIG.

Nesse estudo utilizou-se como critério diagnóstico para DMG o TTGO com sobrecarga de 100 gramas de glicose. Não foram incluídas no estudo pacientes que tiveram diagnóstico de DMG por quaisquer outros critérios.

Inúmeros são os critérios utilizados nos dias de hoje para o diagnóstico de DMG podendo ser realizado desde glicemias aleatórias, glicemia de jejum ou teste de tolerância à glicose oral. Contudo, na grande maioria das vezes os critérios utilizados para o diagnóstico de DMG são obtidos por meio da realização dos testes de sobrecarga à glicose oral de 75 ou 100 gramas entre 24 a 28 semanas [67].

As diferenças, quanto aos métodos e critérios laboratoriais para os diagnósticos de DMG, dificultam, em muitas vezes, a comparação de resultados. Por isso, em nosso estudo utilizamos apenas o TTGO-100g.

Para a análise dos transportadores de glicose fez-se a opção pela seleção de todos os casos de placentas de gestações com RN GIG, pareados com placentas de gestações que resultaram em RN AIG. A opção pelo pareamento visou à viabilização do estudo no que se refere à

operacionalização e custos. Para confirmar que o grupo - RN AIG - selecionado fosse semelhante ao grupo original foi realizada análise univariada entre os grupos utilizados no pareamento. A semelhança dos resultados obtidos demonstra adequação do pareamento e, portanto, a viabilidade de continuidade do estudo com os transportadores de glicose.

Ressalta-se que à análise dos blocos de placenta foi possível devido a encaminhamento rotineiro, para processamento e armazenamento no setor de anatomia patológica, de todas as placentas dos casos de diabetes gestacional.

Na análise observou-se que em apenas cinco casos do grupo de RN GIG os blocos de parafina armazenados de placenta não se encontravam adequados para a realização dos experimentos, sendo excluídos do estudo de marcadores de transporte de glicose, assegurando a representatividade dos casos analisados.

A técnica de TMA utilizada nesse estudo apresentou como vantagem a possibilidade da análise simultânea de vários casos gerando economia de tempo e de insumos. Alguns cuidados realmente precisam ser tomados na utilização dessa técnica sendo um dos maiores a escolha correta da área a ser analisada.

É importante salientar que nesse estudo todas as áreas foram selecionadas por um único patologista, com grande experiência na análise de placentas, Dra. Regina Schultz que reviu todas as lâminas efetuando a marcação das áreas de interesse processadas na confecção do TMA, garantido a homogeneidade e qualidade das amostras.

QUANTO À ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES CLÍNICOS E A OCORRÊNCIA DE RN GIG

As características familiares, hábitos e estilos de vida influenciam a transcrição epigenética do ambiente intrauterino e desta forma o genótipo fetal pode produzir mais de um fenótipo dependendo das condições pré e pós-natais as quais esses indivíduos foram submetidos. No caso de RN GIG, algumas características maternas, envolvidas nessas transcrições intrauterinas, podem apresentar maior associação com esse desfecho e suas consequências na idade adulta [68].

Existem diversos fatores que afetam o peso do recém - nascido como as características de peso e altura dos pais, hereditariedade, nível sócio econômico, etnia, sexo, tabagismo e álcool, e em especial doenças metabólicas como o diabetes [24, 69].

Estudo de coorte envolvendo 146526 gestantes demonstrou que RN masculinos apresentam RR de 1,65 de nascerem com peso superior a 4000 gramas.

A idade materna e o diabetes gestacional apresentaram associação com a macrossomia [70]. Esse dado difere do observado em nosso estudo em que a idade materna não diferiu estatisticamente entre os grupos de RN AIG e GIG.

O IMC no presente estudo foi significativamente mais elevado no grupo de RN GIG, confirmando os achados da literatura que atestam que quanto maior o IMC maior é risco de desenvolvimento de fetos macrossômicos. Sabe-se que a obesidade materna, representada pelo IMC pré-gestacional e pelo ganho excessivo de peso durante a gestação, é fator de risco associado à macrossomia [71].

Na análise de 2454 diabéticas gestacionais, a obesidade pré-gravídica, definida pelo IMC superior a 29 kg/m², aumentou em seis vezes o risco de RN macrossômicos [72]. Kerche et al. demonstraram que IMC pré-gestacional superior a 25 kg/m² aumenta em duas vezes a chance de ocorrer macrossomia [73].

Analisando 209 diabéticas gestacionais, Gutaj et al. também observaram aumento da frequência de nascimento de fetos com peso maior 4.300g em mulheres com IMC superior a 25 kg/m² [74]. Estudo nacional também relaciona o IMC maior que 25 kg/m² com aumento de probabilidade fetos RN GIG [21].

É importante descrever que esse fator além de se associar a ocorrência de GIG foi também selecionado pelo modelo de regressão logística como preditor independente desse evento.

Não houve diferença entre os grupos em relação à frequência de antecedente familiar de diabetes melito, porém observe-se que a frequência desse achado nos dois grupos foi elevada, superior a 50% dos casos e dos controles. Logo, o antecedente familiar de diabetes nesse estudo pode estar associado à ocorrência de DMG e não de macrosomia fetal.

