



**ANÁLISES MOLECULARES EM GESTANTES COM
DIABETE E HIPERGLICEMIA LEVE E EM SEUS
RECÉM-NASCIDOS**

RAFAEL BOTTARO GELALETI

Botucatu
2012

RAFAEL BOTTARO GELALETI

**ANÁLISES MOLECULARES EM GESTANTES COM
DIABETE E HIPERGLICEMIA LEVE E EM SEUS
RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia. Área de concentração: Tocoginecologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge

Botucatu
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gelaleti, Rafael Bottaro.

Análises moleculares em gestantes com diabete e hiperglicemia leve e em seus recém-nascidos / Rafael Bottaro Gelaleti. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marilza Vieira Cunha Rudge

Capes: 40101150

1. Mulheres grávidas - Doenças - Diagnóstico. 2. Hiperglicemia. 3. Diabetes na gravidez.

Palavras-chave: Danos oxidativos no DNA; Diabete; Hiperglicemia gestacional leve; IRS-1; Polimorfismo Gly972Arg.

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!"

(Mahatma Gandhi)

Dedicatória

A vocês, que me deram a vida
e me ensinaram a vivê-la com dignidade,
A vocês, que iluminaram os caminhos
obscuros com afeto e dedicação
para que os trilhasse sem medo e
cheio de esperança,
A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram
aos seus sonhos, para que, muitas vezes,
pudesse realizar os meus.
Pela compreensão, dedicação e apoio
durante meus anos longe,
dedico esta conquista com a mais profunda admiração, respeito e amor.

(Autor desconhecido)

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

Agradecimientos

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

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

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

À **Bruna Lara de Arantes**, por todo apoio, amor, compreensão e pela companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho.

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

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

À **Profa. Adjunta 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 Obstetria**: Aline Bueno, Aline de Oliveira Netto, Bruna Dallaqua, Daniele Santos, Felipe Hiroshi Saito, Fernanda Piculo, Franciane Quintanilha Galego, Gabriela Marini, Gabriela Oliveira, Gilciane Morceli, Isabela Lovizutto Lessi, Jusciele Brogin Moreli, Joice Vernini, Mikaela Corrêa, Rebeca Serrano, Silvana Barroso Corvino e Taís Tiemi Sato. Muito obrigado pela colaboração, pelo aprendizado e pela boa convivência diária.

Às **pacientes participantes desse estudo e seus recém-nascidos**, pela colaboração e permissão para o desenvolvimento desse estudo.

À assistente de suporte acadêmico do LAPGO: **Talísia Moretto**

Ao **Prof. Dr. Edson Seizo Mori e Gilberto** pela auxílio e pela oportunidade de uso do laboratório.

Ao laboratório de biologia celular e molecular do hemocentro da FMB, especialmente à **Profa. Dra. Maria Inez Pardini, Profa. Dra. Adriana Ferrasi e Natália Picelli**.

Ao **Prof. Dr. Sandro Condessan e Profa. Dra. Daisy Salvadori** pela contribuição no exame de qualificação.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)** pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho;

Aos Funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Aparecida Benedita Vasques, César Eduardo Guimarães, Regina Célia Gamito e, em especial à Ana Claudia Garcia Mira, pela dedicação, paciência e auxílios prestados.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação Janete Ap. Nunes Silva, Regina C. Spadin, Lilian Cristina N.B. Nunes, Andréia Longo Devede e Nathanael P. Salles, pelo apoio e serviços prestados.

Ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) 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.

Ao Serviço de Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação no campus da Unesp – Botucatu, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão dos auxílios pesquisa (processos número 2008/11621-8 e 2008/06642-6) e bolsa de mestrado (processo número 2009/12947-7) que possibilitaram o desenvolvimento dessa dissertação.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos amigos da república RT, Dany Bruno Grosklauss, Eduardo Tachlitsky, Diego Marcelino, Gustavo Branco, Hugo Kano, João Priolli, Luiz Constantino, Murilo Gaia Filla e Vitor Hugo Parra pela convivência, amizade e companheirismo durante estes anos de trabalho e longe da família.

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

Muito Obrigado!

Índice

Capítulo 1

GENOTOXICITY EVALUATION IN PREGNANT WOMEN WITH DIABETES AND MILD GESTATIONAL HYPERGLYCEMIA	02
---	-----------

Capítulo 2

DIABETES E O POLIMORFISMO ARG ₉₇₂ – ATUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA	22
--	-----------

Capítulo 3 – Projeto em andamento

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO POLIMORFISMO ARG ₉₇₂ DO GENE DO IRS-1 EM GESTANTES DIABÉTICAS E COM HIPERGLICEMIA LEVE E EM SEUS RECÉM-NASCIDOS	33
--	-----------

Anexos	51
---------------	-----------

Capítulo 1

GENOTOXICITY EVALUATION IN PREGNANT WOMEN WITH DIABETES AND MILD GESTATIONAL HYPERGLYCEMIA

Short title: Genotoxicity and mild gestational hyperglycemia

Rafael B Gelaleti^{1b}, Débora C Damasceno^{1a}, Paula H O Lima^{1a}, Daniele P Santos^{1c},
Rebeca G Serrano^{1c}, Iracema MP Calderon^{1a}, Marilza V C Rudge^{1a*}

^aPhD, ^bMaster degree and ^cUnder-graduate student

¹Botucatu Medical School, UNESP_ Univ Estadual Paulista, Department of
Gynecology and Obstetrics, Laboratory of Experimental Research in Gynecology and
Obstetrics, São Paulo State, Brazil

*Correspondence to: Profa. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge
 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
 Faculdade de Medicina de Botucatu_UNESP
 Distrito de Rubião Júnior s/n
 CEP. 18618.000
 BOTUCATU, São Paulo, BRAZIL
 Phone/Fax: 55 14 38116181
 Email: marilzarudge@iq.com.br

Este manuscrito foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista **Diabetes Care**, para a qual será submetido.

ABSTRACT

Objective: Although not diagnosed with diabetes, mild gestational hyperglycemic women might show high levels of oxidative DNA damage. The aim of this study was to evaluate genotoxicity (basal and oxidative DNA damage levels) in lymphocyte samples from pregnant women with diabetes and with mild gestational hyperglycemia. **Research design and methods:** This study included 113 pregnant women who were distributed into four groups based on oral glucose tolerance test (OGTT) results and glycemic profiles (GP), as follows: IA – Normal OGTT and GP (Non-diabetic group); IB – Normal OGTT and abnormal GP (mild gestational hyperglycemic group); IIA – Abnormal OGTT and normal GP (gestational diabetes group); IIB – Abnormal OGTT and GP (gestational or overt diabetes group). Maternal blood samples (5 -10 mL) were collected and processed for the determination of basal and oxidative DNA damage using Fpg and Endo III by comet assay. **Results:** In groups IIA and IIB analyzed together, there was a larger number of Fpg-sensitive sites, while in IB there was a greater numbers of Endo III-sensitive sites. **Conclusion:** Diabetic pregnant women (IIA+IIB groups) showed a higher level of oxidative DNA damage due to hyperglycemia, whereas mild hyperglycemic pregnant women (IB) showed oxidative DNA damage associated with oxidative stress due to obesity and/or insulin resistance in these patients.

Key-words: diabetes, pregnancy, mild gestational hyperglycemia, genotoxicity, comet assay, oxidative DNA damage.

Gestational *Diabetes mellitus* is any glucose intolerance of variable magnitude with beginning or diagnosis during pregnancy. Similar to Diabetes mellitus type 2, gestational *Diabetes mellitus* is associated with both insulin resistance and decrease function of beta (β) cell -pancreatic (1). Besides gestational *Diabetes mellitus*, in 1983, Rudge used two parallel diagnostic tests, 100-g Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Glycemic Profile (GP), to classify pregnant women. The combination of those two tests characterized another group, the mild gestational hyperglycemia. The Mild gestational hyperglycemia comprises a group of pregnant women with positive screening but negative diagnosis for gestational *Diabetes mellitus* and hyperglycemia detected only in the GP. Subsequently, Rudge et al. (2) defined a new classification system for the diagnosis of pregnancies complicated by diabetes: IA – Normal OGTT and glycemic profile (Non-diabetic group); IB – Normal OGTT and abnormal glycemic profile (mild gestational hyperglycemic group); IIA – Abnormal OGTT and normal glycemic profile (gestational diabetes group); IIB – Abnormal OGTT and glycemic profile (gestational or overt diabetes group).

The pregnant women with mild gestational hyperglycemia represent 13.8% of the population of pregnant women screened in, added to 7.0% of pregnancies complicated by diabetes, increase the occurrence of hyperglycemic disorders in pregnancy to about 20% (3). These patients present at high risk for hypertension, obesity and hyperglycemia, and seem to reproduce the model of metabolic syndrome (MS) in pregnancy with hyperinsulinemia and insulin resistance that persists six weeks postpartum (4). After 10 to 12 years of the index-pregnancy, type 2 *Diabetes mellitus* was confirmed in 16.7% of women who had mild gestational hyperglycemia during pregnancy (5). Newborns of women with mild gestational hyperglycemia present 53.8% of macrosomia, a proportion similar to the 51.9% seen in clinics and

gestational diabetes (6). The perinatal mortality rate of 41‰ was similar to that of diabetic women and 10 times greater than that of normal pregnant women in group IA (7). The attributable risk of perinatal mortality in this group was 4.16%, comparable to that identified in groups of pregnant women with diabetes (8). These newborns may also exhibit hypoglycemic crises, hyperbilirubinemia and high incidence of prematurity and congenital anomalies (9). Therefore, pregnant women with mild gestational hyperglycemia despite being identified in the literature as low-risk characterize a population with adverse maternal and perinatal outcomes and represent a public health problem (8).

Pregnancy is an oxidative stress state (10), which leads to increased metabolic activity in the placental mitochondria and a decrease in the antioxidant system. Besides, hyperglycemia generates reactive oxygen species (ROS) exacerbating the oxidative stress state. This fact can damage the biological macromolecules including proteins, lipids and nucleic acids (11). Studies show an increased level of DNA damage in the leukocytes of individuals with type 1 *Diabetes mellitus* and type 2 *Diabetes mellitus* (12, 13). Anderson et al. (14) reported that patients with type 2 *Diabetes mellitus* showed a higher frequency of cells with DNA damage compared to patients with type 1 *Diabetes mellitus*.

Oxidatively damaged DNA may involve breakage in single and double-strand, base modifications, fragmentation of deoxyribose, formation of DNA–protein cross-links as well as abasic sites (15). The comet assay is a rapid and sensitive method that can be used to detect oxidized bases in DNA with the utilization of repair endonucleases. The Endonuclease III (Endo III) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) are involved in the first step of the base excision repair to remove specific modified bases from DNA (16) to create an abasic site (AP site, for

apyrimidic/apurinic site) which is subsequently cleaved by their AP lyase activity giving a gap in the DNA strand (17). Both (Fpg and Endo III) can be also detected by the comet assay.

In the damage generated by ROS in DNA molecules, guanine is most prone to oxidation. When there is oxidation, a hydroxyl group is added to the guanine molecule and results in the formation of a new structure called 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG or 8-oxo-dG), so the 8-OHdG serves as a marker sensitive to oxidative damage of DNA (18). Clinical and experimental investigations show the presence of oxidative damage in the DNA of individuals with *Diabetes mellitus* (19, 20). It was observed that patients with type 1 *Diabetes mellitus* and type 2 *Diabetes mellitus* show an increase in urinary 8-OHdG (21).

Studies in our laboratory showed that rats with mild diabetes (blood glucose level between 120 and 300 mg/dL) or severe diabetes (glycemia > 300 mg/dL) and their newborns also exhibit oxidative DNA damage detected by comet assay (22). A similar result was observed by Dandona et al. (23) in patients with DM1 and DM2. Dincer et al. (24) confirmed that individuals with with type 1 *Diabetes mellitus* show an increase in DNA damage and restriction sites sensitive to FAP glycosylase. Pitozzi et al. (25) also detected increased oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with type 2 *Diabetes mellitus*, although this increase was not observed in isolated lymphocytes. Zengi et al. (26) showed that the oxidative DNA damage was increased in lean normoglycemic offspring of type 2 *Diabetes mellitus* patients. According to literature data, we hypothesized that, although not diagnosed with diabetes, mild gestational hyperglycemic women might show high levels of DNA oxidative damage. The aim of this study was to evaluate

genotoxicity (basal and oxidative DNA damage levels) in lymphocyte samples from pregnant women with diabetes and with mild gestational hyperglycemia.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

The present investigation was conducted at Specialized Service of Diabetes and Pregnancy, Botucatu Medical School, UNESP_ Univ Estadual Paulista, Brazil, after approval of the Ethics Committee of the institution. This study included 113 pregnant women. The pregnant women were assigned to participate if they presented a fasting glycemia level ≥ 90 mg/dL and/or risk factors for developing gestational *Diabetes mellitus*. Between the 24th and 28th week of gestation, a 100 g oral glucose tolerance test (OGTT) and a glycemic profile were done; the cutoff values for the OGTT were those proposed by Carpenter & Coustan (fasting ≥ 95 mg/dL; 1 h ≥ 180 mg/dL; 2 h ≥ 155 mg/dL; 3 h ≥ 140 mg/dL) (8) and for the glycemic profile, those proposed by Gillmer et al. (fasting ≥ 90 mg/dL and/or postprandial ≥ 130 mg/dL) (27). The patients were distributed into four groups based on these two tests: IA – Normal OGTT and glycemic profile (non-diabetic group); IB – Normal OGTT and abnormal glycemic profile (mild gestational hyperglycemic group); IIA – Abnormal OGTT and normal glycemic profile (gestational diabetes group); and IIB – Abnormal OGTT and glycemic profile (gestational or overt diabetes group). The gestational or overt diabetes group corresponds to pregnant women with gestational diabetes or type 2 diabetes. Pregnant women presenting type 1 *Diabetes mellitus* were excluded from this study.

