

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ADRIANA TELEGINSKI

VARIABILIDADE DOS GENES SLC30A8 E LEP ASSOCIADA AO DIABETES
***MELLITUS* GESTACIONAL**

CURITIBA

2017

ADRIANA TELEGINSKI

**VARIABILIDADE DOS GENES SLC30A8 E LEP ASSOCIADA AO DIABETES
MELLITUS GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. Geraldo Picheth

Coorientadoras:
Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Profa. Dra Dayane Alberton

CURITIBA

2017

Teleginski, Adriana

Variabilidade dos genes SLC30A8 e LEP associada ao Diabetes *Mellitus* gestacional / Adriana Teleginski - Curitiba, 2017.

106 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Coorientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

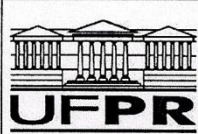
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. Zinco. 3. Leptina. I. Picheth, Geraldo. II. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. III. Alberton, Dayane. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.462



TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIANA TELEGINSKI

Título: "VARIABILIDADE DOS GENES SLC30A8 E LEP ASSOCIADAS AO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Prof. Dr. Geraldo Picheth
Orientador

Prof. Dr. Glaucio Valdameri
Universidade Federal do Paraná

Profª. Dra. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 23 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu força e coragem para chegar até aqui. Agradeço por cada dia, tenha sido ele bom ou ruim, pois tudo fez parte do aprendizado e da experiência nesta vida.

Ao meu orientador, prof Dr Geraldo Picheth. Obrigada por ter me aceitado sob sua tutela, por sua paciência e por compartilhar suas experiências, elas tornaram este trabalho melhor.

Bem como agradeço as minhas coorientadoras, prof^a Dr^a Fabiane Gomes de Moraes Rego e prof^a Dr^a Dayane Alberton, pela atenção, paciência e ensinamentos.

Agradeço também aos meus colegas de mestrado, que fazem parte desta equipe maravilhosa, a todos os meus amigos de longa data e a todos os meus familiares, que me suportaram nesse período, ou que aceitaram minha ausência, sempre justificada pela falta de tempo, ou pela necessidade de dedicação ao estudo.

Agradecimentos especiais aos meus pais, Antonio Teleginski e Cecília Teleginski, pois talvez não saibam, mas são o maior exemplo de sucesso que tenho e além de tudo, me trouxeram até aqui e me guiaram do início ao fim.

E claro, não poderia esquecer-me da minha grande incentivadora, aquela que segurou minha mão em todos os momentos, aconselhou-me e dividiu comigo os momentos bons e ruins, minha amada irmã Cristiane Teleginski Machado.

“As pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo.”

Epicuro

RESUMO

A leptina, codificada pelo gene LEP, tem papel fundamental no metabolismo das reservas de energia e consistentemente tem sido associada com o risco de diabetes. O gene SLC30A8, que está relacionado com a secreção de insulina humana, codifica um transportador de zinco específico (ZnT8) para as células β do pâncreas que torna a insulina menos susceptível à degradação. Mulheres com diabetes gestacional têm um risco moderado de desenvolver diabetes tipo 1 ou 2 após a gravidez, além de complicações para o feto. Foi investigada a associação dos polimorfismos *rs7799039* (LEP) e *rs13266634* (SLC30A8) em estudo do tipo caso-controle em gestantes brasileiras com diabetes gestacional (DMG, n = 134) e saudáveis (controle, n = 180). Sondas fluorescentes com PCR em tempo real (sistema TaqMan) foram empregadas na genotipagem. Os polimorfismos estavam no equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências dos alelos menores (raros), para o grupo controle e grupo DMG, foram respectivamente, para o gene LEP *rs7799039* (alelo A) 40,3% [95%IC, 35-45] vs. 36,6% [95% IC, 31-42], P = 0,345; e para o gene SLC30A8 *rs13266634* (alelo T) 27,8% [95%IC, 23-32] vs. 23,5% [18-29%], P = 0,227. As comparações das frequências genotípicas para ambos os polimorfismos não mostraram diferença significativa (P > 0,05). Os polimorfismos *rs7799039* e *rs13266634* não foram associados com DMG na população estudada (P > 0,05). As frequências de alelos menos comuns para ambos os polimorfismos foram semelhantes às de outras populações caucasianas. Gestantes saudáveis, portadoras do alelo T em homozigose (TT) do polimorfismo *rs13266634* do gene SLC30A8 apresentaram menor concentração de creatinina e ureia, em gestantes com DMG este efeito não foi observado.

Palavras-chave: Diabetes gestacional; *Solute carrier family 30* (transportador de zinco), membro 8; Leptina; Suscetibilidade genética; SNPs; Mutações

ABSTRACT

Leptin, (LEP), plays a fundamental role in the metabolism of energy reserves and the solute carrier family 30 A8 - zinc transporter (SLC30A8) had been consistently associated with diabetes. Women with gestational diabetes have a moderate risk for developing diabetes type 1 or 2 after pregnancy, in addition to complications to the fetus. We investigated the association of the polymorphisms *rs7799039* (LEP) and *rs13266634* (SLC30A8) in a case-control study in Euro-Brazilians pregnant women with gestational diabetes (GDM, n = 134) and healthy (control, n = 180). Fluorescent probes and real time PCR (TaqMan system) were applied to genotyping. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The minor allele frequencies, for healthy and GDM respectively, for A-allele; LEP gene *rs7799039* were 40.3% [95%CI, 35-45] vs. 36.6% [95%CI, 31-42], P=0.345; and for T-allele; SLC30A8 gene *rs13266634* were 27.8% [95%CI, 23-32] vs. 23.5% [18-29%], P=0.227. Genotypes comparison for both polymorphisms showed no significant difference (P>0.05). The polymorphisms *rs7799039* and *rs13266634* were not associated with GDM in the studied population (P>0.05). The minor allele frequencies for both polymorphisms were similar to other Caucasians populations. Healthy pregnant women that carriers of the T allele homozygous (TT) of the polymorphism *rs13266634* of the SLC30A8 gene presented lower concentration of creatinine and urea. The GDM group did not shown this effect.

Key words: Gestational diabetes; Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8; Leptin; Genetic susceptibility; SNPs; Mutations

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AÇÃO DO HORMÔNIO INSULINA.....	21
FIGURA 2 - TIPOS DE DIABETES <i>MELLITUS</i>	24
FIGURA 3 - COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELO DMG.....	31
FIGURA 4 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DMG.....	35
FIGURA 5 - AÇÃO DO HORMÔNIO LEPTINA.....	40
FIGURA 6 - EFEITOS DA LEPTINA SOBRE A CÉLULA β -PANCREÁTICA PARA A SECREÇÃO DE INSULINA.....	42
FIGURA 7 - POLIMORFISMO <i>rs7799039</i> NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE LEP.....	44
FIGURA 8 - POLIMORFISMO <i>rs13266634</i> NO ÉXON 9 DO GENE SLC30A8.....	47
FIGURA 9 - CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CTRL E DMG.....	49
FIGURA 10 - ANELAMENTO ESPECÍFICO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE SONDAS MARCADAS COM FLUORÓFOROS VIC [®] E FAM [®] EM UM ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.....	51
FIGURA 11 - PCR EM TEMPO REAL COM SONDA TAQMAN [®]	53
FIGURA 12 - MOLÉCULA DE MGB.....	54
FIGURA 13 - ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>rs13266634</i> DO GENE SLC30A8 COM AS CONCENTRAÇÕES DE CREATININA E UREIA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	67
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DA PROTEÍNA ZNT8 E SÍTIO DO POLIMORFISMO <i>rs13266634</i> NA ESTOCAGEM DOS GRÂNULOS DE INSULINA NA CÉLULA β -PANCREÁTICA.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	RESUMO DOS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DIABETES	26
TABELA 2-	VALORES DE GLICOSE PLASMÁTICA NORMAL E TOLERÂNCIA A GLICOSE DIMINUÍDA	26
TABELA 3-	FREQUÊNCIA DE GESTANTES COM DMG CONFORME ETNIA	28
TABELA 4-	DIAGNÓSTICO DE DMG COM TOTG – INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE	34
TABELA 5-	POLIMORFISMOS GENOTIPADOS PELO MÉTODO <i>TAQMAN</i> [®]	54
TABELA 6-	PROTOCOLO DEFINIDO PARA A TÉCNICA DE <i>TAQMAN</i> [®] PARA PCR EM TEMPO REAL	56
TABELA 7-	DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO	58
TABELA 8-	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE LEP NAS AMOSTRAS EM ESTUDO	62
TABELA 9-	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE SLC30A8 NAS AMOSTRAS EM ESTUDO	63
TABELA 10-	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS <i>rs7799039</i> E <i>rs13266634</i> DOS GENES LEP E SLC30A8, RESPECTIVAMENTE, COM DADOS DA LITERATURA	65

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO - MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE LAHIRI E NURBERGER, 1991	87
ANEXO 2 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO <i>rs7799039</i> DO GENE LEP EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA ...	88
ANEXO 3 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO <i>rs13266634</i> DO GENE SLC30A8 EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA	89
ANEXO 4 - GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO - DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (<i>rs7799039</i> DO GENE LEP).....	90
ANEXO 5 - GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO - DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (<i>rs13266634</i> DO GENE SLC30A8)	91
ANEXO 6 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR.....	92
ANEXO 7 - CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO GMR9515.....	93

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A

ARTIGO GMR9515 - "LEPTIN (<i>rs7799039</i>) AND SOLUTE CARRIER FAMILY 30 ZINC TRANSPORTER (<i>rs13266634</i>) POLYMORPHISMS IN EURO-BRAZILIAN PREGNANT WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES"	95
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> – Associação Americana de Diabetes.
Arg	Arginina.
Ca	Cálcio.
DM	Diabetes <i>mellitus</i> , Diabetes melito.
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional.
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico.
FAM	Frequencia do alelo menor ou raro; <i>minor allele frequency</i> (MAF)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administração de comida e medicamento.
HbA1c	Hemoglobina Glicada fração A1c.
HDL	HDL – <i>High Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade.
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> - Federação Internacional de Diabetes.
IADPSG	<i>International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups</i> .
IMC	Índice de Massa Corporal.
K	Potássio.
LDL	LDL – <i>Low Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade.
LEP	Gene Leptina.
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the Young</i> – Diabetes da maturidade de início precoce.
OMIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> – Herança Mendeliana no Homem Online.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase.
rs	<i>Reference Sequence</i> – Identificação dos Polimorfismos de único nucleotídeo.
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico.
RNA_m	RNA mensageiro.
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes.
SLC30A8	<i>Solute Carrier Family 30 (zinc transporter)</i> – Carreador de zinco, família 30 (transportador de zinco).
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Único

	Nucleotídeo.
SOD	Superóxido Dismutase.
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose.
Trp	Triptofano.
Zn²⁺	Zinco.
ZnT8	Transportador de zinco 8.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA	17
2.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	20
4.1.1 Sintomas.....	21
4.1.2 Classificação.....	22
4.1.3 Diagnóstico	25
4.2 DIABETES <i>MELLITUS</i> GESTACIONAL	26
4.2.1 Fisiopatologia do Diabetes <i>mellitus</i> gestacional	29
4.2.2 Complicações materno-fetais	30
4.2.3 Fatores de risco para o Diabetes <i>mellitus</i> gestacional	32
4.2.4 Diagnóstico do Diabetes <i>mellitus</i> gestacional.....	33
4.2.5 Tratamento	36
4.3 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES	37
4.3.1 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	38
4.4 GENE LEP	39
4.4.1 Polimorfismo <i>rs7799039</i> (-2548G/A).....	43
4.5 GENE SLC30A8	44
4.5.1 Polimorfismo <i>rs13266634</i> (R325W).....	45
5 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1 COMITÊ DE ÉTICA	48
5.2 AMOSTRAS.....	48
5.2.1 Caracterização das amostras	48
5.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	50
5.3 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS <i>TAQMAN</i> [®]	50
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O número de adultos com Diabetes *mellitus* (DM) em todo o mundo aumentou de 108 milhões em 1980 para cerca de 422 milhões até o ano de 2014 (ZHOU *et al.*, 2016) e a estimativa é que este número aumente para 592 milhões em 2035 (IDF, 2014), sendo o DM considerado a pandemia do século XXI (IMS, 2014). Mais de 70% dos portadores de diabetes vivem em países de baixa e média renda e a maior parte têm entre 40 e 59 anos de idade (SBD, 2015).

