



**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 diabete, 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.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DO SANGUE TOTAL DIFERENCIA GESTANTES COM RASTREAMENTO POSITIVO E DIAGNÓSTICO NEGATIVO PARA *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL

Objetivo

Identificar o perfil de expressão gênica em células de sangue total de gestantes com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para diabetes.

Resultados

A Tabela 1 mostra as características clínicas das gestantes recrutadas. As características clínicas avaliadas foram similares entre os 2 grupos ($P > 0,05$). A avaliação do perfil de expressão gênica mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo ND ($p < 0,05$), apresentando 22 sequências diferencialmente expressas (7 hiperexpressos e 15 hipoexpressos) (tabela 2 e figura 1). Dos genes diferencialmente expressos, destacamos três sendo 2 hiperexpressos (*EEF2K* e *CDR2*) e um hipoexpresso (*AKAP5*), dos quais foram feitas redes gênicas (Figuras 2, 3 e 4) e tabelas de interações (tabelas 3 e 4) com os principais processos biológicos envolvidos. As redes elaboradas evidenciaram 49 interações com outros genes; gene *EEF2K* apresentou interações com 20 genes diferentes, o gene *CDR2* com somente um gene e o gene *AKAP5* com 28 genes diferentes.

Tabela 1. Características da população de estudo.

	Grupos	
	Controle	ND
Número de Gestantes	08	13
Idade (anos)	29,1 ± 6,02	27,09 ± 6,78
Glicemia jejum (mg/dL)	79,30 ± 4,73	82,09 ± 6,53
HbA1C	5,15 ± 0,55	5,45 ± 0,53
IMC Inicial (Kg/m²)	23,6 ± 1,08 (normal)	28,22 ± 5,15 (sobrepeso)
IMC Final (Kg/m²)	28,78 ± 2,70	32,37 ± 3,39
Antecedentes pessoais, obstétricos e/ou familiares de diabete (%)	0%	100%

Legenda: ND: Não diabético (rastreamento positivo e diagnóstico negativo)

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média ou porcentagem.

Sem diferença estatística entre os grupos

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos entre os grupos controle e não-diabético.

Símbolo do gene ou "Probe"	Valor de p	"Fold Change"
<i>EEF2K</i>	0,00012	1.21
<i>BTBD16</i>	0,00029	1.07
<i>CDR2</i>	0,00044	1.12
<i>SNHG20</i>	0,00006	1.10
<i>A_21_P0000001</i>	0,00015	1.11
<i>A_33_P3322724</i>	0,00017	1.11
<i>AMER1</i>	0,00033	1.10
<i>AKAP5</i>	0,00024	0.95
<i>ZNF441</i>	0,00041	0.91
<i>MINPP1</i>	0,00048	0.89
<i>A_21_P0001425</i>	0,00005	0.91
<i>A_21_P0002456</i>	0,00049	0.90
<i>A_21_P0007723</i>	0,00024	0.89
<i>A_21_P0009347</i>	0,00010	0.91
<i>A_21_P0014156</i>	0,00012	0.88
<i>A_21_P0014587</i>	0,00030	0.90
<i>A_19_P00320229</i>	0,00033	0.93
<i>A_19_P00315625</i>	0,00042	0.92
<i>A_33_P3225397</i>	0,00045	0.91
<i>A_33_P3300916</i>	0,00033	0.92
<i>A_33_P3319957</i>	0,00040	0.89
<i>A_33_P3780834</i>	0,00022	0.92

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

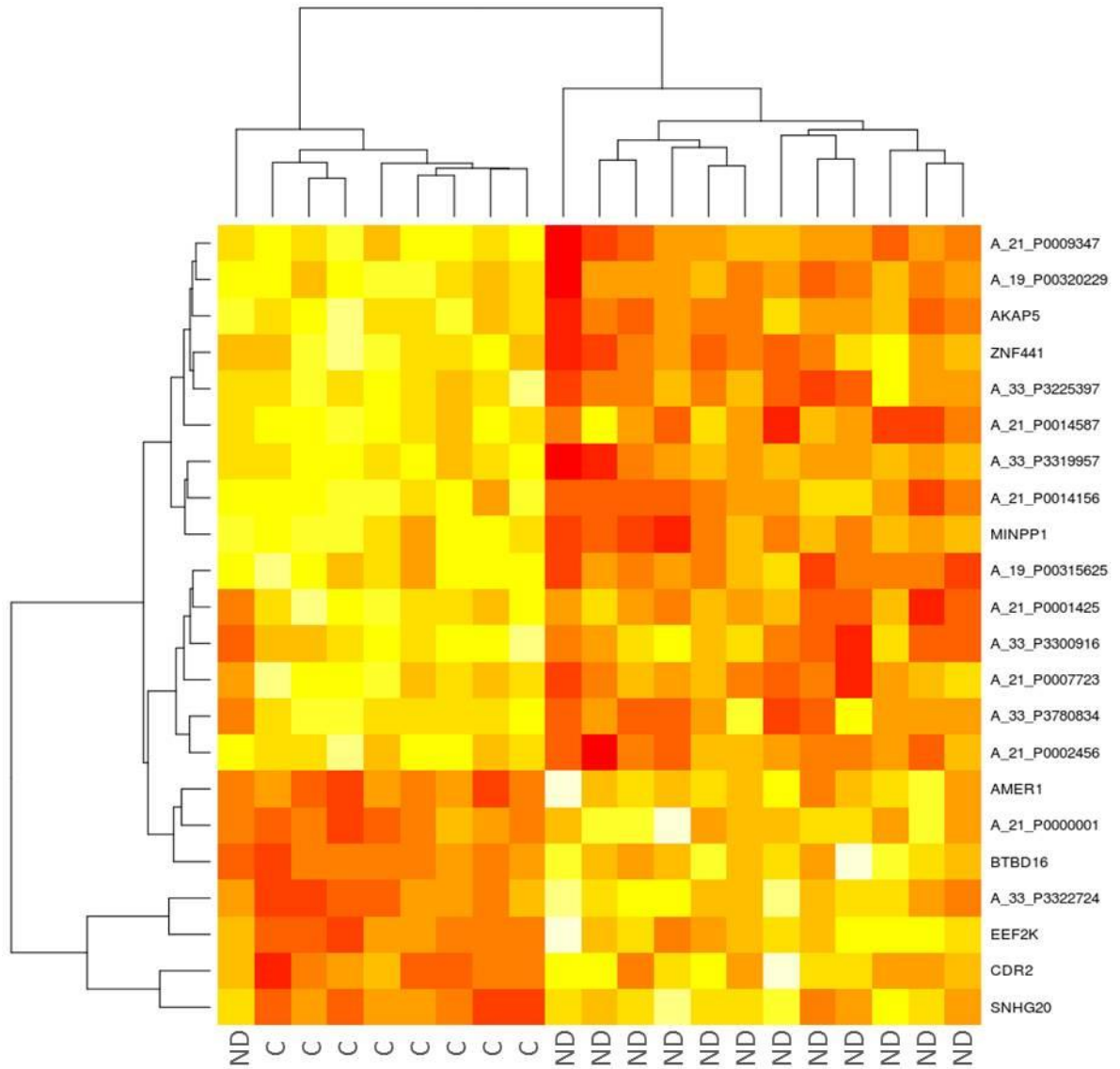


Figura 1. Heat map das comparações de expressão gênica entre os grupos controle e ND.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hipoexpresso) e branco (ausência de modulação)

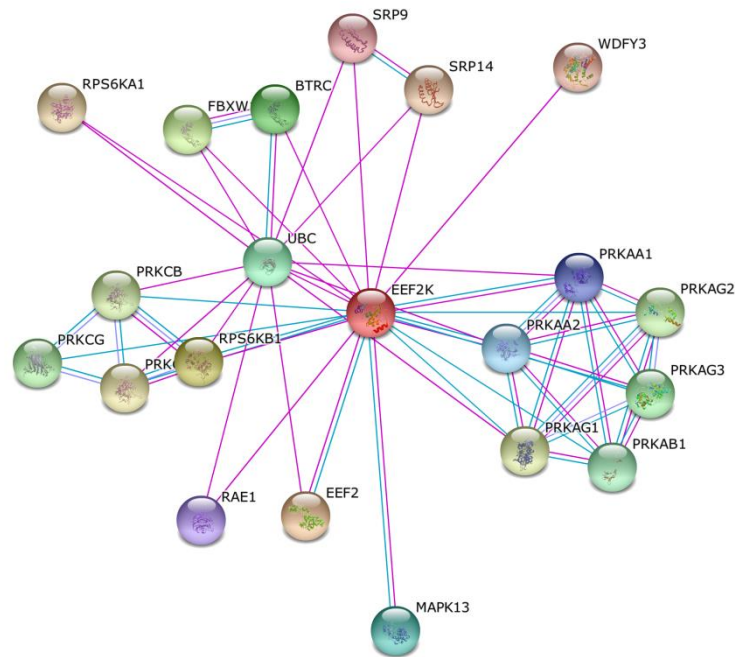


Figura 2. Rede de interações gênicas do gene *EEF2K*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 3. Tabela de interações gênicas do gene *EEF2K*, mostrando os principais processos biológicos de interesse envolvidos na rede.

Gene Ontology	Processos biológicos	Número de genes envolvidos*	Valor de <i>p</i>
GO:0019538	Proteínas de processos metabólicos	16	$3.2e^{-6}$
GO:0007049	Ciclo celular	15	$5.3e^{-11}$
GO:0010467	Expressão gênica	15	$2.9e^{-5}$
GO:0008286	Via de sinalização de receptor de insulina	8	$2.4e^{-9}$
GO:0032869	Resposta celular ao estímulo de insulina	8	$2.7e^{-8}$
GO:0032868	Resposta à insulina	8	$1.0e^{-7}$

*Número de genes na interação que estão relacionados com o processo biológico descrito.
 $P < 0,05$ – Significância do processo biológico na rede.



Figura 3. Rede de interação gênica do gene *CDR2*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linha roxa) e *databases*.

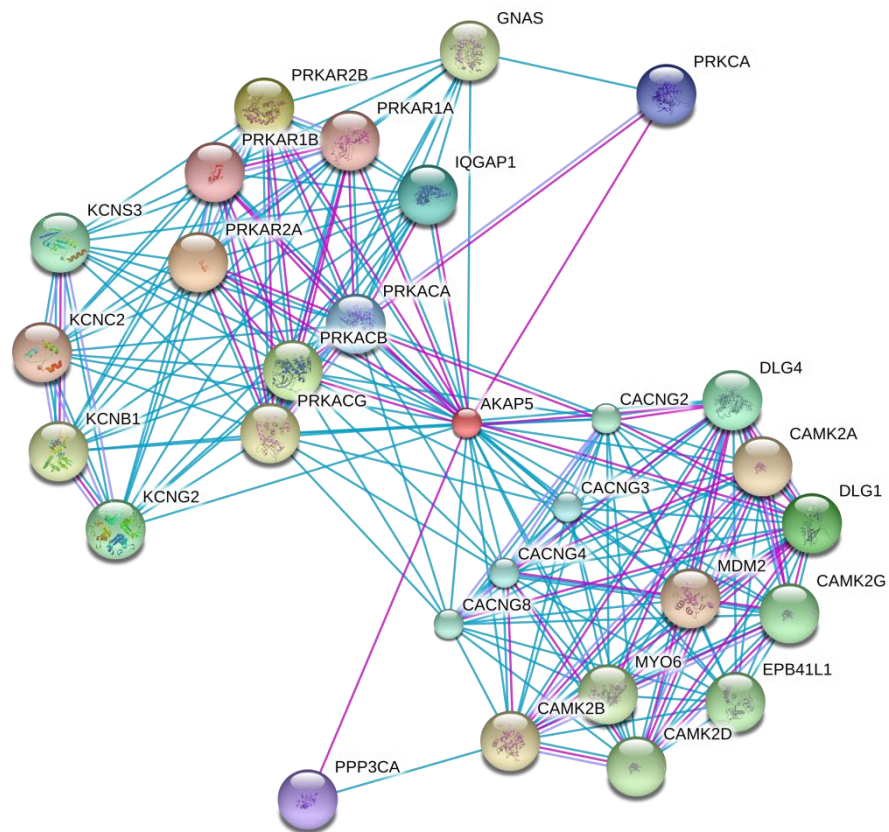


Figura 4. Rede de interações gênica do gene *AKAP5*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 4. Tabela de interações gênicas do gene *AKAP5*, mostrando os principais processos biológicos de interesse envolvidos na rede.

Gene Ontology	Processos biológicos	Número de genes envolvidos*	Valor de p
GO:0051046	Regulação de secreção	18	9.2e ⁻¹⁸
GO:0050796	Regulação de secreção de insulina	16	1.4e ⁻²²
GO:0050708	Regulação de secreção proteica	16	9.2e ⁻¹⁸
GO:0006955	Resposta imune	15	2.7e ⁻⁹
GO:0002376	Processos do sistema imune	14	4.2e ⁻⁶

*Número de genes na interação que estão relacionados o processo biológico descrito. P<0,05 – Significância do processo biológico na rede.

Discussão

Este estudo foi delineado para investigar o perfil de expressão gênica em gestantes não diabéticas (rastreamento positivo e diagnóstico negativo) comparadas com gestantes controle com rastreamento negativo para DMG. A análise da expressão gênica envolvendo 66.000 genes resultou numa lista de 22 genes diferencialmente expressos nas gestantes não diabéticas sendo 7 hiperexpressos e 15 hipoexpressos. Esses resultados são importantes porque separam duas populações com expressão gênica diferenciada decorrente apenas do rastreamento positivo do DMG (Ayash *et al.*, 2005) e dão suporte à estratégia do rastreamento do “two-step Carpenter-Coustan” recomendado pela *American College of Obstetricians and Gynecology* (ACOG 1998).