The pregnant women of the non-diabetic group were not treated. For maternal hyperglycemia control was followed the protocol of the service, using the GP, with

fasting, pre and post prandial glucose levels weekly evaluated for 24 hours, at intervals from two to 32 weeks . Pregnant women with mild gestational hyperglycemia and gestational *diabetes mellitus* were treated with diet, indicated by a nutritionist, associated with exercise, and when necessary, insulin therapy was initiated. Women with type 2 diabetes were treated with diet, exercise and insulin therapy since the beginning of pregnancy (1, 7, 9).

Inclusion criteria were defined: (a) be classified in the study groups, (b) to have maximum gestational age of entry into the treatment protocol of 30 weeks for women with mild gestational hyperglycemia and gestational *Diabetes mellitus* and 20 weeks pregnant for type 2 *Diabetes mellitus*; (c) carry out prenatal care and birth on the service, (d) sign consent form. Exclusion criteria were multiple pregnancies, those with fetal malformations and those with birth before 34 weeks.

The glycemic mean was calculated by the arithmetic mean of plasma glucose measured in all GP performed at diagnosis (group ND) and the control treatment (groups mild gestational hyperglycemia, gestational *Diabetes mellitus* and gestational and over diabetes). Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method (Glucose - Analyzer II Beckman[®], Fullerton, California, USA) and the body mass index (BMI) was calculated by body weight divided by the square of height.

From the week 34 of gestation and before the onset of labor, maternal blood samples (5 to 10 mL) were collected in Vacutainer tubes with EDTA (BecktonDickinson, FranklinLakes, New Jersey – USA). The collected blood samples were immediately processed for determination of oxidative DNA damage by comet assay. The comet assay was performed to evaluate the maternal genotoxic effect resulting from diabetes or mild gestational hyperglycemia.

In order to evaluate basal DNA damage levels, maternal lymphocytes were isolated by centrifugation using Ficoll, according to the protocol described by Collins et al. (19). The lymphocytes (20µl for the maternal) were mixed with low melting point (LMP) agarose (120µl), placed on a slide with normal melting point (NMP) agarose, and immediately covered with a coverslip. The slides were left at 4°C for 10 min to solidify the agarose. The coverslip was gently removed and the slides were immersed in an ice-cold freshly prepared lysis solution [2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, with 1% Triton 100-X, and 10% dimethylsulphoxide added just before use] to lyse cells and to allow DNA to unfold.

For obtaining a positive control, a solution of H₂O₂ (200µM) was added to lymphocyte samples. Following, the cells were incubated in ice for 30 minutes according to the protocol described by Blasiak et al. (28). This procedure was used to control the quality of the experiment.

The comet assay was performed according to the protocol described by Gontijo and Tice (29). The slides were placed on a horizontal electrophoresis unit filled with fresh electrophoresis alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13). The alkali unwinding duration was 20 min. Electrophoresis was conducted at 4°C for 30 min at 25 V/cm and 300 mA. All the steps were carried out under minimal illumination. The slides were neutralized in a buffer (0.4M Tris at pH 7.5) and dipped in absolute alcohol for fixation. The dried microscope slides were stained with ethidium bromide (20 µg/ml in distilled H₂O; 50 µl/slide), covered with a coverslip prior to analysis with a Nikon fluorescence microscope was connected to a charge-coupled device (CCD) camera and a personal computer-based analysis system (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK) to determine the extent of DNA damage after electrophoresis of the DNA fragments in the agarose gel. Results were

expressed as percentage of DNA in the tail (fraction of DNA in the tail divided by the amount of DNA in the cell multiplied by 100 – tail intensity – % tail and the relationship between the tail length and the amount (%) of DNA that migrated during the electrophoresis - tail moment) (30). One hundred randomly selected cells (50 from each of two replicate slides) were scored per blood sample.

For analysis of levels of oxidative DNA damage, the enzymatic treatment according to similar protocol used to evaluate basal DNA damage (until immersion of the slides into lysis solution). The enzymes formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) utilized to detect damage in the puric bases and Endonuclease III (Endo III) used to detect oxidized pyrimidines were used for the enzymatic treatments. This treatment followed the methodology described by Collins et al. (31). After electrophoresis, the slides containing the samples were immersed into absolute alcohol and the protocol of basal DNA damage was followed (staining with ethidium bromide and data analysis)

Analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple comparisons test, was used for characteristics of the study population. For basal and oxidative DNA damage among the experimental groups was applied Gamma distribution. The level of statistical significance adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 113 patients were evaluated: 41 in the group IA (normal GTT and glycemc profile), 24 in IB group (normal GTT and altered glycemc profile), 02 in IIA group (altered GTT and normal glycemc profile) and 46 in the IIB group (GTT and

glycemic profile altered). As in IIA group there were only 02 subjects, the groups IIA and IIB were analyzed together, and will be thereafter referred to as diabetic group.

Table 1 shows the characteristics (age, body mass index and glycemic mean) of the study population. Pregnant women of group IB presented age statistically higher compared to pregnant women of group IA ($p < 0.05$). The body mass index (BMI) did not differ among the groups. It was observed that groups IB and IIA+IIB showed higher glycemic means compared to those of group IA. Besides, the glycemic mean of group IIA+IIB was higher compared to that of group IB ($p < 0.05$).

In the groups IB (mild gestational hyperglycemia) and IIA+IIB (diabetes), the basal DNA damage levels (tail moment) was lower compared to those of group IA (non-diabetic) (Figure 1). When the tail intensity was assessed, the diabetic groups presented decreased damage levels compared to those of non-diabetic group ($p < 0.05$) (Figure 1).

Figure 2 shows data after the treatment with the enzyme formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). The oxidative DNA damage levels (for tail moment) in the group IIA+IIB was higher compared to those of groups IB and IA ($p < 0.05$). For the tail intensity, the oxidative DNA damage levels of group IIA+IIB was higher only compared to those of group IA ($p < 0.05$).

In the treatment with the enzyme endonuclease III (Endo III), it was observed a significant statistically increase ($p < 0.05$) in oxidative damage levels in the DNA of the group IB compared to those of group IA for the tail moment and the tail intensity (Figure 3).

CONCLUSION

In this study, comet assay was used to evaluate DNA damage levels (basal and oxidative) in pregnant women with either diabetes or mild hyperglycemia. In groups IB and IIA+IIB, basal DNA damage levels were lower. In the non-diabetic women (IA group), who showed risk factors for gestational *Diabetes mellitus*, OGTT and GP indicated no hyperglycemia or change in glucose metabolism. Major risk factors include overweight and obesity, that are likely to be associated with sedentarism and an unbalanced diet. Advanced transportation means, devices designed to facilitate daily activities, easy food access, and the fact that high-fat and high-sugar foods are frequently the cheapest, have created an “obesogenic” environment (32) that could explain the increased levels of basal DNA damage observed here. Habitual exercise confers increased resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage, and this protective effect is possibly attributed to the regular exercise-induced elevated expression of antioxidant, DNA repairing enzymes (33) and reduction of lipoperoxidation (decreased plasma MDA concentration) (34). In contrast to the diabetic and hyperglycemic groups, the women in the non-diabetic group did not feel the need to take preventive measures that could minimize basal DNA damage.

Fpg and Endo III, that recognize oxidated puric and pyrimidic bases respectively, increase the specificity of the comet assay and make possible to detect oxidative DNA damage. (19).

The number of Fpg-sensitive sites in the diabetic group was larger, indicating a higher level of oxidative DNA damage in comparison with the non-diabetic group. Furthermore, there was no increase in the number of Endo III-sensitive sites in the diabetic group. This suggests that although glycemic rate was higher in this group, Fpg-sensitive sites were more closely associated with glycemia. Thus, as glycemia

level was not high enough to exacerbate oxidative stress, the higher number of Fpg-sensitive sites observed in this group was directly associated with hyperglycemia (28)

In the mild gestational hyperglycemia group, the number of Endo III-sensitive sites was increased, resulting in a higher level of oxidative DNA damage. BMI was not statistically different from the other groups, but absolute BMI values were higher. Thus, the higher number of Endo III-sensitive sites and consequent oxidative DNA damage could have derived from the higher rate of obesity ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) and morbid obesity found in this group (35). Due to the production of several cytokines or adipokines, obesity is characterized as a low intensity inflammatory condition (36). In inflammatory processes, reactive oxygen species (ROS) are overproduced and may damage cell structures, proteins, lipids, and macromolecules such as DNA, leading to the development of genotoxicity-related disorders (37). Minamino et al. (38) demonstrated that in the fatty tissue of genetically obese Agouti mice, ROS and DNA levels are higher than in normal diet lean mice. Luperini (35) reported that morbidly obese women showed high levels of genotoxic injury (basal and oxidative DNA damage) including double-strand breaks, alkali labile sites and oxidated purins and pyrimidins. Insulin resistance indices (HOMA-R e HOMA-IR) can also lead to oxidative stress (39). Negrato et al. (40) demonstrated that patients with mild gestational hyperglycemia showed higher HOMA-IR values and lower peripheral insulin sensitivity, although not statistically significant, compared with the non-diabetic group, showing that besides presenting insulin resistance, they also had a compensatory hyperinsulinemia. Moreover, Negrato et al. (4) reported that mild hyperglycemic pregnant women showed persistently high HOMA levels up to six weeks postpartum. Further studies of the factors involved in oxidative DNA stress should be undertaken in this group of women.

In conclusion, diabetic pregnant women (IIA+IIB) showed increased oxidative DNA damage due to hyperglycemia, while women with mild gestational hyperglycemia (IB) showed oxidative DNA damage associated with oxidative stress caused by obesity and insulin resistance. This underscores the importance of adequate glycemic control and lifestyle (healthy diet and regular physical exercises) during pregnancy in order to attenuate the repercussions of diabetes and mild gestational hyperglycemia on the maternal organism, embryofetal development and perinatal outcomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the staff of the Laboratory for Experimental Research in Gynecology and Obstetrics and to Talisia Moretto, for her technical and scientific contribution. They are also thankful to the Research Support Center (GAP) of Botucatu Medical School – Unesp for their assistance with statistical analyses. This study was supported by grants from FAPESP/Brazil (Grant number 2008/06642-6) under the supervision of Marilza Vieira Cunha Rudge.

REFERENCES

1. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 32, p.30-45, 2010.
2. 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;23:1079-1089.

3. Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Suetake H, Peraçoli JC. Investigação diagnóstica do diabetes na gesta o. Rev Bras Ginecol Obst 1996;18:21-26.
4. Negrato CA, Jovanovic L, Tambascia MA, Calderon IMP, Geloneze B, Dias A, Rudge MV. 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.
5. Silva MRG, Calderon IMP, Gonçalves LC, Aragon FF, Padovani CR, Pimenta WP. Ocorrência de diabetes melito em mulheres com hiperglicemia em gesta o pr via. Rev Saúde Pública 2003;37:345-350.
6. 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;14:678-685.
7. Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Maestá I, Souza LMS, Peraçoli JC. Perspectiva perinatal decorrente do rígido controle pré-natal em gesta es complicadas pelo diabete. RBGO 1995;17:26-32
8. Rudge MVC; Calderon IMP; Ramos MD; Brasil MAM; Rugolo LMSS; Bossolan G; Odland JO. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. Rev Bras Ginecol Obstet 2005;27:691-697.
9. 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;50:108-112.

10. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol Oxf* 2002;57(5):609-613.
11. Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 2006;60(3):308-314.
12. Dinçer Y, Akçay T, İlkova H, Alademir Z, Ozbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. *Mutat. Res* 2003;527: 49-55.
13. Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003;28:129-133.
14. Anderson D, Yu TW, Wright J, Ioannides C. An examination of DNA strand breakage in the Comet Assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutat Res* 1998;398:151-161.
15. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 2006;26:533-554.
16. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994;63:915-948.
17. David-Cordonnier MH, Laval J, O'Neill P. Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and *Escherichia coli* Nth and Fpg proteins. *J Biol Chem* 2000;275:11865-11873.
18. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer atherosclerosis and diabetics. *Clin Chimica Acta* 2004;339:1-9.

19. Collins AR, Raslová K, Smorovská M P, Petrovská H, Ondrusová A, Vohnout B, Fábry R, Dusinská M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Rad Biol Med* 1998;25:373-377.
20. Viana M, Aruoma OI, Herrera E, Bonet B. Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Rad Biol Med* 2000;29:1115-1121.
21. Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M, Babahmadi-Rezaei H. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(2):72-6.
22. Lima PHO, Sinzato YK, Gelaleti RB, Calderon IMP, Rudge MVC, Damasceno DC. Genotoxicity evaluation in severe or mild diabetic pregnancy in laboratory animals. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011;119:408-413.
23. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996;347:444-445.
24. Dinçer Y, Akçay T, İlkova H, Alademir Z, Ozbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2003;527:49-55.
25. Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003;28:129-133.
26. Zengi A, Ercan G, Caglayan O, Tamsel S, Karadeniz M, Simsir I, Harman E, Kahraman C, Orman M, Cetinkalp S, Ozgen G. Increased oxidative DNA damage in lean normoglycemic offspring of type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011;119:467-471.
27. Carvalho Silva SAL. Dopplervelocimetria da artéria umbilical como marcador de alterações imunológicas placentárias e de risco de morte perinatal em gestações

complicadas por diabetes ou hiperglicemia leve [tese]. Faculdade de medicina (Botucatu): Universidade Estadual Paulista; 2010.

28. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2004;554:297-304.
29. Gontijo AMMC, Tice R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In *Mutagênese Ambiental*. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Eds. Canoas, Ulbra, 2003, p. 173-200.
30. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins A, Escobar P, Homma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res* 2007;627:31–35.
31. Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis* 1993;14:1733-1735.
32. Mattar R, Torloni MR, Betrán AP, Merialdi M. Obesity and pregnancy. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:107-110.
33. Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol* 2011;96:889-906.
34. Kim KS, Paik IY, Woo JH, Kang BY. DNA damage and antioxidant capacity during three-dimensional space exercise. Re: The effect of training type on oxidative DNA damage and antioxidant capacity during three-dimensional space exercise. *Med Princ Pract* 2011;20:300.

35. Luperini BCO, Salvadori DMF. Polimorfismos gênicos e danos no DNA em indivíduos com obesidade mórbida. (Tese). 2010.
36. Greenberg AS, Martin SO, Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and Metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006;83:461–465.
37. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117-3132.
38. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 2009:1082-1987.
39. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci* 2007;112:599-606.
40. Negrato CA, Jovanovic L, Rafacho A, Tambascia MA, Geloneze B, Dias A, Rudge MVC. Association between different levels of dysglycemia and metabolic syndrome in pregnancy. *Diabetol Metab Syndr* 2009, 1:3.

Table 1. Characteristics of study population (sample number, age, body mass index – BMI, and glycemc mean).

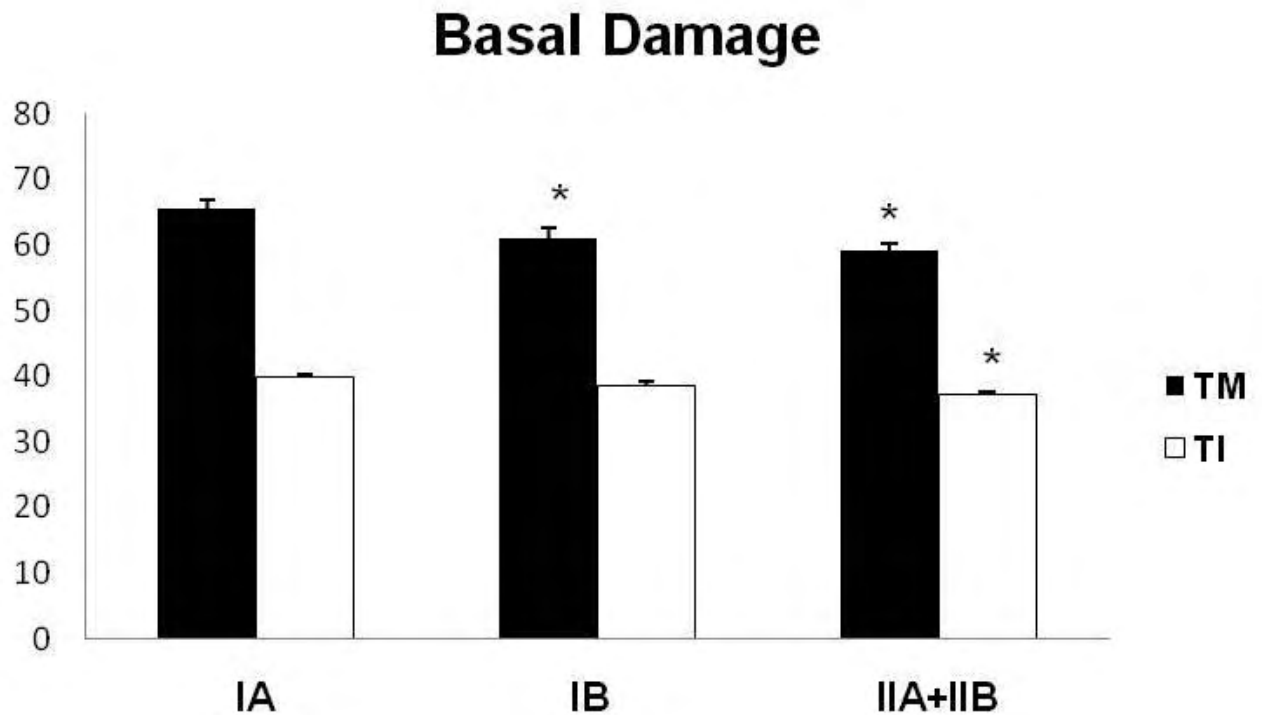
	Groups		
	IA	IB	IIA+IIB
N	41	24	48
Age (years)	28.85 ± 6.21	32.63 ± 4.90 *	31.50 ± 5.66
BMI (kg/m ²)	32.77 ± 6.99	36.03 ± 7.44	35.25 ± 6.32
Glicemic Mean (mg/dL)	81.50 ± 9.58	97.92 ± 7.52 *	111.59 ± 17.60 * #

Data presented as mean ± standard error of mean

*p<0.05 – significant statistically difference compared to group IA (Tukey multiple comparison test).

#p<0.05 – significant statistically difference compared to group IB (Tukey multiple comparison test).

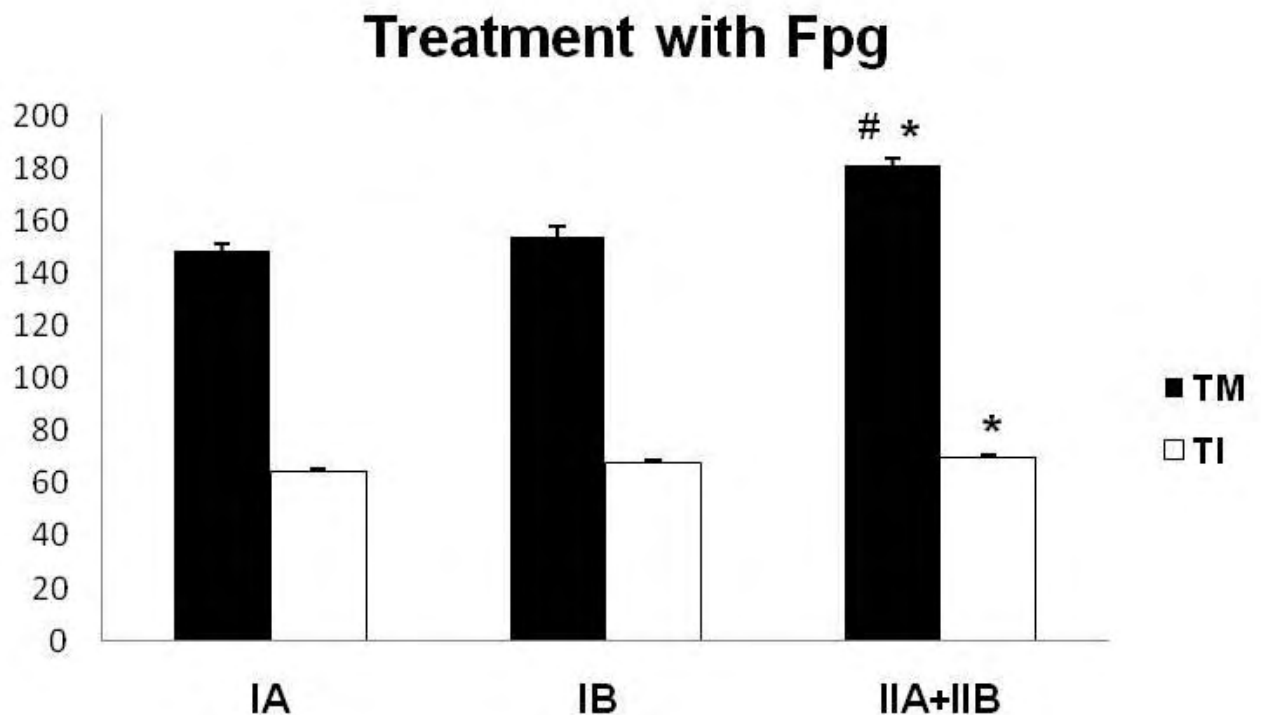
Figure 1. Basal DNA damage levels (tail moment – TM, and tail intensity – TI) in the non-diabetic (group IA), mild gestational hyperglycemic (IB group) and gestational and overt diabetes (group IIA+IIB) in the pregnant women.



Data presented as mean \pm standard error of mean

* $p < 0.05$ – significant statistically difference compared to group IA (Gamma distribution).

Figure 2. Oxidative DNA damage levels (tail moment – TM, and tail intensity – TI) after treatment using enzyme formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) in the non-diabetic (group IA), mild gestational hyperglycemic (IB group) and gestational and overt diabetes (group IIA+IIB) in the pregnant women.

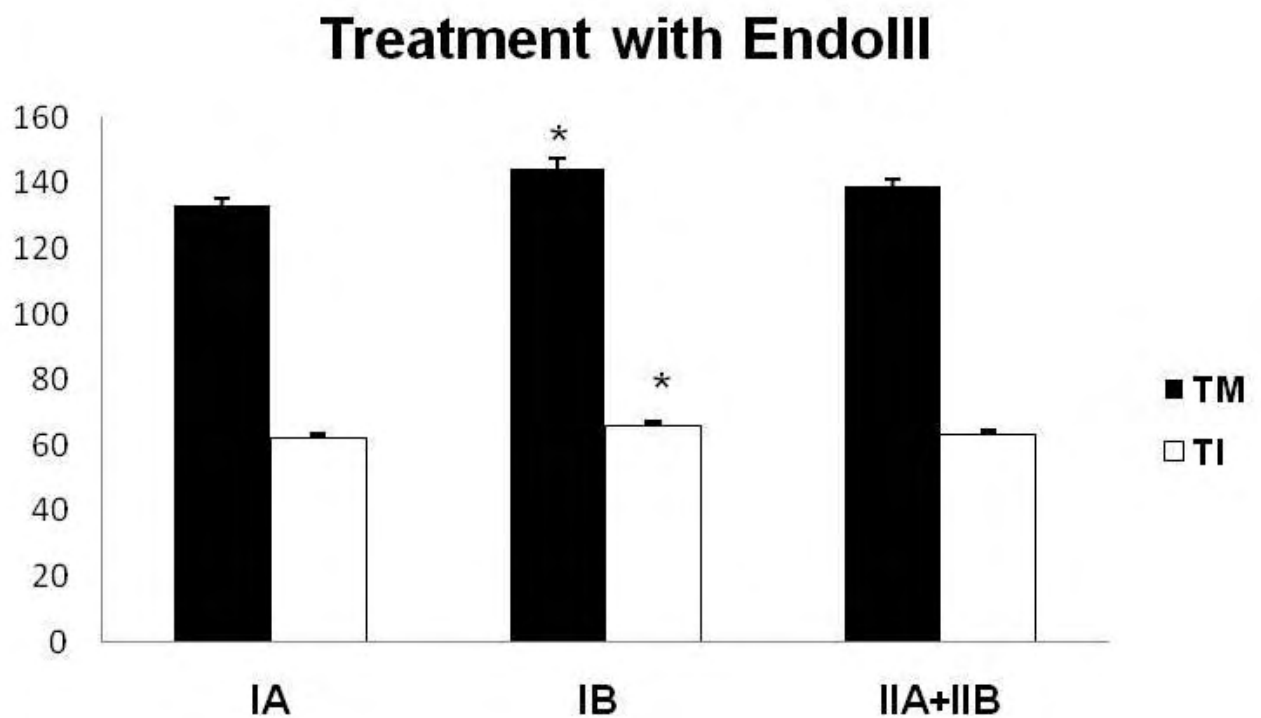


Data presented as mean ± standard error of mean

*p<0.05 – significant statistically difference compared to group IA (Gamma distribution).

[#]p<0.05 – significant statistically difference compared to group IB (Gamma distribution).

Figura 3. Oxidative DNA damage levels (tail moment – TM, and tail intensity – TI) after treatment using enzyme endonuclease III (Endo III) in the non-diabetic (group IA), mild gestational hyperglycemic (IB group) and gestational and overt diabetes (group IIA+IIB) in the pregnant women.



Data presented as mean \pm standard error of mean

* $p < 0.05$ – significant statistically difference compared to group IA (Gamma distribution).