O diabetes foi a sétima principal causa de morte nos Estados Unidos em 2010 (ADA, 2015). Devido às alterações vasculares, o diabetes acelera a aterogênese, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), bem como complicações microvasculares, citando-se principalmente a retinopatia, nefropatia e neuropatia. Os mecanismos prováveis para suas manifestações aceleradas são os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre o epitélio vascular, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco, como a obesidade e dislipidemias (TOUSOULIS; KAMPOLI; STEFANADIS, 2012). A condição diabética torna altos os índices de morbidade e mortalidade (NAKA *et al.*, 2004; WAUTIER; SCHMIDT, 2004).

Muitos indivíduos com diabetes são incapazes de continuar a trabalhar em decorrência de complicações crônicas ou ainda podem permanecer com alguma limitação no seu desempenho profissional. A frequência do DM está assumindo proporções epidêmicas na maioria dos países, sendo as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares as principais causas de óbito de portadores de diabetes (SBD, 2015).

Mulheres com histórico de DM durante a gestação apresentam maior risco de desenvolver Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) em comparação àquelas cuja gravidez tenha sido normoglicêmica. Também dentre os fatores que aumentam o risco de DM2 após a gestação estão a idade e a obesidade (KWAK *et al.*, 2013).

Atualmente, 1-14% de todas as gestações são complicadas pelo Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e a cada ano, a incidência dos casos vem aumentando (SINGH; SINGH, 2015). Já no Brasil, o número de casos de DMG chega a 7%, semelhante aos EUA (SCHMIDT, 2000; SBD, 2016). A prevalência varia em diferentes populações ou grupos étnicos (ZHANG, C. *et al.*, 2013).

Com base em estudo realizado por Kwak e colaboradores (2012), pode-se supor que o DMG e o DM2 possuem variações genéticas em comum, estando fortemente associados.

Estudos epidemiológicos confirmaram que a prevalência de DMG é proporcional à prevalência de DM2, pois compartilham uma base genética comum, bem como a intolerância à glicose, resistência à insulina, e secreção de insulina prejudicada (ALHARBI *et al.*, 2014). Polimorfismos associados ao risco para desenvolver DM2 têm sido associados à susceptibilidade para DMG (ROBITAILLE; GRANT, 2008; PAPPA *et al.*, 2011).

O diabetes gestacional é um dos problemas de saúde mais comuns que acometem as gestantes. A patologia apresenta importantes associações com componentes genéticos e isto demonstra a relevância da realização de estudos para ampliar o conhecimento científico sobre o diabetes (SINGH; SINGH, 2015).

Um dos tipos mais frequentes de variação genética no genoma humano é representado pelo Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism – SNP*), o qual pode contribuir para as diferenças interindividuais. O mecanismo molecular da origem ou da suscetibilidade de doenças hereditárias pode ser identificado através dos estudos dos polimorfismos (STRACHAN; READ, 2013). A análise de *SNPs* tem sido amplamente utilizada em pesquisas de síndromes humanas de caráter genético com base na variação das sequências genéticas, na tentativa de prevenir as doenças. Além disso, a compreensão dos efeitos da variação genética é extremamente importante e pode fornecer metas para estudos (LIAO; LEE, 2010). Alguns polimorfismos em determinados genes tem sido associados ao DMG. Em estudo prévio, oito polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) foram significativamente associados com DMG em seus respectivos genes: (*rs7903146*) TCF7L2, (*rs10830963*) MTNR1B, (*rs4402960*) IGF2BP2, (*rs5219*) KCNJ11, (*rs7754840*) CDKAL1, (*rs2237892*) e (*rs2237895*) KCNQ1 e (*rs4607517*) GCK (HUOPIO *et al.*, 2013).

A associação de polimorfismos no gene da leptina com DMG é controversa. VASKU *et al.* (2006) mostraram uma associação de polimorfismo de leptina -2548G> A com pré-eclâmpsia em DMG, mas YANG *et al.* (2016) não associou este polimorfismo ao DMG em uma população chinesa.

2 JUSTIFICATIVA

2.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O Diabetes *mellitus* é uma síndrome que apresenta diferentes fenótipos. A pesquisa de biomarcadores associados ao risco/proteção para o diabetes e suas complicações pode oferecer aos afetados um diagnóstico precoce, melhor identificação do prognóstico e resposta terapêutica eficaz. Neste contexto, a proposta de estudar os Polimorfismos de Único Nucleotídeo (*SNPs*) e suas relações com o diabetes e outros marcadores já estabelecidos, objetiva ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos associados ao DMG.

O conhecimento das variações genéticas associadas ao diabetes gestacional pode permitir a identificação precoce de mulheres em risco e elucidar novos alvos de tratamento, permitindo a seleção de terapia sob medida para as vulnerabilidades individuais das pacientes (STUEBE *et al.*, 2014). O estudo de polimorfismos que contribuem para o desenvolvimento de uma doença pode oferecer o diagnóstico precoce e até mesmo a prevenção e tratamento da mesma (SUH; VIJG, 2005; ANDERSON *et al.*, 2007; WANG, L.; LUHM; LEI, 2007).

A leptina promove uma redução na captação de combustível e um aumento no gasto de energia quando as reservas de gorduras são suficientes e promove um equilíbrio na quantidade de alimento que é consumido e a energia que é gasta. Além de regular o apetite e o metabolismo, essa adipocina também desempenha importante função na secreção de insulina (OSWAL; YEO, 2010; ROMANOWSKI *et al.*, 2015). Assim sendo, um polimorfismo no gene da Leptina (*LEP*) poderia afetar a sua expressão, interferindo na secreção normal de insulina. Da mesma forma um polimorfismo no gene *SLC30A8*, pois este codifica um transportador de zinco que é necessário para o armazenamento e a maturação de insulina em grânulos da célula β (FLANNICK *et al.*, 2014). Neste contexto, resolvemos estudar os genes *LEP* e *SLC30A8* e seus respectivos polimorfismos: *rs7799039* e *rs13266634*, utilizando a plataforma *TaqMan*[®] para a genotipagem.

A plataforma *TaqMan*[®] (Applied Biosystems; Foster City, CA) é uma técnica conveniente para genotipagem, utilizando reação de amplificação em cadeia da

polimerase e discriminação alélica de forma fácil e eficiente, gerando dados de genótipo de uma maneira custo-efetiva (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

No Brasil tem sido descrita uma elevada prevalência de diabetes entre as mulheres, o que evidencia que este é um grupo particularmente vulnerável necessitando atenção especial, e também há crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens. Dados brasileiros de 2011 mostram que as taxas de mortalidade por DM são de 0,033% em mulheres e 0,027% em homens, com acentuado aumento com o progredir da idade (SBD, 2015).

Aproximadamente 80% dos indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, além da provável suscetibilidade genética (SBD, 2015). O Diabetes *mellitus* está entre as 10 principais causas de mortalidade no Brasil, cerca de 50% da população não sabe que é portadora. Muitas vezes estes pacientes só são diagnosticados quando afetados por alguma complicação (MALERBI *et al.*, 1992).

Poucos estudos populacionais associados ao diabetes gestacional envolvendo variações genéticas foram conduzidos na população brasileira, isto demonstra a relevância deste estudo, já que possibilita um desenvolvimento futuro de políticas públicas relacionadas a esta doença metabólica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar as variações de DNA que contribuem de forma significativa para o DMG a fim de investigar associações da ocorrência da doença com fatores genéticos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar as frequências genóticas e alélicas das variantes *rs7799039* do gene *LEP* e *rs13266634* do gene *SLC30A8*, através de PCR em tempo real (RT - qPCR) em amostras de gestantes saudáveis (grupo controle) e em gestantes portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional;
- Buscar associação dos polimorfismos *rs7799039* (*LEP*) e *rs13266634* (*SLC30A8*) com DMG;
- Associar os polimorfismos de estudo com biomarcadores de função glicêmica, com história familiar de diabetes, idade, altura, índice de massa corporal, idade gestacional, além de marcadores de função renal como albumina e creatinina.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes *mellitus* (DM), como o distúrbio metabólico mais prevalente, é caracterizado por hiperglicemia crônica devido ao defeito na secreção de insulina das células β de ilhotas de Langerhans ou resistência à ação da insulina (KHODAEIAN *et al.*, 2015). Nas gestantes, DMG pode causar aumento da pré-eclâmpsia, maior taxa de cesárea e desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) após a gravidez. Diversos processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes, que incluem desde a destruição autoimune das células β do pâncreas com consequente deficiência de insulina até anormalidades que resultam da resistência à ação da insulina (ADA, 2014).

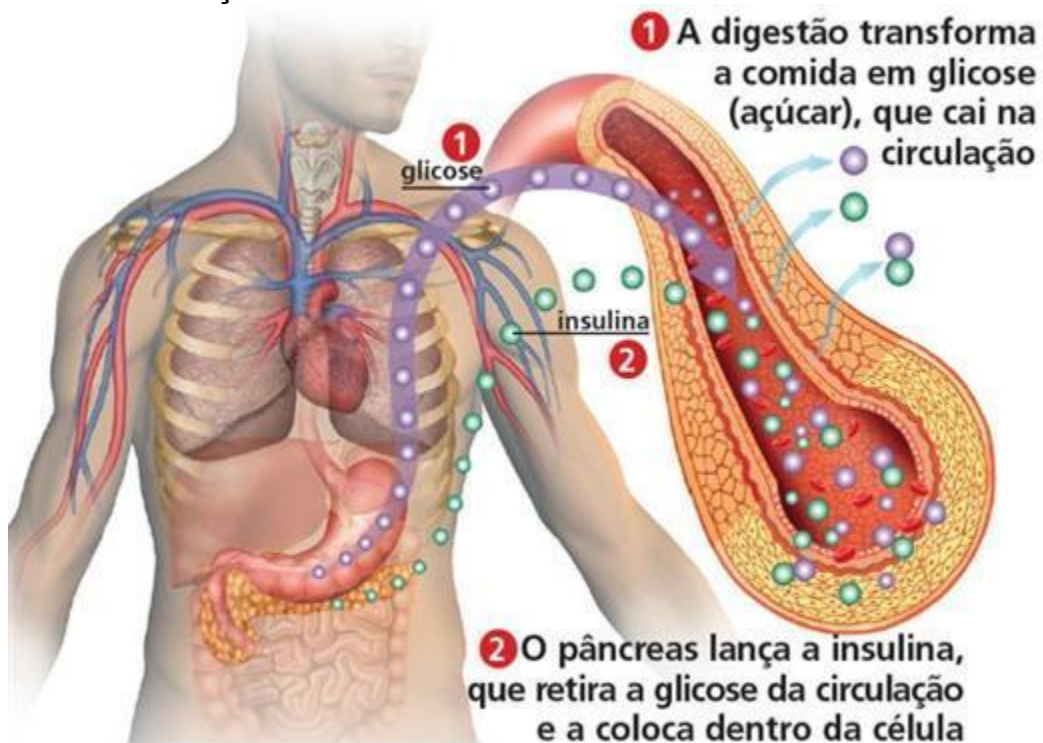
Os portadores de DM comumente apresentam uma maior incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovascular, além da maior frequência de hipertensão e anormalidades no metabolismo lipídico. Esta síndrome também pode causar complicações em órgãos como olhos e rins (KHODAEIAN *et al.*, 2015; SBD, 2015).

A causa das anormalidades no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas nos diabéticos é a ação deficiente da insulina nos tecidos alvos, resultando na secreção inadequada da mesma (WILD *et al.*, 2004). Segundo Raw (2006), a glicose sanguínea é retirada pelos tecidos, depositando-se nos mesmos sob a forma de glicogênio. A ação da insulina, entretanto, determina uma diminuição da glicose no sangue e um aumento de glicogênio nos tecidos (figura 1), função esta que pode estar diminuída ou ausente nos pacientes diabéticos.

O diabetes é uma das doenças não transmissíveis mais comuns no mundo. Na América Central e do Sul é responsável por 12,3% das causas de morte. Estima-se que em 2030 haverá cerca de 10 milhões de novos casos por ano (IDF, 2013).

As complicações decorrentes do diabetes são a maior causa da redução na qualidade de vida, morbidade e mortalidade. Cerca de 50% dos diabéticos morrem de doença cardiovascular, 10-20% por insuficiência renal e 10% desenvolvem deficiência visual severa (WHO, 2009).

FIGURA 1 – AÇÃO DO HORMÔNIO INSULINA



A insulina é secretada pelo pâncreas e é responsável pela captação da glicose sanguínea, função esta que fica prejudicada ou ausente nos pacientes diabéticos.