A literatura atual evidencia grande discussão sobre a melhor estratégia diagnóstica do DMG capaz de detectar os resultados perinatais adversos (Metzger *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2016; ADA 2015). As questões referentes ao custo-efetividade e benefícios para

detectar e tratar DMG estão crescendo nas publicações nacionais e internacionais e variam desde publicações que negam a sua importância (US Preventive Services Task Force, 2008; Scott *et al.*, 2002) até as que concluem que o rastreamento, diagnóstico e tratamento do DMG é custo-efetivo (NCCWCH, 2008). Os resultados do *Hapo Study* (2009) evidenciaram que graus menos severos de intolerância à glicose que o DMG estão associados com resultado perinatal adverso e que o rastreamento deve ser universal com uso do TTG 75g (Metzger *et al.*, 2010). A ACOG (*American College of Obstetrician and Gynecology*), 2013 define a estratégia do “*two steps*” com: rastreamento seguido de sobrecarga de glicose para aquelas com rastreamento positivo porque a considera custo efetiva (ACOG 1998). A mais recente publicação da ADA (2015) deixa as 2 estratégias de rastreamento (“*one-step*” e “*two-step*”) como alternativas a serem usadas. Muitos trabalhos têm sido publicados e outros estão em andamento avaliando se a estratégia de rastreamento “*one-step DMG*” preconizada pela IADPSG é mais eficiente que a “*two-steps Carpenter-Coustan*”, mas na revisão feita nas Bases de Dados *NCBI-PubMed* não encontramos nenhum relato sobre a expressão gênica diferenciada entre essas populações. Para o rastreamento do DMG utilizamos glicemia de jejum acima de 90mg/dl e fatores de risco para diabetes. Apesar de diferir do descrito pela ADA, considerando que apenas o rastreamento é suficiente para separar 2 populações com perfil de expressão gênica diferenciada e que é custo-efetiva, no nosso ponto de vista os nossos achados orientam para a estratégia “*Two steps*”: rastreamento positivo seguido de diagnóstico.

Bonomo (2005) e Bevier (1999) evidenciaram que tratar gestantes apenas com rastreamento positivo (TTG 50g alterado) diminui a ocorrência dos recém-nascidos grandes para idade gestacional. A diferença na expressão gênica entre gestantes com rastreamento negativo e positivo detectada neste trabalho pode ser o fator responsável pela melhoria do

resultado perinatal adverso nessa população com rastreamento positivo para DMG que foi tratada.

Dos 22 genes diferencialmente expressos destacamos três, sendo dois hiperexpressos (*EEF2K* e *CDR2*) e um hipoexpresso (*AKAP5*). As redes de interação construídas com estes três genes resultaram no envolvimento de 49 genes. O gene *EEF2K* hiperexpresso em pacientes do grupo ND codifica uma proteína-quinase altamente conservada na via de sinalização mediada pela calmodulina, que ativa receptores de superfície para a divisão celular. Esta quinase está envolvida na regulação da síntese proteica e fosforila o fator de alongamento eucariótico 2 (*EEF2*) inibindo sua função. A atividade desta quinase é aumentada em muitos tipos de câncer e pode ser um alvo válido no tratamento (Niemann *et al.*, 2013). *EEF2* apresenta papel essencial na síntese de proteínas, uma vez que catalisa a translocação da subunidade ribossomal do RNAm e de dois RNAt após a transferência de peptídeo. A fosforilação de *EEF2* para *EEF2K* bloqueia a tradução do RNAm (Jørgensen *et al.*, 2006). Foi verificado que *knock-down* para *EEF2* apresentaram diminuição acentuada no teor total de insulina mais pronunciada do que a diminuição da insulina causada por hiperglicemia, sugerindo que a hipoexpressão de uma ou mais isoformas desta proteína desempenha papel importante na regulação da biossíntese de insulina. Além disso, a atenuação da tradução em longo prazo pode contribuir também para glicotoxicidade das células beta pancreáticas (Xie *et al.*, 2014). Na avaliação de redes gênicas, o gene *EEF2K* apresentou interação com 20 genes diferentes, e relação com processos biológicos referentes a proteínas de processos metabólicos, ciclo celular e expressão gênica, além de via de sinalização de receptores de insulina, resposta celular a insulina e ao estímulo de insulina (Szkłarczyk *et al.*, 2015). O gene *EEF2K* e suas interações gênicas apresentam papel importante na regulação da biossíntese de insulina. Sugerem que

este grupo de gestantes mesmo com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para diabetes e com esta alteração gênica possa no futuro em circunstâncias que exijam a produção aumentada de insulina desenvolver hiperglicemia favorecendo ao aparecimento de fatores relacionados à síndrome metabólica e diabetes.

O gene *CDR2*, também hiperexpresso no grupo ND, é um antígeno tumoral expresso numa percentagem elevada de tumores da mama e do ovário. É também uma proteína reguladora do ciclo celular em células tumorais com altos níveis de mitose e sua hiperexpressão é responsável pela proliferação celular em tumores (O'Donovan *et al.*, 2010). A proteína CDR2 está presente em 62% dos cânceres de ovário e não está presente em tecidos normais (Balamurugan *et al.*, 2009). O gene *CDR2* apresenta apenas uma interação gênica com o gene *MYC* (*myelocytomatosis oncogene*) que tem sua função relacionada com processos tumorais (Szklarczyk *et al.*, 2015). Vrachnis (2016) mostram uma possível correlação entre diabetes, câncer de mama e patogênese de carcinoma endometrial por vias inflamatórias e também possível correlação com carcinoma de ovário. Além disso, vários trabalhos mostram a relação da obesidade com câncer de mama (Huang *et al.*, 1997 e Wolk *et al.*, 2001) e câncer de ovário (O'Flanagan *et al.*, 2015). Pacientes do grupo ND além de apresentarem hiperexpressão deste gene, também apresentam obesidade desde antes da gestação. Isso reforça a atenção que este grupo requer, pois apesar de apresentarem diagnóstico negativo para diabetes, apresentam rastreamento positivo e processo inflamatório devido à obesidade, o que pode contribuir juntamente com a hiperexpressão do gene *CDR2* com o possível aumento na probabilidade de desenvolver câncer de mama e ovário neste grupo.

AKAP5 é um membro da família AKAP. As proteínas de ancoragem quinase-A (AKAPs) são um grupo de proteínas estruturalmente diversas, que têm a função se ligarem à

subunidade reguladora da proteína quinase A (PKA) e confinar a holoenzima em diversos locais dentro da célula (AKAP5 gene, 2015). O AMPc dependente do PKA interfere na ativação das células T através da inibição da expressão do receptor da cadeia alfa da interleucina (IL) 2 e da produção da IL-2 (Ramstad *et al.*, 2000). Estudos genéticos e imunológicos ressaltam as deficiências no receptor de IL-2 e em sua via de sinalização como um defeito central na patogênese do DM1. A falta de IL-2 no pâncreas pode impedir a ação das células Treg e levar à destruição de células beta-pancreáticas (Hartemann *et al.*, 2012). Estudos de intervenção prévia em modelos animais indicam que o aumento da sinalização de IL-2 pode prevenir e reverter a doença, com a proteção conferida principalmente por restabelecimento da função reguladora das células Treg (Hulme *et al.*, 2012). Na obesidade, fator presente neste grupo de gestantes, as células Treg recrutam macrófagos que secretam citocinas e estão diretamente relacionadas com a resistência a insulina. Além disso, células T estão diretamente relacionadas com inflamação crônica e o bloqueio dessas células pode melhorar o quadro de resistência à insulina (Lumeng *et al.*, 2009). Essa cascata de eventos é de grande interesse, pois a hipoexpressão do gene *AKAP5* levando a diminuição das células Treg, pode ser uma tentativa compensatória de evitar o aparecimento da insulino resistência devido à obesidade e provável estado pré-diabético presente neste grupo. Além disso, na interação de redes gênicas, o *AKAP5* mostrou relação com 28 genes, vários deles relacionados com resposta e processos do sistema imune e regulação da secreção de insulina e proteínas em geral (Szkarczyk *et al.*, 2015). Esse achado sugere que indiretamente este gene pode influenciar os níveis de insulina, e estar relacionado com a possível evolução para diabetes neste grupo de gestantes que apresenta neste momento apenas fatores de risco para a doença. A análise conjunta desses genes hiper e hipoexpressos sugerem que esse grupo de gestantes não diabéticas, mas com rastreamento positivo está num momento

de equilíbrio entre a resistência e a produção de insulina. A simples presença de fatores de risco pessoais, obstétricos e ou familiares associados ou não à glicemia de jejum alterada tem relação com o perfil de expressão gênica balanceado, mas preocupante pois fatores ambientais e pessoais especialmente de sobrepeso podem desestabilizar esse equilíbrio. Esses resultados necessitam de confirmação com outros trabalhos, mas, evidenciam que a orientação dietética vinda da nutrigenômica pode interferir, adiar ou mesmo impedir a evolução deste grupo para DM2 dentro dos conhecimentos atuais que existem na literatura.

As limitações deste estudo estão relacionadas ao tamanho amostral pequeno devido às dificuldades de encontrar gestantes com rastreamento negativo, dentro dos critérios de inclusão, em especial a obesidade e devido à perda de alguns pacientes devido à correção dos valores de fundo após análise bioinformática para mantermos a qualidade do *microarray*. A análise no tecido sanguíneo pode ter sido um dos fatores que influenciou na quantidade reduzida de genes diferencialmente expressos nos dois grupos. Outra limitação deste estudo é a falta de trabalhos similares na literatura para comparação e discussão dos resultados obtidos. Mas, apesar das limitações mencionadas, nossos resultados mostram que gestantes com rastreamento positivo para DMG apresentam alterações significativas no perfil de expressão gênica, exibindo 22 genes diferencialmente expressos. Ainda mais, nossos resultados mostram que estes genes estão envolvidos em redes gênicas e processos biológicos relacionados à biossíntese, regulação da secreção e vias de sinalização da insulina, processos implicados na patogênese do diabetes na gestação. Apesar do número reduzido de genes diferencialmente expressos, nossos achados separam geneticamente as duas populações de gestantes normoglicêmicas diferenciadas apenas pelo rastreamento positivo. 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.

Nosso estudo contribui com novas perspectivas para o melhor entendimento dos processos biológicos específicos envolvidos na patogênese do diabetes na gestação. Apesar de serem gestantes não diabéticas, mas com fatores de risco, a atenção a esses genes é importante para a possível linha do tempo da evolução dessa doença mostrando que este grupo de gestantes está um passo a frente no diabetes em relação ao grupo sem fatores de risco.

Referencias Bibliográficas

AKAP5 gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKAP5>>. Acesso em 05 nov. 2015.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Reading the medical literature: applying evidence to practice American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC (1998).

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

Ayach W, Calderon IMP, Rudge MVC, Costa RAA. Associação glicemia de jejum e fatores de risco como teste para rastreamento do diabetes gestacional. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2005; 5(3): 329-35.

Balamurugan K, Luu VD, Kaufmann MR, Hofmann VS, Boysen G, Barth S, Bordoli MR, Stiehl DP, Moch H, Schraml P, Wenger RH, Camenisch G. Onconeural cerebellar degeneration-related antigen, Cdr2, is strongly expressed in papillary renal cell carcinoma and leads to attenuated hypoxic response. Oncogene. 2009 Sep 17;28(37):3274-85.

Bevier WC, Fischer R, Jovanovic L. Treatment of women with an abnormal glucose challenge test (but a normal oral glucose tolerance test) decreases the prevalence of macrosomia. Am J Perinatol. 1999;16(6):269-75.

Bonomo M, Corica D, Mion E, Gonçalves D, Motta G, Merati R, Ragusa A, Morabito A. Evaluating the therapeutic approach in pregnancies complicated by borderline glucose intolerance: a randomized clinical trial. Diabet Med. 2005 Nov;22(11):1536-41.

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.

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

Hartemann A, Bourron O. Interleukin-2 and type 1 diabetes: new therapeutic perspectives. *Diabetes Metab.* 2012 Nov;38(5):387-91.

Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA.* 1997 Nov 5;278(17):1407-11.

Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012 Jan;61(1):14-22.

Jørgensen R, Merrill AR, and Andersen GR (2006) The life and death of translation elongation factor 2. *Biochem Soc Trans* 34:1–6.

Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):846-7.

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.

National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. *Diabetes in Pregnancy: Management of Diabetes and Its Complications from Preconception to the Postnatal Period.* London, U.K., RCOG Press, 2008.

Niemann B, Pan R, Teschner M, Boening A, Silber RE, Rohrbach S. Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue. *Exp Gerontol.* 2013 Jan;48(1):55-63.

O'Donovan KJ, Diedler J, Couture GC, Fak JJ, Darnell RB. The onconeural antigen cdr2 is a novel APC/C target that acts in mitosis to regulate c-myc target genes in mammalian tumor cells. *PLoS One.* 2010 Apr 7;5(4):e10045.

O'Flanagan CH, Bowers LW, Hursting SD. A weighty problem: metabolic perturbations and the obesity-cancer link. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015 Aug;23(2):47-57.