Capítulo 2



Apoio:



SUA SAÚDE É A NOSSA META

"IDF Centre of Education"



Conselho de Secretários Municipais
de Saúde do Estado de São Paulo
"Dr. Sebastião de Moraes"
Fundado em março de 1988

Diabetes Clínica

REVISTA MULTIDISCIPLINAR DO DIABETES E DAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS

DESTAQUES:

- 4**
- Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2011
Resumo das Recomendações sobre Cuidado Médico em Diabetes
da American Diabetes Association 152
 - FDA Aprova a Nova Terapia com Incretina para o
Tratamento do Diabetes: LINAGLIPTINA 164
 - Os Diabéticos Têm Risco Até Cinco Vezes Maior de
Desenvolver Tuberculose 165
 - As Sociedades Médicas Respondem ao Anúncio de Segurança
da FDA sobre o Uso do Medicamento Actos (pioglitazona)
para o Diabetes 165
 - Insulina Combinada com Pioglitazona: Risco de Insuficiência Cardíaca 172
Prazo com Menos Hipoglicemia Noturna, se Comparada
com a Insulina Glargina: Resultados de 1 Ano de um Ensaio Randomizado
Basal-Bolus em Diabetes Tipo 1 176
 - AACE: Guidelines Enfatizam o Cuidado Abrangente 214
 - AACE: O Liraglutide Pode Oferecer Reduções de
HbA1c Mais Expressivas 215

INFORMES E RESUMOS DOS EVENTOS:



Diabetes Clínica

REVISTA MULTIDISCIPLINAR DO DIABETES, OBESIDADE E DAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS

Índice

Editorial - DMT1: O Caminho para a Cura	151
Diretrizes	152
<i>Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2011</i>	
Resumo das Recomendações sobre Cuidado Médico em Diabetes da American Diabetes Association - 2011	152
Screening e Gerenciamento de Complicações Crônicas em Crianças e Adolescentes com Diabetes Tipo 1	160
DC Informes	164
A FDA Aprova a Nova Terapia com Incretina para o Tratamento do Diabetes: LINAGLIPTINA	164
A Insulina Nasal Induz Tolerância Imunológica à Insulina Injetável	164
Os Diabéticos Têm Risco Até Cinco Vezes Maior de Desenvolver Tuberculose	165
As Sociedades Médicas Respondem ao Anúncio de Segurança da FDA Sobre o Uso do Medicamento	
Actos (pioglitazona) Para o Diabetes	165
Nova Orientação da Sociedade Americana do Diabetes para Pais de Crianças com Diabetes	166
Central de Controle de Doenças, Instituto Nacional de Saúde, Associação Americana do Diabetes	169
8 de Agosto - Dia Nacional de Combate ao Colesterol	170
Resumos	172
Tratamento para Insuficiência Cardíaca em Diabéticos - Comparação com Orientações ESC/EASD Recentes	172
Insulina Combinada com Pioglitazona: Risco de Insuficiência Cardíaca	172
Medição Não Invasiva de Glicose Plasmática por Expiração em Indivíduos Saudáveis e Diabéticos Tipo 1	173
Conformidade com as Novas Orientações do Consenso para Gerenciamento de Hiperglicemia em UTI:	
O Protocolo Yale para Infusão de Insulina. Atualizado	173
Insulina Technosphere® versus Insulina Lispro em Pacientes com Diabetes Tipo 1 Usando Múltiplas Injeções Diárias	174
Tratamento de Tolerância Diminuída à Glicose com Insulina em Spray Bucal: 6 Meses de Estudo Randomizado Controlado	175
Insulina Degludec Melhora o Controle Glicêmico de Longo Prazo com Menos Hipoglicemia Noturna, se Comparada com a Insulina Glargina: Resultados de 1 Ano de um Ensaio Randomizado Basal-Bolus em Diabetes Tipo 1	176
Um Novo Paradigma no Tratamento do Diabetes Tipo 2: Adição Sequencial de Liraglutida à Metformina e, então, Insulina Basal Detemir	176
DURAÇÃO-3: Eficiência da Exenatida Uma Vez por Semana (EQW) e Insulina Glargina (IG) depois de 84 Semanas em Pacientes com Diabetes Tipo 2 (DM2)	177
Combinação de Linagliptina e Metformina Melhora o Controle Glicêmico em Diabetes Tipo 2:	
Um Ensaio Randomizado com Braço Open-label em Pacientes com Controle Glicêmico Pobre	178
Dapagliflozina, Metformina-XR ou Ambas como Terapia Inicial para DM2	180
Reversibilidade da Função Renal Induzida por Fenofibrato em Participantes Diabéticos Tipo 2 - ACCORD	181
O Colesevelam HCl Melhora a Clearance da Glicose Plasmática em Jejum e Disposição Glicolítica de Glicose Oral, mas Não Tem Efeito na Taxa de Aparência de Glicose Oral ou Gliconeogênese	181
Comparação de 3 Regimes Intensificados com Insulina Adicionados à Terapia Oral para o Tratamento do Diabetes Tipo 2: Insulina Aspart Pré-Misturada, Duas Vezes ao Dia versus Glargina Mais 1 Glulisina Prandial ou Gradual Adição de Glulisina na Glargina	182
Produtos e Novidades	186
Saúde na Imprensa	186
Implante para Abrir Artérias só Funciona em Metade dos Casos, diz Pesquisa	187
Estudo Mostra que Diabetes já Atinge 10% da População Mundial	188
Efeito Rápido é Atrativo de Nova Pílula Para Impotência	188
SUS Terá de Dar Insulina Mais Segura a Crianças	190
Elo Entre Sal e Doenças do Coração Não é Automático	190
Diminuição do Iodo no Tempero é Nova Proposta de Órgãos de Saúde	191
Açúcar Causa Dependência Como Alcool e Cigarro	192
"Solução Caseira" Barateia Diálise, diz Nova Pesquisa	193
População com Diabetes Mais Que Dobra em 30 Anos	194
Ecos do 16º Congresso	196
Educação em Saúde no D.M. Programas de Aprendizagem em Foco	196
D.M. 1 E D.M. 2 - Etiopatogenia e Fisiopatogenia	196
Conheça o Que São BÍOSSIMILARES	197
Como Abordar a Criança Diabética?	197
Tratamento da Hipertensão e Dislipidemia	198
Pé Diabético Como Cenário Cirúrgico	198
Notícias	200
Uma Vacina para a Diabetes	200
Artigo de Revisão	204
Diabetes e o Polimorfismo Arg972 - Atualização Bibliográfica	204
Comentários	210
AAN: Guideline Apóia a Pregabalina para a Dor Neuropática do Diabetes	210
ACC: Resultados Similares com BRAs e Bloqueadores do Canal de Cálcio (BCC)	212
AACE: Guidelines Enfatizam o Cuidado Abrangente	214
AACE: O Liraglutide Pode Oferecer Reduções de HbA1c Mais Expressivas	215
A Dieta Cetogênica Pode Reverter a Nefropatia Diabética	217
Normas de publicação	218
Calendário	220



Diabetes e o Polimorfismo Arg972 – Atualização Bibliográfica

DIABETES AND THE ARG972 POLYMORPHISM – A UPDATE

Rafael Bottaro Gelaleti¹ - Paula Helena Ortiz Lima² - Débora Cristina Damasceno³ - Iracema de Mattos Paranhos Calderon⁴ - Marilza Vieira Cunha Rudge⁵

1. *Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP.*
2. *Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP.*
3. *Professora Assistente Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP.*
4. *Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP.*
5. *Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP.*

Diabetes e o Polimorfismo Arg972

Resumo

O objetivo deste trabalho de atualização foi realizar um levantamento bibliográfico dos artigos publicados nos últimos anos sobre o polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 e suas repercussões no diabetes. Foi utilizado o site do database do National Center of Biotechnology Information (NCBI – PUB-MED).

Para a busca dos artigos foram empregados os termos "polymorphisms on IRS-1 and diabetes". Aproximadamente 54% dos artigos encontrados estavam relacionados com o polimorfismo de interesse. Destes, aproximadamente 68% o polimorfismo estava ligado de várias formas ao diabetes. O polimorfismo Arg972 relaciona-se com diminuição na síntese e na secreção de insulina, com estímulo reduzido da atividade da via insulínica da PI3K, MAPK e da incorporação da timidina. Ele está presente em maior frequência em pacientes com diabetes tipo 2 e com diabetes gestacional e apresenta ligação direta com o quadro de obesidade e de resistência à insulina.

Palavras chave: Diabetes, polimorfismo, Gly972Arg, IRS-1

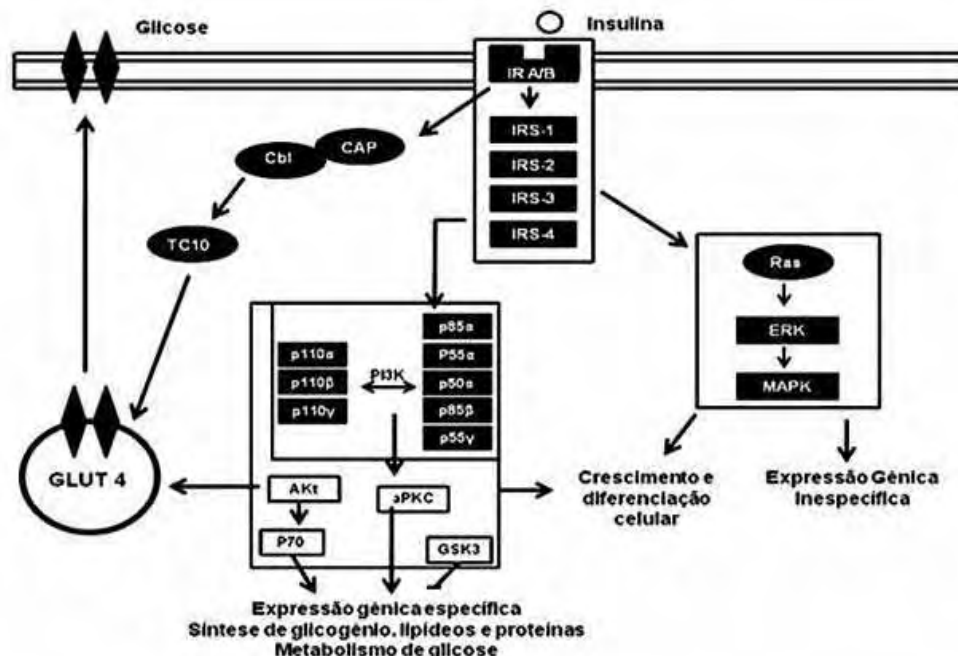
Abstract

The objective of this update was to perform an evaluation of articles published in recent years about the Arg972 polymorphism of IRS-1 gene and its role in diabetes. It was used the database site of National Center of Biotechnology Information (NCBI - PUB-MED). For search of articles the terms "polymorphisms on IRS-1 and diabetes" were used. Approximately 54% of the articles found were related to the polymorphism of interest and of these, approximately 68% the polymorphism was linked to various forms of diabetes. The Arg972 polymorphism is associated with decreased insulin synthesis and secretion with reduced stimulation of the activity of insulin pathway PI3K, MAPK and thymidine incorporation. It more frequently in patients with type 2 diabetes and gestational diabetes, showing a direct connection with the status of obesity and insulin resistance.

Keywords: Diabetes, polymorphisms, Gly972Arg, IRS-1

DIABETES E O POLIMORFISMO ARG972 – ATUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Diabetes mellitus (DM) é considerada uma das principais doenças crônicas, sendo um problema de



saúde universal que acomete todas as classes socioeconômicas. Afeta populações de países tanto desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Apresenta importante perda na qualidade de vida e promove altos encargos para os sistemas de saúde (1). É caracterizada pela presença de hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Isto resulta em defeitos na secreção e/ou ação da insulina com consequências a longo prazo (2, 3).

Dentre as classificações para o DM, há o diabetes tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e o gestacional (DM gestacional). DM1 acomete principalmente crianças e jovens e resulta na destruição das células beta (β)-pancreáticas devido a processos auto-imunes. DM2 refere-se à diminuição da insulina endógena nos tecidos-alvos, particularmente fígado, músculos e tecido adiposo com relativa deficiência de insulina. DM gestacional caracteriza-se pelo quadro de intolerância à glicose, com primeira identificação a partir da 24-26ª semana de gravidez (3, 4). Similarmente ao *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), o DMG é associado tanto a resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β -pancreáticas (5, 6).

Via de Sinalização da Insulina

Figura 1: desenho esquemático da via de sinalização da insulina – modificado de (7, 8).

A sinalização da insulina é mediada por uma rede complexa e altamente integrada que controla vários processos. Na presença de insulina, o receptor de insulina (IR), que é uma glicoproteína transmembrana, possui atividade tirosina quinase e é formado por duas subunidades α e duas subunidades β (8, 9, 10, 11). Fosforila proteínas do substrato receptor de insulina (IRS), que estão associadas à ativação das duas principais vias de sinalização: via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – via AKT/proteína quinase B (PKB), que é responsável pela maioria das ações metabólicas da insulina, e a via Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK), que regula a expressão de alguns genes e colabora com a via PI3K para controlar o crescimento e diferenciação celular (12). Entre as centenas de moléculas envolvidas na via de sinalização da insulina, os IR/IRS, os heterodímeros da PI3K e AKT/PKB são os três complexos mediadores mais bem definidos (Fig. 1) e responsáveis por alterações que levam a falhas na sinalização insulínica (7).

O primeiro problema que pode existir na via de sinalização da insulina está relacionado ao complexo IR/IRS e proteínas associadas (Fig. 1) (7). Ao contrário de outros receptores tirosina quinases (RTK), que se ligam diretamente às caudas citoplasmáticas efetoras



(13), o IR e as proteínas satélites, receptores do fator de crescimento-1 mediado pela insulina (IGF1R) medeiam a ligação do IRS a outros efetores intracelulares. Além disso, o IR e proteínas do IRS compartilham mecanismos comuns de regulação: ambos são ativados por fosforilação em tirosina e são negativamente regulados por proteínas tirosina-fosfatases (PTPs), fosforilação em serina e por ligantes que diminuem a regulação da via (7).

Fosforilação e expressão das proteínas IRS

As proteínas IRS são ativadas pelo IR e sofrem fosforilação em resíduos de tirosina. Para dar continuidade à sinalização intracelular, as IRS ligam-se a proteínas que apresentam domínios de homologia Src – 2 (SH2). As proteínas SH2 são moléculas adaptadoras que ativam a PI3K ou a via MAPK através das proteínas associadas GRb2/SOS (7).