Fonte: (<http://alimentosnaturais.blog.br/2015/06/diabete-aprenda-controlar-la/>).

4.1.1 Sintomas

Muitas vezes os pacientes podem não apresentar nenhum tipo dos sintomas, mas quando presentes são comuns os listados a seguir (IDF, 2015):

- Micção frequente;
- Sede excessiva;
- Aumento do apetite;
- Perda de peso;
- Cansaço;
- Falta de interesse e de concentração;
- Sensação de formigamento ou dormência nas mãos ou pés;
- Visão embaçada;
- Infecções frequentes;
- Feridas que não cicatrizam.

O diabetes do tipo 1 (DM1) normalmente se desenvolve súbita e dramaticamente, enquanto que no DM2 os sintomas muitas vezes são leves ou ausentes, o que dificulta sua detecção (IDF, 2015).

4.1.2 Classificação

A Associação Americana de Diabetes (ADA, 2016) propõe uma classificação da patologia em quatro categorias, baseada nas várias formas da etiologia do diabetes (figura 2):

- I. *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1);
- II. *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2);
- III. Outras formas específicas de diabetes e
- IV. *Diabetes mellitus* gestacional (DMG).

O diabetes tipo 1 (DM1) é consequência de uma destruição autoimune das células- β do pâncreas, resultando numa deficiência absoluta de insulina, sendo necessária administração exógena deste hormônio. Nesta forma de diabetes, a taxa de destruição das células β é bastante variável, sendo rápida em alguns indivíduos (principalmente bebês e crianças) e lenta normalmente em adultos. Esta condição é comumente designada como “diabetes juvenil” e pode ser do tipo imuno mediado onde há presença de marcadores da destruição imune das células β (5-10% dos casos de diabetes são deste tipo) e do tipo idiopático, cuja etiologia não é conhecida.

O diabetes tipo 2 (DM2) acomete cerca de 90-95% das pessoas. Anteriormente referido como “diabetes do adulto não-insulino-dependente”, englobando os indivíduos que têm resistência à insulina e/ou relativa deficiência de sua secreção ou ação. Embora as etiologias específicas não sejam totalmente conhecidas, a destruição autoimune das células β não ocorre.

O DM2 resulta da interação entre uma predisposição genética e fatores comportamentais e/ou ambientais. Há fortes evidências de que entre os fatores de risco estão a obesidade e o sedentarismo, sendo estes os principais determinantes não genéticos da doença (NEEL, 1999). A secreção de insulina declina nestes

pacientes e é insuficiente para compensar a progressiva resistência à insulina. Faz-se necessário então o uso de antidiabéticos orais para o controle glicêmico, mas após longos períodos instalada a patologia, é necessário o uso de insulina exógena (STRASSER; PESTA, 2013).

Na categoria “outras formas específicas de diabetes”, como principais subgrupos, destacam-se:

Defeitos genéticos da célula β : Várias formas de diabetes estão associadas a defeitos monogenéticos em função das células β . Estas formas de diabetes são frequentemente caracterizadas pelo aparecimento de hiperglicemia em uma idade precoce. Eles são referidos como diabetes da maturidade de início precoce do jovem (MODY- *Maturity-Onset Diabetes of the Young*) e são caracterizados por secreção de insulina diminuída ou defeitos na ação da insulina. São defeitos herdados num padrão autossômico dominante. Uma segunda forma está associada a mutações no gene da glucoquinase, esta proteína converte a glicose em glicose-6-fosfato, a qual estimula a secreção de insulina pela célula β . Assim, a glucoquinase serve como um "sensor de glicose" para a célula β .

- **Defeitos genéticos envolvendo a ação da insulina:** Há causas incomuns de diabetes que interferem na ação da insulina. As alterações metabólicas associadas a mutações do receptor de insulina podem variar de hiperinsulinemia e hiperglicemia modestas para diabetes grave.
- **Doenças no pâncreas:** Danos ao órgão como pancreatite, trauma, infecção, pancreatectomia, e carcinoma de pâncreas são fatores predisponentes para o desenvolvimento de diabetes, pois prejudicam as células β e conseqüentemente, a secreção de insulina.
- **Endocrinopatias:** Hormônios (por exemplo, hormônio do crescimento, cortisol, glucagon e epinefrina) antagonizam a ação da insulina. Anormalidades que causam desequilíbrio destes, podem também levar à ocorrência de diabetes, quadro que pode ser revertido com a normalização das concentrações dos hormônios.

Destacam-se também as infecções e indução por fármacos ou produtos químicos que possam alterar a função hepática como causas de diabetes.

O Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) é o tipo de diabetes que é diagnosticado durante a gestação e chega a atingir até 7% das gestações no Brasil (KHODAEIAN *et al.*, 2015).

FIGURA 2 – TIPOS DE DIABETES *MELLITUS*



DM1: A produção de insulina é insuficiente, o que leva a reposição exógena com doses diárias. **DMG:** Geralmente a concentração elevada de glicose no sangue se normaliza após o parto, entretanto, essas mães possuem maior risco de desenvolverem DM2 tardiamente, o mesmo ocorrendo com os filhos. **DM2:** Nesse caso há uma resistência do organismo à ação da insulina, com consequente produção insuficiente do hormônio.

Fonte: O autor.

4.1.3 Diagnóstico

O grau de controle glicêmico no paciente diabético tem sido comumente avaliado através de medidas da glicemia de jejum, glicemia após sobrecarga oral de glicose (TOTG) e através da determinação da hemoglobina glicada (HbA1C).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, são três os critérios aceitos para o diagnóstico de diabetes para a população em geral, com utilização da glicemia: Sintomas de poliúria, polidipsia com glicemia casual > 200 mg/dl; glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl e glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose (teste oral de tolerância a glicose – TOTG) > 200 mg/dl (SBD, 2015), onde o jejum é definido como nenhuma ingestão calórica por no mínimo 8 horas antes do teste e o TOTG deve ser executado usando o equivalente a 75g de glicose anidra solubilizada em água, segundo descrito pela OMS (ADA, 2015). Os valores estão apresentados na tabela 1.

A glicemia de jejum é a mais utilizada na avaliação do controle glicêmico e reflete os valores mais baixos de glicemia do dia, sofre a menor variabilidade. A glicemia 2 horas pós-sobrecarga mede os picos atingidos em resposta ao teste com 75 g de glicose oral (TOTG) e tem sido considerada equivalente no que diz respeito ao seu significado fisiopatológico (TUOMILEHTO, 2002).

A hemoglobina glicada, em particular a subfração A1c (HbA1C), pode ser medida como um índice da glicemia média durante um período de 2-3 meses, sendo o marcador melhor validado em estudos prospectivos intervencionais e epidemiológicos para predizer o risco de complicações no diabetes (ADA, 2010). Aprovado recentemente, o teste de hemoglobina glicada (HbA1C) também pode ser utilizado como critério de diagnóstico. Deve ser realizado em laboratório utilizando o método padronizado e certificado pelo Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada, valores superiores ou iguais a 6,5% podem confirmar o diagnóstico. Para os pacientes com sintomas clássicos, na ausência de hiperglicemia em uma coleta ao acaso, deve-se repetir os testes de HbA1C, glicemia de jejum e teste com sobrecarga de glicose (TOTG) para confirmação do diagnóstico (ADA, 2015).

TABELA 1 - RESUMO DOS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DIABETES

HbA1C	≥6,5%
Glicemia em jejum	≥126mg/Dl
Glicemia 2 horas após ingestão de 75g de glicose anidra (via oral)	≥200mg/Dl
Glicemia ao acaso	≥200mg/Dl

Fonte: Adaptado de *American Diabetes Association* (ADA, 2015) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015) preconiza que a glicemia em jejum seja inferior a 100 mg/dL para o paciente ser considerado não diabético. Quando os níveis de glicemia não preenchem os critérios para o diagnóstico de DM, é reconhecido um grupo intermediário de indivíduos que se enquadram na categoria de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, cujos valores são descritos na tabela 2:

TABELA 2 - VALORES DE GLICOSE PLASMÁTICA NORMAL E TOLERÂNCIA À GLICOSE DIMINUÍDA

CATEGORIA	JEJUM	2H APÓS 75G DE GLICOSE
Glicemia normal	<100mg/dl	<140
Tolerância à glicose diminuída	>100mg/dl a <126mg/dl	≥140mg/dl a <200mg/dl

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015).

4.2 DIABETES *MELLITUS* GESTACIONAL

Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como o aparecimento de níveis variados de intolerância a glicose, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação (REECE; LEGUIZAMON; WIZNITZER, 2009). Desenvolve-se em uma a cada 25 gestantes em todo o mundo e está associado a complicações para a mãe e para o bebê (IMS, 2014).

Nas gestantes em que não há incremento adequado na produção/liberação de insulina, faz-se o diagnóstico de Diabetes *mellitus* gestacional (DMG), definido

como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento na gravidez (BASSO *et al.*, 2007).

Como todas as formas de hiperglicemia, o DMG é caracterizado por níveis de insulina que são insuficientes para atender às demandas do metabolismo dos carboidratos (METZGER *et al.*, 2007).

Durante a gravidez, as mulheres são confrontadas com o aumento da adiposidade e da resistência à insulina, que são explicadas em parte pelo aumento da produção de hormônio lactogênico placentário, estrogênio e prolactina pela placenta humana. Esta mudança endocrinológica e metabólica assegura que o feto tenha uma ampla oferta de combustível e de nutrientes durante toda a gestação. Estudos determinaram que mulheres com DMG possuem função diminuída das células β pancreáticas secretoras de insulina, caso semelhante ao Diabetes *mellitus* tipo 2, sendo que após o parto, quase metade destas mulheres podem progredir para DM2 dentro de 5 anos (GASPAR; NASCIMENTO, 2004; KWAK *et al.*, 2012).

Uma das principais características da gravidez é a resistência à insulina, que aumenta com o aparecimento da placenta e a consequente liberação de antagonistas da insulina como o hormônio lactogênico placentário humano. Estas alterações podem ser adaptativas, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e desenvolvimento fetal, uma vez que a glicose é o principal substrato para o feto. A gravidez é assim, um estado diabetogênico, e indivíduos mais suscetíveis estão em risco de desenvolver diabetes gestacional (CARLIN; ALFIREVIC, 2008; TAN; TAN, 2013).

O DMG é caracterizado por baixo grau de inflamação, com consequente produção anormal de citocinas e mediadores (DAHER, *et al.*, 2011), também destaca-se a resistência à insulina, mecanismo que tem sido classicamente atribuído à hormônios da gestação (PETRY, 2010). Variações genéticas (polimorfismos) podem influenciar a produção de mediadores inflamatórios e predispor a diferentes distúrbios (HOLLEGAARD; BIDWELL, 2006). Polimorfismos de genes que codificam para mediadores pró-inflamatórios podem afetar a resposta inflamatória, podendo estar associados com o desenvolvimento de DMG (DAHER *et al.*, 2011). Além disso, o DMG é recorrente numa média de 30% das mulheres com histórico de diabetes gestacional, isto sugere que há um subgrupo de mulheres que pode ser geneticamente predispostas a desenvolver DMG (KIM; BERGER; CHAMANY, 2007).

Diabetes *mellitus* é considerado uma das mais importantes complicações gestacionais. A triagem é recomendada entre 24^a e 28^a semanas de gestação para o diagnóstico da doença, sendo que até 40% das gestantes portadoras do DMG, podem ter o diagnóstico já no início da gravidez (IMS, 2014).

Variações da prevalência do DMG entre grupos raciais ou etnias têm sido documentadas, com uma prevalência maior entre as nativas americanas, populações asiáticas, afro-americanas e hispânicas em relação às caucasianas (CDC, 2001).

A partir de estudo realizado é possível observar as diferentes prevalências do DMG entre etnias (HUNSBERGER; ROSENBERG; DONATELLE, 2010), conforme apresentado na tabela a seguir:

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DE GESTANTES COM DMG CONFORME ETNIA

Origem	Gestantes com DMG (%)
Asiáticas (Ilhas do Pacífico)	14,8
Hispanicas	11,1
Negras	8,1
Índias americanas	7,9
Branças	6,0

Fonte: Adaptado de HUNSBERGER; ROSENBERG; DONATELLE (2010). (<http://www.sciencedirect.com>).