Ramstad C, Sundvold V, Johansen HK, Lea T. cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal.* 2000 Aug;12(8):557-63.

Scott DA, Loveman E, McIntyre L, Waugh N. Screening for gestational diabetes: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2002;6(11):1-161.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

US Preventive Services Task Force, authors. Screening for gestational diabetes mellitus: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2008;148:759–765.

Vrachnis N, Iavazzo C, Iliodromiti Z, Sifakis S, Alexandrou A, Siristatidis C, Grigoriadis C, Botsis D, Creatsas G. Diabetes mellitus and gynecologic cancer: molecular mechanisms, epidemiological, clinical and prognostic perspectives. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Feb;293(2):239-46.

Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyrén O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adam HO. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control.* 2001 Jan;12(1):13-21.

Xie CM, Liu XY, Sham KW, Lai JM, Cheng CH. Silencing of EEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) reveals AMPK-ULK1-dependent autophagy in colon cancer cells. *Autophagy.* 2014 Sep;10(9):1495-508.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE GESTANTES BRASILEIRAS NÃO DIABÉTICAS E COM HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE: EVOLUÇÃO PARA O APARECIMENTO DO DIABETE

Objetivo geral

Identificar e comparar o perfil de expressão gênica em células do sangue total de gestantes controle, não diabéticas (com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para diabetes), hiperglicemia gestacional leve e *Diabetes mellitus* gestacional (DMG).

Objetivos específicos

- Relacionar os genes diferencialmente expressos utilizando redes gênicas e tabelas de interação.
- Comparar o perfil de expressão gênica entre os grupos gestantes não diabéticas (com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para diabetes), hiperglicemia gestacional leve e *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e relacionar com a patogênese do DMG.

Resultados

A figura 1 representa a caracterização das gestantes dos diferentes grupos de estudo. Um total de 52 gestantes foram incluídas no estudo, das quais 9 apresentaram rastreamento negativo para DMG (grupo controle), 13 gestantes com rastreamento positivo e diagnóstico negativo (grupo não diabético), 14 com TTG75g normal e perfil glicêmico alterado (grupo Hiperglicemia gestacional leve) e 16 com TTG 75g alterado e perfil glicêmico normal ou alterado (grupo DMG) entre 24-28 semanas de gestação. As gestantes com HGL e

DMG foram estratificadas de acordo com a resposta ao tratamento: dieta e atividade física e se necessário insulina. As gestantes com HGL e as com DMG foram monitoradas com a realização de perfil glicêmico com 10 determinações de glicemia semanalmente, orientadas por nutricionistas e acompanhadas pelo médico. A Tabela 1 mostra as características demográficas das gestantes recrutadas. A idade não diferiu entre os grupos. Todas as gestantes com HGL e diabéticas apresentaram normoglicemia após o tratamento e, assim, se mantiveram até o parto. Apesar disso, os grupos HGL e DMG apresentaram médias glicêmicas maiores em relação aos grupos controle e não diabético e o grupo DMG apresentou média glicêmica maior comparado ao HGL ($p < 0,05$). As gestantes do grupo DMG mostraram níveis mais elevados de HbA1C em relação aos outros grupos ($p < 0,05$) e esse grupo de gestantes também mostrou IMC inicial e final maiores em relação aos do grupo controle.

A avaliação do perfil de expressão gênica mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos HGL e DMG ($p < 0,05$). Em relação ao grupo controle, o grupo HGL apresentou 5 genes diferencialmente expressos (1 hiperexpresso e 4 hipoexpressos) (Tabela 2 e Figura 2). Destes genes, destacamos o gene *KCNIP3*, do qual foi feita a rede gênica (Figura 3). A avaliação do perfil de expressão gênica entre os grupos não diabéticos e HGL mostrou diferença significativa ($p < 0,05$), porém com separação fraca, apresentando 3 genes diferencialmente expressos (2 hiperexpressos e 1 hipoexpresso) (Tabela 3 e Figura 4), sem rede de interação gênica e nenhuma relação com diabetes. O grupo DMG apresentou 17 genes diferencialmente expressos (10 hiperexpressos e 7 hipoexpressos) em relação ao controle (Tabela 4 e Figura 5). Foram destacados os genes *MILR1*, *EPN2* e *RPA1*, a partir dos quais foram feitas as redes gênicas (Figuras 6 e 7) e as tabelas de interações (Tabelas 5 e 6) com os principais processos biológicos envolvidos. O gene *MILR1* não apresentou rede de

interação gênica, o gene *EPN2* apresentou interações com 17 genes diferentes e o *RPA1* apresentou interação com 50 genes diferentes. Na comparação entre os grupos não diabético e DMG, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com 5 genes diferencialmente expressos (3 hiperexpressos e 2 hipoexpressos) (Tabela 7 e Figura 8), sem apresentação de rede de interação gênica e nenhum gene de destaque. A comparação realizada entre os grupos HGL e DMG também foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com 11 genes diferencialmente expressos (9 hiperexpressos e 2 hipoexpressos) (Tabela 8 e Figura 9). Destacamos os genes *RHBDL2* e *ZNF668*, porém estes genes não apresentaram redes de interações. Quando o conjunto dos três grupos juntos (não diabético, HGL e DMG) foi comparado ao grupo controle foram encontrados 8 genes diferencialmente expressos (3 hiperexpressos e 5 hipoexpressos) ($p < 0,05$) (Tabela 9 e Figura 10). Destacamos o gene *CRCP*, que apresenta rede de interação com 21 genes diferentes (Tabela 10 e Figura 11).

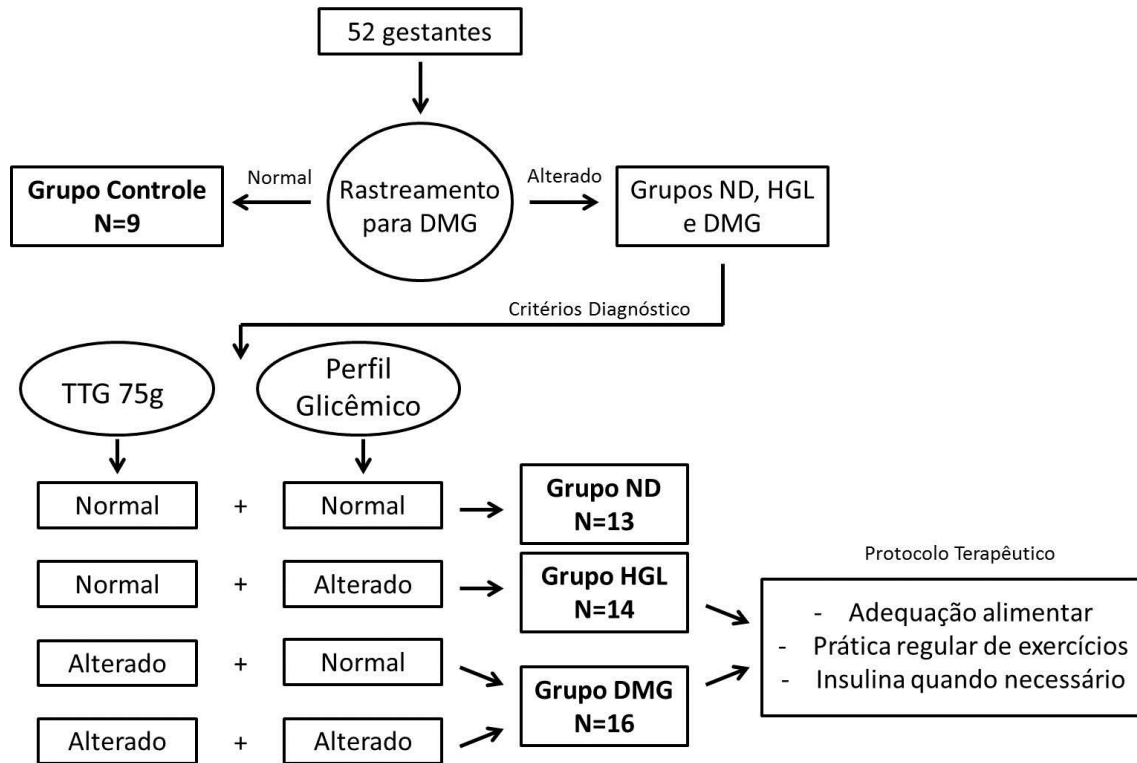


Figura 1. Caracterização das gestantes nos diferentes grupos de estudo

Tabela 1. Características da população de estudo.

	Grupos			
	Controle	ND	HGL	DMG
Número de Gestantes	08	13	14	16
Idade (anos)	29,11 ± 6,02	27,09 ± 6,78	27,58 ± 7,84	31,76 ± 5,65
Média Glicêmica (mg/dL)	79,30 ± 4,73	82,09 ± 6,53	94,35 ± 5,22* [#]	106,54 ± 15,42* ^{#&}
IMC Inicial (Kg/m²)	23,60 ± 1,08	28,22 ± 5,15	27,51 ± 6,94	32,75 ± 8,57*
IMC Final (Kg/m²)	28,78 ± 2,70	32,37 ± 3,39	31,63 ± 5,43	36,91 ± 7,20*
HbA1C (%)	5,15 ± 0,55	5,45 ± 0,53	5,74 ± 0,67	6,33 ± 0,90* ^{#&}

Legenda: ND – Não diabético; HGL – Hiperglicemia gestacional leve; DMG – Diabético gestacional.

Dados apresentados como média ± desvio padrão da média.

*p<0,05 – em relação ao grupo controle - Teste de comparações múltiplas de Tukey.

[#]p<0,05 – em relação ao grupo ND - Teste de comparações múltiplas de Tukey.

[&]p<0,05 – em relação ao grupo HGL - Teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos entre os grupos controle e HGL.

Símbolo do gene ou "probe"	Valor de p	"Fold Change"
A_21_P0009872	0,00002	1.22
KCNIP3	0,00003	0.90
TCHHL1	0,00006	0.87
A_21_P0001425	0,00003	0.81
A_21_P0009347	0,00005	0.90

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

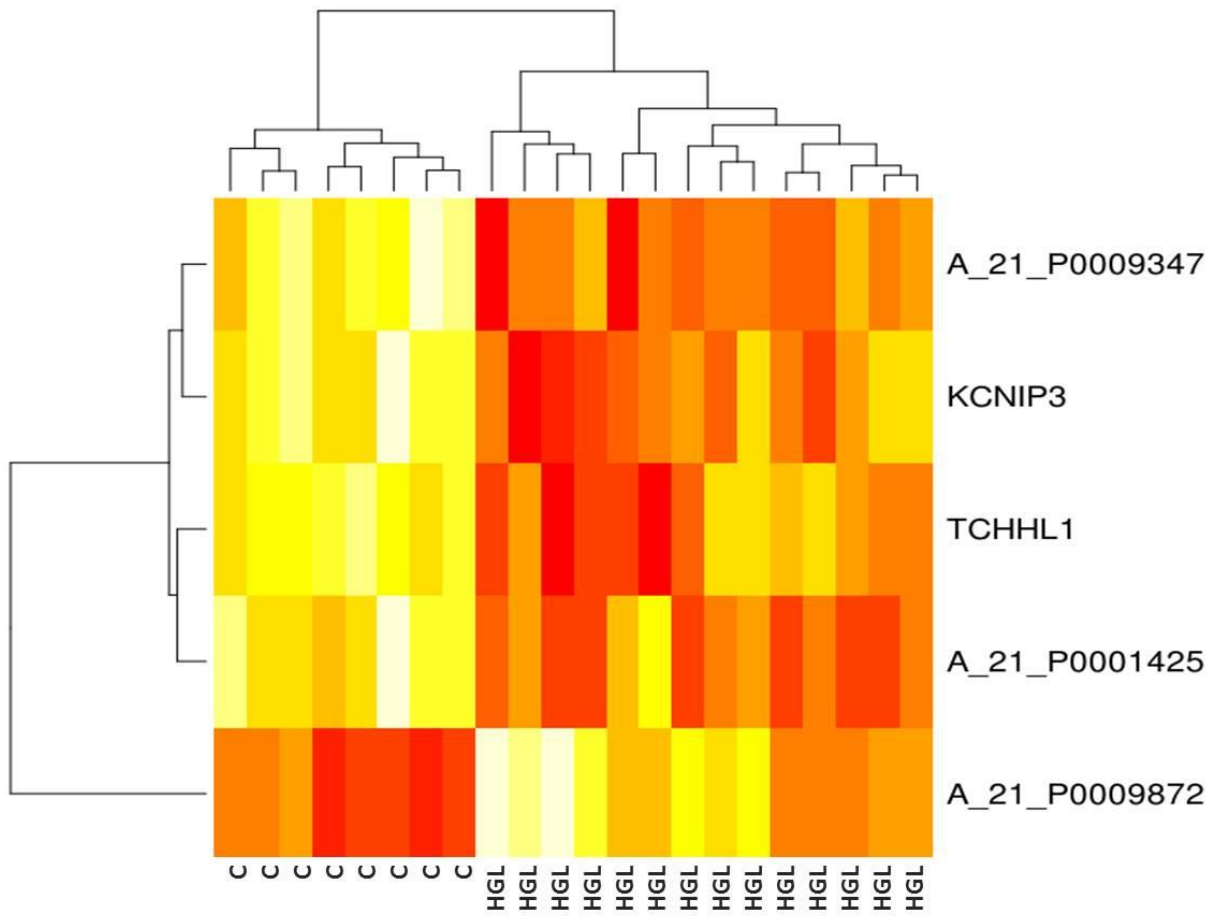


Figura 2. Heat map da comparação de expressão gênica entre os grupos controle e HGL.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hypoexpresso) e branco (sem modulação).