A hipertensão na gestação é uma complicação materna comumente associada à macrosomia fetal e ao diabetes gestacional [64]. Em nosso estudo a prevalência de hipertensão foi semelhante nos grupos de RN AIG e GIG com ocorrência superior a 30%, o que pode ser justificado pelas características dessa unidade hospitalar terciária, que presta atendimento à gestações de alto risco.

Entretanto, Evers et al. não encontrou diferença na frequência de hipertensão gestacional entre mães com RN GIG e AIG, dado semelhante ao nosso estudo. A doença hipertensiva está associada à restrição do crescimento intra-uterino e, de certa forma, poderia ser fator protetor para o crescimento fetal exagerado [75].

Bartha et al. observaram maior prevalência de síndrome metabólica em gestantes portadoras de hipertensão quando comparadas a gestantes com DMG, sugerindo que, em situações de descontrole pressórico seria facilitado o desenvolvimento de danos vasculares endoteliais responsáveis pela resistência periférica de insulina futura [76].

Com relação ao hábito de fumar, esse foi mais frequentemente observado no grupo de RN AIG. Porém, o baixo número de gestantes tabagistas em casos de RN GIG dificulta uma análise estatística adequada. Por outro lado, é conhecido o fato que o de hábito de fumar apresenta maior risco para RN PIG provavelmente pelas alterações vasculares provocadas pelo tabagismo. Gestantes com diabetes tipo 1 apresentam relação direta e significativa entre ausência de tabagismo e macrosomia fetal [75].

A utilização de insulina foi estatisticamente maior no grupo de gestantes que resultou em RN GIG. Apesar de confirmar a maior gravidade desses casos, esse dado só poderia ser computado no dia do parto perdendo sua força com agente preditor, objetivo desse estudo.

O Uso ou não de insulina não deve ser a questão mais importante, mas sim a resposta para manter a normoglicemia. Em nosso meio, Thatianne et al., em 2012, demonstrou em casos de DMG que a média de pesos dos recém nascidos foi significativamente maior no grupo que apresentou maior percentual de hiperglicemias (tese Thati).

Os antecedentes obstétricos, número de gestações, partos e abortos não demonstraram diferenças estatísticas em entre os grupos de RN GIG e AIG. A paridade não representou risco para a macrosomia fetal sendo uma característica natural de mulheres com idade mais avançada, mais vulneráveis ao diabetes clínico tipo 2 ou ao diabetes gestacional, o que favorece o crescimento fetal exagerado [77].

O histórico pessoal de macrosomia fetal esteve associado à ocorrência de RN GIG e sua análise demonstrou que o mesmo é preditor independente para esse desfecho. Estudo realizado em nosso meio, por Sapienza et al., demonstrou a associação entre antecedente de macrosomia fetal e o uso de insulina, ou seja a macrosomia anterior pode nos sugerir uma maior gravidade na doença atual e portanto maior risco de RN GIG [78].

Outros estudos também demonstraram que o antecedente de macrosomia fetal associa-se com o aumento de frequência de macrosomia em gestações futuras [78, 79].

Finalmente, Boulet et al. relacionaram o peso do recém nascido anterior com o risco de macrosomia na gestação atual. Observam que quanto mais elevado o peso do recém - nascido anterior, maior o risco de macrosomia em gestações subsequentes [68].

QUANTO À ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS E A OCORRÊNCIA DE RN GIG

Optamos em nosso estudo em utilizar como critério diagnóstico para o DMG os valores alterados do TTGO-100g e verificar a associação dos valores de jejum, uma, duas e três horas pós-sobrecarga com a ocorrência de RN GIG foi um dos nossos interesses. A idade gestacional do teste mostrou-se mais elevada no grupo de RN GIG quando comparada ao grupo controle.

Gonzalez-Quintero et al. Encontraram associação entre a idade gestacional na qual o diagnóstico de DMG foi realizado e a probabilidade dos uso de insulina nesses casos, ou seja à gravidade do caso [80].

Considerando-se que a fisiopatologia do DMG é similar ao do diabetes do tipo 2, a dificuldade na metabolização dos carboidratos é mais evidente nos momentos após sobrecarga glicêmica do que na glicemia de jejum. Por isso, que a glicemia de duas e três horas foi relacionada com o peso dos RN estudados [81].

Observe-se que, quando considerados os fatores preditores da ocorrência de RN GIG, encontramos o antecedente obstétrico de macrosomia e o IMC pré-gravídico elevado que traduzem uma possível intolerância à glicose pré-existente. A idade gestacional no TTGO-100g e os valores da glicemia nesse teste, por outro lado, apontam para uma maior gravidade da doença o que pode ser confirmado por esses fatores também terem sido os mesmos selecionados por Sapienza et al. quando o objetivo foi prever a necessidade de utilização da insulina [78].

QUANTO À ASSOCIAÇÃO DE TRANSPORTADORES DE GLICOSE E A OCORRÊNCIA DE RN GIG

O principal substrato nutricional para o metabolismo fetal é a glicose, obtida da circulação materna e, conseqüentemente, os mecanismos responsáveis por sua absorção e transporte são muito importantes.

A glicose é importante, não só para o metabolismo fetal, mas também para a própria placenta que apresenta taxas de consumo três vezes maior que a utilizada pelo feto [2].