A mortalidade perinatal em filhos de mãe diabética era de 50% antes da descoberta da insulina; a partir daí, as novas tecnologias puderam melhorar estes dados, uma vez que pesquisas sobre o metabolismo dos carboidratos e a fisiologia da gestação geraram conhecimentos para o atendimento racional da diabética grávida, assim como de seu feto e recém-nascido, com expressiva melhoria nos índices de morbimortalidade perinatal (GASPAR; NASCIMENTO, 2004).

4.2.1 Fisiopatologia do Diabetes *mellitus* gestacional

A gestação é um estado de hiperfunção pancreática, caracterizado por aumento da resistência periférica à insulina para manter o controle adequado da glicose na gravidez, as células β -pancreáticas da mãe tendem a aumentar a secreção de insulina com o objetivo de suprir suas necessidades nutricionais bem como as do feto. Mulheres grávidas que desenvolvem diabetes gestacional são incapazes de aumentar a produção de insulina ou ainda podem manifestar certa resistência à ação desse hormônio (PRATIPANAWATR *et al.*, 2001; BASSO *et al.*, 2007).

A fisiopatologia do DMG é explicada pela elevação de hormônios contrarreguladores da insulina e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais). O principal hormônio relacionado com a resistência à insulina durante a gravidez é o hormônio lactogênico placentário (SBEM, 2008; INTURRISI; LINTNER; SOREM, 2011). Esses hormônios produzidos pela placenta bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina. No DMG, as células β -pancreáticas são incapazes de produzir insulina suficiente para compensar a resistência à insulina da gestação. A obesidade e a história familiar de diabetes apresentam forte influência no grau de resistência à insulina destas pacientes (BUCHANAN; XIANG; PAGE, 2012; FLORES LE-ROUX; BENAIGES BOIX; PEDRO-BOTET, 2013).

Evidências apresentadas sugerem que a resistência insulínica em DMG é uma forma crônica que está presente antes da gravidez e é agravada pelas alterações fisiológicas durante a gestação (METZGER *et al.*, 2007).

O risco de gestantes com DMG desenvolverem novamente DMG nas gestações seguintes ou até mesmo DM2 nos anos seguintes chega até 60%, por este motivo estas pacientes necessitam de rastreamento ao longo da vida para desenvolvimento de Diabetes *mellitus* (BUCHANAN; XIANG; PAGE, 2012).

Com os achados no entendimento da fisiologia do diabetes durante a gravidez, tem-se alcançado um melhor controle metabólico das gestantes e melhor homeostase fetal, em termos práticos, se reflete em menores taxas de mortalidade perinatal, assim como menor morbidade neonatal (GASPAR; NASCIMENTO, 2004).

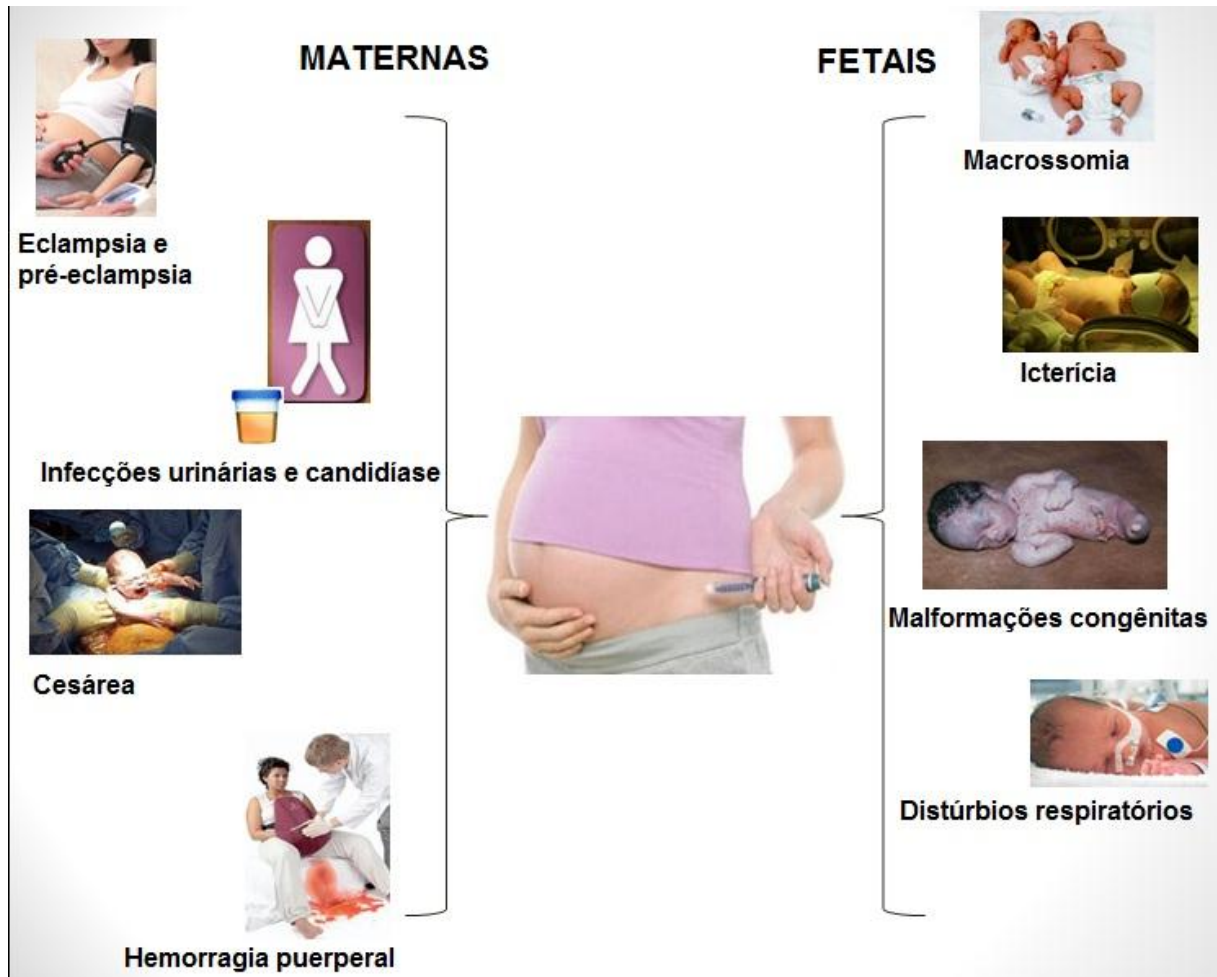
4.2.2 Complicações materno-fetais

Diabetes durante a gestação é associado com aumento de riscos perinatais além de complicações a curto e a longo prazo. Nas gestantes, DMG pode causar aumento da pré-eclâmpsia (10 a 30%) quando comparadas àquelas com tolerância normal à glicose (de 5 a 7% de risco) e maior taxa de cesárea devido o feto tornar-se macrossômico quando exposto à hiperglicemia materna (SINGH; SINGH, 2015). Além disso, o DMG aumenta substancialmente a chance de desenvolver diabetes após o parto, de acordo com alguns estudos que mostraram que este risco é de aproximadamente 40% após um período de acompanhamento de 10 anos. Complicações maternas são relevantes, especialmente na presença de retinopatia e nefropatia, sobretudo naquelas que já apresentavam tais complicações previamente (ABI-ABIB *et al.*, 2014). Infecções urinárias podem ser frequentes na gestação das pacientes diabéticas; parto prematuro em função do excesso de líquido amniótico no útero, causando inclusive, aumento exagerado da barriga e do peso corporal (BALTAR; ANDRADE, 2005).

Para o feto, existe um risco aumentado de morte (neonatal ou feto natimorto) e anomalias congênitas. Na gestação diabética, o feto desenvolve-se em um ambiente intrauterino desfavorável exposto às alterações metabólicas diversas ocasionando uma maior morbidade perinatal. Riscos a curto prazo para o bebê incluem hipoglicemia neonatal: causada pelo excesso de insulina produzida inicialmente em resposta à hiperglicemia materna, o pâncreas fetal é estimulado resultando em hipertrofia e hiperplasia das células β com aumento dos níveis da insulina fetal. Com a separação do binômio mãe-feto, ao nascimento, suspende-se a transferência de aporte glicêmico, levando à hipoglicemia neonatal. Além disso, a hiperinsulinemia gera aumento das necessidades de oxigênio, hipoxemia crônica e, decorrente dela, o aumento do número das hemácias para compensação do transporte de O_2 causando assim a síndrome do desconforto respiratório, asfixia, policitemia e óbito fetal (GASPAR; NASCIMENTO, 2004; PETRY, 2010). A hiperglicemia materna e os níveis muito oscilantes de glicose no sangue são os responsáveis pelos índices elevados de morbiletalidade perinatal; bem como macrossomia, hiperbilirrubinemia e malformações congênitas (GASPAR;

NASCIMENTO, 2004; BALTAR; ANDRADE, 2005). A figura 3 ilustra algumas complicações relevantes para a mãe e para o feto causadas pelo DMG.

FIGURA 3 – COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELO DMG



Fonte: FUKS, 2008; Adaptado do *Manual de la asociación Colombiana de Endocrinología*, Williams Ginecología.

A **mortalidade perinatal** dos fetos de gestantes com DMG ocorre de 3 a 6 vezes mais quando comparado à população geral, porém, o principal problema está intimamente ligado às malformações fetais; cerca de 30 a 40% devidos à hipóxia intrauterina (GASPAR; NASCIMENTO, 2004).

A **macrossomia fetal**, definida quando o peso do recém-nato é maior que 4 kg, é a complicação mais característica. Observa-se em até 30% dos casos e pode predispor a traumas obstétricos e distócia de ombro. Estudos demonstram que há

aumento do risco de obesidade e intolerância à glicose na infância e no início da vida adulta em indivíduos expostos ao diabetes materno (tipo 1, 2 ou DMG) intraútero. Além disso, mesmo com controle glicêmico adequado mantido durante a gestação, aproximadamente 20 a 30% dos recém-nascidos de mães diabéticas nascem com peso excessivo. O resultado final é um feto de peso aumentado, com o polo cefálico de dimensões inferiores a do seu potencial e com excesso de gordura. O impacto desse crescimento inicial comprometido ainda não foi determinado, mas alguns estudos relatam alterações cognitivas e comportamentais nesses recém-nascidos (GASPAR; NASCIMENTO, 2004; ABI-ABIB *et al.*, 2014).

A **hiperbilirrubinemia neonatal** pode complicar a evolução de cerca de 20% dos filhos de mães diabéticas. A causa exata de sua ocorrência ainda é pouco conhecida estando envolvidos fatores como a hipoxemia, a imaturidade do sistema de conjugação hepática e a policitemia (GASPAR; NASCIMENTO, 2004).

4.2.3 Fatores de Risco para o Diabetes *mellitus* gestacional

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015), algumas características tornam as pacientes mais suscetíveis a desenvolver DMG ou não. Estão listadas a seguir:

- Idade de 35 anos ou mais;
- Sobrepeso, obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual;
- Deposição central excessiva de gordura corporal;
- História familiar de diabetes em parentes de primeiro grau;
- Crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual;
- Antecedentes obstétricos de abortamentos de repetição, malformações, morte fetal ou neonatal, macrossomia ou DMG;
- Síndrome de ovários policísticos;
- Baixa estatura (menos de 1,5 m).

4.2.4 Diagnóstico do Diabetes *mellitus* gestacional

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2015), o diagnóstico do DMG pode ser feito de duas maneiras:

- O teste oral de tolerância à glicose (TOTG), onde é feita dosagem da glicemia de jejum e após uma sobrecarga de 75g de glicose anidra é feita a dosagem da glicemia 1h e 2h após a sobrecarga oral (tabela 4);
- A outra forma é uma sobrecarga de 50g de glicose com posterior dosagem 1h após, sendo desnecessário o jejum. Se o resultado for superior ou igual a 140 mg/dL, procede-se para a sobrecarga com 100g de glicose, e nesta etapa o jejum é necessário, com dosagens em jejum, 1h, 2h e 3h após a sobrecarga. O rastreio com 50g de glicose não requer jejum e, portanto, é mais fácil de ser realizado para muitas mulheres.

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015) preconiza a primeira forma descrita anteriormente. Para as gestantes, na primeira consulta pré-natal deve ser solicitada glicemia de jejum. Caso o valor encontrado seja ≥ 126 mg/dL, é feito o diagnóstico de Diabetes *mellitus* manifesto ou pré-gestacional. Se a glicemia plasmática em jejum estiver entre 92 mg/dL e 126 mg/dL, é feito o diagnóstico de DMG. O diagnóstico deve ser confirmado com uma segunda dosagem da glicemia de jejum e ainda entre a 24^a e 28^a semana de gestação. Nas gestantes com glicemia normal deve-se realizar o TOTG, teste confirmatório para o Diabetes *mellitus* gestacional, que utiliza uma ingesta oral de sobrecarga de 75g de glicose anidra (figura 4), dieta sem restrição de carboidratos e jejum de 8 horas antecedendo o teste. A investigação de DMG deve ser feita em todas as gestantes sem diagnóstico prévio de diabetes.