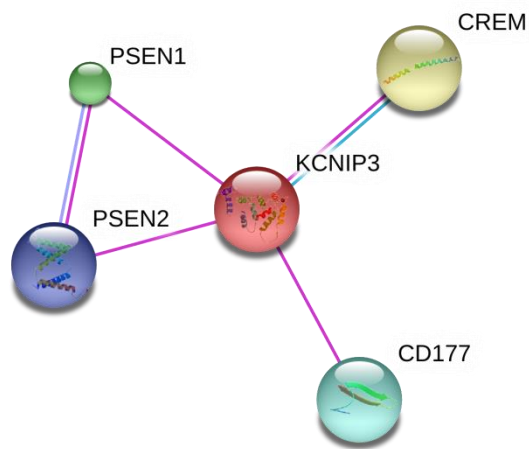
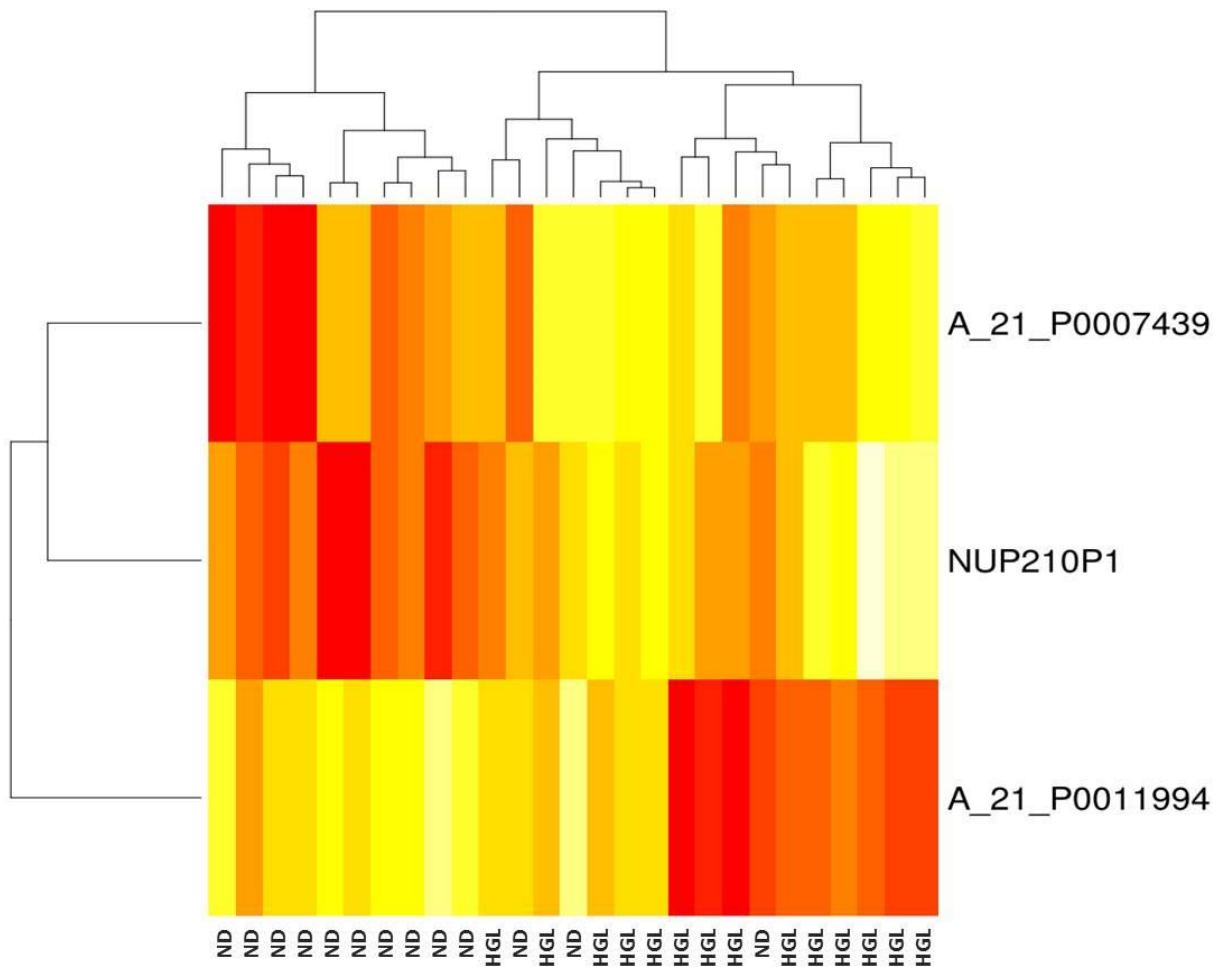


Figura 3. Rede de interações gênicas do gene *KCNIP3*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos entre os grupos ND e HGL.

Símbolo do gene ou "probe"	Valor de <i>p</i>	"Fold Change"
A_21_P0007439	0,00050	1,07
A_21_P0011994	0,00024	0,94
NUP210P1	0,00002	1,11

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

**Figura 4.** Heat map da comparação de expressão gênica entre os grupos ND e HGL.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hipoexpresso) e branco (sem modulação)

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos entre os grupos controle e DMG.

Símbolo do gene ou "probe"	Valor de p	"Fold Change"
<i>MILR1</i>	0,00018	1.31
<i>RPA1</i>	0,00026	1.29
<i>DISC1</i>	0,00044	1.18
<i>EPN2</i>	0,00012	1.22
<i>A_21_P0001704</i>	0,00036	1.21
<i>A_21_P0009872</i>	0,00002	1.22
<i>A_21_P0012944</i>	0,00014	1.84
<i>A_21_P0012993</i>	0,00001	1.94
<i>A_32_P145051</i>	0,00008	1.22
<i>A_33_P3321130</i>	0,00027	1.38
<i>HYPM</i>	0,00019	0.91
<i>TCHHL1</i>	0,00046	0.92
<i>A_21_P0002540</i>	0,00005	0.95
<i>A_21_P0003290</i>	0,00020	0.60
<i>A_21_P0009146</i>	0,00015	0.93
<i>A_19_P00320229</i>	0,00004	0.91
<i>A_21_P0000980</i>	0,00019	0.92

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

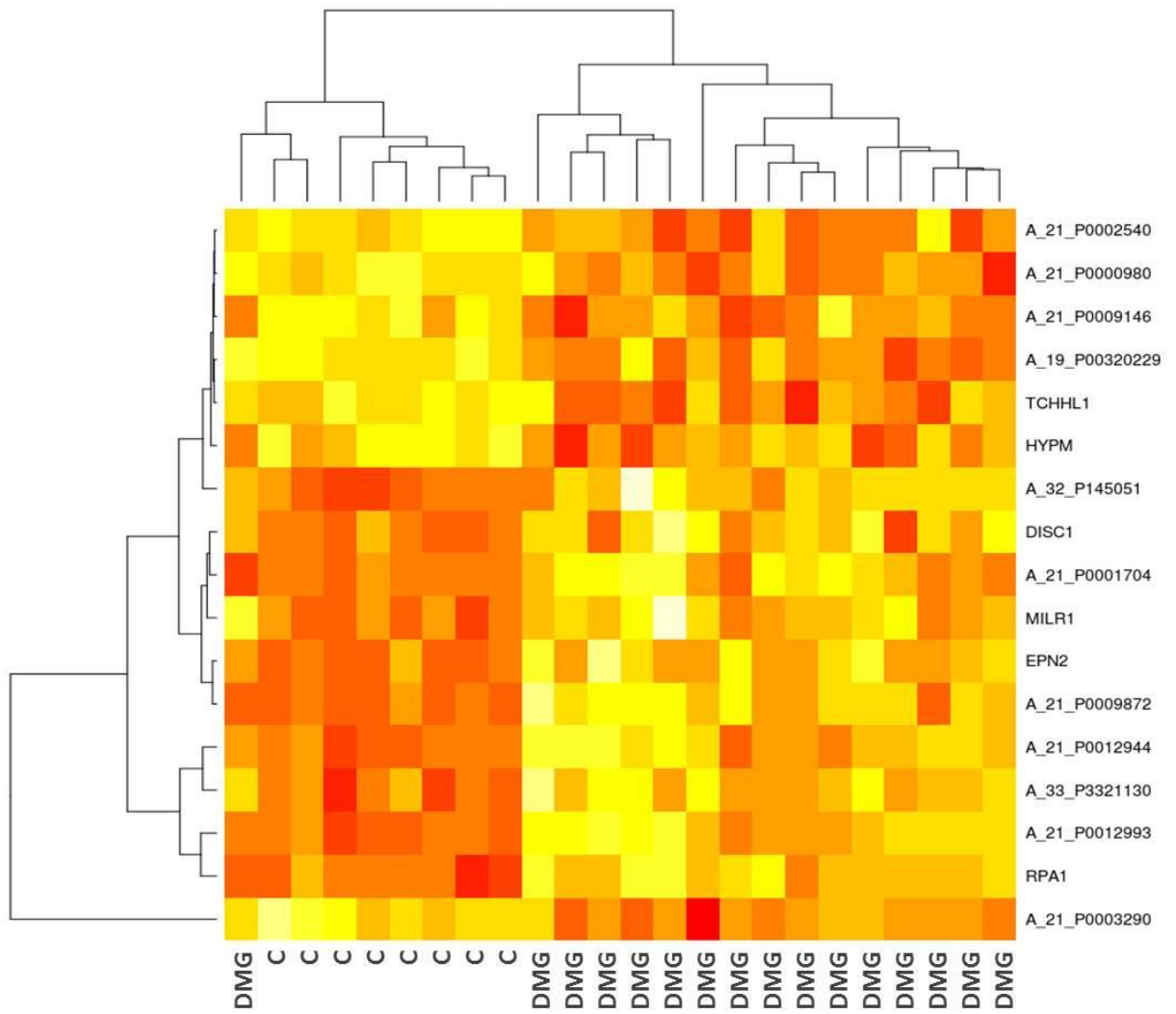


Figura 5. Heat map da comparação de expressão gênica entre os grupos controle e DMG.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hipoexpresso) e branco (sem modulação)

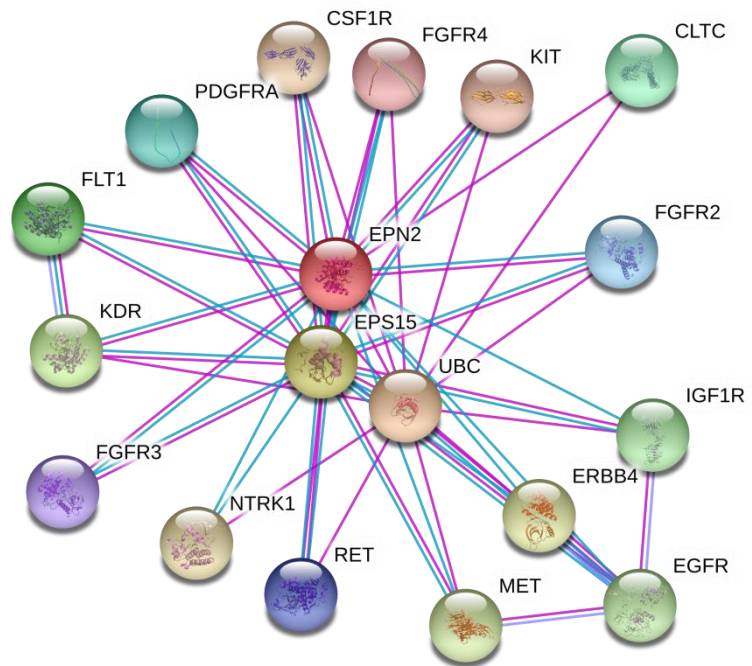


Figura 6. Rede de interações gênicas do gene *EPN2*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 5. Interações gênicas do gene *EPN2* mostrando os principais processos biológicos de interesse envolvidos na rede.

Gene Ontology	Processos biológicos	Número de genes envolvidos*	Valor de p
GO:0007169	Receptor transmembrana da proteína tirosina quinase em vias de sinalização	14	$6.8e^{-15}$
GO:0007167	Enzima ligada a receptores proteicos em vias de sinalização	14	$2.0e^{-13}$
GO:0007165	Transdução de sinal	13	$2.3e^{-4}$
GO:0009966	Regulação da transdução de sinal	13	$1.8e^{-7}$
GO:0001525	Angiogênese	4	$5.0e^{-3}$

*Número de genes na interação que estão relacionados com o processo biológico descrito.

p<0,05 – Significância do processo biológico na rede.