Comparativamente o suprimento de glicose na placenta é muito mais elevado que em qualquer tecido fetal assegurando que a principal função placentária é manter o equilíbrio adequado entre a oferta de glicose para o feto e para a própria placenta.

Dessa forma, o transporte de glicose por meio da placenta ocorre por um mecanismo de difusão facilitada através dos transportadores de glicose (GLUT).

A análise placentária da expressão dos transportadores de glicose do tipo GLUT1, GLUT3 e GLUT4 foi avaliada nas regiões das vilosidades coriônicas e decídua.

O GLUT1 não apresentou, na região da decídua, uma marcação que difira estatisticamente entre as gestantes que tiveram RN AIG e GIG. Em contrapartida, as regiões das vilosidades coriônicas apresentaram uma diferença entre os dois grupos analisados.

O GLUT1 é expresso em uma grande variedade de tecidos humanos, apresentando uma expressão elevada no sítio placentário. É considerado o principal transportador de glicose na placenta humana [58-60].

Vários estudos demonstram que com o evoluir da gestação a concentração do GLUT1 segue paralelamente as curvas de crescimento fetal aumentando o transporte de glicose para o adequado crescimento [59].

A maior concentração de GLUT1 é coerente com os resultados visto que as membranas das vilosidades coriônicas apresentam características anatômicas propícias para suporte e transferências adequados de glicose para o feto, por estarem em íntimo contato com sangue intervilo [59, 61, 82].

Alterações dos níveis de GLUT1 na placenta são demonstrados em situações que comprometem o crescimento fetal como a restrição de crescimento intra-uterino (RCF), a hipóxia fetal e o diabetes na gravidez. A RCF e a hipóxia fetal promovem, na placenta, devido as alterações histopatológicas, consumo placentário exagerado de glicose ocasionado diminuição do transporte de glicose ao feto. Nessas situações a expressão do GLUT1 pode diminuir em até 40% [83-85]. Nas gestações complicadas por diabetes observa-se um aumento na expressão do GLUT1 quando comparados a controles não diabéticos [36].

Assim, o aumento do transporte placentário de nutrientes pode contribuir para o aumento do crescimento fetal em resposta a hiperglicemia. O fornecimento de nutrientes intra-uterinos responsáveis pelo metabolismo e crescimento fetal seriam responsáveis pela programação uterina de doenças que surgiram na idade adulta [86].

A análise do GLUT3 não apresentou, na região da decídua e das vilosidades coriônicas, marcações que diferem estatisticamente entre as gestantes que tiveram RN AIG e GIG.

O GLUT3 apresenta maior expressão nas células do citotrofoblasto apresentando pouca coloração no sinciciotrofoblasto fato esse que deverá ser analisado em nossos casos brevemente [87, 88].

Outros estudos demonstram que expressão do GLUT3 nos diversos componentes celulares placentários é mais marcante no primeiro trimestre da gestação diminuindo sua expressão ao evoluir da gestação, o que pode justificar nossos achados [59, 89]. São escassos os relatos na literatura de estudos que avaliaram a expressão desse transportador de glicose em gestações a termo. Devido a isso também nosso interesse em avaliar este transportador.

Acredita-se que o GLUT3 diminui sua marcação à medida que a gestação evolui e que em gestações a termo possa até mesmo estar ausente, sendo um marcador de transporte de glicose para gestações no primeiro trimestre.

No início da gestação a circulação placentária é limitada para o aporte nutricional do feto, logo há necessidade que um transportador de glicose eficiente e de alta afinidade aos níveis de glicose como GLUT3 seja responsável pelo aporte desse nutriente assegurando o crescimento fetal [90].

Na análise comparativa entre a afinidade da glicose com seus transportadores observou-se que o GLUT3 apresenta afinidade superior ao GLUT1 [91]. Esse fato demonstra o papel do GLUT3, fundamental na regulação do transporte de glicose, em especial nas situações em que as concentrações de glicose apresentam-se abaixo dos níveis normais na circulação e nos tecidos.

Alguns tecidos considerados nobres como o cérebro dependem dessa regulação realizada pelo GLUT3 para sua integridade. A ação evidente da atuação do GLUT3 parece estar relacionada às alterações dos níveis sanguíneos de glicose particularmente em relação à hipoglicemia.

Esses fatos podem explicar porque que a expressão do GLUT3 em nossos casos não foi significativa pois, as placentas na sua maioria foram avaliadas no termo e as taxas de hipoglicemias são raras em casos de DMG.

QUANTO À ASSOCIAÇÃO DE TRANSPORTADORES DE GLICOSE DO TIPO GLUT4 E A OCORRÊNCIA DE RN GIG

Igualmente ao GLUT3, a análise do GLUT4 não apresentou, na região da decídua e das vilosidades coriônicas, marcações que diferem estatisticamente, entre às gestantes que tiveram RN AIG e GIG. Apesar de nos grupos de RN AIG e GIG a frequência de uso de insulina ter sido semelhante, o uso de insulina poderia alterar a expressão dos transportadores de glicose. Em nosso estudo observou-se uma tendência de maior expressão de GLUT4 nas vilosidades no grupo que utilizou insulina como tratamento.

