

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/02/2017.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafael Bottaro Gelaleti

**Avaliação no Padrão de Expressão Gênica em Células do
Sangue Total de Gestantes Diabéticas e com
Hiperglicemia Gestacional Leve**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (área de concentração: Tocoginecologia, com ênfase em Biologia Molecular e Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

**Botucatu
2016**

Rafael Bottaro Gelaleti

**Avaliação no Padrão de Expressão Gênica em Células do
Sangue Total de Gestantes Diabéticas e com
Hiperglicemia Gestacional Leve**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (área de concentração: Tocoginecologia, com ênfase em Biologia Molecular e Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gelaleti, Rafael Bottaro.

Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve / Rafael Bottaro Gelaleti. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marilza Vieira Cunha Rudge
Coorientador: Débora Cristina Damasceno
Capes: 40101150

1. Diabetes na gravidez. 2. Hiperglicemia. 3. Análise de microarranjo. 4. Expressão gênica.

Palavras-chave: Diabete; Gestação; Hiperglicemia Gestacional Leve; Microarray; Perfil de Expressão Gênica.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

Dedicatória

Obrigado por existirem e por serem quem são: mais que apenas pais biológicos.

Obrigado pela dedicação, pela amizade, pelo companheirismo.

Obrigado pela vida e pelo orgulho que é ter nascido de vocês.

Obrigado pelos ensinamentos, pelos sermões, pelos castigos, pelas palmadas e,
principalmente pelos exemplos. Vocês são valiosíssimos.

Obrigado pelos agradados e principalmente pelos desagradados.

Assim, eu pude ver que na vida nem tudo é como a gente quer.

Obrigado pelas preocupações, sei que muitas vezes fui (e ainda sou) causa de
inapetência e insônia.

Obrigado pela caminhada, pela luta, pela lida.

Apreendi com vocês a ter coragem, a não desanimar, a saborear a vitória.

Obrigado pelas mãos entrelaçadas na minha, doando-me confiança, na certeza de
estar indo por caminhos seguros e na certeza de que terei sempre onde amparar
caso eu tropece.

Obrigado por tudo que vocês planejaram e fizeram, por tudo que planejaram e não
fizeram e pelo o que fizeram sem planejar.

Amo vocês!

Todas as minhas vitórias serão dedicadas a vocês!

Aos meus pais Jorge Luiz Gelaleti e Mirtes Ap. Bottaro Gelaleti

Agradecimientos

À minha irmã **Gabriela Bottaro Gelaleti**, pela amizade, companheirismo, apoio e exemplo em minha vida pessoal e profissional.

Aos meus avós **Jorge João Gelaleti** (*in memoriam*), **Dornélia Inez Gelaleti** (*in memoriam*), **Hilário Bottaro** (*in memoriam*) e **Hermínia Brazolotto Bottaro**, pelo amor, ensinamentos e contribuição de todas as formas na minha educação.

Aos meus **tios** e **tias**, pela união, apoio e contribuição na minha formação e educação.

À **Marina de Carvalho**, por todo apoio, amor, compreensão, incentivo e pela companhia nesta trajetória.

À **Profa. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge**, pela orientação, confiança, oportunidade, pelos ensinamentos científicos e pelo exemplo de profissional.

À **Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno**, pela ajuda, atenção e presença no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigado pela dedicação, orientação, confiança, exemplo de profissional e pelos conhecimentos científicos transmitidos durante todo este período.

À **Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**, pela orientação, confiança, disponibilidade e toda atenção cedidas no desenvolvimento deste projeto.

Profa. Dra. Iracema de Mattos Paranhos Calderon, por todo aprendizado e crescimento profissional que me ofereceu nos últimos anos.

Aos **amigos do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia**:

Aline Bueno, Aline Netto, Ana Paula Campos, Bianca Cassettari, Bruna Dallaqua Jaquie, Felipe Hiroshi Saito, Fernanda Piculo, Franciane Quintanilha Gallego Souza, Gabriela Marini Prata, Giovana Vesentini, Gustavo Tadeu Volpato, Isabela Lovizutto Iessi, Kleber Eduardo Campos, Mariana Alvarez Arantes, Nathália Cristine Dias de Macedo, Silvana Barroso Corvino e Yuri Karen Sinzato. Muito obrigada! Muito obrigado pela colaboração, pelo aprendizado e pela ótima convivência diária.

Aos amigos do **Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica** em especial ao **Prof. Dr. João Paulo de Castro Marcondes** por toda ajuda cedida durante o desenvolvimento deste projeto

Às **pacientes participantes desse estudo**, pela colaboração e permissão para o desenvolvimento.

Ao assistente de suporte acadêmico do LAPGO: **Danilo Chaguri**

À **Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva, Prof. Dr. David Martins e Prof. Dr. Jose Luiz Rybarczyk Filho** pela ajuda bioinformática.

À **Profa. Dra. Daisy Salvadori e Profa Dra. Patrícia Pintor dos Reis** pela contribuição no exame de qualificação.

Ao **Dr. Marcos Guazelli**, pela colaboração na coleta das pacientes.

À Faculdade de Medicina de Botucatu_UNESP, em especial ao **Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia** e ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** pela acolhida e concessão das dependências e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** em função do espaço físico e utilização dos aparelhos durante a realização deste trabalho.

Ao **Hospital Misericórdia Botucatuense (UNIMED)**, pela concessão das dependências para a coleta de pacientes.

Aos **funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, Aparecida Benedita Vasques, Ligia Maria da Silva Rodrigues, Regina Célia Gamito e à Solange Sako Cagliari (secretária do programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) pela dedicação e auxílios prestados.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação** Janete Aparecida Herculano Nunes da Silva, Andreia Paula Longo Devidé, Diego Cezario Bovolim de Oliveira, Luciene de Cassia Jeronimo Tobias, Lilian Cristina Nadal Bianchi, Vanessa Mores Braite e Rosana Aparecida Florencio pela dedicação e serviços prestados.

Ao **Escritório de Apoio a Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu-GAP**, principalmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corren** pela ajuda no delineamento do projeto e análise estatística dos dados.

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

Aos **funcionários da Biblioteca da Unesp de Botucatu** pela atenção durante o período do doutorado, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão do auxílio pesquisa (processos número 2012/19362-7) e bolsa de doutorado (processo número 2011/23749-1) que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado que possibilitou o desenvolvimento desta tese.

Aos amigos de Botucatu, Dany Bruno Grosklauss, Diego Marcelino, Geraldo Gabriel Perez, Guilherme Soares, Gustavo Branco, Hugo Kano, Inaiã Vieira, Kayque Fracarolli, Luiz Constantino, Mateus Pontin, Nadino Carvalho, Ronaldo Mattos e Vitor Hugo Parra pela convivência, amizade e companheirismo durante estes anos de trabalho e longe da família

E também, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Índice

Resumo	01
Introdução	03
Justificativa	15
Hipóteses	16
Objetivos	16
Metodologia	17
Capítulo 1	23
Capítulo 2	38
Referências	70
Anexos	80

Avaliação no Padrão de Expressão Gênica em Células do Sangue Total de Gestantes Diabéticas e com Hiperglicemia Gestacional Leve