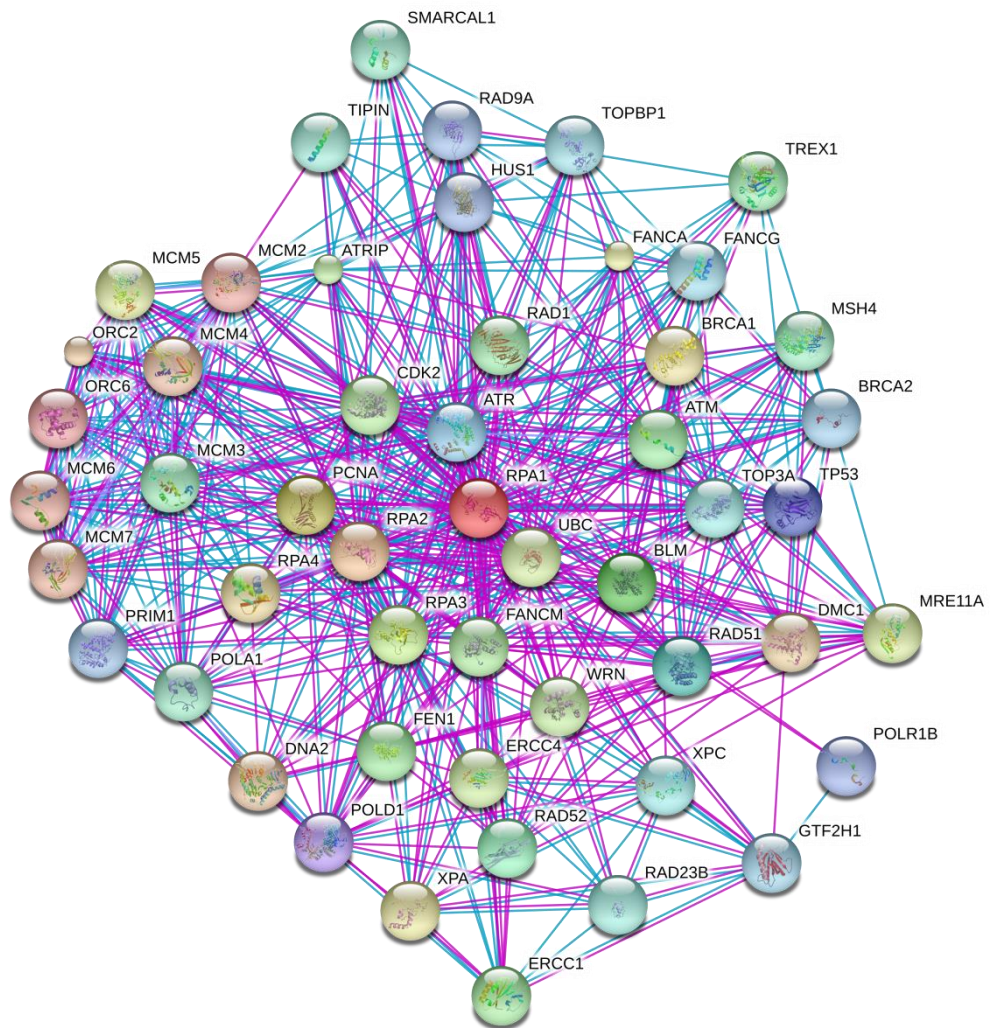


Figura 7. Rede de interações gênicas do gene *RPA1*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 6. Interações gênicas do gene *RPA1* mostrando os principais processos biológicos de interesse envolvidos na rede.

Gene Ontology	Processos biológicos	Número de genes envolvidos*	Valor de <i>p</i>
GO:0006974	Resposta celular por estímulo de danos no DNA	37	5.0e ⁻⁴¹
GO:0033554	Resposta celular por estresse	37	2.9e ⁻²⁸
GO:0010467	Reparo de DNA	36	2.7e ⁻⁴⁶
GO:0000077	Verificação de danos no DNA	15	1.8e ⁻¹⁸
GO:0006289	Reparo por excisão de nucleotídeo	14	2.7e ⁻²⁰
GO:0006284	Reparo por excisão de base	10	7.8e ⁻¹⁵

*Número de genes na interação que estão relacionados com o processo biológico descrito.

p<0,05 – Significância do processo biológico na rede.

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos entre os grupos ND e DMG.

Símbolo do gene ou “probe”	Valor de <i>p</i>	“Fold Change”
<i>A_21_P0001390</i>	0,00003	1,07
<i>A_21_P0001926</i>	0,00002	1,07
<i>A_21_P0002356</i>	0,00003	1,07
<i>SHISA3</i>	0,00004	0,87
<i>A_21_P0006315</i>	0,00003	0,92

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

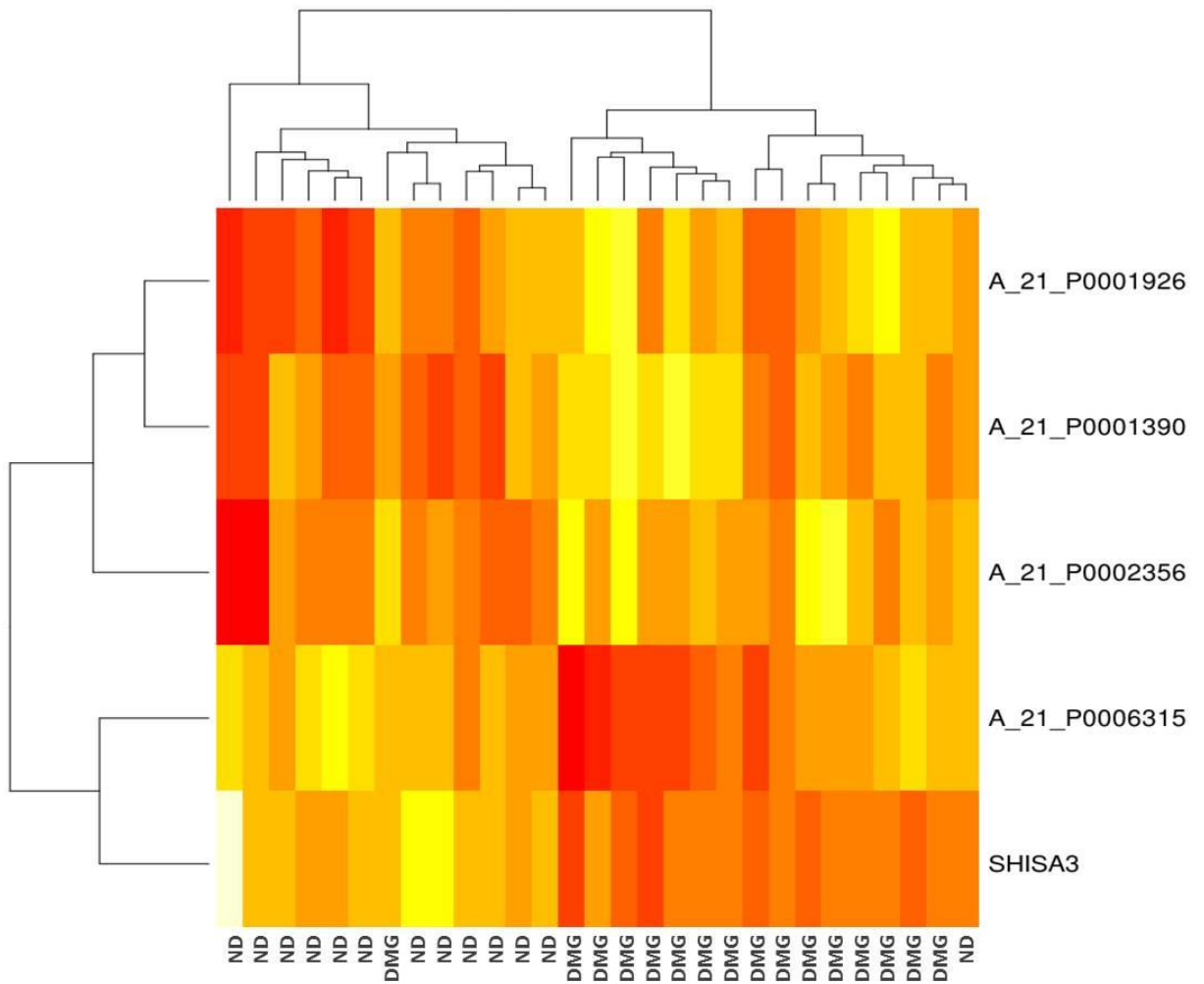


Figura 8. *Heat map* da comparação de expressão gênica entre os grupos não diabético e DMG.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hypoexpresso) e branco (sem modulação)

Tabela 8. Genes diferencialmente expressos entre os grupos HGL e DMG.

Símbolo do gene ou "probe"	Valor de p	"Fold Change"
<i>RHBDL2</i>	0,00027	1.08
<i>A_19_P00321986</i>	0,00056	1.07
<i>A_21_P0002923</i>	0,00058	1.08
<i>A_21_P0004973</i>	0,00048	1.08
<i>A_33_P3233250</i>	0,00041	1.09
<i>A_33_P3274129</i>	0,00071	1.08
<i>A_33_P3358143</i>	0,00020	1.08
<i>A_33_P3389689</i>	0,00071	1.09
<i>A_33_P3407344</i>	0,00061	1.09
<i>ZNF668</i>	0,00094	0.84
<i>A_21_P0014215</i>	0,00089	0.92

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

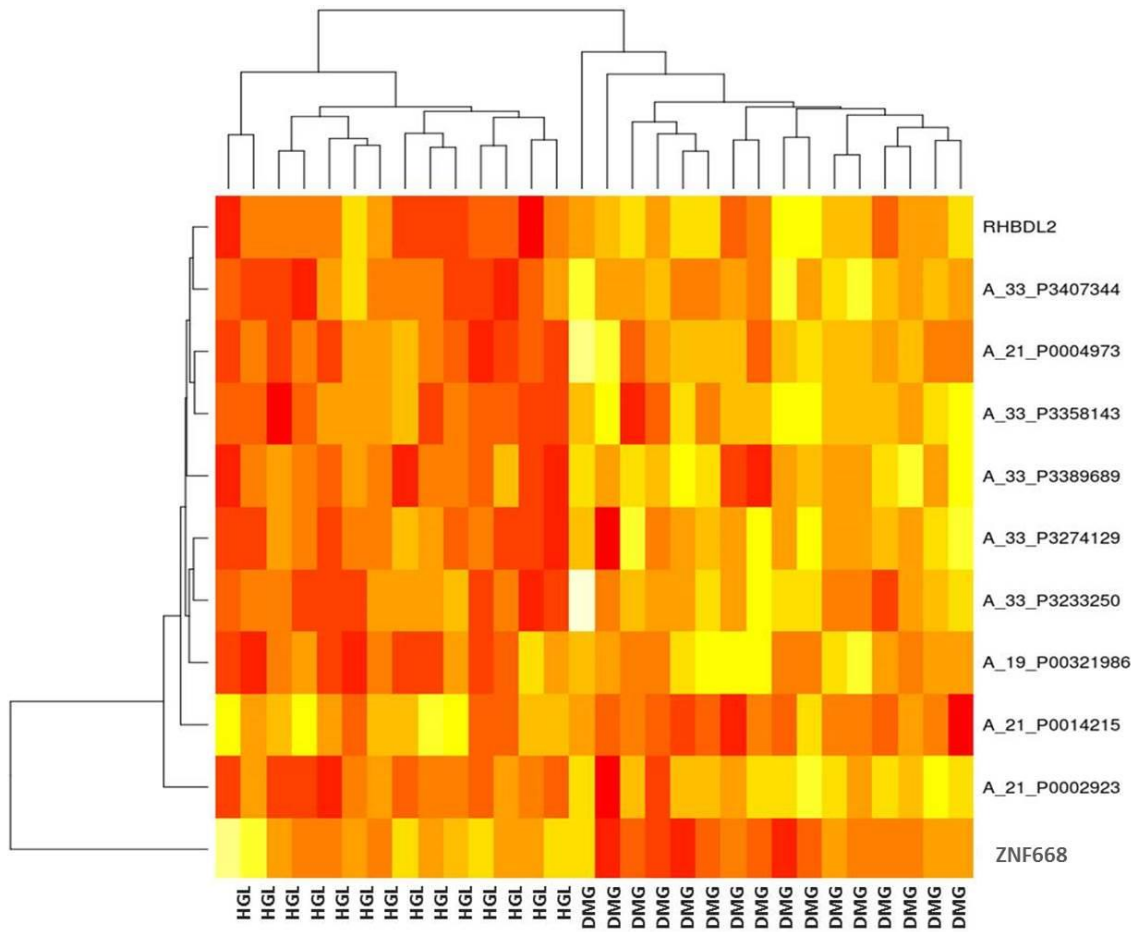


Figura 9. Heat map da comparação de expressão gênica entre os grupos HGL e DMG.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hypoexpresso) e branco (sem modulação)

Tabela 9. Genes diferencialmente expressos entre os grupos controle, não diabético, HGL e DMG.

Símbolo do gene ou "probe"	Valor de p	"Fold Change"
<i>KIAA0226</i>	0,00006	1,25
<i>CRCP</i>	0,00001	1,11
<i>A_21_P0009872</i>	0,00004	1,23
<i>TTY3</i>	0,00001	0,93
<i>A_19_P00320229</i>	0,00001	0,93
<i>A_21_P0009146</i>	0,00004	0,94
<i>A_21_P0009347</i>	0,00004	0,92
<i>A_33_P3424122</i>	0,00001	0,91

p<0,05 – diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle comparado aos grupos ND, HGL e DMG (Teste-F com correção Benjamini-Hochberg).