Tanto os receptores de GLUT4, como os de insulina tem uma preferência de localização em células estromais, como os fibroblastos, sugerindo que a insulina possa regular a absorção de glicose na região amnionica e dos fibroblastos placentários [92, 93].

A placenta humana é ricamente dotada de receptores de insulina, e o transportador de glicose do tipo GLUT4 é principal isoforma relacionada associada à resposta insulínica [94, 95]. A alta especificidade do GLUT4 pelas células intravilosas estromais poderia ocasionar uma dificuldade de identificar esse marcador na camada do sinciotrofoblasto da placenta humana [96].

A insulina de origem materna não ultrapassa a barreira placentária sugerindo que a insulina fetal seja a responsável pela regulação do transportador de glicose do tipo GLUT4 [97, 98].

Há somente um estudo na literatura que relatou o efeito da insulina sobre a captação de glicose fetal em ovelhas no qual conclui - se que a insulina materna não apresenta regulação sobre a placenta no termo da gestação. Contudo, o controle glicêmico adequado propiciado pelo tratamento seria responsável pela queda dos níveis de hiperinsulinismo fetal, reflexo dos níveis glicêmicos maternos, de tal forma que poderia haver até uma diminuição da expressão da secreção do GLUT4 controlada pela insulina fetal [99].

Em síntese, os transportadores de glicose através das suas isoformas apresentam localizações e papéis distintos de ações no mecanismo regulatório do transporte de nutrientes para o adequado crescimento fetal. Algumas situações clínicas metabólicas, como o diabetes, podem ser responsáveis por interferir na expressão desses transportadores de glicose alterando o mecanismo de aporte nutricional fetal ocasionando desvios do crescimento.

Com relação aos transportadores de glicose analisados em nosso estudo, observamos que na placenta humana de casos de DMG:

- O GLUT1 apresenta-se como o principal transportador de glicose, localizado nas vilosidades coriônicas, sendo responsável pela transferência da glicose da circulação materna para o feto. Em nosso estudo, isso explicaria o porquê da diferença de expressão do GLUT1 nas vilosidades coriônicas entre os grupos de RN GIG e AIG.
- GLUT3 desempenharia sua ação mais efetiva no início da gestação com uma expressão influenciada por níveis glicêmicos baixos. Na placenta a termo e, em especial no DMG, em que os episódios de hipoglicemia são raros, sua expressão não demonstrou ser significativamente diferente entre os grupos casos e controles de RN.
- GLUT4 é o transportador de glicose com mais afinidade a resposta de insulina. O GLUT4 não apresentou diferença significativa de expressão nas regiões das vilosidades coriônicas e decídua entre os grupos de RN casos e controles. A procura por outras áreas como a região das membranas, poderia nos fornecer uma nova leitura da possível relação entre os desvios de crescimento fetal e a expressão do GLUT4.

Surgem evidências que mesmo com bom controle glicêmico, em gestantes com DMG, alguns casos não se comportam da forma esperada em relação ao crescimento fetal, sugerindo a existência de outros mecanismos que atuem nesse processo [100].

Apesar do conhecimento de fatores de risco associados aos desvios de crescimento fetal, não são conhecidos indicadores que possam prever a ocorrência desse evento e, portanto, evitá-lo. Em pacientes com DMG, as propostas de tratamento existentes que tem como objetivo o crescimento fetal, levam em consideração o controle da glicemia, porém sem avaliar de forma conjunta os demais fatores de risco como ocorrência de doenças relacionadas à restrição de crescimento fetal como o IMC.

A procura de fatores clínicos e laboratoriais preditores dos desvios de crescimento fetal e a análise dos mecanismos que influenciam o controle desse crescimento na placenta poderá ser ferramenta útil no entendimento dos desvios de crescimento, nos casos de DMG.

Saber o que acontece na interface materno-fetal poderá nortear a pesquisa de outros marcadores que acrescidos aos fatores clínicos e laboratoriais encontrados possam prever o risco de desvios do crescimento fetal e assim possibilitar intervenção positiva na correção desta intercorrência. [16, 26].

Em síntese, o crescimento fetal é regulado pelo equilíbrio entre a demanda fetal de nutrientes, determinada por seu potencial de crescimento genético, e pelo transporte e fornecimento placentário de nutrientes, em especial de glicose.

O papel da insulina na fisiopatologia do crescimento fetal é demonstrado pelos efeitos diretos e indiretos na estimulação da síntese de glicogênio placentário e angiogênese induzida por insulina via hipoxia fetal [41]. Com base nestes dados, sugere-se que existe uma ligação entre a resistência à insulina durante a gravidez e a resposta inflamatória ao nível da transcrição do gene da placenta [101].

A importância desta análise baseia-se na evidência que alterações ou desvios do peso fetal ao nascimento trazem prejuízos não somente ao momento do nascimento e sim na gênese de doenças futuras nestes indivíduos. Estudos da composição corporal têm mostrado que a deposição de gordura e massa gorda fetal neonatal é significativamente aumentada em crianças de mulheres com DMG [102, 103]

COLABORAÇÃO DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nosso estudo vem reforçar os aspectos de alguns fatores clínicos e laboratoriais como preditores da ocorrência de RN GIG no. A utilização de uma fórmula de probabilidade de ocorrência de RN GIG que utiliza-se de dados de anamnese e do exame de TTGO-100g é ferramenta útil para o enfrentamento desse problema por meio da estimativa de risco dessa ocorrência bem como possibilitando orientar melhor planejamento de gravidezes futuras com a correção de alguns fatores envolvidos.