As proteínas IRS também sofrem fosforilação em serina em resposta à insulina e outros estímulos, incluindo citocinas e ácidos graxos livres (14). Muitas IRS quinases, tais como proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) (15), S6 quinase (16) e c-jun N-terminal quinase (JNK) (17), são ativadas pela insulina. Isto indica que a fosforilação das proteínas IRS em serina poderia representar um mecanismo de feedback negativo na via de sinalização de insulina. Além disso, a fosforilação das proteínas IRS em serina pode ser um mecanismo que medeia uma ligação cruzada entre os sistemas de sinalização.

A fosforilação em serina no IRS-1 é aumentada no quadro de resistência à insulina, contribuindo para essa patologia. Recentemente, a ativação do Fator Nuclear (NF)- κ B também têm sido apontado como um inibidor da sinalização de insulina pelo aumento da fosforilação em serina do IRS-1 (18).

A hiperinsulinemia diminui a expressão do IRS-1 e IRS-2 tanto em modelos de cultura de células quanto em tecidos de camundongos. A explicação para esse efeito está relacionada à degradação de proteínas IRS-1 e inibição transcricional de IRS-2 (19). Além disso, alguns autores mostraram que proteínas SOCS promovem ubiquitinação e degradação de IRS-1 e IRS-2 em culturas de células e tecidos animais, contribuindo para resistência à insulina (20). Independente do mecanismo, a diminuição dos níveis de proteínas IRS e IR contribui para a resistência à insulina em estados diabéticos tanto em roedores como em humanos (21).

Considerando a importância dos IRS, principalmente o IRS-1 na via de sinalização de insulina, alterações genéticas como polimorfismos podem alterar o funcionamento perfeito dessa via de sinalização. Portanto, o objetivo deste artigo de atualização foi realizar um levantamento bibliográfico das publicações nos últimos anos sobre o polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 e suas repercussões no diabetes.

Foi realizada revisão de literatura referente ao período de 1993 a 2011 (18 anos) no site do database do National Center of Biotechnology Information (NCBI – PUB-MED). Para a busca dos artigos foram empregados os termos "polymorphisms on IRS-1 and diabetes".

No levantamento, foram encontrados 41 artigos. Destes, 22 (aproximadamente 54%) estavam relacionados com o polimorfismo de interesse (Gly972Arg do gene IRS-1). Dos 22, apenas 7 (aproximadamente 32%) mostravam que o polimorfismo não tinha qualquer tipo de relação com diabetes. Nos outros 15 artigos (aproximadamente 68%), o polimorfismo estava ligado de várias formas ao diabetes.

Tabela 1 – Total de artigos encontrados no levantamento

	Número de artigos	Porcentagem
Relação com o polimorfismo Arg972 do gene IRS-1	22	53,7%
Sem qualquer tipo de relação com o polimorfismo de interesse	19	46,3%
Total	41	100%

Tabela II – Artigos relacionados com o polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 encontrados no levantamento

	Número de artigos	Porcentagem
Polimorfismo ligado de várias formas ao diabetes	15	68,1%
Sem qualquer tipo de relação com o diabetes	7	31,9%
Total	22	100%

De acordo com os artigos analisados no levantamento bibliográfico, foi evidenciado que o gene do IRS está localizado no braço longo do cromossomo 2 (2q36) e é altamente polimórfico, com variações na sequência codificadora em cerca de 5% dos indivíduos normais e em 10-20% dos pacientes com DM2 (22). Algumas variantes no gene IRS-1 foram identificadas em humanos: Ala512Pro e Gly972Arg (23), Pro170Arg, Ser809Phe e Met209Thr (24), Ser892Gly (25) e Gly819Arg e Arg1221Cys (26). A substituição mais prevalente é o polimorfismo Gly-Arg no codon 972 (Arg972) do gene IRS-1 (22). É uma substituição não-conservativa localizada entre dois sítios de ligação para PI3K. A expressão *in vitro* dessa proteína mutante resultou na redução da estimulação da atividade da via insulínica da PI3K e MAPK e da incorporação da timidina (27). Este polimorfismo é mais frequente em mexicanos, caucasianos (23, 25) e japoneses (28).

Shimokawa et al. (1994) encontraram três substituições não-conservativas no IRS-1: Gly819Arg, Gly972Arg e Arg1221Cys e três polimorfismos silenciosos: Asp9 (GAC vs GAT), Gly235 (GGG vs GGA) e Ala805 (GCA vs GCG). Os autores evidenciaram o polimorfismo 972 em 7 de 31 sujeitos com DM2, em 4 de 32 sujeitos normais e em 4 de 16 indivíduos obesos. As substituições Arg819 e Cys1221 foram ambas detectadas apenas em um sujeito com DM2. Esses três polimorfismos foram conservados e identificados pelas sequências de aminoácidos em humanos, ratos e camundongos, sugerindo que Gly819, Gly972 e Arg1221 são importantes para a função normal do IRS-1. A prevalência dessas substituições foram aumentadas

em pacientes com DM2, sugerindo que mutações no IRS-1 tem papel importante na patogênese do DM2 (28).

Indivíduos normais e diabéticos heterozigotos para o variante Arg972 exibiram baixas concentrações de insulina e peptídeo-C no estado de jejum (23). Além disso, parentes não diabéticos em primeiro grau de pacientes com DM2, que são heterozigotos para o variante Arg972, exibiram níveis mais baixos de insulina em jejum e menor resposta insulínica a uma carga de glicose oral quando comparados com os não-portadores (29). Zhang et al. (1996) sugeriram que mutantes Arg972 do IRS-1 podem prejudicar diferencialmente a síntese e a secreção de insulina na presença de glicose. Os autores apontaram que esta variante foi mais prevalente em indivíduos com DM2 com resistência à insulina, associada ou não à dislipidemia (30).

Em indivíduos obesos não-diabéticos, o polimorfismo Arg972 do IRS-1 em sua forma heterozigota está associado à redução de 50% na sensibilidade à insulina em comparação com obesos sem polimorfismo (31). Crianças obesas com polimorfismo Arg972 também têm índice de sensibilidade à insulina ligeiramente menor que crianças sem o polimorfismo e pacientes com o polimorfismo Arg972 associado ao polimorfismo no IRS-2, tem 25-35% de diminuição na sensibilidade à insulina do que pacientes controle (32).

Imai et al.(1994) mostraram uma significativa interação entre obesidade e a forma heterozigota do variante 972. Os obesos portadores do variante 972 também foram caracterizados por um "cluster" de fatores de riscos metabólicos cardiovasculares, com elevadas concentrações de glicose plasmática de jejum e triglicerídeos séricos. Além disso, esses mesmos autores verificaram que um indivíduo não obeso homozigoto para o 972 apresentou baixa concentração de insulina sérica de jejum e de peptídeo-C, baixa sensibilidade à insulina e eficácia de glicose. Além disso, foi verificado que na 24ª hora do teste dexametazona, houve o aparecimento de um diabetes transitório (26).

Estas observações sugerem que o polimorfismo Arg972 do IRS-1 também pode contribuir para resistência à insulina. Porzio et al. (1999), ao avaliarem células-β em culturas que tinham o polimorfismo, verificaram que não houve alteração na expressão



e ação do IRS-2 e nem na fosforilação do IRS-1 estimulada pela insulina, mas diminuiu a ligação do IRS-1 na subunidade p85 da PI3K prejudicando a transdução do sinal. Além disso, o polimorfismo interferiu na secreção insulínica estimulada pela glicose e pela sulfoniluréia, contribuindo para resistência periférica à insulina e diminuição da secreção de insulina, sendo que essas alterações contribuíram para a patogênese do DM2 (22).

Estudos mostraram a relação entre o polimorfismo Arg972 com outros polimorfismos. Stumvoll et al. (2002) testaram se portadores do polimorfismo Pro12Ala do receptor ativado por proliferador de peroxisomo gama 2 (PPARGama2) exibiam um fenótipo diferente quando este polimorfismo estava presente com o polimorfismo Arg972 do IRS-1. O alelo Ala do PPARGama2 se mostrou em vantagem quando houve outro polimorfismo adicional desvantajoso (Arg972), isto é, portadores do polimorfismo Pro12Ala do PPARGama2 e do polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 tiveram maior sensibilidade à insulina que portadores somente do polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 (33). Benecke et al. (2000) sugeriram que houve um sinergismo entre os polimorfismos Trp64Arg do beta-3-Arg e o Arg972 do IRS-1 em mulheres germânicas caucasianas obesas, levando à diminuição da perda de peso além da frequência do DM2 ter sido maior nas pacientes polimórficas (34).

Ratos obesos geneticamente modificados (heterozigotos Knockout para IRS-1) foram avaliados com relação ao impacto da expressão do IRS-1 na obesidade ligada à resistência à insulina. Os ratos obesos (+/-) apresentaram profunda resistência à insulina comparados aos controle. A expressão dos substratos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2) foi menor em obesos IRS-1 (+/-), o que poderia explicar a resistência (35).

Em relação ao DM Gestacional (DMG), a frequência do polimorfismo Arg972 foi aumentada nestes pacientes (36). Além disso, pacientes com DMG e com o polimorfismo Arg972 são mais obesas no início da gestação e apresentam altos níveis de glicose e insulina sérica de jejum. Assim, este polimorfismo está associado a características basais de pacientes com DMG e pode estar relacionado com resistência à insulina em obesas com DMG (37).

Frente aos artigos analisados, é possível concluir que o polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 está presente com maior frequência em pacientes diabéticos (DM2 e DM gestacional) e apresenta ligação direta também com o quadro de obesidade e de resistência à insulina.

Referências

1. Toscano CM. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. *Ciências e Saúde Coletiva* 2004; 9(4):885-895.
2. Gross JL, Ferreira SRG, Franco LJ, et al. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellito e Tratamento do Diabetes Mellito Tipo 2. Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44(1):8-35.
3. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 (Supplement 1): S62-S67, 2009. Available in http://care.diabetesjournals.org/cgi/reprint/32/Supplement_1/S62
4. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005; 115(3):485-491.
5. Kuhl C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. *Diabetes* 1991; 40(2):18-24.
6. Saisho Y, Miyakoshi K, Tanaka M, et al. Beta cell dysfunction and its clinical significance in gestational diabetes. *Endocrine Journal* 2010; 57(11):973-980.
7. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:85-96.
8. Carnevali JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2002; 46(4):419-425.
9. Leroy D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001; 24(3):588-597.
10. Farese RV. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp. Biol. Med* 2001; 226(4):283-295.
11. Lima PHO, Damasceno DC, Campos KE, et al. Relação entre os fatores que interferem na secreção de insulina e no transporte de glicose. *Diabetes Clínica (Atibáia)* 2003; 7(6):441-445.
12. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell Biochem* 1998; 182:31-48.
13. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203-212.
14. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci. STKE* 2005, PE4.
15. Bouzakri K, Roques M, Gual P, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1319-1325.
16. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol* 2004; 166:213-223.
17. Miller BS, Shankavaram UT, Horney MJ, et al. Activation of cJun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase by insulin. *Biochemistry* 1996; 35:8769-8775.
18. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Med* 2005; 11:183-190.
19. Hirashima Y, Tsuruzoe K, Kodama S, et al. Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Endocrinol* 2003; 179:253-266.
20. Rui L, Yuan M, Frantz D, et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem* 2002; 277:42394-42398.
21. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell* 2000; 6:77-86.
22. Porzio O, Federici M, Hribal ML. The Gly972Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β cells. *J. Clin. Invest* 1999; 104:357-364.
23. Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, et al. Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342:828-832.
24. Ura S, Araki E, Kishikawa H, et al. Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia* 1996; 39:600-608.
25. Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, et al. Insulin receptor substrate-variants in non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94:1141-1146.
26. Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, et al. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1655-1658.
27. Almind K, Inoue G, Pedersen O, et al. A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest* 1996; 97:2569-2575.
28. Shimokawa K, Kadowaki H, Sekura H, et al. Molecular scanning of the glycogen synthase and insulin receptor substrate-1 genes in Japanese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:463-469.
29. Rett K, et al. Codon 972 polymorphism of the IRS-1 gene is prevalent in offspring of subjects with type 2 diabetes without determining clamp-derived insulin action. *Diabetes* 1998; 47(1):393a(Abstr.).
30. Zhang Y, Wat N, Stratton IM, et al. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: Separate contributions of IRS-1 and β 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. *Diabetologia* 1996; 39:1505-1511.
31. Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, et al. Insulin resistance: interaction between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 1995; 346:397-402.
32. Le Fur S, Le Stunff C, Bougnères P. Increased insulin resistance in obese children who have both 972-IRS-1 and 1057-IRS-2 polymorphisms. *Diabetes* 2002; 51(3):304-307.
33. Stumvoll M, Stefan N, Fritsche A, et al. Interaction effect between common polymorphisms in PPARgamma2 (Pro12Ala) and insulin receptor substrate 1 (Gly972Arg) on insulin sensitivity. *J Mol Med* 2002; 80(1):33-38.
34. Benecke H, Topak H, von zur Muhlen A, et al. A study on the genetics of obesity: influence of polymorphisms of the beta-3-adrenergic receptor and insulin receptor substrate 1 in relation to weight loss, waist to hip ratio and frequencies of common cardiovascular risk factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108(2):86-92.
35. Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, et al. Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 2002; 174(2):309-319.
36. Fallucca F, Dall'ra MG, Sculio E, et al. Polymorphisms of insulin receptor substrate 1 and beta3-adrenergic receptor genes in gestational diabetes and normal pregnancy. *Metabolism* 2006; 55 (11):1451-1456.
37. Tok EC, Ertunc D, Bilgin O, et al. Association of insulin receptor substrate-1 G972R variant with baseline characteristics of the patients with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194(3):868-872.