Resumo: Objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão gênica em células do sangue total de gestantes com distúrbios glicêmicos. Foram recrutadas 52 gestantes distribuídas em 4 grupos: controle (Teste oral de tolerância glicose (TTG) e perfil glicêmico (PG) normal, com rastreamento negativo para DMG); Não diabético (ND) (TTG e PG normais, com rastreamento positivo para DMG); Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL) (TTG normal e PG alterado) e DMG (TTG alterado e PG normal ou TTG e PG alterado). Células do sangue total foram coletadas e utilizadas para análise do perfil de expressão gênica pela técnica de *microarray*. A avaliação do perfil de expressão gênica mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo ND, apresentando 22 genes diferencialmente expressos. Em relação ao grupo controle, o grupo HGL apresentou 5 genes diferencialmente expressos e quando comparado com o grupo rastreamento positivo, apresentou 3 genes diferencialmente expressos. O grupo DMG apresentou 17 genes diferencialmente expressos em relação ao grupo controle e quando comparado com o grupo ND, cinco genes. A comparação realizada entre os grupos HGL e diabético também foi estatisticamente significativa com 11 genes diferencialmente expressos e quando o conjunto de todos os outros três grupos juntos (ND, HGL e diabete) foi comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), foram verificados 8 genes diferencialmente expressos. Foram feitas redes gênicas e tabela de interações para avaliação de processos biológicos com todos os genes de interesse diferencialmente expressos nos grupos. No grupo com rastreamento positivo, existe um aparente balanceamento regulatório entre as funções dos genes diferencialmente expressos

relacionados à patogênese do diabetes (hiperexpressos) e uma tentativa compensatória de amenizar a possível etiologia da doença (hipoexpressos). Esses resultados fortalecem a estratégia “*two steps de Carpenter-Coustan*” porque as gestantes com rastreamento negativo não precisam prosseguir na investigação diagnóstica do diabetes gestacional, diminuindo o custo em saúde e a medicalização da gestação. As pacientes com HGL tem perfil de expressão gênica relacionada com resistência à insulina e hiperinsulinemia e com níveis glicêmicos alterados representando o início da descompensação metabólica. Aparentam ser um grupo intermediário, descrito como síndrome metabólica na gestação, e suportam o conceito que mulheres com disglícemia gestacional têm não apenas uma síndrome metabólica basal latente, mas também um perfil de expressão que distingue essa população das demais. O perfil de expressão gênica nas DMG está relacionado à repercussão da hiperinsulinemia e resistência insulina nos processos inflamatórios, de angiogênese e sistemas de reparo contra danos de DNA, fatores reconhecidos na patogênese da doença. A análise conjunta destes dados sugerem que o rastreamento do diabetes na gestação deve ser universal, e é suficiente para distinguir duas populações com perfil transcricional diferenciado. As gestantes com rastreamento positivo devem obrigatoriamente ir para a fase de diagnóstico para identificação dos subgrupos de distúrbios hiperglicêmicos na gestação, variando desde uma fase compensada (grupo ND), passando pelo início da descompensação metabólica, com resistência a insulina e hiperinsulinemia (HGL) até a fase de repercussão dos fatores relacionados à resistência à insulina (DMG).

Introdução

A hiperglicemia é uma das condições médicas mais comuns que as mulheres enfrentam durante a gravidez. A ocorrência de *Diabete mellitus Gestacional* (DMG) vem aumentando globalmente sendo paralela com a prevalência de intolerância à glicose (IGT), obesidade e *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (Ayres-de-Campos (FIGO), 2015). A *International Diabetes Federation (IDF)* estima que nos dias atuais um em cada seis nascidos vivos (16,8%) são filhos de mulheres com alguma forma de hiperglicemia durante a gravidez, valores que são similares (1:5 ou 20%) aos do Centro de Investigação do Diabete Perinatal- Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp ainda no final da década de 90 (Rudge *et al.*,1996). Outro aspecto a ser considerado é que a idade de aparecimento de diabete e pré-diabete está diminuindo enquanto a idade de ter filhos está aumentando o que contribui para a concomitância de gravidez e distúrbios hiperglicêmicos. Existe também um aumento na taxa de mulheres com sobrepeso e obesidade de idade reprodutiva. Dessa maneira mais mulheres que engravidam atualmente têm fatores de risco que as tornam vulneráveis à hiperglicemia durante a gestação (Hod *et al.*, 2015 (a)).

Apesar da elevada prevalência dos distúrbios hiperglicêmicos na gestação e das repercussões maternas a longo prazo que devem ter cuidados relacionados à mudança de estilo de vida, o critério diagnóstico ainda não atingiu o nível "A" de evidência (ADA,2015). O "*Pragmatic Guide for Diagnosis, Management, and Care*" (2015) da FIGO mostra que apesar de todo o esforço de inúmeras organizações de saúde e associações internacionais e nacionais nas áreas de diabete, endócrino e obstetrícia estabelecendo protocolos, pontos de corte e algoritmos para o diagnóstico do DMG, o nível de evidência ainda é baixo. Essas recomendações são criticadas pela falta de validação desenvolvida com base tênue; as

opiniões de especialistas são tendenciosas devido a considerações de ordem econômica, ou de conveniência orientada (Hod *et al.*, 2015 (b)) criando confusão e incerteza entre os usuários. Um problema subjacente, mas fundamental, como mostram vários estudos, é que os pontos de corte ainda considerados no diagnóstico levam em consideração o risco de desenvolvimento futuro de DM2 enquanto os resultados do HAPO STUDY demonstraram que o risco de resultado adverso materno e perinatal está associado com a hiperglicemia contínua, sem pontos de inflexão claras (HAPO Study Group *et al.*, 2002, Jensen *et al.*, 2001).

A ADA (2015) orienta que 2 estratégias podem ser adotadas no diagnóstico do DMG: a- "One-Step" com TTG de 75g e b- "Two-Steps" com rastreamento com 50g seguido de TTG de 100g e apresenta as recomendações com os respectivos níveis de evidência. A estratégia "One-Step", avalia a glicose em jejum, 1 e 2 horas após a sobrecarga, em gestantes entre a 24ª e 28ª semanas de gestação, sem diagnóstico prévio de *overt diabetes*. Os valores limites para as glicemias são: Jejum (92 mg/dL), 1 hora (180mg/dL) e 2 horas (153 mg/dL), qualquer valor igual ou acima do descrito confirma o diagnóstico de DMG. Na estratégia "Two-Steps", primeiramente é feito o TTG de 50g, em gestantes entre a 24ª e 28ª semanas de gestação, sem diagnóstico prévio de *overt diabetes*, com valor limite de 140mg/dL. Gestantes alteradas pra este teste vão para o segundo passo com TTG de 100g, com valores limites de: Jejum (95mg/dL), 1 hora (180 mg/dL), 2 horas (155 mg/dL) e 3 horas (140 mg/dL), definidos por Carpenter/Coustan (Carpenter e Coustan, 1982), ou jejum (105mg/dL), 1 hora (190/mg/dL), 2 horas (165 mg/dL) e 3 horas (145 mg/dL), definidos por NDDG (NDDG, 1979), onde dois ou mais valores iguais ou acima dos descritos confirmam o diagnóstico de DMG. A ADA, finaliza mostrando que os diferentes critérios diagnósticos identificarão diferentes graus de hiperglicemia materna e de riscos maternos e fetais, levando o debate entre os experts,

desagradando alguns e agradando outros.

O Centro de Investigação do Diabete Perinatal- FMB-UNESP faz o diagnóstico da hiperglicemia na gestação usando o rastreamento com glicemia de jejum maior ou igual a 90mg/dl e fatores de risco (pessoais, obstétricos e familiares); os positivos vão para a fase de diagnóstico com TTG75g e perfil glicêmico. Visa a separação das gestantes nos 4 grupos de Rudge(1983) e identificação das DMG e HGL.