O conhecimento da expressão dos fatores placentários preenche mais uma lacuna no complexo sistema placentário de regulação do crescimento fetal e sua análise pós-gestacional pode contribuir na mensuração da qualidade do seguimento e manejo terapêutico do DMG em relação ao crescimento fetal; diminuindo a ocorrência de RN GIG e conseqüentemente reduzindo as complicações neonatais e maternas do DMG.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo em gestações com DMG visou identificar fatores clínicos e laboratoriais preditores da ocorrência de RN GIG e também avaliar a expressão de marcadores de transporte de glicose do tipo GLUT1, GLUT3 e GLUT na placenta. Foram observadas relações significativamente estatísticas em relação aos seguintes fatores:

Fatores Clínicos: índice de massa corpórea, tabagismo, uso de insulina e antecedente antecedente de RN macrossômico.

Fatores Laboratoriais: idade gestacional da realização do TTG0-100g e valores da glicemia 2 e 3 horas após a sobrecarga de 100g de glicose oral.

Fatores Clínicos e laboratoriais considerados preditores: índice de massa corpórea, antecedente de RN macrossômico, idade gestacional da realização do TTG0-100g e valor da glicemia 2 horas após a sobrecarga de 100g de glicose oral.

Marcadores Placentários: transportador de glicose do tipo GLUT1 nas regiões das vilosidades coriônicas.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0646/09**, intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES PREDITORES E DOS RESULTADOS PERINATAIS DOS FETOS COM DESVIOS DE PESO EM GESTANTES DIABÉTICAS GESTACIONAIS**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco**

Pesquisador (a) Executante: **Douglas Bernal Tiago**

CAPPesq, 01 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das variáveis quantitativas maternas (Índice de Massa Corpórea e Idade Materna) nos diferentes grupos (AIG, GIG) – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 2. Descrição das características nominais segundo os grupos de estudos e os resultados dos testes de associação com tabagismo, antecedente familiar de diabetes melito, antecedentes pessoais de hipertensão arterial sistêmica e de lúpus eritematoso sistêmico e uso de insulina. – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 3. Descrição das variáveis quantitativas e resultado dos testes de comparação com relação à análise dos antecedentes obstétricos nos diferentes grupos (AIG, GIG). – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 4. Descrição das características nominais segundo os grupos estudados (AIG e GIG) e os resultados dos testes de associação com classificação do peso de recém - nascido anterior categorizado em dois grupos: ≥ 4000 gramas e ≤ 2.500 gramas – HC-FMUSP- 2003 a 2009

Tabela 5. Descrição das variáveis quantitativas segundo os diferentes grupos de RN AIG e GIG e os resultados dos testes de comparação com a idade gestacional de realização do teste TTOG-100g e valores das glicemias de jejum, 1, 2 e 3 horas após a sobrecarga de 100gramas de glicose – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 6. Descrição das variáveis quantitativas segundo os diferentes grupos de RN AIG e GIG e os resultados dos testes de comparação com a idade gestacional no momento do parto e peso médio do recém - nascido – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 7. Descrição das características nominais segundo os grupos estudados (AIG e GIG) e os resultados dos testes de associação com gênero do RN (sexo), Índices de Apgar e tipo de parto realizado – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 8. Resultado do modelo de Regressão logística multivariada para predição da ocorrência de RN GIG em gestações com diabetes gestacional – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 9. Descrição das características nominais segundo os grupos de estudo e resultado dos testes de associação – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 10. Descrição das variáveis quantitativas maternas segundo os grupos de estudo e os resultados dos testes de comparação – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 11. Descrição das medidas placentárias segundo os grupos estudados e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 12. Descrição da expressão dos marcadores segundo classificação de Alexander e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

Tabela 13. Descrição da expressão dos marcadores segundo insulinoterapia e resultado das comparações– HC-FMUSP- 2003 a 2009.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte histológico representativo do TMA. A) Decídua (d) e vilosidade (v); B) Vilosidade coriônica; C) Observar na decídua as células do citotrofoblasto extraviloso (evt). Hematoxilina-eosina.

Figura 2: Construção do *tissue microarray* (TMA). A) visão do equipamento MTA-1; B) Preparação do bloco receptor; C) Introdução do fragmento no bloco receptor; D) Bloco receptor parcialmente montado; E) Bloco receptor finalizado; F) Lâmina do TMA corado pela HE.

Figura 3: Placentas a termo. As figuras mostram imagens representativas de imunomarcação GLUT-1 (A), GLUT-3 (B), GLUT-4 (C), citoqueratina-7 (D) e controle negativo (E). Nota-se marcação presente no sinciciotrofoblasto (setas) em todos os grupos, citotrofoblasto extraviloso (evt) na decídua em B e C, vasos vilosos (vv) em A e vasos maternos (vm) em B e C.

Figura 4: Análises qualitativas das marcações para as reações de imunoistoquímicas A) +; B) ++; C) +++. Imunoistoquímica revelação fostatase alcalina, contra coloração Hematoxilina de Mayer.