Capítulo 3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
LABORATÓRIO DE PESQUISA EXPERIMENTAL DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO POLIMORFISMO ARG972
DO GENE DO IRS-1 EM GESTANTES DIABÉTICAS E COM
HIPERGLICEMIA LEVE E EM SEUS RECÉM-NASCIDOS**

RAFAEL BOTTARO GELALETI

Candidato ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia

Prof. Titular Marilza Vieira Cunha Rudge

Orientadora

Botucatu

2012

Resumo

O grupo IB corresponde a gestantes portadoras de hiperglicemia leve, ou seja, gestantes que apresentam rastreamento positivo, mas diagnóstico negativo para diabetes gestacional (DMG) teste de tolerância a glicose (TTG100g normal), e resposta alterada no perfil glicêmico (PG). Este grupo foi, acidentalmente, identificado em 1983, quando projeto prospectivo foi desenvolvido para padronização do PG comparando-o com o TTG100g no diagnóstico do diabetes na gestação. Essas gestantes apresentam resistência à insulina, intolerância à glicose, maior susceptibilidade de desenvolver Diabetes Tipo 2 alguns anos após o parto, e 53,8% de seus recém-nascidos (RN) são grandes para idade gestacional e/ou macrossômicos, semelhantes às mulheres com DMG. A sinalização da insulina é mediada por uma complexa e altamente integrada rede que controla vários processos, sendo responsável pela maioria das ações metabólicas da insulina, pela regulação da expressão de alguns genes e controle do crescimento e diferenciação celular. O gene do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) produz a proteína IRS-1, que é uma molécula expressa em muitos tecidos sensíveis à insulina, no qual tem um papel muito importante na regulação dos efeitos da insulina na célula. O gene IRS-1 é altamente polimórfico, e esses polimorfismos podem prejudicar gravemente a função do IRS-1. A substituição mais prevalente é o polimorfismo Gly-Arg no codon 972 (Arg972) do gene IRS-1 que mostra ligação direta a resistência à insulina, alterações lipídicas, Diabetes *mellitus* gestacional e Diabetes *mellitus* tipo 2. O presente estudo objetiva avaliar o quadro de diabetes e hiperglicemia leve na gestação, para identificar possíveis alterações genéticas relacionadas a essa alteração glicêmica, que podem aumentar o risco para o desenvolvimento de futuras doenças degenerativas na própria gestante ou em seus descendentes.

Palavras-chave: hiperglicemia leve, diabetes, IRS-1, polimorfismo Gly972Arg,

1. Introdução

Diabetes mellitus Gestacional e hiperglicemia leve

Diabetes mellitus gestacional (DMG) é qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação (ADA, 2006). Similar ao *Diabetes mellitus* Tipo 2 (DM2), o DMG é associado tanto a resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta (β)-pancreáticas (Kühl, 1991).

A hiperglicemia materna ocasiona hiperglicemia-hiperinsulinemia fetal responsável pela macrosomia fetal que causa complicações perinatais como distócia de bis-acromial, aumento do risco de tocotraumatismos e asfixia ao nascimento, aumento da síndrome de desconforto respiratório, policitemia e hipoglicemia neonatal (Oh, 2004). Esta macrosomia fetal e o DMG tem relação com o desenvolvimento de obesidade na infância e adolescência (Vohr *et al.*, 1999, Yogev *et al.*, 2009).

A *American Diabetes Associations* (ADA) recomenda para o rastreamento do DMG, o teste de sobrecarga a glicose de 50g de glicose via oral entre a 24^a e 28^a semana de gestação para mulheres com fatores de risco para DMG. As mulheres com rastreamento positivo vão para a fase de diagnóstico com o uso do teste de Tolerância a Glicose (TTG) de 75 ou 100g (ADA, 2004).

Em 1983, Rudge utilizando dois testes de diagnóstico em paralelo, o TTG100g e o perfil glicêmico (PG) identificou um grupo diferenciado de mulheres (Grupo – IB) que apresentava rastreamento positivo, diagnóstico negativo para DMG (TTG100g normal), mas PG alterado. Essas gestantes apresentam hiperglicemia leve (HL) ao longo do dia (detectada pelo PG) (Rudge, 1983) e as mesmas repercussões perinatais do DMG. Correspondem a 13,8% da população de gestantes rastreadas que, somados aos 7,0% das gestações complicadas por diabetes, aumentam a ocorrência de distúrbios hiperglicêmicos na gestação para cerca de 20% (Rudge *et al.*, 1996). Ao longo dos últimos 20 anos temos procurado estudar e entender melhor este grupo de gestantes, seus recém-nascidos e suas placentas.

Os recém-nascidos das gestantes com HL apresentaram 53,8% de macrosomia, proporção semelhante aos 51,9%, observados nas diabéticas clínicas e gestacionais (Rudge, 1983). O índice de mortalidade perinatal é de 41%, semelhante ao de gestantes diabéticas e 10 vezes maior que o de não-diabéticas (Rudge *et al.*, 1995). O risco atribuível de morte perinatal neste grupo é de 4,16%, comparável ao identificado nos grupos de gestantes diabéticas (Rudge *et al.*, 2005).

As gestantes portadoras de HL têm risco elevado para hipertensão arterial, obesidade e hiperglicemia e parecem reproduzir o modelo da síndrome metabólica (SM) na gestação

(Negrato *et al.*, 2008), com hiperinsulinemia e resistência a insulina na gestação que persiste 6 semanas pós-parto. Após 10 a 12 anos da gravidez-índice, o DM2 foi confirmado em 16,7% das mulheres que tiveram HL na gestação (Silva *et al.*, 2003).

As placentas de mulheres com HL têm maior densidade absoluta e maior incidência de endarterite (lesão descrita como *posmortem*), quando comparadas a aquelas de mulheres normais (Lima & Rudge, 1998; Del Nero & Rudge, 2003). 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 e diagnóstico negativo para DMG, mas que apresentam hiperglicemia ao longo do dia quando ingerem uma dieta geral, ou seja, quando ingerem mistura de carboidratos, lipídios e proteínas, tem as mesmas repercussões maternas, neonatais e placentárias das gestantes diabéticas. Portanto, as gestantes com HL (identificada apenas pelo TTG de 100g normal e PG alterado), apesar de serem classificadas como de baixo risco, caracterizam uma população de resultado materno e perinatal adverso. 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 Serviço de Diabetes e Gravidez da Disciplina de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu–UNESP.

A literatura internacional sobre gestantes com quadros semelhantes é praticamente inexistente. O único dado conhecido é sobre grupo semelhante que foi diagnosticado na Holanda em 1989 (Backx *et al.*, 1989). No entanto, há relatos que definem as gestantes com HL como um grupo com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG (Weijers *et al.*, 2002), ou com rastreamento positivo e diagnóstico negativo para DMG, ou com apenas um valor do TTG alterado (Bo *et al.*, 2004). Ressalta-se que Bo *et al.*, 2004, concluem que o teste de rastreamento positivo identifica gestações com anormalidades metabólicas e resultado perinatal adverso mesmo na presença de TTG normal. Ao que parece tanto às mulheres com DMG, quanto as portadoras de HL apresentam distúrbio metabólico semelhante, muito embora não seja ainda entendido o mecanismo(s) responsável (eis) por tal similaridade.

Fisiopatologia do Diabetes mellitus Gestacional

O desbalanço entre a capacidade das células beta-pancreáticas e o aumento da demanda por insulina causada pela diminuição da sensibilidade a insulina durante a gravidez é o principal mecanismo patogênico causador do DMG (Damm *et al.*, 1992; Buchanan *et al.*,

1990; Catalano *et al.*, 1991; Ryan *et al.*, 1995). Entretanto o DMG tem sido aceito como uma manifestação precoce da Síndrome Metabólica (SM) na qual a combinação de resistência a insulina e hiperinsulinemia compensatória predispõem 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- β que levam à insuficiência de insulina não estão bem definidas, mas três categorias gerais são identificadas: 1) disfunção autoimune das células- β ; 2) anormalidades genéticas que levam à diminuição da secreção de insulina e 3) disfunção das células- β associada à resistência à insulina crônica (Metzger *et al.*, 2007). DMG pode representar uma fase inicial do desenvolvimento de SM ou diabete. Mulheres com histórico de DMG têm chance aumentada de 50% para desenvolver o DM2 (Lobner *et al.*, 2006).

Via de Sinalização da Insulina

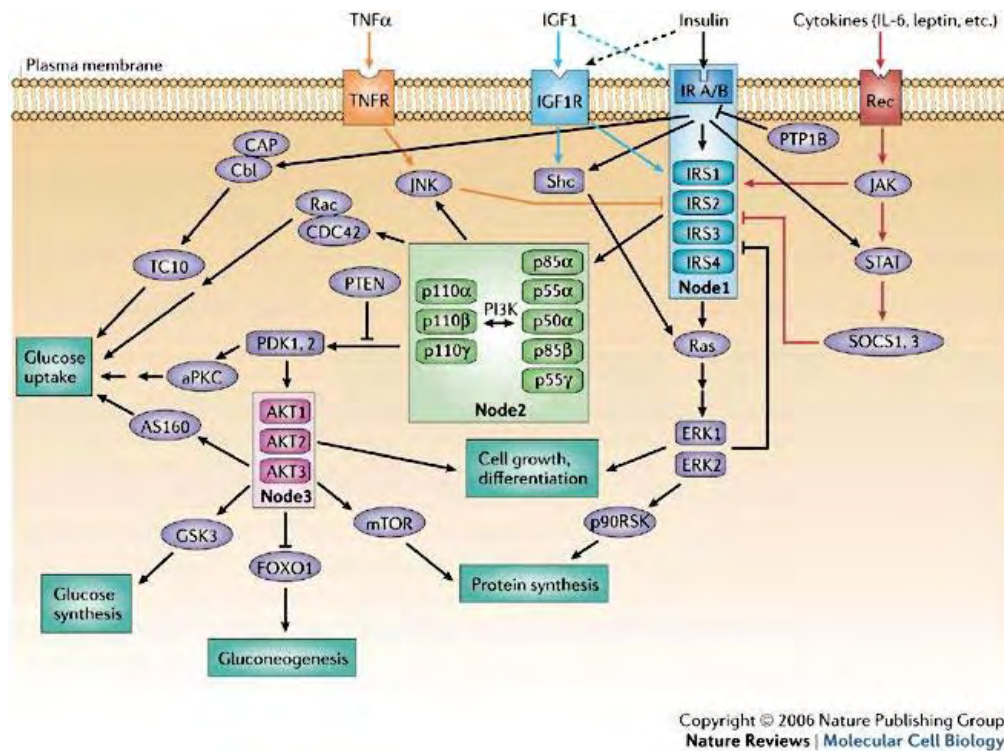


Figura 1: Via de sinalização da insulina

A sinalização da insulina é mediada por uma complexa e altamente integrada rede que controla vários processos. Na presença de insulina, o receptor de insulina (IR) fosforila proteínas do substrato receptor de insulina (proteínas IRS) que estão associadas à ativação das duas principais vias de sinalização: via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – via AKT/proteína quinase B (PKB), que é responsável pela maioria das ações metabólicas da

insulina, e a via Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK), que regula a expressão de alguns genes e colabora com a via PI3K para controlar o crescimento e diferenciação celular (revisto em Avruch, 1998). Entre as centenas de moléculas envolvidas na via de sinalização da insulina, os IR/IRS, os heterodímeros da PI3K e AKT/PKB são os três complexos mediadores mais bem definidos (Fig. 1) (Taniguchi *et al.*, 2006) e alterações nesses complexos levam a uma falha na sinalização insulínica.

O primeiro problema que pode existir na via de sinalização da insulina está relacionado ao complexo IR/IRS e proteínas associadas (Fig. 1) (Taniguchi *et al.*, 2006). Ao contrário de outros receptores tirosina quinases (RTKs) que se ligam diretamente com as caudas citoplasmáticas efetoras (Ullrich e Schlessinger, 1990), o IR e as proteínas satélites, receptores do fator de crescimento mediado pela insulina 1 (IGF1R) medeiam a ligação do IRS a outros efetores intracelulares. Além disso, o IR e proteínas do IRS compartilham mecanismos comuns de regulação: eles são ativados por fosforilação em tirosina, e são negativamente regulados por proteínas tirosina fosfatases (PTPs), fosforilação em serina e ligantes que diminuem a regulação da via. (Taniguchi *et al.*, 2006)

Fosforilação e expressão das proteínas IRS

As proteínas IRS são ativadas pelo IR e sofrem fosforilação em resíduos de tirosina. Para dar continuidade a sinalização intracelular, as IRS ligam-se a proteínas que apresentam domínios de homologia Src – 2 (SH2). As proteínas SH2 são moléculas adaptadoras que ativam a PI3K, ou a via MAPK através das proteínas associadas GRb2/SOS (Taniguchi *et al.*, 2006).