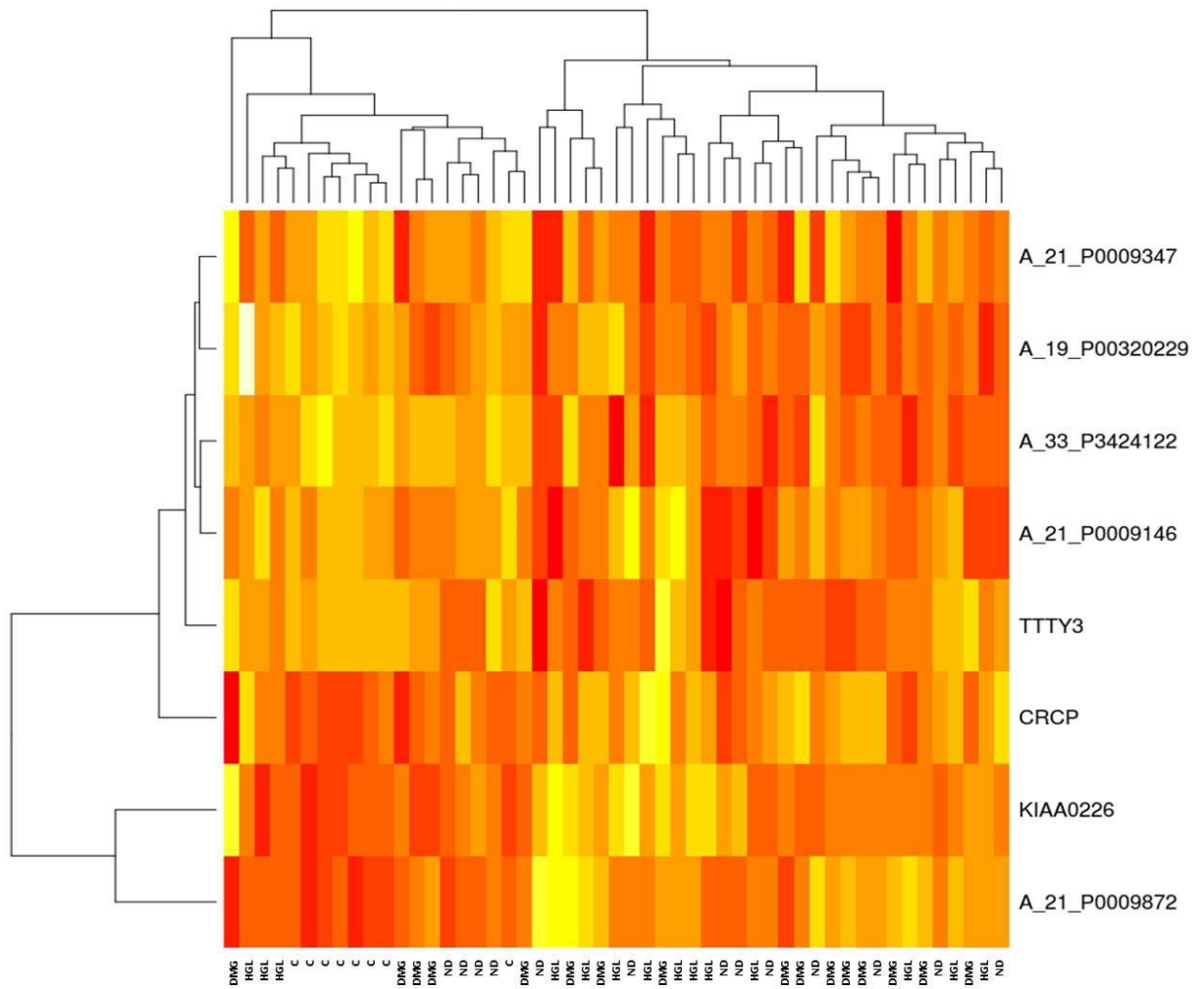


Figura 10. Heat map da comparação de expressão gênica entre todos os grupos (ND, HGL e DMG) com o grupo controle.

Legenda: Amarelo (hiperexpresso), vermelho (hipoexpresso) e branco (sem modulação).

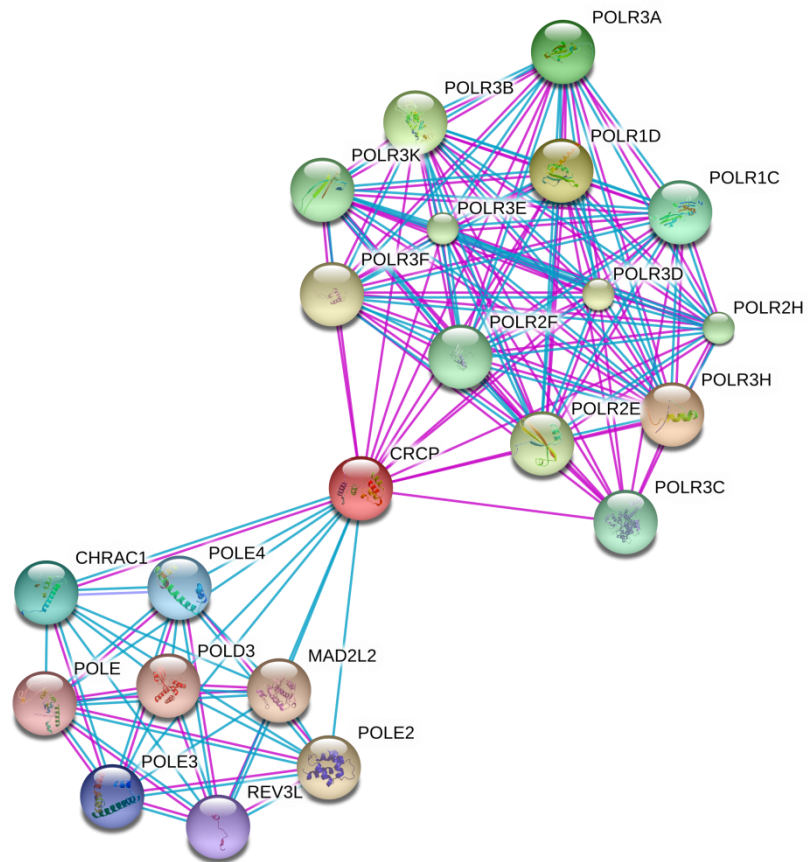


Figura 11. Rede de interações gênicas do gene *CRCP*. *Confidence score* de 0,7 (*high confidence*) e não mais que 50 interações por gene. Métodos de predição utilizados: *Experiments* (linhas roxas) e *databases* (linhas azuis).

Tabela 10. Interações gênicas do gene *CRCP* mostrando os principais processos biológicos de interesse envolvidos na rede.

Gene Ontology	Processos biológicos	Número de genes envolvidos*	Valor de <i>p</i>
GO:0044260	Processos metabólicos de macromoléculas celulares	21	3.0e ⁻⁸
GO:0043170	Processos metabólicos de macromoléculas	20	3.1e ⁻⁶
GO:0044237	Processos metabólicos celulares	20	3.2e ⁻⁵
GO:0008152	Processos metabólicos	20	2.9e ⁻⁴

*Número de genes na interação que estão relacionados com o processo biológico descrito.

p<0,05 – Significância do processo biológico na rede.

Discussão

Este estudo identificou que o perfil de expressão gênica de gestantes não diabéticas, com HGL e com DMG evidencia uma arquitetura genética subjacente, semelhante e evolutiva dentro da fisiopatologia do DMG associada com as vias metabólicas da glicose, resistência periférica à insulina, inflamação e função das células beta pancreáticas. Esse achado fundamenta a observação de que essas gestantes estão em risco aumentado para o desenvolvimento do DMG e posteriormente do DM2 (Lee *et al.*, 2007). Há evidência de um *link* genético temporal entre gestantes com DMG e aquelas com níveis glicêmicos inferiores aos do diagnóstico do DMG, que corrobora os achados do *HAPO Study* (2009). Isto confirma também que as gestantes com HGL, descritas há mais de 30 anos pelo nosso grupo, que apresentam hiperglicemia ao longo do dia ao ingerir dieta com proteínas, lipídios e glicose, possuem resistência à insulina após o término da gestação, obesidade, mortalidade perinatal similar às diabéticas, placentas com aumento de vascularização do vilo terminal e aumento de VGF2 e tem perfil de expressão gênica relacionado à homeostase da glicose na gestação (Rudge *et al.*, 1990; Negrato *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2003, Calderon *et al.*, 2007; Pietro *et al.*, 2010).

A partir da análise do perfil de expressão gênica do presente estudo, a comparação entre o grupo controle e o HGL destacou o gene *KCNIP3* hipoexpresso conhecido como calsenilina, que codifica um membro da família de proteínas que interage com canais potássio dependentes de voltagem (Kv), contendo domínios *EF-hand-like*. São componentes integrais de subunidades de complexos de canais Kv4, que podem regular as correntes do tipo A e, por conseguinte, a excitabilidade neuronal em resposta a alterações no cálcio intracelular. A proteína codificada por este gene também funciona como um repressor de transcrição regulada pelo cálcio e interage com as presenilinas, proteína totalmente

relacionada à doença de Alzheimer (KCNIP3 gene, 2015). Modulam a expressão de canais na membrana celular e podem desempenhar papel na regulação do processamento da presenilina 2 proteolítica e apoptose. *KCNIP3* ou *Dream* (*Downstream regulatory element antagonistic modulator*) modula a transcrição gênica de genes alvo no núcleo (Carrión *et al.*, 1999), interage com várias nucleoproteínas (Ledo *et al.*, 2000, Ledo *et al.*, 2002), liga-se e regula as propriedades de seleção de canais de potássio da classe Kv4 fora do núcleo (An *et al.*, 2000; Takimoto *et al.*, 2002; Bekar *et al.*, 2005). Este gene também reprime diretamente a transcrição por se ligar especificamente ao DNA. Funções como homotetrâmero e a sua afinidade com o DNA é reduzida após a ligação ao Ca^{2+} . Isto representa um mecanismo direto de indução de expressão de genes Ca^{2+} induzidos que não são dependentes de alterações na atividade de transcrição através de outros efetores de fosforilação ou interação proteína-proteína. *DREAM* pode ter amplo papel na regulação de uma variedade de genes (Carrión *et al.*, 1999). Há pouca descrição sobre esse assunto, mas também está associado à retinopatia diabética (Chavira-Suárez *et al.*, 2011) e conectado espacialmente com polimorfismos em DM2 (Morris *et al.*, 2012). Por codificar proteínas que interagem com canais de potássio (Kv), podem atuar na repolarização de células beta que são excitáveis.

As gestantes com HGL apresentam hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina, que persiste pelo menos até seis semanas pós-parto (Negrato *et al.*, 2009). Os resultados encontrados na avaliação do perfil de expressão gênica das gestantes com HGL mostraram hipoexpressão do gene *KCNIP3*, sugerindo a formulação de uma hipótese que envolve aspectos moleculares de secreção de insulina (Henquin *et al.*, 2002). Os processos celulares com forte influência nas respostas de células beta envolvem duas vias denominadas “*triggering*” e “*amplifying*”, que foram demonstradas por Henquin (2000). Na via “*triggering*”, a glicose modula a relação ATP/ADP. Quando a concentração e o

metabolismo de glicose aumentam, esse aumento da relação ATP/ADP fecha os canais de potássio, que são ATP sensíveis. O fechamento desses canais produz a despolarização da membrana que abre os canais de cálcio. A abertura dos canais de cálcio aumenta o influxo de cálcio e sua concentração intracelular aciona a exocitose de grânulos de insulina. Na via “*amplifying*”, a glicose aumenta a secreção de insulina independentemente de alterações na concentração do cálcio intracelular (Henquin *et al.*, 2002). As gestantes com HGL, pelo próprio nível de hiperglicemia detectada no perfil glicêmico, sugere-se que essas gestantes tenham aumento na produção intracelular de insulina. Sendo assim, a hipoexpressão do gene *KCNIP3* pode levar ao fechamento constante dos canais de potássio favorecendo a abertura dos canais de cálcio com conseqüente aumento do cálcio intracelular e liberação constante de insulina. Dessa maneira, a hipoexpressão deste gene associado à hiperglicemia pode influenciar a hiperinsulinemia detectada nessas gestantes (Negrato *et al.*, 2008) e resistência à insulina presente neste grupo. Na avaliação de redes gênicas, o gene *KCNIP3* apresentou interação com 4 genes diferentes e relação com processo biológico referente à regulação negativa de processos metabólicos (Szklarczyk *et al.*, 2015), o que fortalece nossa hipótese do aumento de secreção de insulina já detectada nestas gestantes. É importante salientar que essa rede de interação persistiu nessas gestantes, mesmo com o controle da glicemia materna.

A média glicêmica das gestantes com HGL tratadas é maior que a do grupo das não diabéticas, mas a separação no perfil de expressão gênica é fraca, evidenciando apenas 3 genes, sem rede de interação e, de acordo com os conhecimentos atuais, sem relação com diabete e sua fisiopatologia.

Os “*guidelines*” atuais baseados no rastreamento sobre diabete, sugerem duas estratégias: “*one step-75g OGTT*” ou “*two steps*” com GCT de 50g seguidos de 100g OGTT

para pacientes com rastreamento positivo (ADA, 2015). As duas estratégias excluem as gestantes dos grupos não diabético com rastreamento positivo e as com HGL, porque apresentam TTG normal. No entanto, a estratégia que vem sendo utilizada no Centro de Investigação do Diabete Perinatal-FMB/UNESP identifica as gestantes destes grupos ao realizar o TTG 75g e o perfil glicêmico como métodos diagnósticos. É importante ressaltar que, apesar dos grupos não diabético e HGL mostrarem uma separação fraca entre si quando comparadas ao grupo controle, evidenciam no seu perfil de expressão gênica uma evolução temporal da fisiopatologia do diabete. As gestantes não diabéticas apresentam perfil de expressão gênica sugestiva de genes relacionados à patogênese do diabete numa tentativa compensatória de amenizar o possível aparecimento da doença, conforme demonstrado no Capítulo 1. No grupo HGL, o perfil de expressão gênica confirma os dados clínicos de hiperinsulinemia e resistência à insulina, representando um passo a frente na evolução temporal para DMG. Esses resultados de expressão gênica precisam ser confirmados e intervenções podem ser estabelecidas para evitar a evolução temporal destes genes diferencialmente expressos nos dois grupos.