Em 2010, o *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) decidiu que os critérios diagnósticos do DMG teriam como pontos de corte para o TOTG a glicemia plasmática em jejum, 1 e 2 horas com valores ≥ 92 mg/dl, ≥ 180 mg/dl e ≥ 153 mg/dl, respectivamente, sendo que um dos valores alterados confirma o diagnóstico (SBD, 2015).

TABELA 4 – DIAGNÓSTICO DE DMG COM TOTG - INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE

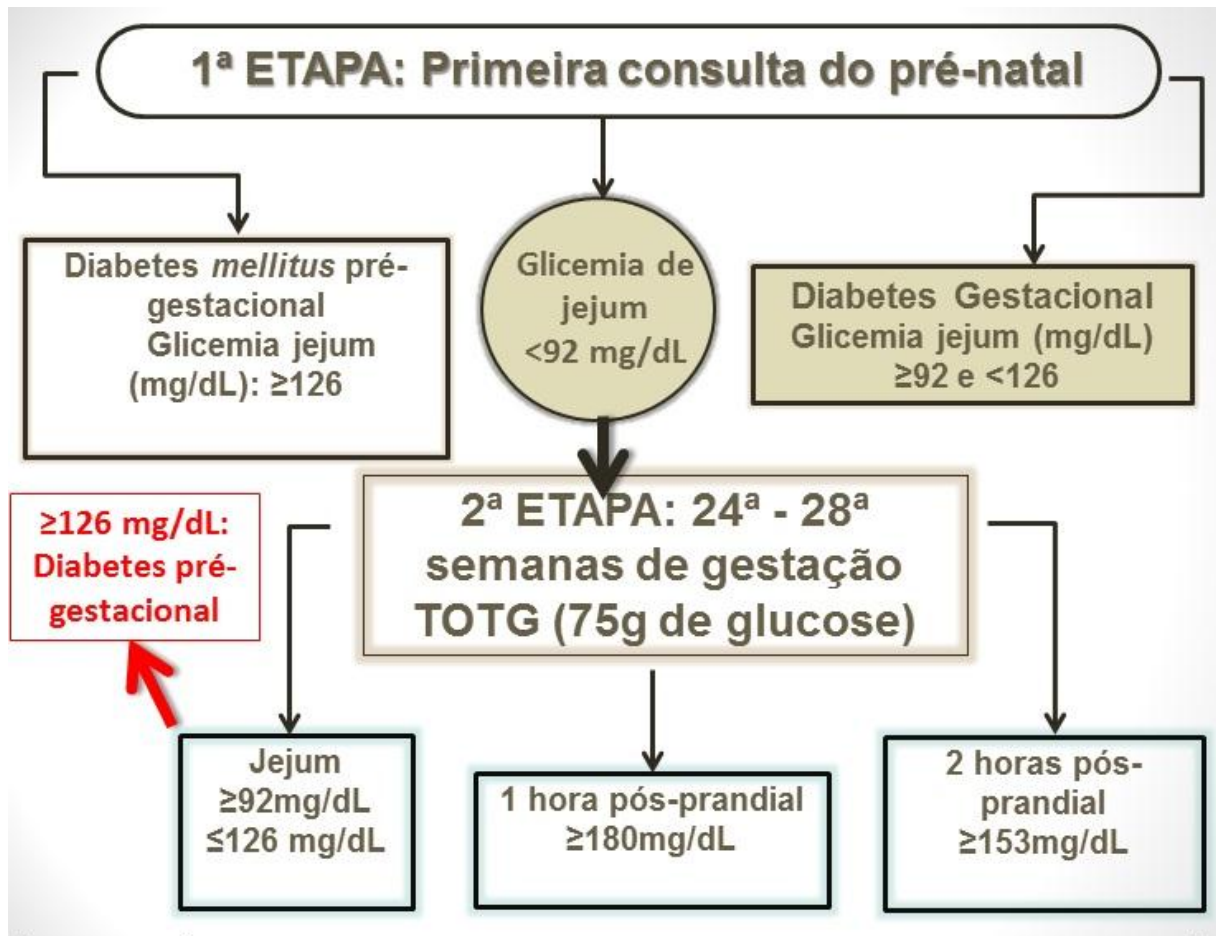
Jejum	≥92 mg/dL*
1 hora	≥180 mg/dL*
2 horas	≥153 mg/dL*

*Um valor alterado já confirma o diagnóstico.

Fonte: Adaptado de Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015).

O rastreamento do DMG deve ser realizado em todas as gestantes sem diabetes pré-gestacional através do TOTG, a partir da 24^a semana de gestação, com 75g de glicose anidra (via oral) (SBD, 2015).

FIGURA 4 – CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DMG



De acordo com os novos critérios para o diagnóstico do diabetes manifesto e gestacional, na primeira consulta pré-natal, a gestante fará o exame de glicemia em jejum (1ª etapa) e dependendo dos valores desta glicemia, poderá ser classificada em diabetes manifesto/diabetes pré-gestacional (≥ 126 mg/dL), diabetes gestacional (glicemia entre 92 e 126 mg/dL) ou glicemia normal (≤ 92 mg/dL). Em ambos os casos, deve ser confirmado o resultado com uma segunda dosagem da glicemia de jejum. Se o resultado apontar para glicemia normal, entre a 24ª – 28ª semanas de gestação, como teste confirmatório a gestante deverá realizar o teste oral de tolerância à glicose – TOTG (2ª etapa), onde é feita a dosagem de glicemia em jejum e após administra-se uma sobrecarga de 75g de glicose anidra, realizando-se a dosagem da glicemia nos tempos de 1 e 2 horas após a ingestão da solução, sendo os resultados adequados respectivamente: < 92 mg/dL, < 180 mg/dL e < 153 mg/dL. Um dos valores alterados já confirma o diagnóstico de DMG. Se entre a 24ª – 28ª semanas de gestação a glicemia de jejum for superior a 126 mg/dL, é feito o diagnóstico de diabetes prévio, e não DMG. Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes (2015) e *American Diabetes Association* (ADA, 2015).

Fonte: O autor.

4.2.5 Tratamento

A terapia nutricional é a primeira opção de tratamento para a maioria das gestantes com DMG, numa tentativa de evitar o ganho de peso excessivo além de gerar menos riscos de complicações perinatais, comuns quando em uso de insulina (BALSELLS *et al.*, 2015). A orientação nutricional é parte fundamental do tratamento de toda gestante portadora de diabetes. O cálculo calórico diário deve ser individualizado de acordo com IMC, nível de atividade física e crescimento fetal (ABI-ABIB *et al.*, 2014). Aproximadamente entre 50 e 80% das mulheres com DMG alcançam o controle glicêmico satisfatório com dieta e exercício. No restante, a insulina é a terapia de escolha, já que esta não atravessa a placenta e tem segurança conhecida. O uso de análogos de insulina de ação rápida normalmente é seguro durante a gravidez, propiciando um melhor controle dos níveis de glicemia pós-prandial e menor ocorrência de hipoglicemia. A insulina NPH humana é a primeira escolha entre as insulinas basais. A taxa de mortalidade perinatal em filhos de mãe diabética era de 50% antes da descoberta da insulina; a partir daí, as novas tecnologias puderam melhorar os resultados em relação a dados específicos de uma gestação (GASPAR; NASCIMENTO, 2004; ABI-ABIB *et al.*, 2014; SBD, 2015).

Embora, a terapia com insulina tem sido o padrão e também o modo de tratamento universalmente aceito há várias décadas, o seu uso em curto prazo durante o DMG, nem sempre é possível, especialmente no contexto de países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados (SINGH; SINGH, 2015). Assim, a metformina parece ser uma droga atraente para uso em DMG, porém por atravessar a placenta, existe a preocupação de efeitos adversos para a mãe e para o feto, e isto tem limitado o seu potencial uso no DMG. É um medicamento listado no grupo B da tabela de classificação do *Food and Drug Administration* (FDA), isto significa que somente pode ser administrado durante a gravidez sob prescrição médica, se estritamente necessário. Estudos em animais não demonstraram qualquer risco para o feto, mas não existem estudos adequados e bem controlados em mulheres grávidas (SINGH; SINGH, 2015). Pacientes portadoras de diabetes tipo 2, em uso de hipoglicemiantes orais, devem ser recomendadas a suspender essas medicações e iniciar tratamento com insulina quando estiverem planejando engravidar, uma vez

que não há comprovação de segurança do uso de hipoglicemiantes no primeiro trimestre (ABI-ABIB *et al.*, 2014).

Entretanto, a recomendação que se tem utilizado em alguns países em relação aos medicamentos antidiabéticos orais são metformina e glibenclamida no diabetes gestacional. Porém ainda existem dúvidas dos efeitos em longo prazo para a mãe e o filho em relação ao seu uso durante a gravidez. O uso destes medicamentos deve ser indicado apenas nos casos em que não se alcançou controle adequado da glicemia com medidas não farmacológicas nos quais o uso de insulina não é viável. A SBD sugere o uso de insulina como tratamento padrão. As insulinas ultrarrápidas *lispro* e *aspart* são seguras na gestação e têm a vantagem de proporcionar maior flexibilidade de estilo de vida e melhor controle da glicemia pós-prandial do que a insulina regular, embora com a desvantagem do custo mais elevado (ABI-ABIB *et al.*, 2014; SBD, 2015).

Após o parto, é frequente o retorno à normoglicemia nas mulheres com diabetes gestacional, porém devido ao risco aumentado de desenvolverem diabetes tipo 2 mais tarde, devem ser monitoradas. Além disso, é importante que adotem hábitos saudáveis para redução do risco de adquirir diabetes futuramente, bem como serem submetidas regularmente a exames glicêmicos para avaliação de possível aparecimento de diabetes (ADA, 2010).

Deve-se estimular o aleitamento materno. Caso ocorra hiperglicemia durante esse período, a insulina é o tratamento indicado. É recomendado reavaliar a tolerância à glicose a partir de seis semanas após o parto com glicemia de jejum ou com um teste oral com 75 g de glicose, dependendo da gravidade do quadro metabólico apresentado na gravidez (SBD, 2015).

4.3 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES

A contribuição da genética para o desenvolvimento do Diabetes *mellitus* gestacional não está bem estabelecida. Dados em estudos sugerem modesta hereditariedade. No entanto, as formas de diabetes autoimune e insulinoresistente, alterações para as quais DMG é muitas vezes um precursor, são hereditárias e comprovadamente, variantes genéticas podem contribuir para diabetes durante a

gestação. Ainda existem poucos estudos relacionados a esta área, apesar da importância do DMG na sociedade (METZGER *et al.*, 2007).

4.3.1 Polimorfismos de Único Nucleotídeo (*SNPs*)

Polimorfismos de único nucleotídeo ou polimorfismos de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymorphism – SNP*) são as diferenças de uma única base entre sequências de DNA no genoma de indivíduos. Eles podem ser ensaiados e explorados como marcadores moleculares de alto rendimento (TRICK *et al.*, 2009).

Os polimorfismos (*SNPs*) consistem na troca de um único nucleotídeo na sequência de DNA por outro em um local específico no genoma (LIAO; LEE, 2010). É o tipo mais comum de variação genética humana. Os polimorfismos ocorrem com uma frequência considerável (>1%) na população humana e podem servir como marcadores genéticos para identificar genes de doenças por estudos de ligação nas famílias (WANG, D. G. *et al.*, 1998).

Os *SNPs* não estão uniformemente distribuídos em todo o genoma. Em geral, ocorrem com muito menos frequência em regiões codificantes (éxons) do genoma do que em regiões não codificadoras (íntrons). Os *SNPs* em sítios reguladores de um gene podem afetar as taxas de transcrição, o que muda a expressão de proteínas correspondentes. Podem afetar fenótipos a níveis de DNA, RNA e proteínas. Um *SNP* em um sítio de ligação do DNA regulador pode alterar a afinidade com a proteína de regulação, resultando na expressão dos genes diferentes (LIAO; LEE, 2010).