Hiperglicemia Gestacional Leve e Diabetes mellitus Gestacional

A Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL) compreende um grupo de gestantes com rastreamento positivo para DMG, hiperglicemia detectada apenas no perfil glicêmico (PG) e diagnóstico negativo para DMG. Este grupo foi identificado em 1983, quando um projeto prospectivo foi desenvolvido para padronização do PG comparando-o ao TTG100g para o diagnóstico do diabete na gestação. O uso de dois testes, aplicados em paralelo, identificou quatro grupos de gestantes: IA - gestantes não diabéticas com os 2 teste normais; Grupo IB - portadoras de hiperglicemia gestacional com apenas o PG alterado; Grupo IIA - portadoras de DMG com apenas o TTG 100g alterado e o grupo IIB - portadoras de DMG e/ou DM2 com os 2 testes alterados (Rudge, 1983; Rudge *et al* .,1990). Nesse primeiro trabalho ficou muito bem estabelecido que o TTG 100g com seus pontos de corte estabelecidos por O'Sullivan (1964) era mau preditor do resultado perinatal adverso e que o PG alterado estava associado a mais de 50% de recém-nascidos macrossômicos, percentual semelhante ao das diabéticas gestacionais (Rudge *et al.*, 1990; Rudge *et al.*, 2000). Essas gestantes com hiperglicemia gestacional leve correspondem a 13,8% da população de gestantes rastreadas que, somados aos 7,0%

das gestações complicadas por diabetes, aumentam a ocorrência de distúrbios hiperglicêmicos na gestação para cerca de 20% (Rudge *et al.*,1996). Interessante que no resultado do “*The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*” – (*HAPO Study* (2009), Metzger *et al.*, 2010) há grande similaridade com essa ocorrência de hiperglicemia na gestação: relato de 17,8%.

Ao longo dos últimos 30 anos temos investigado os mecanismos fisiopatológicos relacionados a este grupo de gestantes, seus recém-nascidos e suas placentas. As gestantes portadoras de HGL têm risco elevado para hipertensão arterial, obesidade e hiperglicemia e parecem reproduzir o modelo da síndrome metabólica (SM) na gestação com hiperinsulinemia e resistência à insulina que persiste seis semanas pós-parto (Negrato *et al.*,2008). Após 10 a 12 anos da gravidez-índice, o DM2 foi confirmado em 16,7% das mulheres que tiveram HGL na gestação (Silva *et al.*, 2003). Estudo recente usando os dados do banco de dados de 20 anos (1983-2003) evidenciou que diminuir os pontos de corte do TTG e do PG aumenta a chance de diagnóstico de macrossomia fetal, porém os dois testes precisam ser feitos um após o outro (Rudge *et al.*,2008) corroborando com os resultados do *HAPO Study*, onde o aumento progressivo do nível glicêmico cursou com aumento do peso fetal (HAPO, 2009). Os recém-nascidos das gestantes com HGL apresentaram 53,8% de macrossomia, proporção semelhante aos 51,9%, observados nas diabéticas clínicas e gestacionais (Rudge *et al.*, 2005). O índice de mortalidade perinatal de 41‰, foi semelhante ao de gestantes diabéticas e 10 vezes maior que o das gestantes normais do grupo IA (Rudge *et al.*,1995). O risco atribuível de morte perinatal neste grupo foi de 4,16‰, comparável ao identificado nos grupos de gestantes diabéticas (Rudge *et al.*,2005). Esses recém-nascidos também podem apresentar hipertrofia das células beta-pancreáticas, exibindo ao nascimento crises

hipoglicêmicas, hiperbilirrubinemia, além de alta incidência de prematuridade e anomalias congênitas (Rudge *et al.*, 2000).

As placentas de mulheres com HGL têm maior densidade absoluta e maior incidência de endarterite (lesão descrita como *posmortem*), quando comparadas a aquelas de mulheres normais (Del Nero & Rudge, 2003; Rudge *et al.*, 2011). Essas placentas também apresentam alterações morfológicas caracterizadas por vilosidades pequenas com grande número de capilares (Rudge *et al.*, 2000; Calderon *et al.*, 2007) com aumento de apoptose e diminuição de proliferação celular (Sgarbosa *et al.*, 2006).

Os achados descritos evidenciam que esse grupo de gestantes com rastreamento positivo para diabetes, diagnóstico negativo para DMG e hiperglicemia ao longo do dia quando ingerem dieta geral, ou seja, quando ingerem uma mistura de carboidratos, lipídios e proteínas, tem as mesmas repercussões maternas, neonatais e placentárias das gestantes diabéticas. Portanto, gestantes com HGL apesar de serem identificadas na literatura como de baixo risco caracterizam uma população com resultados materno e perinatal adversos e representam um problema de saúde pública (Rudge *et al.*, 2005). Devido a esses resultados, esse grupo de gestantes foi incluído no protocolo de diagnóstico e tratamento das gestações complicadas por diabetes ou hiperglicemia de graus variados do Centro de Investigação do Diabetes Perinatal - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

A literatura internacional tem poucas publicações sobre gestantes portadoras de HGL. Trabalho descrevendo grupo similar ao nosso foi realizado na Holanda em 1989 (Bacchs *et al.*, 1989). Há relatos que definem as gestantes com HGL como as gestantes com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG (Weijers *et al.*, 2002), ou com apenas um valor do TTG alterado (Bo *et al.*, 2004). Estes mesmos autores

concluem que o teste de rastreamento positivo identifica gestações com anormalidades metabólicas e resultado perinatal adverso mesmo na presença de TTG normal. É controverso se níveis de glicemia materna inferiores aos do diagnóstico de DMG estão associados com resultado perinatal adverso. As publicações dos resultados do *HAPO Study* mostram que há forte e contínua associação dos níveis de glicemia materna abaixo dos estabelecidos para o diagnóstico do DMG com o risco de aumento do peso dos recém-nascidos e dos níveis de peptídeo-C (*HAPO et al.*, 2008).

Os resultados das nossas pesquisas evidenciam que, tanto as mulheres com DMG quanto as portadoras de HGL, apresentam distúrbio metabólico semelhante, muito embora não seja ainda entendido o mecanismo(s) responsável(eis) por tal similaridade. A literatura atual está reconhecendo que a hiperglicemia materna, de qualquer intensidade independente do diagnóstico de diabetes gestacional, deve ser controlada pelo risco perinatal adverso (RPA) (*HAPO* 2009). Isto valida a identificação e o tratamento, iniciado há mais de 25 anos, do grupo IB de Rudge (portadoras de HGL).

Em resumo, os resultados do *HAPO Study* (2009) evidenciam o link perdido entre a glicemia materna, a resposta a insulina fetal e crescimento neonatal, especificamente adiposidade neonatal, confirmando a hipótese de Pedersen proposta há mais de 50 anos de que esses resultados perinatais adversos não estão limitados apenas ao diabetes clínico, mas estão ligados a níveis crescentes de glicemia materna. Apesar de todas as nossas investigações, é necessário definir se essas gestantes representam um grupo diferente das diabéticas gestacionais ou apenas representam etapas mais precoces da mesma patologia. Essa dúvida nos acompanha ao longo dos últimos 30 anos, pois como relatamos, encontramos nessas gestantes alguns parâmetros clínicos, laboratoriais, placentários e de risco de desenvolvimento de DM2 num nível intermediário entre as

gestantes não diabéticas (rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG) e as portadoras de DMG.