Figura 5: Constituição da amostra final – HC-FMUSP- 2003 a 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes, A., *Gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S103-5.
2. Bener, A., N.M. Saleh, and A. Al-Hamaq, *Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons*. Int J Womens Health, 2011. **3**: p. 367-73.
3. Group, H.S.C.R., et al., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
4. Black, M.H., et al., *The relative contribution of prepregnancy overweight and obesity, gestational weight gain, and IADPSG-defined gestational diabetes mellitus to fetal overgrowth*. Diabetes Care. **36**(1): p. 56-62.
5. Alexander, G.R., et al., *A United States national reference for fetal growth*. Obstet Gynecol, 1996. **87**(2): p. 163-8.
6. Clausen, T.D., et al., *High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia*. Diabetes Care, 2008. **31**(2): p. 340-6.
7. Schaefer-Graf, U.M., et al., *Birth weight and parental BMI predict overweight in children from mothers with gestational diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(7): p. 1745-50.

8. Silverman, B.L., et al., *Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism.* Diabetes Care, 1995. **18**(5): p. 611-7.
9. Langer, O., et al., *Intensified versus conventional management of gestational diabetes.* Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(4): p. 1036-46; discussion 1046-7.
10. Conway, D.L., *Obstetric management in gestational diabetes.* Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 2**: p. S175-9.
11. Jovanovic-Peterson, L., et al., *Maternal postprandial glucose levels and infant birth weight: the Diabetes in Early Pregnancy Study. The National Institute of Child Health and Human Development--Diabetes in Early Pregnancy Study.* Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(1 Pt 1): p. 103-11.
12. Ehrlich, S.F., et al., *The risk of large for gestational age across increasing categories of pregnancy glycemia.* Am J Obstet Gynecol, 2011. **204**(3): p. 240 e1-6.
13. Marini, M., et al., *Effect of impaired glucose tolerance during pregnancy on the expression of VEGF receptors in human placenta.* Reprod Fertil Dev, 2008. **20**(7): p. 789-801.
14. Pietro, L., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women.* Placenta, 2010. **31**(9): p. 770-80.

15. Jiang, H., et al., *Levels of insulin-like growth factors and their receptors in placenta in relation to macrosomia*. Asia Pac J Clin Nutr, 2009. **18**(2): p. 171-8.
16. Combs, C.A., et al., *Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy*. Diabetes Care, 1992. **15**(10): p. 1251-7.
17. Most, O. and O. Langer, *Gestational Diabetes: Maternal Weight Gain in Relation to Fetal Growth, Treatment Modality, BMI and Glycemic Control*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011.
18. Gutaj, P., et al., *[Maternal body mass index and gestational weight gain and their association with perinatal outcome in women with gestational diabetes]*. Ginekol Pol, 2011. **82**(11): p. 827-33.
19. Denguezli, W., et al., *Risk factors of fetal macrosomia: role of maternal nutrition*. Tunis Med, 2009. **87**(9): p. 564-8.
20. Mehta, S.H., M. Kruger, and R.J. Sokol, *Is maternal diabetes a risk factor for childhood obesity?* J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. **25**(1): p. 41-4.
21. Das, U.G. and G.D. Sysyn, *Abnormal fetal growth: intrauterine growth retardation, small for gestational age, large for gestational age*. Pediatr Clin North Am, 2004. **51**(3): p. 639-54, viii.
22. Bao, C., et al., *Reasons for the increasing incidence of macrosomia in Harbin, China*. BJOG, 2011. **118**(1): p. 93-8.

23. Braga, C.S., FA.; Silva, EG.; Hirakawa, HS.; Fernandes, AAh.; Calderon, IMP., *relationship of weight gain before and during pregnancy with fetal macrosomia in gestation complicated by diabetes and mild hyperglycemia*. J Brazilian Soc Food Nutr, 2011. **36**: p. 14.
24. Langer, O., et al., *Gestational diabetes: the consequences of not treating*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **192**(4): p. 989-97.
25. Crowther, C.A., et al., *Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes*. N Engl J Med, 2005. **352**(24): p. 2477-86.
26. Buchanan, T.A. and S.L. Kjos, *Counterpoint: glucose monitoring in gestational diabetes: lots of heat, not much light*. Diabetes Care, 2003. **26**(3): p. 948-9.
27. Svare, J.A., B.B. Hansen, and L. Molsted-Pedersen, *Perinatal complications in women with gestational diabetes mellitus*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2001. **80**(10): p. 899-904.
28. Metzger, B.E., et al., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
29. Ergin, T., et al., *Does insulin secretion in patients with one abnormal glucose tolerance test value mimic gestational diabetes mellitus?* Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**(2): p. 204-9.

30. Lesage, J., et al., *Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels.* J Endocrinol, 2002. **174**(1): p. 37-43.
31. Machado, U.F., B.D. Schaan, and P.M. Seraphim, *[Glucose transporters in the metabolic syndrome]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2006. **50**(2): p. 177-89.
32. Hashimoto, N., et al., *SLC2A1 gene analysis of Japanese patients with glucose transporter 1 deficiency syndrome.* J Hum Genet, 2011. **56**(12): p. 846-51.
33. Barros, L.F., et al., *Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta.* Placenta, 1995. **16**(7): p. 623-33.
34. Hauguel-de Mouzon, S., et al., *Developmental expression of Glut1 glucose transporter and c-fos genes in human placental cells.* Placenta, 1994. **15**(1): p. 35-46.
35. Jansson, T., M. Wennergren, and N.P. Illsley, *Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(6): p. 1554-62.
36. Gaither, K., A.N. Quraishi, and N.P. Illsley, *Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 695-701.