Embora a maioria dos *SNPs* sejam neutros, alguns podem alterar genes/proteínas e assim levar a diferenças fenotípicas entre os portadores. Essas diferenças fenotípicas podem resultar em maior susceptibilidade a várias doenças. Na última década, numerosos *SNPs* foram identificados e explicam, pelo menos parcialmente, a arquitetura genética de doenças complexas tais como diabetes (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

A identificação de polimorfismos que contribuem para o desenvolvimento de uma doença complexa fornece informações valiosas, importantes para o diagnóstico

precoce, prevenção e tratamento de doenças comuns (SUH; VIJG, 2005; ANDERSON *et al.*, 2007; WANG, L.; LUHM; LEI, 2007).

Recentemente, FLANNICK *et al.* (2014) realizaram um estudo de triagem de mutação para variantes raras em genes (a frequência do alelo menor é inferior a 1%) e sugeriram que as variantes raras com perda de função podem proteger contra o diabetes.

Vários métodos podem ser utilizados para a descoberta de *SNPs*, porém uma das maneiras mais simples de descobrir novos *SNPs* é sequenciando fragmentos de DNA amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR). Os produtos de PCR são sequenciados e alinhados em sequências de genes, permitindo novas identificações de polimorfismos (LIAO; LEE, 2010).

4.4 GENE LEP (LEPTINA)

O gene LEP codifica uma proteína chamada leptina, que desempenha um papel importante na regulação do peso corporal. Está localizado no cromossomo 7, na região 7q31.3, possui 16.352pb e contém 3 éxons e dois íntrons (NCBI, 2016), possui 167 aminoácidos e seu nome deriva da palavra grega "leptos", que significa "magro". A leptina é importante na regulação da massa adiposa dos tecidos e do peso, atua estimulando o gasto de energia (PARACCHINI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005).

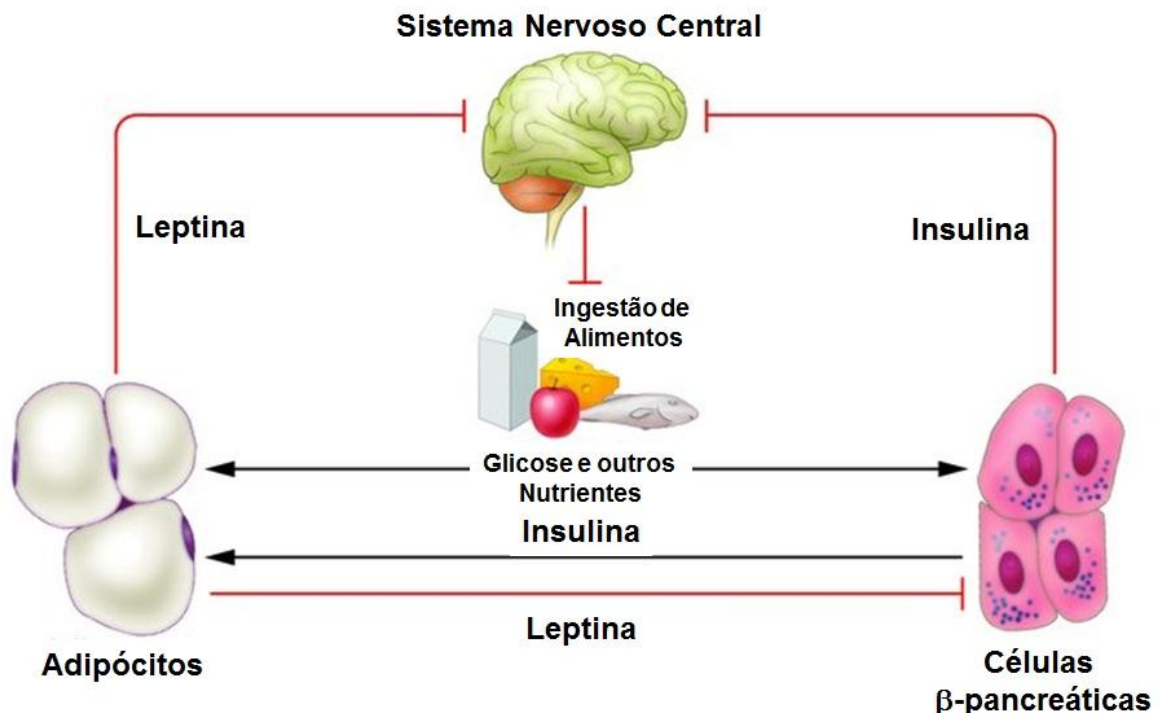
A leptina é uma adipocina, ou seja, hormônio peptídico produzido pelo tecido adiposo. Normalmente as adipocinas produzem mudanças no metabolismo energético. Esse hormônio age nos receptores hipotalâmicos reduzindo o apetite e sua função é perdida quando o seu receptor (LEPR) é defeituoso. A leptina promove uma redução na captação de combustível e um aumento no gasto de energia quando as reservas de gorduras são suficientes (OSWAL; YEO, 2010), no entanto promove um equilíbrio na quantidade de alimento que é consumido e a energia que é gasta (FRIEDMAN, 2002). Funciona como parte de uma via de sinalização que pode inibir a ingestão de alimentos e/ou regular o gasto de energia para manter a constância da massa adiposa (figura 5) (NCBI, 2016). Assim como regula o apetite e o metabolismo, essa adipocina também desempenha importante função na secreção de insulina (ROMANOWSKI *et al.*, 2015). O hormônio atua mantendo a

permeabilidade do canal de K na célula β -pancreática, pois seu fechamento promove despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais de Ca com consequente exocitose de insulina (NISWENDER; MAGNUSON, 2007), conforme esquematizado na figura 6.

A interação leptina-receptor no hipotálamo altera a liberação de sinais neuronais para a região do cérebro que controla o apetite. A quantidade de leptina liberada pelo tecido adiposo depende do tamanho e do número dos adipócitos; quando há redução no tecido lipídico devido a perda de peso, os níveis de leptina no sangue diminuem (OSWAL; YEO, 2010).

Indivíduos com produção deficiente de leptina ou defeitos em seu receptor (LEPR) não apenas desenvolvem obesidade, mas tornam-se tanto resistentes a insulina quanto intolerantes à glicose e estão em alto risco de desenvolver diabetes (NISWENDER; MAGNUSON, 2007; SHEN *et al.*, 2014).

FIGURA 5 – AÇÃO DO HORMÔNIO LEPTINA



Leptina e insulina são ambos secretados em proporção à disponibilidade de reservas energéticas. Quando as reservas de energia são suficientes, a leptina age no sistema nervoso central para reduzir a ingestão de nutrientes.

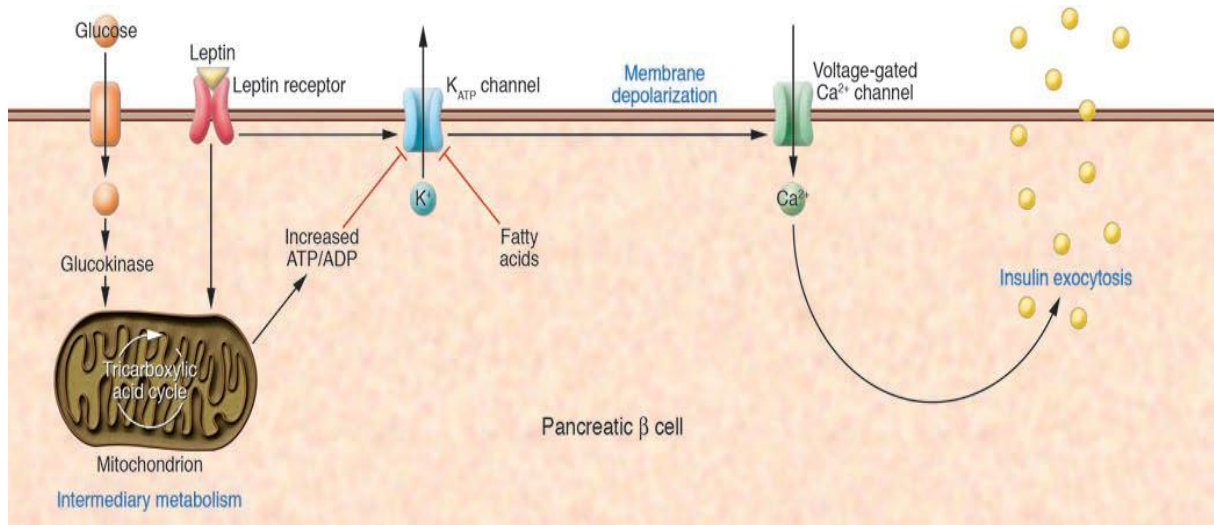
Fonte: Adaptado de Niswender; Magnuson (2007).

A leptina e a insulina são secretadas pelo tecido adiposo e pelo pâncreas, respectivamente, em proporção com a massa da gordura corporal. Ambos estimulam a liberação de um hormônio estimulador de melanócitos, o qual envia sinais a neurônios que produzem sinais neuronais para comer menos e metabolizar mais o combustível. A leptina estimula a síntese de termogenina pelo sistema nervoso simpático através de alterações nas transmissões sinápticas (NISWENDER; MAGNUSON, 2007).

A produção insuficiente de leptina está normalmente associada à obesidade humana e também ao metabolismo da glicose. Estudos têm indicado que a sinalização da insulina é afetada pelo excesso de células lipídicas (FRIEDMAN, 2002). A redução no nível de leptina reverte os processos de termogênese, permitindo a conservação de combustível (LEHNINGER, 2014).

A leptina pode controlar o peso corporal e regular o equilíbrio energético. Além disso, pode suprimir a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (PARACCHINI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005). Alguns estudos clínicos têm demonstrado que as concentrações de leptina no soro são diretamente proporcionais à gordura em massa e diminuição da capacidade de resposta a leptina central tem sido observada no paciente obeso. Os níveis elevados de leptina no plasma têm sido observados em pacientes obesos resistentes à insulina (ZHENG, J. *et al.*, 2014).

FIGURA 6 - EFEITOS DA LEPTINA SOBRE A CÉLULA β -PANCREÁTICA PARA A SECREÇÃO DE INSULINA



A célula β detecta a disponibilidade de nutrientes, incluindo a de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, através do metabolismo dessas moléculas. Um aumento na relação ATP / ADP estimula o fechamento do canal de K, provocando assim a despolarização da membrana plasmática, a ativação de um canal de cálcio-dependente e conseqüentemente a exocitose de insulina. A leptina modula a secreção de insulina. O hormônio parece funcionar para manter a permeabilidade do canal de K, assim hiperpolarizando a membrana plasmática das células β .

Fonte: Niswender; Magnuson (2007).

Durante a gestação, a placenta passa a aumentar a expressão de citocinas como a leptina, o que pode ser relevante para o desenvolvimento da resistência à insulina exagerada em gestações com diabetes gestacional (METZGER *et al.*, 2007).

Em mulheres grávidas, por causa do aumento da massa de gordura e a presença da placenta, as concentrações de leptina materna aumentam de 2 a 3 vezes acima da concentração de mulheres não grávidas, com o pico ocorrendo em média a partir da 28^a semana de gestação (YANG *et al.*, 2016).

As mutações no gene da leptina (LEP) frequentemente são causadoras de obesidade grave e podem também contribuir para complicações associadas à obesidade (OKPECHI *et al.*, 2010), podendo-se citar entre elas o diabetes.

4.4.1 Polimorfismo *rs7799039* (-2548G/A)

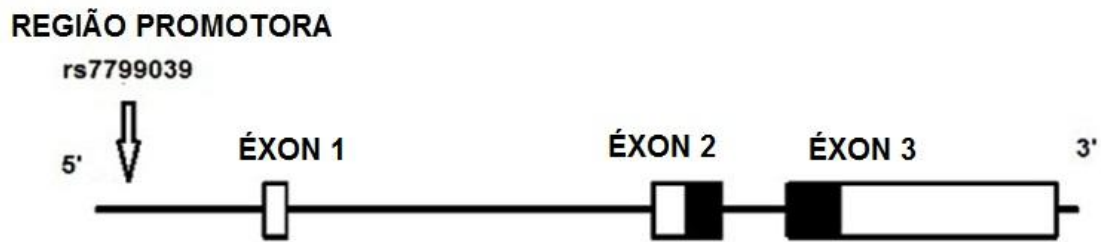
Alguns polimorfismos do gene da leptina têm sido estudados extensivamente, com especial ênfase em *SNPs* na região promotora, pois afetam significativamente seu potencial de transcrição. (NISWENDER; MAGNUSON, 2007).