O desbalanço entre a capacidade das células β -pancreáticas e o aumento da demanda por insulina causada pela diminuição da sensibilidade à insulina durante a gravidez é o principal mecanismo patogênico causador do DMG (Homko *et al.*, 2001, Ernst *et al.*, 2011). Por outro lado o DMG tem sido aceito como uma manifestação precoce da Síndrome Metabólica (SM) na qual a combinação de resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória predispõe o indivíduo a desenvolver altos níveis de triglicérides e baixos níveis de HDL-colesterol, aumento da pressão arterial e doença coronária (Reaven, 1994). As causas da disfunção das células beta-pancreáticas que levam à insuficiência de insulina não estão bem definidas, mas três categorias gerais são identificadas: 1) disfunção autoimune das células beta-pancreáticas; 2) anormalidades genéticas que levam à diminuição da secreção de insulina e 3) disfunção das células beta-pancreáticas associada à resistência à insulina crônica (Metzger *et al.*, 2007). DMG pode representar uma fase inicial do desenvolvimento de SM ou diabetes. Mulheres com histórico de DMG têm chance aumentada de 50% para desenvolver o DM2 (Ferrara 2007). A HGL deve ser uma etapa precoce desse grande quebra-cabeça que está se construindo que considera o DMG, a SM e a própria HGL.

Existe muita controvérsia na literatura sobre a melhor forma de identificar o DMG e se os benefícios dessa intervenção justificam os investimentos em saúde, a ansiedade da mulher ao ser rotulada como diabética e a medicalização dessa população (Feldman *et al.*, 2016; ADA 2015; Ayres-de-Campos *et al.*, 2015; HAPO STUDY 2009; IADPSG 2010; Ferrara *et al.*, 2007 e Hod *et al.*, 2015). No nosso ponto de vista, aprofundar o conhecimento sobre as gestantes portadoras de HGL permitirá um avanço do conhecimento em relação à

possível “janela de oportunidades” que a gestação está dando a essas mulheres. Se isto for confirmado com este projeto de avaliação do perfil de expressão gênica poderemos caminhar na prevenção do DM2 e da nova síndrome denominada “diabesidade” por Langer (2010). Talvez a identificação mais aprofundada desse grupo de mulheres na gestação represente um marcador precoce de muita utilidade para definição das políticas de prevenção e de novas terapêuticas nessa epidemia que assola o século 21: a “diabesidade”.

Hiperglicemia e fatores genéticos

A literatura descreve que existem diversos genes relacionados ao diabete, porém não foram estudados genes ligados à HGL. Além disso, é conhecido que a fisiopatologia do DMG e DM2 também está relacionada com anormalidades genéticas, as quais são amplamente estudadas. Vários genes estão relacionados à via de sinalização de insulina, que está diretamente ligada ao DM2 e DMG. O gene *INSR* codifica o receptor de insulina que desempenha papel fundamental na via de sinalização de insulina. Mutações neste gene são a causa mais comum de resistência à insulina (Bell *et al.*, 1982; Pugliese *et al.*, 1997). O gene *IRS1* é altamente polimórfico, com variações na seqüência codificadora em cerca de 5% dos indivíduos normais e em 10-20% dos pacientes com DM2 (Porzio *et al.*, 1999). Polimorfismos neste gene interferem na secreção insulínica estimulada pela glicose e pela sulfoniluréia contribuindo para a resistência periférica à insulina e diminuição da secreção da insulina, sendo essas alterações contribuintes para a patogênese do DM2. Defeitos no gene *IRS2* podem contribuir para o DM2 por prejudicar a produção de insulina por efeitos sobre a

neogênese, proliferação ou sobrevivência das células beta-pancreáticas e a ação da insulina (Iwamoto *et al.*, 2003). O gene *PTPN1* participa da via de sinalização de insulina como um regulador negativo. Desta forma, defeitos neste gene também estão associados ao diabetes (Cheyssac *et al.*, 2006; Bento *et al.*, 2004). Este gene foi identificado como um alvo potencial para o tratamento de obesidade e DM2 (Zhang *et al.*, 2007). Garofalo (2003) e Brozinick (1998) descreveram o gene *AKT2* (conhecido como proteína kinase beta) como intermediador no controle da captação de glicose muscular e em tecidos adiposos. Portadores de mutações neste gene apresentam resistência à insulina severa, hiperinsulinemia e obesidade. Outro gene responsável pela resistência à insulina é o gene *ENPP1*, que codifica uma glicoproteína transmembrana do tipo II que inibe o receptor de insulina, portanto, a superexpressão deste gene leva a um aumento na resistência à insulina (Maddux *et al.*, 2006).

O fator de necrose tumoral alfa (*TNF-alfa*) é uma citocina pró-inflamatória (Dandona *et al.*, 1998). Alguns estudos têm demonstrado que polimorfismos no gene promotor do *TNF-alfa* estão diretamente relacionados à resistência à insulina (Fernandez-Real *et al.*, 1997). Outros exemplos de genes relacionados à resistência à insulina, conseqüentemente ao DM2 e DMG, são o *SLC2A2* (Joost *et al.*, 2002), *SLC2A4* (Lesage *et al.*, 1997); os genes *AQP2* (Satake *et al.*, 2010), *IDE* (Rudovich *et al.*, 2009) e *NEUROD1* (Malecki *et al.*, 2003) e, finalmente, o gene *RETN* que tem sido apontado como candidato para resistência a insulina e ligação molecular entre DM2 e obesidade (Steppan *et al.*, 2001).

O gene do *PPARG* é um fator de transcrição com papel fundamental na sensibilização à insulina e adipogênese (Fajas *et al.*, 2001). Mutações frequentes neste gene foram associadas à obesidade e fenótipos relacionados ao diabetes (Deeb *et*

al., 1998). O gene do *PPARGC1 β* , que é um co-ativador de receptores nucleares, e outros fatores de transcrição que regulam a termogênese adaptativa, gliconeogênese hepática e biogênese mitocondrial, também podem desempenhar papel importante na obesidade e no DM2 (Puigserver *et al.*, 2003). O gene *ENPP1*, também conhecido como glicoproteína da membrana plasmática celular (Groop *et al.*, 1997) e o *UCP* (gene que traduz a proteína *UCP1* localizada na membrana mitocondrial interna, expressa principalmente no tecido adiposo marrom) (Clement *et al.*, 1996) estão associados à obesidade, níveis séricos de insulina e DM2 em diferentes populações.

Outro gene recém descoberto que está totalmente ligado à obesidade é o gene *FTO*. Ratos com superexpressão deste gene apresentaram obesidade (Church *et al.*, 2010) e indivíduos com o alelo de risco aumentaram a ingestão de alimentos (Speakman *et al.*, 2008), o que resulta em pré-disposição à obesidade e risco aumentado para desenvolver o DM2. Sabendo que gestantes com HGL apresentam obesidade, é de grande interesse analisar a expressão deste gene nestas pacientes.

O gene da insulina (*INS*) tem sido proposto como um candidato potencial na patogênese do DM2 (Hattersley *et al.*, 1999), pois polimorfismos neste gene estão associados a alterações na expressão de insulina no pâncreas (Bennet *et al.*, 1995) e no timo (Pugliese *et al.*, 1997), além do risco aumentado de DM1 em populações caucasianas (Bennett *et al.*, 1996). O gene *PDX1* também está relacionado a estas patologias, pois é essencial para o desenvolvimento do pâncreas, manutenção das células β -pancreáticas e transcrição de insulina (Li *et al.*, 2005). A superexpressão gênica do *FBP1* em células β -pancreáticas leva à deficiência na secreção de insulina estimulada pela glicose (Kebede *et al.*, 2008).