37. Jansson, T., E.A. Cowley, and N.P. Illsley, *Cellular localization of glucose transporter messenger RNA in human placenta*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(6): p. 1425-30.
38. Esterman, A., et al., *The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism*. Placenta, 1997. **18**(2-3): p. 129-36.
39. Joost, H.G. and B. Thorens, *The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)*. Mol Membr Biol, 2001. **18**(4): p. 247-56.
40. Bell, G.I., et al., *Molecular biology of mammalian glucose transporters*. Diabetes Care, 1990. **13**(3): p. 198-208.
41. Jansson, T., et al., *Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report*. Placenta, 2006. **27 Suppl A**: p. S109-13.
42. Parsons, T.J., et al., *Childhood predictors of adult obesity: a systematic review*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23 Suppl 8**: p. S1-107.
43. Tian, J.Y., et al., *Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(4): p. 601-7.
44. Wei, J.N., et al., *Low birth weight and high birth weight infants are both at an increased risk to have type 2 diabetes among schoolchildren in taiwan*. Diabetes Care, 2003. **26**(2): p. 343-8.

45. McCance, D.R., et al., *Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype?* Bmj, 1994. **308**(6934): p. 942-5.
46. Szostak-Wegierek, D. and K. Szamotulska, *Fetal development and risk of cardiovascular diseases and diabetes type 2 in adult life.* Med Wieku Rozwoj, 2011. **15**(3): p. 203-15.
47. Matthews, D.R., S.E. Inzucchi, and G. Position Statement Writing, *ADA/EASD position statement of the treatment of type 2 diabetes: Reply to Rodbard HW and Jellinger PS [letter], Scheen AJ [letter] and Ceriello A, Gallo M, Gentile S et al [letter].* Diabetologia, 2012. **55**(10): p. 2856-7.
48. Atalah, E., et al., *[Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women].* Rev Med Chil, 1997. **125**(12): p. 1429-36.
49. zugaib, M., *PROTOCOLOS ASSISTENCIAIS CLÍNICA OBSTÉTRICA FMUSP.* 4^a ed. 2012, SÃO PAULO. 807.
50. Benirschke, K. and S.L. Pekarske, *Placental pathology casebook. Extensive calcification of the umbilical cord and placenta.* J Perinatol, 1995. **15**(1): p. 81-3.
51. Kirkwood, B.R.S., J.A.C., *Essential medical statistics.* 2^a ed. 2006, Massachusetts.
52. Neter, J.K., M.H.; Nachtsheim, C.J.; Wasserman, W., *Applied Linear Statistical Models,* ed. 4^a. 1996, Illinois.

53. HOSMER DW, L.S., *Applied Logistic Regression*. . 1989: New York
Johns Wiley & Sons.
54. BOX GEP, H.W., HUNTER JS *Statistics for experimenters: a
introducing to design, data analysis and model building*. 1978.
55. Hosmer, D.L., S, *Applied Logistic Regression, 2nd Edition*. 200: p.
392.
56. Zhang, X., et al., *How big is too big? The perinatal consequences of
fetal macrosomia*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **198**(5): p. 517 e1-6.
57. Damodaram, M., et al., *Early adverse perinatal complications in
preterm growth-restricted fetuses*. Aust N Z J Obstet Gynaecol. **51**(3):
p. 204-9.
58. Boney, C.M., et al., *Metabolic syndrome in childhood: association with
birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus*.
Pediatrics, 2005. **115**(3): p. e290-6.
59. Ericsson, A., et al., *Glucose transporter isoform 4 is expressed in the
syncytiotrophoblast of first trimester human placenta*. Hum Reprod,
2005. **20**(2): p. 521-30.
60. Leon, D.A., et al., *Reduced fetal growth rate and increased risk of
death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish
men and women born 1915-29*. Bmj, 1998. **317**(7153): p. 241-5.
61. Harder, T., et al., *Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes:
a meta-analysis*. Am J Epidemiol, 2007. **165**(8): p. 849-57.
62. Curhan, G.C., et al., *Birth weight and adult hypertension, diabetes
mellitus, and obesity in US men*. Circulation, 1996. **94**(12): p. 3246-50.

63. Rudge, M.V., et al., *Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A retrospective 10-year analysis*. Gynecol Obstet Invest, 2000. **50**(2): p. 108-12.
64. Ferber, A., *Maternal complications of fetal macrosomia*. Clin Obstet Gynecol, 2000. **43**(2): p. 335-9.
65. Mehta, S.H., M. Kruger, and R.J. Sokol, *Is maternal diabetes a risk factor for childhood obesity?* J Matern Fetal Neonatal Med. **25**(1): p. 41-4.
66. Zugaib, M.B., RE., ed. *Protocolos Assistenciais Clínica Obstétrica FMUSP*. 4ª ed., ed. 4ª. Vol. 1. 2011: Brazil - São Paulo. 807.
67. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
68. Boulet, S.L., et al., *Macrosomic births in the united states: determinants, outcomes, and proposed grades of risk*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(5): p. 1372-8.
69. Bergmann, R.L., et al., *Secular trends in neonatal macrosomia in Berlin: influences of potential determinants*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2003. **17**(3): p. 244-9.
70. Orskou, J., et al., *Maternal characteristics and lifestyle factors and the risk of delivering high birth weight infants*. Obstet Gynecol, 2003. **102**(1): p. 115-20.