Evidências recentes indicam que a modulação da expressão do gene da leptina pode estar relacionada à presença de polimorfismos no gene *LEP* e também no receptor de leptina (*LEPR*). O *SNP rs7799039* na região promotora do gene *LEP* tem sido associado a um aumento no IMC, sobrepeso e com variações na concentração sérica de leptina (FLANNICK *et al.*, 2014).

O polimorfismo *rs7799039* (-2548G/A) foi descrito pela primeira vez em 1998 por Mammes *et al.* (1998) e consiste na troca de uma única base G>A. Está localizado na região promotora do gene *LEP* (figura 7) que pode sofrer metilação dinâmica, o que afeta sua expressão ao nível da transcrição (MARCELLO *et al.*, 2015). Alterações epigenéticas, incluindo principalmente a metilação do DNA estão envolvidas na patogênese do diabetes. A metilação de um promotor de gene é uma forma de modificação epigenética que afeta interações que desempenham um papel crítico na regulação da expressão do gene (FLANNICK *et al.*, 2014).

Em um estudo, Marcello e colaboradores demonstraram que a concentração sérica de leptina varia de acordo com genótipos específicos herdados (MARCELLO *et al.*, 2015). Hoffstedt e colaboradores (2002) mostraram que o alelo -2548A conduzia a uma maior expressão de RNAm e a um aumento dos níveis plasmáticos de leptina e que indivíduos com o genótipo AA de *rs7799039* apresentaram maiores concentrações de leptina sérica em relação aos portadores de genótipos AG ou GG.

FIGURA 7 – POLIMORFISMO *rs7799039* NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE LEP



O gene LEP possui 3 éxons. O polimorfismo (*rs7799039: G>A*) encontra-se na região promotora do gene.

Fonte: Adaptado de Okpechi, *et al.* (2010).

4.5 GENE SLC30A8

Existem 10 membros da família de genes SLC30 em humanos, e pelo menos 8 destes (SLC30A1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) são expressos em células β humanas (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014).

O gene SLC30A8 - *Solute Carrier Family 30, member 8 (zinc transporter)*, possui 226.442 pb e está localizado na região 8q24.11 do cromossomo 8 (NCBI, 2016).

A insulina, um hormônio pancreático produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans, regula rigorosamente a homeostase da glicose promovendo a captação de glicose a partir do plasma por tecidos periféricos (células musculares e gordurosas) e inibindo a produção hepática de glicose. A insulina é armazenada dentro de vesículas secretoras de células β -pancreáticas, nas quais seis moléculas de insulina formam hexâmeros sólidos com dois íons Zn^{2+} . Tipicamente, após a hiperglicemia pós-prandial, o metabolismo da glicose em células β induz um aumento na razão ATP/ADP, que desencadeia o fechamento de canais de potássio sensíveis a ATP. A despolarização resultante da membrana plasmática provoca então o afluxo de Ca extracelular e conseqüentemente a exocitose de insulina das vesículas. Assim, a insulina segregada é então levada através da circulação para tecidos periféricos, onde a ativação do receptor de insulina estimula a captação e

utilização e/ou armazenamento de glicose como glicogênio, reduzindo a glicose no sangue (CHIMIENTI *et al.*, 2006).

O gene SLC30A8 está relacionado com a secreção de insulina humana, codifica um transportador de zinco (ZnT8) específico para as células β do pâncreas, levando zinco para as vesículas secretoras de insulina da célula β , o que facilita a formação e a estabilização de hexâmeros de insulina, tornando-a menos susceptível de degradação. Esta insulina então armazenada em vesículas fica disponível para liberação com o estímulo da glicose (MARUTHUR *et al.*, 2015).

O transportador é necessário para o fluxo de zinco em grânulos secretores de insulina de células, sendo importante para o armazenamento e a maturação de insulina em grânulos da célula β . Também pode atuar como sinalizador parácrino da secreção deste hormônio. Variações neste gene causam impactos na atividade do zinco (FLANNICK *et al.*, 2014).

Estudos utilizando camundongos têm demonstrado que os níveis de expressão do gene SLC30A8 são reprimidos no pâncreas de animais diabéticos, isto resulta na redução do teor e secreção de insulina (SEMAN *et al.*, 2015).

4.5.1 Polimorfismo *rs13266634* (R325W)

O polimorfismo *rs13266634*, é uma mutação não sinônima no éxon 9 do gene SLC30A8 (figura 8) e tem sido consistentemente associado ao risco aumentado para o diabetes, principalmente o DM2 (BRORSSON *et al.*, 2008). Este polimorfismo resulta em uma troca de base (C \rightarrow T), produzindo uma mudança de aminoácidos não conservativa, de arginina para o triptofano, na posição 325. É também conhecido como a variante Arg325Trp ou R325W. O alelo (C) codifica a arginina (R), e o alelo (T) codifica o triptofano (W) (MARUTHUR *et al.*, 2015; SEMAN *et al.*, 2015). A mudança de codificação influencia diretamente a capacidade do ZnT8 de transportar zinco (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014). Nicolson e colaboradores (2009), mostram os efeitos do polimorfismo utilizando corantes fluorescentes para monitorar a acumulação citosólica de zinco em células expressando transitoriamente as variantes Arg ou Trp de ZnT8 humano. Observaram estes autores que a fluorescência foi significativamente maior nas

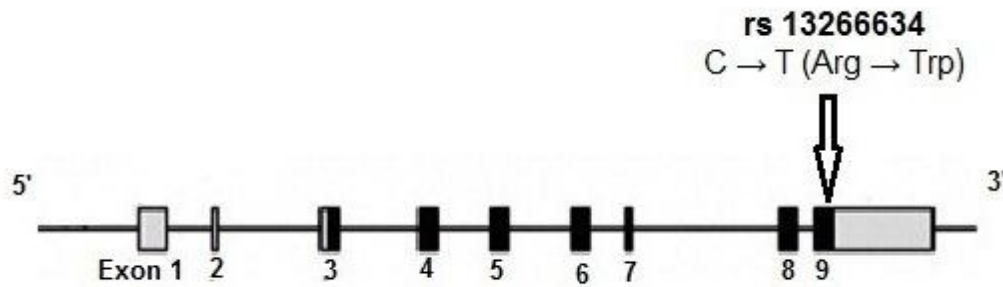
células que expressam a variante Trp, e concluíram que esta variante era, portanto, um transportador mais ativo, sugerindo assim que a variante Trp seria uma isoforma protetora contra o diabetes.

Este sítio polimórfico está localizado próximo a região C-terminal da estrutura da proteína e afeta o reconhecimento da proteína quinase A e da proteína quinase C na molécula de ZnT8 no momento pós tradução (FAGHIH *et al.*, 2014).

O polimorfismo C>T do gene SLC30A8 pode afetar o transporte de zinco e assim também afetar a conversão de pró-insulina a insulina, o que gera redução no processamento ou na secreção deste hormônio (STAIGER *et al.*, 2007). Weijers (2010) em seu estudo sugeriu que o polimorfismo *rs13266634* pode ser tolerado e da mesma forma ocorre uma transferência de zinco para os locais corretos nas células β -pancreáticas, o que diferencia, é a presença da variante Trp nos portadores de homozigose TT, que passam a produzir um transportador de zinco mais ativo em relação aos homozigotos CC.

Um estudo realizado por Chimienti e colaboradores (2006), mostrou que a superexpressão de ZnT8 em células de ratos protegeu significativamente as células contra a morte induzida por depleção de zinco e aumentou a secreção de insulina estimulada pela glicose. Evidências suportam a hipótese de que ZnT8 é um componente principal da via de síntese/secreção de insulina e pode assim constituir um novo alvo farmacológico para o tratamento de diabetes.

Pesquisas revelaram que a suplementação com zinco pode tornar-se benéfica para a prevenção do diabetes e/ou tratamento em alguns indivíduos, com base em variação no gene SLC30A8 (MARUTHUR *et al.*, 2015; SEMAN *et al.*, 2015).

FIGURA 8 – POLIMORFISMO *rs13266634* NO ÉXON 9 DO GENE SLC30A8

C → T: Troca das bases pirimídicas (C por T), gerando uma troca do aminoácido Arginina por Triptofano no éxon 9 do gene SLC30A8.

Fonte: Adaptado de Seman *et al.* (2015).

Além de desempenhar uma função estrutural no armazenamento de insulina, o Zn^{2+} é um cofator essencial para muitos componentes da maquinaria de processamento de pró-insulina. Assim, o ZnT8 pode desempenhar um importante papel na triagem da pró-insulina na via secretora regulada (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014). A apoptose excessiva de células β -pancreáticas tem sido associada com diabetes. A depleção de zinco por si só é um indutor bem conhecido de apoptose, mas também pode promover a apoptose induzida por estresse oxidativo, participando desse modo numa diminuição na massa das células β . Além disso, alguns estudos sugerem que as células com depósitos de zinco privados são menos capazes de se defender contra lesões oxidativas, ressaltando as propriedades antioxidantes do zinco (CHIMIANTI *et al.*, 2006). Esse oligoelemento (Zn) é necessário para a atividade de enzimas antioxidantes citosólicas, como a superóxido dismutase (SOD) de Cu/Zn, que protegem a célula da toxicidade de espécies reativas de oxigênio (HAMASAKI; KAWASHIMA; YANAI, 2016). Portanto, o aumento da capacidade das células β para armazenar o zinco pode ajudar a proteger o pâncreas contra a depleção de zinco e/ou o estresse oxidativo frequentemente observado no DM (CHIMIANTI *et al.*, 2006).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 927.052.10.05 e CAAE: 1924.0.000.091-10, e da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o Registro n.62/2010 para a utilização das amostras de gestantes com diabetes gestacional e de gestantes saudáveis, respectivamente (Anexo 6).

5.2 AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram provenientes do biorrepositório do laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná e já possuíam seus biomarcadores quantificados. Foram utilizadas 314 amostras de sangue periférico de gestantes, destas 180 amostras são de gestantes saudáveis (grupo controle) e 134 amostras são de pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional (grupo DMG). As amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba e as amostras do grupo de gestantes diabéticas foram obtidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR).

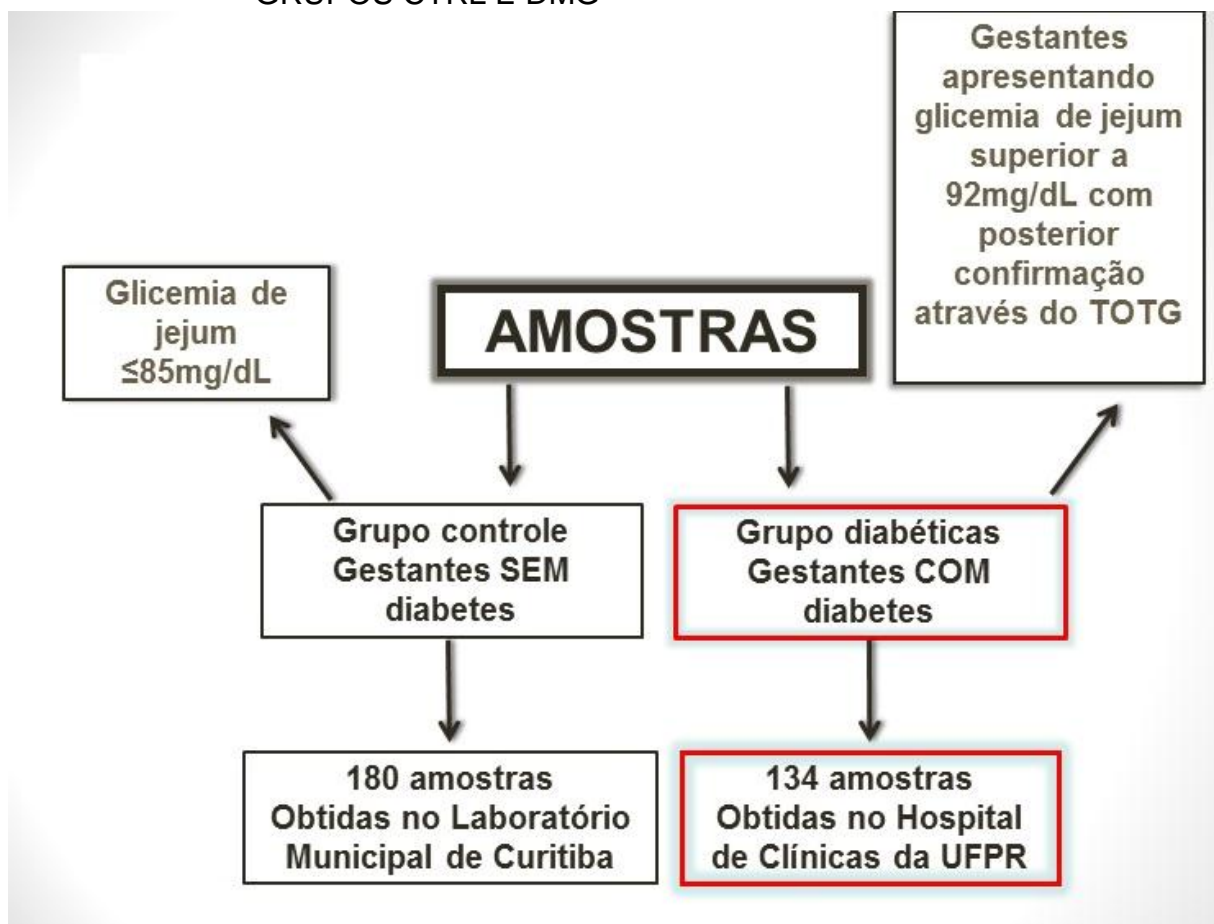
5.2.1 Caracterização das amostras

As amostras utilizadas para o estudo foram subdivididas em dois grupos designados como grupo de Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e grupo controle (CTRL), conforme figura 9. Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos

CTRL e DMG foram as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), sendo:

- Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): Gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 92mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas da ingestão da glicose;
- Grupo Controle para Diabetes Gestacional (CTRL): Gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL.