O gene *WFS1* é regulado durante a secreção de insulina e desempenha um

papel importante papel na manutenção da homeostase do retículo endoplasmático e integridade das células β -pancreáticas (Fonseca *et al.*, 2005). A inativação do gene *WFS1* em células β -pancreáticas de roedores provoca estresse do retículo endoplasmático e morte destas células por apoptose (Fonseca *et al.*, 2005; Riggs *et al.*, 2005). Mutações neste gene são responsáveis pela síndrome de *Wolfram* (Inoue *et al.*, 1998), uma doença recessiva rara caracterizada por atrofia óptica e outras anormalidades neurológicas e endócrinas na presença de *Diabetes mellitus* (Barrett *et al.*, 1995).

Tuomilehto *et al.* (2001) mostraram que deleções no gene *HNF1B* levam à intolerância à glicose, expressão gênica desregulada e redução da secreção da insulina estimulada pela glicose. A relevância deste achado é enfatizada por estudos que mostram que a intolerância à glicose é um dos melhores preditores do desenvolvimento de diabetes.

O gene *FOXC2* é um regulador chave do metabolismo dos adipócitos e polimorfismos neste gene têm sido associados com maior sensibilidade à insulina e níveis plasmáticos mais baixos de triglicérides em indivíduos do sexo feminino da Escandinávia e em mulheres índias Pima (Ridderstrale *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2003).

Existem genes que estão relacionados a patologias causadas pelo diabetes, como os genes *AGT* (Chang *et al.*, 2003) e *NOS3* (Sandrim *et al.*, 2006), que estão associados à nefropatia diabética. Alguns genes estão diretamente relacionados ao DMG e conseqüentemente ao aumento no risco para desenvolver DM2. Polimorfismos no gene *TCF7L2* estão associados à susceptibilidade para DMG, pois afetam a resposta insulínica à glicose oral através da interação com a porcentagem de gordura corporal (Watanabe *et al.*, 2007). Koster *et al.* (2005) demonstraram que o gene *KCNJ11* controla a secreção de insulina, alterando o potencial de membrana da célula β -pancreática, aumentando o risco para o DMG (Cho *et al.*, 2009). Polimorfismos nos genes *IL10*, *TNF-*

alfa (Montazeri *et al.*, 2010), *MTNR1B* (Kim *et al.*, 2011) também apresentam ligação ao DMG.

Em indivíduos saudáveis, não diabéticos e populações não grávidas, aproximadamente um terço da variação na glicemia de jejum é genética, e variantes genéticas comuns em múltiplos locis estão robustamente associadas com glicemia de jejum, DM2 e traços glicêmicos. Assim, os fatores genéticos são susceptíveis na contribuição para a variação nos níveis de glicose durante a gravidez. No entanto, essas variantes não foram analisadas extensivamente em grandes estudos com gestantes (Freathy *et al.*, 2010).

O grande estudo da (HAPO) mostra que variantes genéticas nos genes *GCK* e *TCF7L2* estão associadas com níveis de glicose em jejum e pós-prandiais e com o novo consenso de definição de diabetes gestacional a partir dos “Grupos de estudos de associação de diabetes e gestação”. Variantes nos genes *GCK* e *TCF7L2*, que predisõem maior glicemia de jejum e DM2 na população em geral, estão associados com: 1) níveis mais elevados de glicose a partir de TTG em gestantes que não têm diabetes explícita e 2) DMG no âmbito do novo consenso de definição. Grandes estudos serão importantes para avaliar plenamente a contribuição de variantes genéticas conhecidas com a glicemia materna na gestação, os resultados da gravidez e fenótipos neonatais (Freathy *et al.*, 2010).

O estudo da expressão gênica em larga escala (técnica de Microarray) torna possível o monitoramento de milhares de genes usando somente um ensaio (Golub *et al.*, 1999). O perfil da expressão gênica capta mudanças diárias causadas por fatores ambientais, estilo de vida, bem como mudanças permanentes causadas por variações estruturais no DNA.

Hayashi *et al.* (2010) comparou o perfil de expressão gênica em células do sangue total, tecido adiposo, fígado e músculo esquelético em ratos da linhagem *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)*, espontaneamente diabéticos tipo 2 que apresentam obesidade leve, acúmulo de gordura visceral e resistência à insulina de início tardio com uma linhagem controle (*Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)*). Os resultados mostraram que a expressão gênica em células do sangue total reflete diretamente as condições do fígado, tecido adiposo e músculo esquelético desses animais. Assim, a interação contínua entre o sangue e os tecidos sensíveis à insulina possibilita que a expressão gênica do sangue pode ser um diagnóstico sensível e indicador de alterações nestes tecidos.

O risco genético para DMG é relatado como heterogêneo (Petry *et al.*, 2010) e divide com o DM2 diversos genes relacionados aos aspectos clínicos, fatores de risco de estilo de vida e susceptibilidade genética, incluindo: *KCNJ11*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/CDKN2B*, *HHEX/IDE*, *IGFBP2*, *SLC30A8* e *FTO* (Cho YM *et al.*, 2009). Um total de 486 genes foram caracterizados nas DMG, 202 do DM1, 651 DM2 (Collares *et al.*, 2013). Estudo realizado no Brasil identificou que as DMG tem perfil transcriptômico que é influenciado pelos aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, imunológicos, genéticos e do tratamento (Evangelista *et al.*, 2014). O perfil de expressão gênica de DMG evidencia características comuns com DM1 e DM2 incluindo destruição autoimune e resistência à insulina (Zhao *et al.*, 2011).

Justificativa

Gestantes portadoras de HGL apresentam resistência à insulina, intolerância à glicose e maior susceptibilidade de desenvolver DM2 alguns anos após o parto,

semelhantes às mulheres com DMG. A literatura descreve que existem diversos genes relacionados ao diabetes e a fisiopatologia do DMG e DM2 também está relacionada a anormalidades genéticas amplamente estudadas. Trabalhos realizados em nosso laboratório relacionados às alterações genéticas, polimorfismos, expressão gênica e danos no DNA em gestantes com HGL, mostraram que este grupo de gestantes apresenta frequência de 9,67% do polimorfismo *Pro12Ala* do gene *PPARG*, 22,2% do *SN45T/G* no gene *AdipoQ* e 19,05% do *Gly972Arg* do *IRS1* nas gestantes e 16,67% nos recém-nascidos (Gelaleti *et al.*, 2015-a), apesar de não serem diferentes estatisticamente, esta frequência é muito alta comparada com a frequência deste polimorfismo descrita na literatura, níveis séricos de TNF-alfa maiores e de adiponectina menores em relação aos outros grupos, apesar de não diferirem na expressão gênica, e aumento nos níveis de danos oxidativos no DNA de células do sangue total (Gelaleti *et al.*, 2015 -b). Considerando a existência e a importância destes genes no diabetes, o fato de que gestantes com HGL apresentam características semelhantes ao DMG de acordo com nossos resultados, a avaliação do perfil de expressão gênica nestas gestantes é de extrema importância para a caracterização genética deste grupo e para identificar marcadores genéticos que estejam relacionados à resistência à insulina e às alterações na homeostase da glicose causando, conseqüentemente, alterações no organismo materno que repercutem no desenvolvimento fetal e placentário. Além da necessidade de definir se o perfil de expressão gênica dessas gestantes identifica um grupo diferente das DMG ou apenas representam etapas mais precoces da mesma patologia.

Hipóteses

-Gestantes não diabéticas (com rastreamento positivo para DMG) apresentam perfil

de expressão gênica diferente do grupo de gestantes com rastreamento negativo.

- Gestantes com HGL e DMG tratadas apresentam perfil de expressão gênica diferente entre si, diferente das gestantes não diabéticas (com rastreamento positivo para DMG) e do grupo de gestantes com rastreamento negativo.

Objetivo

Objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão gênica em células do sangue total de gestantes com hiperglicemia.