As proteínas IRS também sofrem fosforilação em serina em resposta à insulina e outros estímulos, incluindo citocinas e ácidos graxos livres (Zick, 2005). Há mais de 70 sítios em potencial de fosforilação em serina no IRS-1 e, em geral, a fosforilação em serina parece regular negativamente a sinalização do IRS. A fosforilação em serina do IRS-1 é aumentada em estados de resistência a insulina contribuindo para essa patologia. Muitos IRS quinases, tais como sinal quinase extracelular-regulamentado (ERK) (Bouzakri *et al.*, 2003), S6 quinase (Harrington *et al.*, 2004), e c-jun N-terminal quinase (JNK) (Miller *et al.*, 1996), são ativadas pela insulina, o que indica que fosforilação em serina das proteínas IRS poderia representar um mecanismo de feedback negativo, na via de sinalização de insulina. A fosforilação em serina das proteínas IRS pode ser também um mecanismo que medeia uma ligação cruzada entre os sistemas de sinalização. Recentemente, a ativação do Fator Nuclear (NF)- κ B também

têm sido apontado como um inibidor da sinalização de insulina através do aumento da fosforilação da serina do IRS-1 (Cai *et al.*, 2005).

A hiperinsulinemia diminui a expressão do IRS-1 e IRS-2 tanto em modelos de cultura de células quanto em tecidos de camundongos (Hirashima *et al.*, 2003). A explicação para esse efeito está relacionada com a degradação de proteínas IRS-1 e inibição transcricional de IRS-2 (Hirashima *et al.*, 2003). Além disso, alguns autores mostraram que proteínas SOCS podem induzir a degradação ubíqua de IRS-1 e IRS-2 (Rui *et al.*, 2002). Independente do mecanismo, a diminuição dos níveis de proteínas IRS e IR contribui para a resistência à insulina em estados diabéticos tanto em roedores como em humanos (Shimomura *et al.*, 2000).

Gene IRS-1 e o polimorfismo Arg 972

O gene do IRS está localizado no braço longo do cromossomo 2 (2q36) e é altamente polimórfico, com variações na seqüência codificadora em cerca de 5% dos indivíduos normais e em 10-20% dos pacientes com diabetes tipo 2 (Porzio *et al.*, 1999). Algumas variantes no gene IRS-1 foram identificadas em humanos: Ala512Pro e Gly972Arg (Almind *et al.*, 1993), Pro170Arg, Ser809Phe e Met209Thr (Ura *et al.*, 1996), Ser892Gly (Laakso *et al.*, 1994), e Gly819Arg e Arg1221Cys (Imai *et al.*, 1994). A substituição mais prevalente é o polimorfismo Gly-Arg no codon 972 (Arg972) do gene IRS-1 (Porzio *et al.*, 1999), é uma substituição não-conservativa localizada entre dois dos sítios de ligação para PI3K. A expressão *in vitro* dessa proteína mutante resultou na redução da estimulação da atividade da via insulínica da PI3K e MAPK e da incorporação da timidina (Almind *et al.*, 1996). Este polimorfismo é mais freqüente em México Americanos, caucasianos (Almind *et al.*, 1993, Laakso *et al.*, 1994) e japoneses (Shimokawa *et al.*, 1994).

Indivíduos normais e diabéticos heterozigotos para o variante Arg972 exibem baixas concentrações de insulina e peptídeo-C de jejum (Almind *et al.*, 1993). Além disso, parentes não diabéticos de primeiro grau de pacientes com diabetes tipo 2, que são heterozigotos para a variante Arg972 exibiram níveis mais baixos de insulina em jejum e uma menor resposta insulínica a uma carga de glicose oral quando comparados com os não-portadores (Rett *et al.*, 1998).

Zhang *et al.*, 1996, sugerem que mutantes Arg972 do IRS-1 podem prejudicar diferencialmente a síntese e a secreção de insulina estimulada pela glicose. Esta variante é

mais prevalente em indivíduos com diabetes tipo 2 que têm resistência insulina associada ou não a dislipidemia.

Em indivíduos obesos não-diabéticos, o polimorfismo Arg972 do IRS-1 em sua forma heterozigota é associado com uma redução de 50% na sensibilidade a insulina em comparação com obesos sem polimorfismo (Clausen *et al.*, 1995). Estas observações sugerem que o polimorfismo Arg972 do IRS-1 também pode contribuir para a resistência à insulina. Porzio *et al.*, 1999, ao avaliarem células- β em culturas que continham o polimorfismo verificaram que a não houve alteração na expressão e ação do IRS-2 e nem a fosforilação do IRS-1 estimulada pela insulina, mas diminuiu a ligação do IRS-1 na subunidade p85 da PI3K prejudicando a transdução do sinal. Além disso, o polimorfismo interferiu na secreção insulínica estimulada pela glicose e pela sulfoniluréia contribuindo para a resistência periférica a insulina e diminuição da secreção da insulina, sendo essas alterações contribuintes para a patogênese do diabetes tipo 2.

Justificativa

O grupo IB compreende as gestantes portadoras de hiperglicemia leve, ou seja, com rastreamento positivo e diagnóstico negativo de diabetes gestacional (TTG100g normal), mas que apresentam alterações no PG. Além disso, mulheres com hiperglicemia leve apresentam resistência à insulina, intolerância à glicose e maior susceptibilidade de desenvolver DM2 alguns anos após o parto, semelhantes às mulheres com DMG. Considerando o desfecho de peso fetal como marcador da necessidade de controle da hiperglicemia e introdução de terapêutica nas gestações complicadas pelo diabetes, mulheres com hiperglicemia leve apresentam 53,8% de recém-nascidos (RN) grandes para idade gestacional (GIG) e/ou macrossômicos, e o risco atribuível de morte perinatal neste grupo é de 4,16%, sendo essas proporções semelhantes aos RN de mães diabéticas. O presente projeto visa dar continuidade aos estudos de genética molecular que já estão sendo realizados com o grupo de gestantes com diabetes e hiperglicemia leve, para tentar identificar outros possíveis marcadores genéticos que estejam relacionados a resistência a insulina e alterações na homeostase da glicose causando, conseqüentemente, alterações no organismo materno que repercutem no desenvolvimento fetal.

Meta/Resultados esperados

Espera-se que o polimorfismo Arg972 esteja presente nas gestantes com hiperglicemia leve e seus recém-nascidos, semelhante ao que ocorre no DM2 e que pode atuar como

marcador genético relacionado à resistência a insulina e alterações na homeostase da glicose presente nestas gestantes. Apesar de serem classificadas como de baixo risco, gestantes portadoras de hiperglicemia leve caracterizam uma população de resultado materno e perinatal adverso que precisa ter um melhor acompanhamento dos profissionais e serviços de saúde.

2. Objetivos

O presente estudo objetiva avaliar o quadro de diabetes e hiperglicemia leve na gestação para identificar possíveis alterações genéticas relacionadas a essa alteração glicêmica, que podem aumentar o risco para o desenvolvimento de futuras doenças degenerativas na própria gestante ou em seus descendentes.

Objetivos específicos

- Avaliar a presença do polimorfismo Arg972 do gene do IRS-1 em gestantes diabéticas ou com hiperglicemia leve.
- Avaliar a presença do polimorfismo Arg972 do gene IRS-1 nos recém-nascidos de gestantes diabéticas ou com hiperglicemia leve.

3. Metodologia

Casuística

Serão avaliadas mulheres atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina– UNESP, Botucatu – SP, e selecionadas com base na ausência de doenças crônicas e infecciosas, não fumantes e que não estejam sob radioterapia. As pacientes com diabetes serão divididas em 4 grupos: 1) mulheres com TTG e Perfil glicêmico normais (grupo controle), 2) mulheres com TTG normal e Perfil glicêmico alterado (hiperglicemia leve), 3) mulheres com TTG alterado e Perfil glicêmico normal (Diabética gestacional), 4) mulheres com TTG e Perfil glicêmico alterados (Diabética gestacional ou clínico) respectivamente. Serão incluídas no estudo as gestantes que passarem pelo Serviço de Diabetes e Gravidez da Disciplina de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, no período de um ano.

Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizada uma frequência do polimorfismo Arg972 do gene do IRS-1 no grupo diabético de 20% (Porzio et al., 1999) com um coeficiente de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, tem-se um n= 246 pacientes no total a serem divididos nos 4 grupos de estudo.

A cada indivíduo participante da pesquisa será aplicado um questionário sobre informações pessoais (idade, tabagismo, etilismo, contato com compostos químicos, exposição a radiações), historia medica (doenças intercorrentes, medicamentos de uso habitual), etc. Além disso, todos os participantes serão informados sobre o objetivo da pesquisa e assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A autorização para a coleta de sangue materno, do cordão e da placenta será solicitada durante a internação.

Coleta de material biológico

Serão coletadas amostras de sangue periférico (10mL) e do cordão (5mL) dos diferentes grupos diabéticos, por profissional experiente e utilizando seringa descartável e com anticoagulante. Essas amostras de sangue serão processadas imediatamente ou armazenadas em freezer -70°C para posterior extração de DNA e pesquisas futuras.

Extração do DNA

A extração do DNA de células sangüíneas será feita pelo método de precipitação salina ou *salting-out* descrito por Salazar et al., 1998. O DNA extraído será mantido a -20°C para posterior amplificação dos genes pela técnica de PCR.

Análise do polimorfismo do Gly972Arg do gene IRS-1

Os fragmentos do DNA genômico contendo o polimorfismo Gly972Arg do gene IRS-1 serão amplificados por reação em cadeia pela polimerase (PCR). Para amplificação, serão utilizados primers descrito por Almind *et al.*, 1993 (tabela 1), e para detecção do polimorfismo será utilizada técnica de Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP). Após amplificação, os produtos de PCR gerados serão digeridos com enzima de restrição *BstNI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Os produtos da digestão enzimática do Gly972Arg serão analisados por eletroforese em gel de agarose 4,5% corado com brometo de etídio visualizados sob luz UV com um transiluminador, utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA (Fallucca *et al.*, 2006).

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos de DNA, amplificados pela PCR, com a respectiva enzima de restrição para o polimorfismo Gly972Arg do gene do IRS-1.

Iniciador	Seqüência (5' → 3')	Polimorfismo	Enzima de Restrição	Tamanho do Fragmento (bp)
IRSF	CTTCTGTCAGGTGTCCATCC	Gly972Arg	<i>BstNI</i>	263
IRSR	TGGCGAGGTGTCCACGTAGC			

Análise Estatística

Os resultados serão estatisticamente analisados por comparação entre as médias das variáveis dos grupos e estabelecimento das possíveis correlações. Para todas as comparações estatísticas será considerado limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$).

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos aplicados nesse projeto serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

4. Referências bibliográficas

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342: 828±832.

Almind K, Inoue G, Pedersen O, Kahn CR. A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest* 1996; 97: 2569±2575.

American Diabetes Associations: Diabetes and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2006; 29 (suppl. 1): 43-8.

American Diabetes Associations: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2004; 27 (Suppl 1).

Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell Biochem*. 1998; 182: 31–48.

Backx CJ, Lotgering FK, Cornelis H, Wallenburg S. Oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycaemia during pregnancy. *J Perinat Med*. 1989; 17:253-7.

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.

Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52: 1319–1325.

Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and β -cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 162: 1008–1014.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Med*. 2005; 11: 183–190.

Calderon IMP, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RAA, Brasil MAM, Rudge MVC. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Res.Clin Pract*. 2007; 78: 65-71.

Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165: 1667–1672.

Clausen JO, Hansen T, Bjørbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, et al. Insulin resistance: interaction between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet*. 1995; 346: 397–402.

Damm P, Kuhl C, Bertelsen A, Molsted-Pedersen L. Predictive factors for the development of diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167: 607–16.

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

Fallucca F, Dalfrà MG, Sciullo E, Masin M, Buongiorno AM, Napoli A, et al. Polymorphisms of insulin receptor substrate 1 and beta3-adrenergic receptor genes in gestational diabetes and normal pregnancy. [Metabolism](#). 2006; 55(11): 1451-6.

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1–2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 2004; 166: 213–223.

Hirashima Y, Tsuruzoe K, Kodama S, Igata M, Toyonaga T, Ueki K, et al. Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Endocrinol.* 2003; 179: 253–266.

Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, Lesniak MA, D'Alfonso R, Sesti G, et al. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1655±1658.

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

Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Debb SS. Insulin receptor substrate-variants in non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1141±1146.

Lima CP, Rudge MVC. Influência da classificação diagnóstica de Rudge (1983) sobre a histopatologia das placentas. (Doutorado). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 1998.

Lobner K, Knopff A, Baumgarten A, Mollenhauer U, Marienfeld S, Garrido-Franco M, et al. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 2006; 55: 792-97.

Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, De Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, et al. Summary and Recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2007; 30 (suppl. 2): 251-60.

Miller BS, Shankavaram UT, Horney MJ, Gore AC, Kurtz DT, Rosenzweig SA. Activation of cJun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase by insulin. *Biochemistry*. 1996; 35: 8769–8775.

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): 324-30.

Oh W. Neonatal Outcome and Care. In: Reece EA, Coustan DR, Gabbe SG, editors. *Diabetes in Women*. Philadelphia. 2004; 451-60.

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.

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

Rett, K, et al. Codon 972 polymorphism of the IRS-1 gene is prevalent in offspring of subjects with type 2 diabetes without determining clamp-derived insulin action. *Diabetes*. 1998; 47(Suppl. 1):393a. (Abstr.).

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 Obst.* 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.

Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 42394–42398.

Ryan EA, Imes S, Liu D, McManus R, Finegood DT, Polonsky KS, et al. Defects in insulin secretion and action in women with a history of gestational diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 506–512.

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SS, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem.* 1998; 44: 1748-1750.

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.

Shimokawa K, Kadowaki H, Sakura H, Otabe S, Hagura R, Kosaka K, et al. Molecular scanning of the glycogen synthase and insulin receptor substrate-1 genes in Japanese subjects

with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 463±469.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell.* 2000; 6: 77–86.

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.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2006; 7: 85-96.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990; 61: 203–212.

Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M, Isami S, et al. Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia* 1996; 39: 600±608.

Vohr BR, McGarvey ST, Tucker R. Effects of maternal gestational diabetes on offspring adiposity at 4-7 years of age. *Diabetes Care.* 1999; 22: 1284-91.

Yogev Y, Visser GH. Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009 Apr;14(2):77-84. Epub 2008 Oct 15.

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 Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, et al. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: Separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic-receptor

mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. *Diabetologia*. 1996; 39: 1505–1511.

Zick, Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci. STKE* 2005, PE4 (2005).

Anexos

Botucatu, 20 de janeiro de 2012.

Ao
Comitê de ética em pesquisa,
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prezados Senhores,

Considerando o estabelecido na legislação vigente, dirijo-me respeitosamente a esse Conselho solicitando a alteração do projeto de pesquisa, de meu(inha) orientado(a) Marilza Vieira Cunha Rudge.

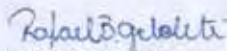
Título do Projeto inicial: Avaliação da genotoxicidade de gestantes com diagnóstico de hiperglicemia leve.

Título do Projeto proposto: Análises moleculares em gestantes com diabetes e hiperglicemia leve e em seus recém-nascidos

Justificativa da alteração: O título é mais adequado frente aos objetivos e aos resultados obtidos após vasta análise do projeto que havia sido desenvolvido com verba FAPESP

Atenciosamente,

Prof(a).Dr(a) 
Assinatura do Orientador(a)


Assinatura do Aluno(a) -

Obs :
Anexar cópia do projeto inicial e cópia do projeto proposto.

14145 20/01/2012 00:00:00 UNM E DE FIM DE ASSINATURA - FAPESP

DIABETES CARE INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

MANUSCRIPT CATEGORIES

See Section 6, [Manuscript Format and Style](#), for detailed instructions on formatting documents.)

5.1. **Original Articles.** Original Articles should be arranged in the following order: title page, structured abstract, introduction (no heading), “Research Design and Methods,” “Results,” “Conclusions,” “Acknowledgments,” “References,” tables, and figure legends.

A **structured abstract** is required for all Original Articles and Brief Reports.

An abstract for an Original Article should not exceed 250 words. (This is not to be confused with abstracts submitted to the Annual Scientific Meeting, for which the word limit is higher.) The abstract must be self-contained and clear without reference to the text and should be written for a general journal readership. The abstract format should include four sections: “Objective” (the purpose or hypothesis of study), “Research Design and Methods” (the basic design, setting, number of participants and selection criteria, treatment or intervention, and methods of assessment), “Results” (significant data found), and “Conclusions” (the validity, limitations, and clinical applicability of the study and its results).

As of July 1, 2011 the journal will follow new formatting guidelines for new submissions: The **word count limit** for Original Articles is a maximum of 4,000 words. In addition, an original article is limited to a total combination of 4 tables and figures. Do not count words in tables, table legends, figure legends, title page, acknowledgments or references. **References** are limited to 40 citations. Exception to the word/table/figure/reference limit is rare.

A conflict-of-interest statement for all authors must be included in the main document, following the text, in the Acknowledgments section. If authors have no relevant conflict of interest to disclose, it should be indicated in the Acknowledgments section.

In the case of **multicenter studies**, authors should provide a list of participating investigators as an appendix to the paper. Papers will not be reviewed if this information is not included.

Where appropriate, **clinical and epidemiological studies** should be analyzed to see if there is an effect of sex or ethnicity. If there is no effect, it should be stated as such in the “Results” section.

Randomized Clinical Trial reporting: Authors of reports on randomized controlled trials are required to use the instructions and checklist in the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\) Statement](#). The instructions and checklist are designed to ensure that information pertinent to the trial is included in the study report. CONSORT information may be included in a supplemental online-only file so that it does not affect word count limitations.

All **clinical trials** submitted to *Diabetes Care* for consideration of publication must be registered with a clinical trial registry approved by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Please see Section 2.5 for more information.

6. MANUSCRIPT FORMAT AND STYLE: Articles must be in clear and understandable English. Non-native English authors are encouraged to seek the assistance of an English-proficient colleague, or a communications agency such as [“American Journal Experts”](#), to help improve the clarity and readability of a paper before it is submitted to the journal.

6.1. **The Main Document** includes the title page, abstract, main text, acknowledgements, disclosure, figure legends, references, and tables. Please do not use headers, footers, or endnotes in your paper.

6.1.1 **Text Composition.** Articles should be written in clear, concise English following the recommendations for scientific writing found in *Scientific Style and Format*, the Council of Science Editors (CSE) style manual (7th ed., 2006, Reston, VA, Council of Science Editors). All accepted manuscripts will be edited according to the CSE style manual and *The Chicago Manual of Style* (15th ed., 2003, Chicago, IL, The University of Chicago Press) by ADA professional publications staff. The authors are responsible for all statements made in their articles or editorials, including any editing changes made by staff. Proof pages should be read carefully.

The designations *type 1 diabetes* and *type 2 diabetes* should be used when referring to the two major forms of diabetes. Abbreviations for diabetes, such as T2D for *type 2 diabetes*, should not be used. The term *diabetic* should not be used as a noun.

All manuscripts should be double-spaced, in Arial or Times New Roman 12-point font, and saved as a .doc, .txt, or .rtf file. In addition, please do not "lock" or "page protect" your document, and avoid using footnote and endnote functions.

6.1.2. **Abbreviations and Units.** Abbreviations should be used only when necessary, e.g., for long chemical names (HEPES), procedures (ELISA), or terms used throughout the article. See the [list of abbreviations](#) that need not be defined; all others must be defined at first use. Abbreviate units of measure only when used with numbers. Abbreviations may be used in tables and figures. The CSE style manual contains lists of standard scientific abbreviations.

Clinical laboratory values and units should be in [Système International \(SI\)](#) form. Kilocalories should be used rather than kilojoules. Glycated hemoglobin should be expressed as percentage of total and as standard deviation from mean control levels.

6.1.3. **Materials.** Authors should provide the name and location (city and state/country) of the source for specified chemicals and other materials only if alternate sources are considered unsatisfactory.

6.1.4. **Title Page.** Every manuscript, including Letters and Brief Reports, must have an accompanying title page. The title page should include the title; a short running title (less than 47 characters and spaces combined); the first name, middle initial, last name, and highest academic degree of each author; affiliation (in English) of each author during the study being reported; name, current address, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author; and the word count and number of tables and figures.

The Main Document should be in Word document format (not as a PDF). This will allow our Editorial Office to verify the word count and our production staff to turn your paper (if accepted) into an article.

6.1.5. **Font.** Text, including title and author names, should be in 12-point Arial or Times New Roman. Please avoid using boldface font. Text in tables should be no smaller than 10-point font.

6.1.6. **Margins.** Margins should be 1" at the top and bottom and 1" on the left and right sides.

6.1.7. **Section Headers.** Except for the Abstract, new sections should not begin on new pages. Each new section should immediately follow the end of the previous section. See [Manuscript Categories](#) for the proper headings.

6.1.8. **Abstract.** Please see Section 5.1.1 of [Manuscript Categories](#).

6.1.9. **Word Count Limit.** Please see instructions for the individual type of article being submitted under section 5.1.2 of [Manuscript Categories](#).

6.1.10. **Acknowledgments.** The acknowledgments are located after the main text and before the reference list. Acknowledgments should contain the author contributions paragraph, brief statements of assistance, the guarantor's name (person(s) taking responsibility for the contents of the article), funding/financial support, and reference to prior publication of the study in abstract form, where applicable.

6.1.11. **References.** The reference list should go at the end of the document, after the main text and acknowledgments (if applicable) and before the tables. Original Articles are limited to 40 references. Brief Reports are allowed 15 references. Letters are allowed 5 references. Review Articles are allowed 40-60 references and a Meta-analysis should have no more than 40 references.

Reference numbers in the text should appear in chronological order in normal type and in parentheses [e.g., "In the study by Norton et al. (23)..."]. Please do not use the footnote or endnote function to cite studies or create a reference list. A reference manager must have the ability to customize the display of references. For example, the reference application should have the option to list the references at the end of the paper, as opposed to listing the references as endnotes or footnotes at the bottom of each page, and should not embed the list in the text as a series of endnotes/footnotes. When using a reference manager (e.g., Thomson's EndNote Reference Program), don't forget to generate the list as a bibliography in a style suitable to *Diabetes Care*, and then save and submit as the final step to creating the references. Otherwise, references should be manually inserted.

All authors must be listed by first initials and last name in each reference, and please provide inclusive page numbers. Journal titles should be abbreviated according to the National Library of Medicine's [List of Journals Indexed for Medline](#); for unlisted journals, please provide complete journal titles. Material in press may be cited, but copies of such material may be requested. Authors are responsible for the accuracy of the references. Click [here](#) for examples of how references should be formatted.

6.1.12. Supplemental Data.(Original Articles only) Original Articles may contain online supplemental files if necessary. All supplementary data to appear online-only file should be combined in one document file (whenever possible) and uploaded separately during the submission process. It must be clearly labeled as “**Online-Only Supplemental Material.**”

All online-only files are subject to review. Content of files submitted for online use only will *not* be copyedited. As such, please review the information carefully before submitting. In addition, supplemental Online-only material *must* be referenced in the text at least once (e.g., “Supplemental Table S1”)

Lists that include names of **principal investigators or writing groups** may be included in print as an Acknowledgement if no more than 150 words and should not be counted in the word count.

Note: Please include a comment to the editor justifying the necessity of online supplemental materials for your Original Article. Allowance of online supplemental materials is at the discretion of the Editorial Committee.

Do not put online supplemental material in the main document. Instead, it should be uploaded as a separate document.

6.2. Tables. Each table should be inserted on a separate page at the end of the document with the table number, title, and legend indicated. Table legends should be inserted below the table and not be included inside the table. Tables should be created using Word and the "Insert Table" command. Please use Arial or Times New Roman font, no smaller than 10-point. Tables with internal divisions are not allowed (Tables 1A and B) and should be submitted as individual tables (Tables 1 and 2).

6.3. Figures. *Diabetes Care* uses digital publishing methods throughout the journal production process. If your article is accepted, it will be published both in the printed journal and online. The following sections provide information on how to format your figures to ensure the best possible reproduction of your images.

Size. Figures should be produced at the size they are to appear in the printed journal. Please make sure your figures will fit in one, two, or three columns in width. Multi-paneled figures should be assembled in a layout that leaves the least amount of blank space.

1 column = 13 picas wide, 2.2 in, 5.6 cm
2 columns = 28 picas wide, 4.6 in, 11.7 cm
3 columns = 41 picas, 6.8 in, 17.3 cm

Font. At 100% size, fonts should be 8-10 points and used consistently throughout all figures.

Text. Information on the axes should be succinct, using abbreviations where possible, and the label on the y-axis should read vertically, not horizontally. Key information should be placed in any available white space **within** the figure; if space is not available, the information should be placed in the legend. In general, figures with multiple parts should be marked A, B, C, etc., with a description of each panel included in the legend rather than on the figure.

Line and bar graphs. Lines in graphs should be bold enough to be easily read after reduction, as should all symbols used in the figure. Data points are best marked with the following symbols, again assuring that they will be readily distinguishable after reduction: ○ ● □ ■ △ ▲. In the figure legend, please use words rather than the symbols; e.g., "black circles = group 1; white squares = group 2; black bars = blood glucose; white bars = C-peptide." Bars should be black or white only, unless more than two datasets are being presented; additional bars should be drawn with clear bold hatch marks or stripes, **not** shades of gray.

Line or bar graphs or flow charts with text should be created in black and white, **not** shades of gray, which are difficult to reproduce in even tones.

Formatting digital figures files for print and online reproduction. To meet ADA's quality standards for publication, it is important to submit digital art that conforms to the appropriate resolution, size, color mode, and file format. Doing so will help to avoid delays in publication and maximize the quality of images, both online and in print. Please refer to [ADA's Digital Art Guidelines](#) when preparing your files. If you are unable to provide files that meet the specifications outlined in the Guidelines, you may submit your original source files (files from the program in which they were originally created).

Reproductions. If materials (e.g., figures and/or tables) are taken from other sources, the author must provide written permission for reproduction from the original publisher and author at the time of submission. In addition, the source should be cited at the end of the figure legend.

Digital image manipulation. The American Diabetes Association has adopted the statement developed by the [Journal of Cell Biology](#) as its policy on the manipulation of digital images:

"No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (i.e., using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original, including backgrounds. Without any background information, it is not possible to see exactly how much of the original gel is actually shown. Non-linear adjustments (e.g., changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend."

All digital images in manuscripts accepted for publication will be scanned using image forensics software for any indication of improper manipulation. Cases of questionable or inappropriate image alterations will be referred to the Association's Subcommittee on Ethical Scientific Publications (ESP). The ESP may request the original data from the authors for comparison to the prepared figures. If the authors fail to provide the original data, the acceptance of the manuscript will be revoked. Cases of deliberate misrepresentation of data will result in revocation of acceptance, and will be reported to the corresponding author's home institution and/or funding agency as appropriate.

For examples of what constitutes improper digital manipulation (as well as other forms of scientific misconduct), ADA encourages authors to refer to the 2006 editorial by the *Journal of Clinical Investigation* titled [“Stop Misbehaving!”](#) In addition, authors are encouraged to refer to [Adobe’s white paper](#) on using Photoshop CS3 Extended in biomedical imaging. The paper provides useful information on maintaining image integrity, editing nondestructively, and the medical and scientific image workflow.