No grupo DMG, os genes diferencialmente expressos que se destacaram foram o *MILR1*, *RPA1* e *EPN2*, todos hiperexpressos em relação ao grupo controle. *MILR1* (*Receptor immunoglobulin-like*) desempenha papel inibitório na degranulação de mastócitos. Regula negativamente a IgE mediada por ativação de mastócitos e suprime a reação de hipersensibilidade imediata tipo I (*MILR1* gene, 2015). Os mastócitos são essenciais em resposta a reações alérgicas e, em tecido adiposo branco de obesos, há grande número destas células. Por consequência, ocorre aumento de citocinas e de inflamação. Os níveis de triptase sérica de mastócitos são significativamente mais elevados em indivíduos obesos do que em indivíduos magros, sugerindo papel destas células inflamatórias na obesidade e no

diabete, podendo levar ao quadro de resistência à insulina (Wang *et al.*, 2011). A hiperexpressão de *MILR1* apresentada por gestantes com DMG sugere um sistema de inibição do processo inflamatório como possível mecanismo compensatório no combate à resistência à insulina e à inflamação devido à obesidade e diabete presente neste grupo.

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram desequilíbrio na relação entre a expressão das citocinas IL-10 e TNF-alfa em gestantes hiperglicêmicas correlacionado com a intensidade da hiperglicemia. Este desequilíbrio aumenta o estado inflamatório e a resistência à insulina e pode estar relacionado à patogênese desta disfunção (Morelli *et al.*, 2015).

Outro gene hiperexpresso nas gestantes com DMG foi o *EPN2*. A proteína EPN2 (Epsina 2) está envolvida em processos celulares, transporte, catabolismo e endocitose (EPN2 gene, 2015). Especificamente, a deleção das epsinas 1 e 2 resulta em letalidade embrionária devido ao seu papel na promoção de sinalização *Notch* em todos os tipos celulares (Chen *et al.*, 2009). Deleções endoteliais-específicas de epsinas 1 e 2 aumentam a sinalização do *VEGF* (Pasula *et al.*, 2012). Ratos *lacking* para epsinas endoteliais 1 e 2 exibiram tumor com angiogênese excessiva, vasos desorganizados e aumento da permeabilidade vascular. Existe correlação entre a perda da epsina e aumento da sinalização do *VEGF* pelo aumento nos níveis de *VEGFR2*. Dessa maneira, as epsinas tem papel na angiogênese patológica e modulam a sinalização de *VEGF* por diminuir os níveis *VEGFR2* (Tessneer *et al.*, 2014). Como consequência da hiperexpressão do *EPN2*, podemos sugerir que há uma diminuição nos níveis de sinalização do *VEGF* em pacientes diabéticos. Roguin (2003) e Waltenberger (2001) mostraram que o DM2 está diretamente associado com sinalização reduzida do *VEGF*, com angiogênese prejudicada e formação de vasos sanguíneos colaterais após isquemia. Trabalhos do nosso grupo evidenciaram que, nas placentas de

gestantes com DMG, o número de vasos do vilo terminal é similar ao grupo controle e prejudicial ao feto que necessita de mais oxigênio porque a HbA1C materna aumentada nas DMG dificulta as trocas de oxigênio materno-fetal (Calderon *et al.*, 2007).

Além disso, Pietro *et al.* (2010) observaram diminuição da produção de *VEGF* nos compartimentos celulares de placenta de gestantes hiperglicêmicas. Estes resultados anteriores do nosso grupo corroboram a hiperexpressão deste gene, que influencia a contenção da angiogênese excessiva induzida pelo diabetes. Após avaliação de interação com redes gênicas, este gene apresentou processos biológicos referentes à angiogênese (Szklarczyk *et al.*, 2015) e mostrou também relação com vias de sinalização e regulação de transdução de sinais (Szklarczyk *et al.*, 2015). Esses achados são interessantes uma vez que também pode ter total relação com via de sinalização de insulina e, conseqüentemente, influenciar a resistência à insulina, uma das principais características presente das diabéticas gestacionais (Kühl *et al.*, 1991; De Fronzo, 2009).

O *RPA1*, hiperexpresso em gestantes com DMG, é um gene de codificação proteica. Liga e estabiliza intermediários de DNA de fita simples, que se formam durante a replicação ou em alterações, impedindo a sua recombinação e, em paralelo, recruta e ativa diferentes proteínas e complexos envolvidos no metabolismo do DNA. Deste modo, desempenha papel essencial na replicação do DNA e na resposta celular a danos no DNA (Lin *et al.*, 1998), controlando o reparo e a ativação de danos (Maréchal *et al.*, 2014). Está envolvido diretamente com o sistema de reparo pelo recrutamento de fatores de resposta a danos e de proteínas envolvidas no complexo de reparo por excisão de nucleotídeos (*NER*) (Sleeth *et al.*, 2007) e também por excisão de bases (*BER*) (DeMott *et al.*, 1998). Nossos trabalhos anteriores mostram aumento nos níveis de danos oxidativos em gestantes diabéticas (Lima *et al.*, 2012; Gelaleti *et al.*, 2015a) e correlação positiva entre o aumento dos níveis

glicêmicos maternos com aumento nos níveis de danos no DNA de seus recém-nascidos (Gelaleti *et al.*, 2015b). Este gene hiperexpresso nas gestantes com DMG talvez seja uma tentativa compensatória para aumentar o sistema de reparo. Na avaliação de redes gênicas, os principais processos biológicos apresentados estão diretamente ligados à resposta celular após estímulos de danos no DNA, verificação de danos no DNA e processos de reparo por excisão de base (*BER*) e nucleotídeo (*NER*) (Szklarczyk *et al.*, 2015), confirmando o importante papel deste gene na tentativa compensatória de diminuição dos níveis de danos no DNA de gestantes diabéticas.

O perfil de expressão gênica entre os grupos não diabético e DMG mostrou separação entre os grupos, porém nenhum gene relacionado ao diabetes. Dos cinco genes diferencialmente expressos, 4 apresentam somente o *refseq*, sem descrição do gene, e 1 não tem relação direta com a doença. Uma possível explicação para esse achado é o controle glicêmico adequado e a similaridade do IMC entre os grupos, talvez mascarando possíveis genes relacionados à fisiopatologia e às complicações do diabetes.

A comparação entre o grupo HGL com o grupo diabético evidenciou dois genes de interesse: o gene *RHBDL2* e o *ZNF668*. A proteína codificada pelo gene *RHBDL2* é membro da família de proteínas rombóides de membrana. O gene rombóide é codificado por sete proteínas transmembrana e é o componente da geração de sinais de fator de crescimento epidérmico (*EGF*) durante o desenvolvimento. Proteínas rombóides funcionam como novas proteases intramembranares que atuam em diversos processos incluindo regulação gênica de bactérias, fusão da membrana mitocondrial, apoptose e diferenciação celular em eucariotos. Está relacionada também a doenças humanas como cegueira de início precoce, diabetes e doenças parasitárias (Urban, 2006). A trombosmodulina (TM) é uma glicoproteína de membrana, regulada positivamente durante a cicatrização de feridas cutâneas. O *RHBDL2*

cliva especificamente a TM no domínio transmembrana e provoca a liberação de TM solúvel (STM), potencial terapêutico no tratamento de feridas crônicas causadas por diabetes, quimioterapia, radioterapia, ou hormônios esteroides (Cheng *et al.*, 2011). É reconhecido na literatura que o diabetes está associado com prejuízo na cicatrização de feridas, tornando os pacientes suscetíveis a feridas crônicas que não cicatrizam (Eming *et al.*, 2014). Além disso, o papel dessa proteína, como protease atuando na apoptose, tem total relação com diabetes. Trabalhos anteriores no nosso grupo detectou que a hiperglicemia materna é fator chave no aumento da apoptose em trofoblasto placentário (Sgarbosa *et al.*, 2006) e que gestantes com DMG apresentam níveis aumentados de TNF-alfa (Moreli *et al.*, 2015) que juntamente com a hiperexpressão deste gene pode contribuir para o aumento da apoptose já descrita no diabetes.

A proteína do gene *ZNF668* (*Zinc finger protein 668*) hipoexpresso em diabéticos foi recentemente identificada como um dos potenciais supressores tumorais em câncer de mama. Atua também em resposta a danos no DNA no processo de reparo. Animais *knockdown* para *ZNF668* tem prejuízo na sobrevivência das células após danos no DNA, afetando o recrutamento de proteínas de reparo devido ao relaxamento da cromatina (Hu *et al.*, 2013). Gelaleti *et al.* (2015a) mostraram que gestantes diabéticas apresentam aumento nos níveis de danos oxidativos no DNA relacionados à hiperglicemia e seus fatores adjacentes e a hipoexpressão do gene *ZNF668*, afetando o relaxamento da cromatina e a resposta a danos no controle de reparo do DNA, pode também contribuir e estar relacionado com o quadro aumentado de danos no DNA nessas gestantes.

O gene *CRCP* (*CGRP receptor component*), hiperexpresso quando os grupos não diabético, HGL e DMG foram agrupados e comparados com o grupo controle, é um peptídeo de 37 aminoácidos com cerca de 50% de homologia com a amilina, que é secretada a partir

das ilhotas pancreáticas (Parlapiano *et al.*, 1995). *CGRP* e amilina inibem a liberação de insulina a partir de células beta e desempenham papel no controle parácrino local da secreção de insulina. Além disso, também diminuem a absorção de glicose pelo músculo estriado, podendo ser o hormônio circulante relacionado com a regulação da sensibilidade periférica à insulina (Parlapiano *et al.*, 1995). Este gene reduz a liberação de insulina estimulada pela glicose, resultando em hiperglicemia (Bretherton-Watt *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 2013) e medeia a resistência à insulina no músculo esquelético, influenciando os eventos *in vivo* se for liberado em quantidade suficiente pelos tecidos perivasculares (Russell *et al.*, 2014). *CGRP* é conhecido por ter forte efeito vasodilatador (Tanaka *et al.*, 2013) e a infusão intravenosa deste peptídeo em ratos antagonizou a capacidade da insulina para estimular a eliminação de glicose periférica e inibição da produção de glicose hepática (Molina *et al.*, 1990). Todos estes são fatores cruciais para o desenvolvimento do diabetes, relacionando diretamente estas populações com a doença. Na avaliação de redes deste gene, encontramos processos biológicos referentes a processos metabólicos de macromoléculas, processos metabólicos celulares e processos metabólicos em geral (Szklarczyk *et al.*, 2015), que corroboram o papel central deste gene no controle da secreção de insulina, contribuindo para a resistência à insulina (Kühl *et al.*, 1991, De Fronzo, 2009).

As limitações deste estudo estão relacionadas ao tamanho amostral pequeno, que também impediu a análise separada da possível influência do tipo de tratamento para controle terapêutico da glicemia, que envolveu dieta e/ou insulino-terapia. Outra limitação do nosso estudo que merece ser mencionada é a possível influência do controle glicêmico durante a gestação decorrente de terapêutica eficaz, demonstrado pela média glicêmica dentro da normalidade, que pode ter interferido nos graus de expressão gênica e no número reduzido de genes diferencialmente expressos. O tipo de estudo de corte transversal,

realizado neste trabalho, pode ser um fator limitante por dificultar a análise da avaliação temporal da influência da expressão dos genes em cada grupo e por último a análise de expressão genica feita no tecido sanguíneo que pode ter influenciado na quantidade de genes diferencialmente expressos.

Este estudo destacou o papel fundamental do perfil de expressão gênica nos grupos com rastreamento positivo para DMG fornecendo evidências que apoiam o envolvimento de genes potenciais na patogênese do DMG em fase precoce e a temporalidade da associação com os diferentes tipos de distúrbios glicêmicos detectados na gestação. O perfil das redes de expressão gênica confirma e ajuda no entendimento dos potenciais mecanismos de desenvolvimento de DMG. Entretanto, outros estudos são necessários para identificar as diferenças e similaridades entre HGL, DMG e a evolução para DM2, bem como os fatores genéticos e ambientais associados que levam ao DM2 (Angueira *et al.*, 2015). Estudos futuros deverão centrar-se nesta população específica de mulheres com ou sem glicemia de jejum alterada e com outros fatores de risco concomitante como obesidade e história familiar (Hod *et al.*, 2015). A questão mais importante é que a gestante diabética, após o parto, deve ser acompanhada e orientada em relação à sua saúde e a de seus filhos.

Nas gestantes não diabéticas, o perfil de expressão gênica sugere uma etapa inicial compensada da resistência à insulina. 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 e que foi descrito como síndrome metabólica na gestação (Negrato *et al.*, 2008). Estas gestantes suportam o conceito de que mulheres com disglucemia gestacional têm não apenas síndrome metabólica basal latente (Retnakaran *et al.*, 2010), mas também perfil de expressão gênica que distingue essa população das demais. O perfil de expressão

gênica nas DMG está relacionado à repercussão da hiperinsulinemia e resistência à insulina nos processos inflamatórios, de angiogênese e sistemas de reparo contra danos de DNA, fatores reconhecidos na patogênese da doença. A comparação dos grupos não diabético, HGL e DMG com o grupo controle detecta um gene relacionado à resistência à insulina, evidenciando que esses três grupos apresentam similaridades gênicas. Porém, quando analisados em separado, demonstram momentos diferentes da evolução da doença. Quando o pâncreas materno é incapaz de suprir a necessidade aumentada de produção de insulina, ocorre o aparecimento da hiperglicemia na gestação, que representa a base fisiopatológica da ocorrência dos distúrbios hiperglicêmicos na gestação.