Objetivos específicos

- Identificar o perfil de expressão gênica em células de sangue total de gestantes não diabéticas (com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG) e comparar com gestantes com rastreamento negativo para DMG. (Capítulo 1)

- Identificar e comparar o perfil de expressão gênica de gestantes não diabéticas (com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG), hiperglicêmicas gestacional leve e diabéticas gestacional. (Capítulo 2).

Método

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Plataforma Brasil (CAAE: 14489013.0.0000.5411, número do parecer 291.638). Todas as pacientes foram informadas sobre o objetivo da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do recrutamento individual. As 52 gestantes foram recrutadas com 34 semanas de gestação no Centro de Investigação do Diabete Perinatal da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp e no Hospital Misericórdia Botucatuense (UNIMED), entre 2012-2015 responsáveis pelo diagnóstico e tratamento. As gestantes coletadas não estavam

em trabalho de parto nem sob influencia de medicamentos para indução do trabalho de parto.

Os grupos foram distribuídos de acordo com os objetivos em dois capítulos:

Capítulo 1: Grupo 1 - Controle (n=8), gestantes com rastreamento negativo; Grupo 2 - Não Diabético (ND; n = 13), com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG (TTG e perfil glicêmico normais).

Capítulo 2: Grupos 1 - Controle (n=8), gestantes com rastreamento negativo para DMG; Grupo 2 - Não Diabético (ND; n = 13), com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG (TTG e perfil glicêmico normais); Grupo 3 - Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL; n = 14), com TTG normal e perfil glicêmico alterado e Grupo 4 – Diabete Gestacional (DMG; n = 16), com TTG alterado e perfil glicêmico normal ou alterado.

O tamanho amostral se apresenta diferente entre os grupos devido a uma correção bioinformática de valores fundo, na qual retiramos as amostras que apresentaram valores de fundo acima da média para garantir a qualidade e confiabilidade da técnica.

Um questionário sobre informações pessoais (idade, tabagismo, etilismo, contato com compostos químicos, exposição a radiações) e histórico médico (doenças intercorrentes, medicamentos de uso habitual) foi aplicado a todas as participantes do estudo. Os fatores de risco presentes nos grupos com rastreamento positivo foram: Glicemia de jejum acima de 90mg/dl, obesidade prévia, histórico familiar de diabete, idade materna acima de 25 anos, história obstétrica de DMG prévio, macrossomia fetal, óbito perinatal anterior, malformação fetal prévia.

Os critérios para a inclusão no estudo foram: (a) a gestante ser classificada dentro de um dos grupos de estudo; (b) realizar assistência pré-natal e parto no Hospital Misericórdia Botucatuense - UNIMED ou no Hospital das Clinicas de Botucatu- Faculdade de Medicina de

Botucatu-Unesp; (d) assinar o TCLE; (e) estar em jejum no momento da coleta; (f) TTG e Perfil glicêmico entre a 24ª e 28ª semanas; (g) idade gestacional máxima de entrada no protocolo de tratamento de 30 semanas para as mulheres com HGL e DMG; (h) não estar em trabalho de parto no momento da coleta. Critérios de não inclusão foram: (a) gestações múltiplas; (b) Fumantes; (c) Etilistas e (d) diabéticas tipo 1. Critérios de exclusão: (a) gestantes com doenças crônicas e infecciosas; (b) malformações fetais e (c) parto antes da 34ª semana. As gestantes com diagnóstico de HGL e de DMG seguiram mesmo protocolo terapêutico que inclui orientação e adequação alimentar, por nutricionistas do serviço, prática regular de exercícios, e, quando necessário, insulina associada à dieta e ao exercício (Metzger *et al.*, 2007). O controle da hiperglicemia materna foi realizado pelo perfil glicêmico, em intervalos máximos de 15 dias. Quando a média glicêmica foi ≥ 120 mg/dL (calculada pela média aritmética de todas as glicemias avaliadas no PG), a insulina NPH foi introduzida, com doses e horários de aplicação ajustados aos valores e picos hiperglicêmicos (Rudge *et al.*, 2005).

Foi coletada amostra de sangue periférico para glicemia, HbA1C e análise de expressão gênica. A glicose plasmática foi mensurada pelo método de glicose oxidase (*Glucose – Analyser II Beckman, Fullerton, California, USA*) e a média glicemia calculada pela média aritmética da glicose plasmática mensurada em todos os perfis glicêmicos realizados ao diagnóstico (grupo ND) e durante o tratamento (grupos HGL e DGC); a HbA1C foi analisada pelo método de HPLC (cromatografia líquida de alta resolução – D10TM *Hemoglobin Testing System, BIO RAD® Laboratories, Hercules, CA, USA*). O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado pela razão entre peso corpóreo dividido pelo quadrado da altura no início e final da gestação.

Parte da amostra de sangue (2,5mL) coletada em seringas foi imediatamente

transferida para tubo Blood RNA (*PaxGene*), homogeneizada e armazenada à temperatura ambiente por até 24 horas. Após esse período, os tubos foram armazenados em freezer a -20°C por 24 horas e, posteriormente, em freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

Extração de RNA e avaliação da concentração e integridade da molécula

A extração do RNA foi feita utilizando-se o *Paxgene Blood RNA kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração foi realizada no equipamento *NanoVue*. A média das concentrações e a relação de contaminação do RNA extraído foram satisfatórias, com rendimento em média de 0,5 µg/µL e índice de pureza (razão 260/280 e 260/230) acima de 1,8. A qualidade e integridade da molécula foram avaliadas por meio da integridade das bandas referentes às subunidades ribossomais 28s e 18s. Além disso, foi realizada a análise por eletroforese em capilar em equipamento *Bioanalyser* (Agilent) para verificação do RIN (*RNA Integrity Number*), sendo que os valores de RIN iguais ou acima de 7 foram considerados aceitáveis para a realização dos microarrays.

Perfil de expressão gênica em larga escala (microarray)

O perfil de expressão gênica foi avaliado pela técnica de *microarray* de uma cor. Foram usadas lâminas de vidro (*SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray Kit*) e feita a conversão do RNA em cDNA, que foi marcado com cianina (Cy3) com o *1-Color Low Input Linear Amplification kit* (Agilent). O cRNA marcado foi purificado com o RNeasy kit (Qiagen), posteriormente eluído em água *RNase-free* e, então, quantificado. As etapas de fragmentação do cRNA e hibridação (em câmara de hibridação *SureHyb* por 17 horas a 65°C) das amostras nas lâminas foram realizadas utilizando-se o *Gene Expression Hybridization kit*. Na sequência, as lâminas hibridadas foram lavadas com as soluções específicas. As soluções

Agilent's Stabilization e *Drying* foram utilizadas para proteger as sondas cianinas da degradação induzida por ozônio. A análise das lâminas de *microarrays* foi feita no equipamento *Agilent Microarray Scan Control*. A extração dos dados foi feita por meio do *Agilent Feature Extraction* e foram avaliados todos os parâmetros, que foram mostrados pelo *QC report* para garantir a qualidade da técnica.