71. Kramer, M.S., et al., *Why are babies getting bigger? Temporal trends in fetal growth and its determinants*. J Pediatr, 2002. **141**(4): p. 538-42.
72. Most, O. and O. Langer, *Gestational diabetes: maternal weight gain in relation to fetal growth, treatment modality, BMI and glycemic control*. J Matern Fetal Neonatal Med. **25**(11): p. 2458-63.
73. Kerche, L.A., JF.; Costa, RA.; Rudge, MVC.; Calderon, IMP, *Fatores de risco para macrosomia fetal em gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia diária*. Rev Bras Ginecol Obstet, 2005. **27**: p. 8.
74. Gutaj, P., et al., *[Maternal body mass index and gestational weight gain and their association with perinatal outcome in women with gestational diabetes]*. Ginekol Pol. **82**(11): p. 827-33.
75. Evers, I.M., et al., *Macrosomia despite good glycaemic control in Type I diabetic pregnancy; results of a nationwide study in The Netherlands*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1484-9.
76. Bartha, J.L., et al., *Metabolic syndrome in normal and complicated pregnancies*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **137**(2): p. 178-84.
77. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S5-S10.
78. Sapienza, A.D., et al., *Factors predicting the need for insulin therapy in patients with gestational diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **88**(1): p. 81-6.

79. Bottalico, J.N., *Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications*. Semin Perinatol, 2007. **31**(3): p. 176-84.
80. Gonzalez-Quintero, V.H., et al., *Antenatal factors predicting subsequent need for insulin treatment in women with gestational diabetes*. J Womens Health (Larchmt), 2008. **17**(7): p. 1183-7.
81. Langer, O., *Maternal glycemic criteria for insulin therapy in gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 1998. **21 Suppl 2**: p. B91-8.
82. Vardhana, P.A. and N.P. Illsley, *Transepithelial glucose transport and metabolism in BeWo choriocarcinoma cells*. Placenta, 2002. **23**(8-9): p. 653-60.
83. Zamudio, S., et al., *Hypoglycemia and the origin of hypoxia-induced reduction in human fetal growth*. PLoS One. **5**(1): p. e8551.
84. Challis, D.E., et al., *Glucose metabolism is elevated and vascular resistance and maternofetal transfer is normal in perfused placental cotyledons from severely growth-restricted fetuses*. Pediatr Res, 2000. **47**(3): p. 309-15.
85. Zamudio, S., M.U. Baumann, and N.P. Illsley, *Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters*. Placenta, 2006. **27**(1): p. 49-55.
86. Gluckman, P.D. and M.A. Hanson, *Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective*. Pediatr Res, 2004. **56**(3): p. 311-7.

87. Ogura, K., et al., *8-bromo-cyclicAMP stimulates glucose transporter-1 expression in a human choriocarcinoma cell line*. J Endocrinol, 2000. **164**(2): p. 171-8.
88. Korgun, E.T., et al., *Do glucose transporters have other roles in addition to placental glucose transport during early pregnancy?* Histochem Cell Biol, 2005. **123**(6): p. 621-9.
89. Hahn, D., et al., *From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(12): p. 1173-8.
90. Burton, G.J., J. Hempstock, and E. Jauniaux, *Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review*. Placenta, 2001. **22 Suppl A**: p. S70-7.
91. Maher, F., T.M. Davies-Hill, and I.A. Simpson, *Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons*. Biochem J, 1996. **315 (Pt 3)**: p. 827-31.
92. Desoye, G., et al., *Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern*. Histochemistry, 1994. **101**(4): p. 277-85.
93. Wolf, H.J. and G. Desoye, *Immunohistochemical localization of glucose transporters and insulin receptors in human fetal membranes at term*. Histochemistry, 1993. **100**(5): p. 379-85.
94. Desoye, G., et al., *Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor tissues*. Microsc Res Tech, 1997. **38**(1-2): p. 63-75.

95. Mericq, V., et al., *Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children*. Diabetologia, 2005. **48**(12): p. 2609-14.
96. Constancia, M., et al., *Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 945-8.
97. Broer, S., *Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands*. Pflugers Arch, 2002. **444**(4): p. 457-66.
98. Verrey, F., *System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport*. Pflugers Arch, 2003. **445**(5): p. 529-33.
99. Simmons, M.A., et al., *Insulin effect on fetal glucose utilization*. Pediatr Res, 1978. **12**(2): p. 90-2.
100. Boguszewski, M.C., et al., *Latin American consensus: children born small for gestational age*. BMC Pediatr, 2011. **11**: p. 66.
101. Radaelli, T., et al., *Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2951-8.
102. Cetin, I., et al., *Fetal nutrition: a review*. Acta Paediatr Suppl, 2005. **94**(449): p. 7-13.
103. Catalano, P.M., et al., *Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**(6): p. 1698-704.