Em conclusão, nosso estudo fornece evidências do envolvimento de potenciais genes em processos biológicos implicados na patogênese e evolução dos diferentes tipos de distúrbios hiperglicêmicos na gestação desde o não diabético, HGL até o DMG. Considerando que o DMG é uma janela de oportunidades para a predição futura do DM2, a avaliação do perfil de expressão gênica dos diferentes grupos analisados neste trabalho sugere evolução temporal para o aparecimento do DMG e confirmam vários trabalhos anteriores realizados por nosso grupo. Essa disglucemia gestacional pode oferecer uma oportunidade para detectar precocemente distúrbios metabólicos latentes não reconhecidos. Entretanto, mais estudos são necessários para validar estas predições.

A análise conjunta destes dados sugere 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 não diabético), passando pelo início da descompensação metabólica com resistência à insulina e hiperinsulinemia (HGL), até a fase

de repercussão dos fatores relacionados à resistência à insulina (DMG). Quando corroborados por mais estudos, esses achados de expressão gênica podem representar uma estratégia importante na prevenção da diabetes, que caracteriza os distúrbios hiperglicêmicos na gestação e, conseqüentemente, na prevenção da obesidade e diabetes tipo 2, a grande epidemia do século XXI.

Referencias Bibliográficas

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

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors, *Nature* 403 (2000) 553–556.

Angueira AR, Ludvik AE, Reddy TE, Wicksteed B, Lowe WL Jr, Layden BT. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes*. 2015 Feb;64(2):327-34.

Bekar LK, Loewen ME, Cao K, Sun X, Leis J, Wang R, Forsyth GW, Walz W. Complex expression and localization of inactivating Kv channels in cultured hippocampal astrocytes, *J. neurophysiol.* 93 (2005) 1699–1709.

Bretherton-Watt D, Ghatei MA, Jamal H, Gilbey SG, Jones PM, Bloom SR. The physiology of calcitonin gene-related peptide in the islet compared with that of islet amyloid polypeptide (amylin). *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Jun 30;657:299-312.

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.

Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*. 1999 Mar 4;398(6722):80-4.

Chavira-Suárez E, Sandoval A, Felix R, Lamas M. Expression and high glucose-mediated regulation of K⁺ channel interacting protein 3 (KCHIP3) and KV4 channels in retinal Müller glial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 14;404(2):678-83.

Chen H, Ko G, Zatti A, Di Giacomo G, Liu L, Raiteri E, Perucco E, Collesi C, Min W, Zeiss C, De Camilli P, Cremona O. Embryonic arrest at midgestation and disruption of notch signaling produced by the absence of both epsin 1 and epsin 2 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:13838–13843.

Cheng TL, Wu YT, Lin HY, Hsu FC, Liu SK, Chang BI, Chen WS, Lai CH, Shi GY, Wu HL. Functions of rhomboid family protease RHBDL2 and thrombomodulin in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2011 Dec;131(12):2486-94.

De Fronzo R. From the triumvirate to the ominous octet; a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009; 58:773-795.

DeMott MS, Zigman S, Bambara RA. Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27492-8.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014 Dec 3;6(265):265sr6.

EPN2 gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPN2>>. Acesso em 05 nov. 2015.

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 DC, Santos DP, Calderon IM, Rudge MV. Increased DNA Damage is Related to Maternal Blood Glucose Levels in the Offspring of Women With Diabetes and Mild Gestational Hyperglycemia. *Reprod Sci*. 2015 Sep 2. (b).

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

Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Jonas JC. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 2002 Feb;51 Suppl 1:S60-7.

Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1751-60.

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.

Hu R, Wang E, Peng G, Dai H, Lin SY. Zinc finger protein 668 interacts with Tip60 to promote H2AX acetylation after DNA damage. *Cell Cycle*. 2013 Jul 1;12(13):2033-41

KCNIP3 gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KCNIP3>>. Acesso em 05 nov. 2015.

Kühl C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. *Diabetes*. 1991; 40 (Suppl 2):18-24.

Ledo F, Carrion AM, Link WA, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM- α CREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000), pp. 9120–9126.

Ledo F, Kremer L, Mellstrom B, Naranjo JR. Ca²⁺-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *EMBO J.*, 21 (2002), pp. 4583–4592.

Lee AJ, Hiscock RJ, Wein P, Walker SP, Permezel M. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long-term risk of developing type 2 diabetes: a retrospective cohort study using survival analysis. *Diabetes Care*. 2007 Apr;30(4):878-83.

Lima PH, Sinzato YK, Gelaleti RB, Calderon IM, Rudge MV, Damasceno DC. Genotoxicity evaluation in severe or mild diabetic pregnancy in laboratory animals. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 May;120(5):303-7.

Lin YL, Shivji MK, Chen C, Kolodner R, Wood RD, Dutta A. The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J Biol Chem*. 1998 Jan 16;273(3):1453-61.

Maréchal A, Li JM, Ji XY, Wu CS, Yazinski SA, Nguyen HD, Liu S, Jiménez AE, Jin J, Zou L. PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol Cell*. 2014 Jan 23;53(2):235-46.

MILR1 gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MILR1>>. Acesso em 05 nov. 2015.

Molina JM, Cooper GJ, Leighton B, Olefsky JM. Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide. *Diabetes*. 1990 Feb;39(2):260-5.

Moreli JB, Corrêa-Silva S, Damasceno DC, Sinzato YK, Lorenzon-Ojea AR, Borbely AU, Rudge MV, Bevilacqua E, Calderon IM. Changes in the TNF-alpha/IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Mar;107(3):362-9.

Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, *et al*. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2012 Sep;44(9):981-90.

Negrato CA, Jovanovic L, Rafacho A, Tambascia MA, Geloneze B, *et al*. Association between different levels of dysglycemia and metabolic syndrome in pregnancy. *Diabetol Metab Syndr*. 2009

Aug 26;1(1):3.

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.

Parlapiano C, Minniti G, Primi F, Campana E. Calcitonin gene-related peptide in diabetes mellitus type 2: a possible etiopathogenetic role. *Riv Eur Sci Med Farmacol*. 1995 Jan-Feb;17(1):35-9.

Pasula S, Cai X, Dong Y, et al. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling. *J Clin Invest*. 2012;122:4424–4438.

Pietro L, Daher S, Rudge MV, Calderon IM, Damasceno DC, Sinzato YK, Bandeira C, Bevilacqua E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta*. 2010 Sep;31(9):770-80.

Retnakaran R, Qi Y, Connelly PW, Sermer M, Zinman B, Hanley AJ. Glucose intolerance in pregnancy and postpartum risk of metabolic syndrome in young women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;95(2):670-7.

Roguin A, Nitecki S, Rubinstein I, Nevo E, Avivi A, Levy NS, Abassi ZA, Sabo E, Lache O, Frank M, Hoffman A, Levy AP1. Vascular endothelial growth factor (VEGF) fails to improve blood flow and to promote collateralization in a diabetic mouse ischemic hindlimb model. *Cardiovasc Diabetol*. 2003; 2: 18.

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.

Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2014 Oct;94(4):1099-142.

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; 37:345-350.

Sleeth KM, Sørensen CS, Issaeva N, Dziegielewska J, Bartek J, Helleday T. RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. *J Mol Biol*. 2007 Oct 12;373(1):38-47.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

Takimoto K, Yang EK, Conforti L. Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of KV4.3 channels, *J. Biol. Chem*. 277 (2002) 26904–26911.

Tanaka H, Kashiwagi R, Koizumi T. Inhibition of calcitonin gene-related peptide (CGRP) has the potential to extend first-phase insulin secretion. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013 May;121(5):280-5.

Tessneer KL, Pasula S, Cai X, Dong Y, McManus J, Liu X, Yu L, Hahn S, Chang B, Chen Y, Griffin C, Xia L, Adams RH, Chen H. Genetic reduction of vascular endothelial growth factor receptor 2 rescues aberrant angiogenesis caused by epsin deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Feb;34(2):331-7.

Urban S. Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes Dev*. 2006 Nov 15;20(22):3054-68.

Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes; potential mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res*. 2001.

Wang J, Shi GP. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res* 2011 Nov;27(8):919-24.

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-Doulier 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, Zalcborg 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.

Anexos

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA PROGRAMAÇÃO FETAL NO DIABETE GESTACIONAL: PREDISPOSIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE
Subprojeto 1: Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve.
Subprojeto 2: Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre Diabetes mellitus gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade.
Subprojeto 3: Efeito do Diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e a implicação na predisposição do recém-nascido à obesidade.

Pesquisador: Marilza Vieira Cunha Rudge

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 14489013.0.0000.5411

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 291.638

Data da Relatoria: 03/06/2013

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

Projeto: **“AVALIAÇÃO NO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DO SANGUE TOTAL DE GESTANTES DIABÉTICAS E COM HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE”**

Responsáveis: Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

DADOS DA PACIENTE

Nome:.....Paciente nº

Data:...../...../.....

Registro FMB.....

Data de nascimento:...../...../.....

RG:.....

Qual o seu endereço (rua, nº , cidade, CEP):

Telefone para contato _____

Qual é sua nacionalidade? _____

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()

Estado civil

(1) casada (2) divorciada (3) solteira

(4) amasiada (5) viúva

Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () há quanto tempo?.....

Por quanto tempo fumou?.....

Fuma () Nº de cigarros/dia.....

Tipo: () cachimbo () charuto () palha () papel com filtro () outros

Convive com fumante? Sim () Não ()

Local: () casa () trabalho () outros

No. de pessoas?.....Quantas horas/dias?.....

Consume bebida alcoólica? Sim () Não ()

Até 7 doses/sem. () Mais de 7 doses/sem ()

Usa drogas? Sim () Não ()

Tipo: () maconha () cocaína () craque () outros

Vias de administração: () inalatória () endovenosa () outras

Durante quanto tempo?.....

Já usou? Sim () Não () Quanto tempo?.....
 Parou há quanto tempo?.....
 Contato com substâncias tóxicas? Sim () Não ()
 Quais?.....
 Por quanto tempo (meses)?.....
 Período sem contato com a (s) substância (s) (meses):.....
Possui algum tipo de doença? Sim () Não () Qual(is)?
Diabetes mellitus ()
 Já teve infarto? Sim () Não () Há quanto tempo?.....
 É hipertensa? Sim () Não ()
 É obeso? Sim () Não ()
 Peso (Kg)..... Altura (cm)..... IMC:.....

Toma medicamento? Sim () Não ()
 Qual(is)? Em que dosagem?.....

Profissão:..... Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()
Pratica exercício físico? Sim () Não () Com que frequência?.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente com:

Diabetes Mellitus () Obesidade () Hipertensão ()
 Doença cardiovascular () Hipercolesterolemia () () outros
 Quem?.....
 Não tem () Não sabe ()

HISTÓRIA GESTACIONAL

G:.....P:.....A:.....C:.....
 DUM:.....
 Pré-natal: Sim () Não () No. de consultas?.....
 Intercorrências durante a gravidez: (..)náuseas () vômitos () dor abdominal
 () dor para urinar () corrimentos () sangramento () outros
 Doenças durante a gestação: Sim () Não () Tipo?.....

Tratamento: Sim () Não () Qual?.....
 Fatores de risco para HIV? Sim () Não ()

AVALIAÇÕES

	Inicial	Final
Peso (kg) (verificar no cartão de pré-natal ou na folha rosa do prontuário)		
Pressão Arterial (mmHg) (verificar no cartão de pré-natal ou na folha rosa do prontuário)		

DADOS DO RECÉM-NASCIDO (RN)

Tipo de parto: () normal () cesária () fórceps () outros

Sinais de sofrimento fetal? Sim () Não ()

Qual?.....

Mecônio: Sim () Não ()

Tipo: () fluido () moderado () espesso

Apgar: 1'5'10'

New Ballard (NB):.....Sexo:.....Peso:.....Estatura:.....

PC:.....PT:.....PA:.....

Classificação do RN: () PIG () AIG () GIG

Necessidade de reanimação: () máscara () ventilação sob pressão () intubação

() drogas Quais drogas?.....

Óbito RN: Sim () Não ()

Vasos do cordão: () 2 artérias e 1 veia () 1 artéria e 1 veia () outros

Anomalias ou malformações: Sim () Não ()

Quais?.....

Tipo de placenta: () normal () calcificada () outras

DADOS DA PACIENTE - EXAMES LABORATORIAIS

(serão anotados e avaliados pela Equipe LAPGO posteriormente)

Parâmetros	Data da coleta	Valores
Glicemia Inicial (mg/dL)		
Glicemia Final (mg/dL)		
Relação cintura/quadril Inicial (cm)		
Relação cintura/quadril Final (cm)		
Glicemia em jejum (mg/dL)		
Glicemia pós-prandial (mg/dL)		
Glico-hemoglobina (mg/dL)		
Insulinemia em jejum (mg/dL)		
Insulinemia pós-prandial (mg/dL)		
Colesterol total (mg/dL)		
LDL-c (mg/dL)		
HDL-c (mg/dL)		
VLDL-c (mg/dL)		
Triglicérides (mg/dL)		
Adiponectina		
Ácidos graxos livres		