Análise estatística e bioinformática

Os dados clínicos foram extraídos do Banco de Dados do Serviço e armazenados em planilhas do *software* Excel 2010. Após isso, foram conferidos e testados quanto à consistência das informações. Para avaliar as características da população do estudo, foi utilizada teste t (capítulo 1) e análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (capítulo 2). O nível de significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

Para análise do *microarray*, a quantificação dos dados e o controle de qualidade foram realizados utilizando-se o *software Feature Extraction (FE) software* versão 15.5 (*Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Clara, CA, USA*). O filtro, normalização e análise dos dados de expressão foram carregados em *R-statistical environment* (<http://www.r-project.org>) versão 3.0.0. O ajuste de fundo foi realizado subtraindo-se os valores medianos de fundo a partir dos valores medianos de expressão. Os dados foram transformados por \log_2 e, em seguida, normalizados utilizando a função quantil do pacote *aroma.light* (Bolstad *et al.*, 2003). Os genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se o teste-F com correção Benjamini-Hochberg visando à comparação entre todos os grupos, foi estabelecido *cutoff* de 2 para o *fold change*. Essas análises foram feitas utilizando-se o pacote *Multtest* (Pollard *et al.*, 2005). Todos os clusters

de genes co-regulados foram submetidos à análise funcional utilizando banco de dados para anotação, visualização e descoberta Integrada (DAVID) versão 6.7 (Huang *et al.* 2009). Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$, incluindo a correção Benjamini-Hochberg.

Após análise bioinformática, foi feita revisão na literatura de todos os genes diferencialmente expressos e elaboradas redes biológicas e discussão dos genes que apresentaram relação direta ou indireta com diabetes e sua fisiopatologia.

Avaliação de redes de interações gênicas

As redes de interações gênicas foram feitas pelo *STRING: functional protein association networks (String-db.org)* utilizando cada gene diferencialmente expresso de interesse que apresentou interações dentro de cada comparação. Foi utilizado *confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Além disso, foram usados *experiments* e *databases* como métodos de predição.

Referências Bibliográficas

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38 Suppl:S8-S16.

Ayres-de-Campos D, Arulkumaran S; FIGO Intrapartum Fetal Monitoring Expert Consensus Panel. FIGO consensus guidelines on intrapartum fetal monitoring: Introduction. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Oct;131(1):3-4.

Bacchs CJM, Lotgering FK, Wallenburg HCS. Oral glucose tolerance test is poor predictor of hyperglycaemia during pregnancy, *J. Perinatol*. 1989. Med. 17 253–257.

Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*. 1995; 346:1458–1463.

Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*. 1982; 295:31–35.

Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*. 1995; 9:284–292.

Bennett ST, Todd JA. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet*. 1996; 30:343–370.

Bento JL, Palmer ND, Mychaleckyj JC, Lange LA, Langefeld CD, et al. Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53: 3007–301

Bo S, Menato G, Gallo ML, Bardelli C, Lezo A, Signorile A, et al. Mild gestational hyperglycemia, the metabolic syndrome and adverse neonatal outcomes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004; 83: 335-40.

Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand R, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19:185–193.

Brozinick JT Jr, Birnbaum MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1998; 273: 14679-14682.

Calderon IM, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RA, Brasil MA, Rudge MV. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Oct;78(1):65-71.

Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144:768–773 57.

Chang HR, Cheng CH, Shu KH, Chen CH, Lian JD, Wu MY. Study of the polymorphism of angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2003; 66 (1), 51–56.

Cheyssac C, Lecoeur C, Dechaume A, Bibi A, Charpentier G, et al. Analysis of common PTPN1 gene variants in type 2 diabetes, obesity and associated phenotypes in the French population. *BMC Med Genet*. 2006; 7: 44.

Cho YM, Kim TH, Lim S, Choi SH, Shin HD, Lee HK, Park KS, Jang HC. Type 2 diabetes associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia* 2009; 52:253–261.

Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, Wells S, Brüning JC, Nolan PM, Ashcroft FM, Cox RD. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet*. 2010 Dec;42(12):1086-92. Epub 2010 Nov 14.

Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P. Additive effect of A → G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996; 20:1062–1066.

Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Takahashi P, Almeida R, Macedo C, Manoel-Caetano F, Foss MC, Foss-Freitas MC, Rassi DM, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA. Transcriptome meta-analysis of peripheral lymphomononuclear cells indicates that gestational diabetes is closer to type 1 diabetes than to type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep*. 2013 Sep;40(9):5351-8.

Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K. et al. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. – *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 2907–2910.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):284-7.

Del Nero U, Rudge MVC. Estudo prospectivo da influência do peso, volume e densidade absoluta da placenta de gestantes portadoras de hipertensão arterial ou diabetes no resultado perinatal. (Doutorado). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Ernst S, Demirci C, Valle S, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocaña A. Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy. *Diabetes Manag (Lond).* 2011; 1(2): 239-248.

Evangelista AF, Collares CV, Xavier DJ, Macedo C, Manoel-Caetano FS, Rassi DM, Foss-Freitas MC, Foss MC, Sakamoto-Hojo ET, Nguyen C, Puthier D, Passos GA, Donadi EA1. Integrative analysis of the transcriptome profiles observed in type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus reveals the role of inflammation. *BMC Med Genomics.* 2014 May 23;7:28.

Fajas L, Debril MB, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol.* 2001 Aug;27(1):1-9. Review.

Feldman RK, Tieu RS, Yasumura L. Gestational Diabetes Screening: The International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups Compared With Carpenter-Coustan Screening. *Obstet Gynecol.* 2016 Jan;127(1):10-7.

Fernandez-Real, J. M, Gutierrez, C, Ricart, W. et al. The TNFalpha gene Nco polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. – *Diabetes.* 1997; 46: 1468–1472.

Ferrara A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care.* 2007 Jul;30 Suppl 2:S141-6.

Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic β -cells. *J Biol Chem.* 2005; 280:39609–39615.

Freathy RM, Hayes MG, Urbanek M, Lowe LP, Lee H, Ackerman C, Frayling TM, Cox NJ, Dunger DB, Dyer AR, Hattersley AT, Metzger BE, Lowe WL Jr; HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: common genetic variants in GCK and TCF7L2 are associated with fasting and postchallenge glucose levels in pregnancy and with the new consensus definition of gestational diabetes mellitus from the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. *Diabetes.* 2010 Oct;59(10):2682-9. Epub 2010 Aug 3.

Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, et al. Severe diabetes, age- dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest.* 2003; 112: 197-208.

Gelaleti RB, Damasceno DC, Lima PH, Salvadori DM, Calderon Ide M, Peraçoli JC, Rudge MV. Oxidative DNA damage in diabetic and mild gestational hyperglycemic pregnant women. *Diabetol Metab Syndr.* 2015 Jan 15;7 (a).

Gelaleti RB, Damasceno DC1, Salvadori DM, Marcondes JP, Lima PH, Morceli G, Calderon IM, Rudge MV. IRS-1 gene polymorphism and DNA damage in pregnant women with diabetes or mild gestational hyperglycemia. *Diabetol Metab Syndr.* 2015 Apr 2;7:30. (b)

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):531-7.

Groop LC & Tuomi, T. Non-insulin-dependent diabetes mellitus—a collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann. Med.* 1997; 29, 37–53.

HAPO Study Cooperative Research Group, Metzger BE, Lowe LP, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008 May 8;358(19):1991-2002.

HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. *Diabetes.* 2009 Feb;58(2):453-9.

Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birth weight with diabetes and vascular disease. *Lancet*. 1999; 353:1789–1792.

Hayashi Y, Kajimoto K, Iida S, Sato Y, Mizufune S, Kaji N, Kamiya H, Baba Y, Harashima H. DNA microarray analysis of whole blood cells and insulin-sensitive tissues reveals the usefulness of blood RNA profiling as a source of markers for predicting type 2 diabetes. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(6):1033-42.

Hod M, Hadar E, Cabero-Roura L. Prevention of type 2 diabetes among women with prior gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Oct;131 Suppl 1:S16-8. (a)

Hod M, Kapur A, Sacks DA, Hadar E, Agarwal M, Di Renzo GC, Cabero Roura L, McIntyre HD, Morris JL, Divakar H. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Oct;131 Suppl 3:S173-211. (b)

Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 568-573.

Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc*. 2009, 4:44–57.

Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet*. 1998; 20:143–148.

Iwamoto K, Mori H, Okazawa H, Hashiramoto M, Kasuga M. Identification of a single nucleotide polymorphism showing no insulin-mediated suppression of the promoter activity in the human insulin receptor substrate 2 gene. *Diabetologia*. 2002 Aug; 45(8):1182-95. Epub 2002 Jun 19.

Jensen DM, Damm P, Sørensen B, Mølsted-Pedersen L, Westergaard JG, Klebe J, et al. Clinical impact of mild carbohydrate intolerance in pregnancy: a study of 2904 nondiabetic Danish women with risk factors for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(2):413–9.

Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Apr; 282(4):E974-6.

Kebede M, Favaloro J, Gunton JE, Laybutt DR, Shaw M, Wong N, Fam BC, Aston-Mourney K, Rantza C, Zulli A, Proietto J, Andrikopoulos S. Fructose-1,6-bisphosphatase overexpression in pancreatic β -cells results in reduced insulin secretion: a new mechanism for fat-induced impairment of β -cell function. *Diabetes*. 2008; 57:1887–1895.

Kim JY, Cheong HS, Park BL, Baik SH, Park S, Lee SW, Kim MH, Chung JH, Choi JS, Kim MY, Yang JH, Cho DH, Shin HD, Kim SH. Melatonin receptor 1 B polymorphisms associated with the risk of gestational diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2011 Jun 10; 12:82.

Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K⁺ channel (K_{ATP}) connection. *Diabetes*. 2005; 54: 3065–3072.

Kovacs P, Lehn-Stefan A, Stumvoll M, Bogardus C, Baier LJ. Genetic variation in the human winged helix/forkhead transcription factor gene FOXC2 in Pima Indians. *Diabetes*. 2003; 52:1292–1295.

Langer O. Changing the diagnosis criteria of type 2 diabetes in pregnancy: do the ends justify the means? *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2010; 23:234-238.

Lesage S, Zouali H, Vionnet N, Philippi A, Velho G, Serradas P, Passa P, Demenais F, Froguel P. Genetic analyses of glucose transporter gene in French non-insulin-dependent diabetes families. *Diabetes Metab*. 1997; 23:137–142.

Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H & Drucker DJ. β -Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 2005; 54:482–491.

Maddux B. A, Chang YN, Accili, D, McGuinness, OP, Youngren, JF & Goldfine, ID. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and

hyperglycemia. *Am. J. Physiol.* 2006; 290, E746–749.

Malecki MT, Cyganek K, Klupa T, Sieradzki J. The Ala45Thr polymorphism of BETA2/NeuroD1 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Acta Diabetol.* 2003 Jun; 40(2):109-11.

Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zouzas C. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2007 Jul;30 Suppl 2:S251-60.

Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 2010;33: 676–682.

Montazeri S, Nalliah S, Radhakrishnan AK. Is there a genetic variation association in the IL-10 and TNF alpha promoter gene with gestational diabetes mellitus? *Hereditas.* 2010 Apr; 147(2):94-102.

National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039–1057.

Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Calderon IMP, Geloneze B, Dias A, et al. Mild gestational hyperglycaemia as a risk factor for metabolic syndrome in pregnancy and adverse perinatal outcomes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24(4): 324-330.

O'sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes.* 1964 May-Jun;13:278-85.

Petry CJ. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. *Br J Nutr.* 2010 Sep;104(6):775-87.

Pollard KS, Dudoit S, van der Laan MJ. Multiple Testing Procedures: the multtest Package and Applications to Genomics. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor Statistics for Biology and Health* 2005, 249-271.

Porzio O, Federici M, Hribal M.L. The Gly972Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β cells. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:357–364.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* 1997; 15:293–297.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α (PGC-1 α): transcriptional co-activator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003; 24: 78–90.

Reaven GM. Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med Suppl.* 1994; 736: 13–22.

Ridderstrale M, Carlsson E, Klannemark M. et al. FOXC2 mRNA expression and a 5' untranslated region polymorphism of the gene are associated with insulin resistance. *Diabetes.* 2002; 51:3554–3560.

Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M et al. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia.* 2005; 48:2313–232.

Rudge MV, Lima CA, Paulette TA, Jovanovic L, Negrato CA, Rudge CV, Calderon IM, Dias A, Atallah AN. Influence of lower cutoff values for 100-g oral glucose tolerance test and glycemic profile for identification of pregnant women at excessive fetal growth risk. *Endocr Pract.* 2008 Sep;14(6):678-85.

Rudge MV, Lima CP, Damasceno DC, Napoli G, Rudge CV, Gallego FQ, Sinzato YK, Calderon IM. Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic women. *Diabetol Metab Syndr.* 2011; 3(1):19.

Rudge MV, Peraçoli JC, Berezowski AT, Calderon IM, Brasil MA. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz J Med Biol Res.* 1990;23(11):1079-89.

Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Abbade JF, Rugolo LMSS. Perinatal outcome of pregnancies complicated by diabetes and by maternal daily hyperglycemia not related to diabetes. A Retrospective 10 year Analysis. *Gynecol Obst Invest.* 2000; 50: 108-12.

Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Brasil MAM, Rugolo LMSS, Bossolan G, et al. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27:691-7.

Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Maestá I, Souza LMS, Peraçoli JC. Perspectiva perinatal decorrente do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelo diabetes. *RBGO.* 1995; 17: 26-32.

Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Suetake H, Peraçoli JC. Investigação diagnóstica do diabetes na gestação. *Rev Bras Ginecol Obst.* 1996; 18: 21-6.

Rudge MVC. Perfil glicêmico e teste de tolerância oral à glicose no diagnóstico do diabetes na gravidez. (Livre-Docência). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1983.

Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M. & Schulze M, Boeing H, Pfeiffer A. Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl).* 2009 Nov;87(11):1145-51.

Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2006;189:241-246.

Satake M, Ikarashi N, Kagami M, Ogiue N, Toda T, Kobayashi Y, Ochiai W, Sugiyama K. Increases in the expression levels of aquaporin-2 and aquaporin-3 in the renal collecting tubules alleviate dehydration associated with polyuria in diabetes mellitus. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(12):1965-70.

Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MAM, Costa ECNF, Calderon IMP, Magalhães CG, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 73:143-9.

Silva MRG, Calderon IMP, Gonçalves LC, Aragon FF, Padovani CR, Pimenta WP. Ocorrência de diabetes melito em mulheres com hiperglicemia em gestação prévia. *Rev Saúde Pública.* 2003; 37: 345-50.

Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring).* 2008 Aug;16(8):1961-5. Epub 2008 Jun 12.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S et al. The hormone RETN links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409:307-312.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen- Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 2001. 344:1343-1350.

Watanabe RM, Allayee H, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lawrence JM et al. Transcription factor 7- like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. *Diabetes.* 2007; 56: 1481-1485.

Weijers RN, Bekedam DJ, Smulders YM. Determinants of mild gestational hyperglycemia and gestational diabetes mellitus in a large dutch multiethnic cohort. *Diabetes Care.* 2002; 25: 72-7.

Zhang S, Zhang ZY. PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov Today.* 2007; 12: 373-381.

Zhao YH, Wang DP, Zhang LL, Zhang F, Wang DM, Zhang WY. Genomic expression profiles of blood and placenta reveal significant immune-related pathways and categories in Chinese women with gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2011 Feb;28(2):237-46.