FIGURA 9 – CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CTRL E DMG



Conforme recomendações da OMS (2006) e SBD (2009), as gestantes que apresentaram glicemia de jejum entre 92 e 126 mg/dL, com posterior confirmação utilizando o TOTG (Teste Oral de Tolerância a Glicose – 75g de sobrecarga e glicemia superior a 180 mg/dL após 1 hora da ingestão da glicose) foram consideradas diabéticas gestacional (grupo DMG). Já as gestantes com glicemia de jejum inferior a 85 mg/dL, foram consideradas gestantes saudáveis (grupo CTRL).

Fonte: O autor.

5.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos das amostras de sangue periférico pelo método *salting out*, descrito por Lahiri e Nurnberger (LAHIRI; NURNBERGER, 1991) com modificações (Anexo 1) e as amostras foram diluídas com água ultrapura estéril até atingirem uma concentração entre 20 e 40 ng/ μ L. A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280nm (razão = A_{260}/A_{280}), sendo considerados adequados valores entre 1,6 e 1,9 (indicando pureza da amostra) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) através do Nanodrop/ Thermo Scientific. O critério de exclusão das amostras foi a concentração inferior a 20 ng/ μ L, o que caracteriza baixa qualidade das mesmas.

A pureza da amostra do DNA é estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,6 e 1,9 são considerados adequados (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

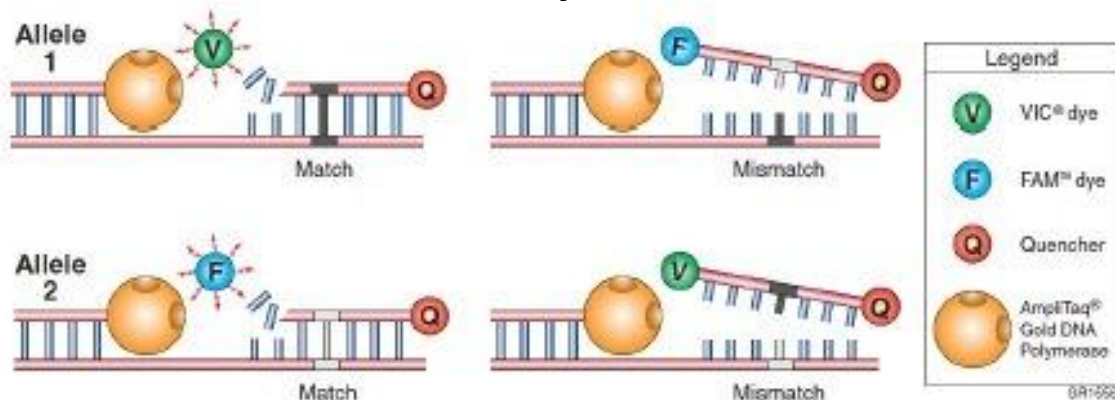
5.3 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS *TAQMAN*[®]

Para obtenção dos resultados apresentados nessa dissertação, foi utilizado o ensaio de discriminação alélica para genotipagem dos polimorfismos *rs7799039* do gene LEP e *rs13266634* do gene SLC30A8 através do método de PCR em tempo real utilizando sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, California, USA).

TaqMan[®] é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA). As sondas fluorescentes (ou fluoróforos) são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. São necessárias para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. A sonda apresenta numa extremidade um fluoróforo, e na outra um *quencher* - molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor. Os produtos da PCR são detectados através da fluorescência gerada

após a atividade da enzima *Taq DNA polimerase* (sentido 5' → 3') (NOVAIS, 2004). A figura 10 ilustra a hibridização específica das sondas e a emissão de fluorescência.

FIGURA 10 – ANELAMENTO ESPECÍFICO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE SONDAS MARCADAS COM FLUORÓFOROS VIC[®] E FAM[®] EM UM ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA



Fonte: Appliedbiosystems (2005).

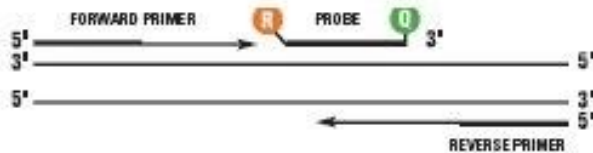
Durante a PCR em tempo real a sonda *TaqMan*[®] hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. Neste processo de amplificação, a sonda é degradada devido a atividade da *Taq DNA polimerase*, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. Esta separação resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Durante a amplificação, a emissão de luz ocorre quando a sonda hibridiza e a amplificação da sequência alvo é estabelecida – figura 11 (NOVAIS, 2004).

Assim como na PCR convencional, um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) é utilizado para amplificação da região de interesse do genoma. O diferencial do sistema de discriminação alélica é a adição de duas sondas, cada uma com especificidade para ligação em um dos alelos do SNP. Cada sonda possui um fluoróforo emissor na porção 5' (*reporter*) e um fluoróforo silenciador na extremidade 3' (*quencher*). Quando a sonda está intacta, a proximidade dos dois fluoróforos resulta na supressão da fluorescência do emissor. Durante a reação de PCR, as sondas hibridizam na região que possuem especificidade e a enzima *Taq DNA polimerase* (que realiza a extensão das fitas durante a PCR) cliva a sonda, já que

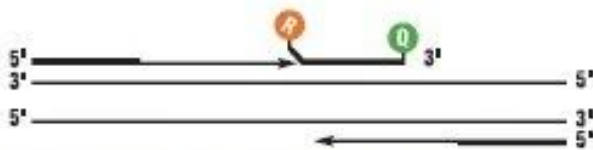
possui atividade de nucleasse 5'-3'. Os fluoróforos são separados pela clivagem e ocorre a emissão da fluorescência do emissor. Cada sonda é marcada com um tipo distinto de fluoróforo. No caso dos polimorfismos genotipados nessa dissertação, utilizou-se a marcação VIC[®] e FAM[®]. A emissão de diferentes fluoróforos detectada ao fim da reação de PCR fornece o genótipo do paciente, já que indivíduos homocigotos contêm apenas a emissão de fluorescência de um dos fluoróforos (VIC[®] ou FAM[®]), enquanto os indivíduos heterocigotos possuem ambos (CONTEXTEUROGENTEC; NOVAIS, 2004; APPLIEDBIOSYSTEMS, 2005).

FIGURA 11 – PCR EM TEMPO REAL COM SONDA *TAQMAN*[®]

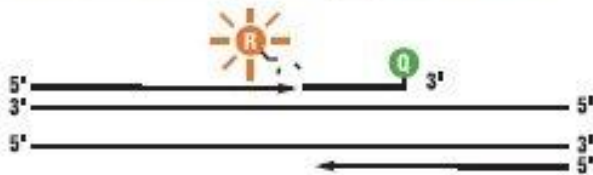
1. Polimerização: Um corante fluorescente *Repórter* (R) e um *Quencher* (Q) estão ligados às extremidades 5' e 3' de uma sonda *TaqMan*[®] respectivamente.



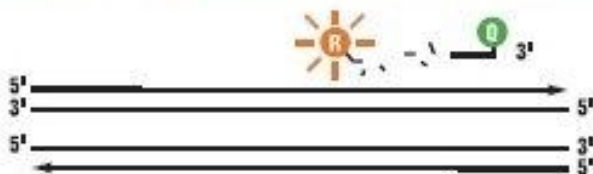
2. Quando a sonda está intacta, a emissão do corante *Repórter* (R) é extinta.



3. Clivagem: Durante o ciclo de extensão, a *DNA polimerase* cliva o corante *Repórter* (R) da sonda.



4. Polimerização completa: Uma vez separado do *Quencher* (Q), o corante *Repórter* (R) emite sua fluorescência.

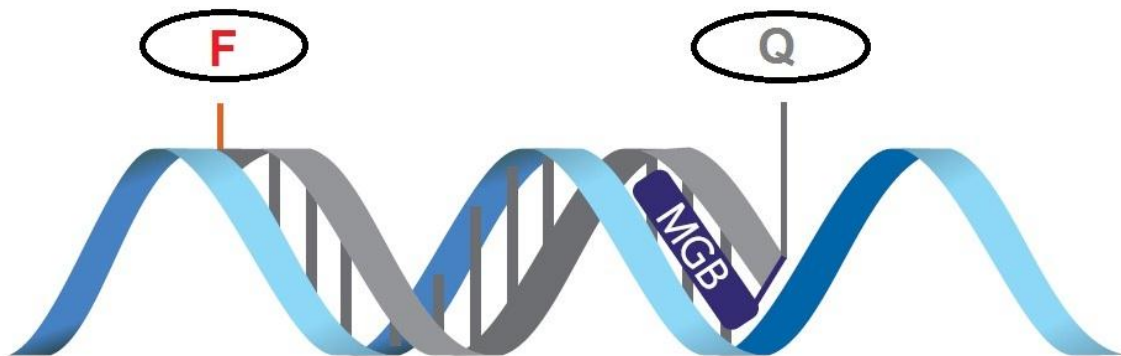


Fonte: Adaptado de Biosynthesis (<http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>).

Além disso, as sondas *Taq Man*[®] incorporam um ligante de ranhura menor (*Minor Groove Binder* - MGB) na extremidade 3' (figura 12). A molécula de MGB liga-se ao sulco menor da hélice do DNA, estabilizando a hibridação e há consequente melhora dos ensaios. O MGB também aumenta a TM (temperatura de *Melting*), por

isso, as sondas contendo tal estrutura têm temperaturas de fusão mais elevadas e maior especificidade (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

FIGURA 12 – MOLÉCULA DE MGB



F = Fluoróforo
Q = Quencher
MGB = Minor Groove Binder

Fonte: Adaptado de IDT - *Integrated DNA Technologies* (<https://www.idtdna.com/pages/products/gmp-manufacturing/mgb-probes>).

Foram analisados 2 polimorfismos de um único nucleotídeo em 2 genes alvo pelo método *TaqMan*[®] (tabela 5):

TABELA 5 – POLIMORFISMOS GENOTIPADOS PELO MÉTODO *TAQMAN*[®]

GENE (OMIM)	RC	LOCAL NO GENE	VARIANTE	CÓDIGO <i>TAQMAN</i>[®]
<i>LEP</i> (164160)	7q31.3	Região promotora	<i>rs7799039</i> : G>A	C___1328079_10 [SG, 40x]
<i>SLC30A8</i> (611145)	8q24.11	Éxon 9	<i>rs13266634</i> : C>T	C___357888_10 [SG, 40x]

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*[®] (<http://omim.org/>).

RC: Região cromossômica.

Reference SNP database: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rs7799039>), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/169026>).

Código *TaqMan*[®]: Específico para cada polimorfismo (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Os ensaios de PCR foram realizados em equipamento de PCR em tempo real (termociclador) *7500 FAST (Applied Biosystems/ Life Technologies)* utilizando as sondas fluorescentes (fluoróforos) *TaqMan[®]* no laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná, sob orientação e autorização do Prof. Dr. Geraldo Picheth.

Para a reação utilizou-se os reagentes *TaqMan[®] Master Mix e SNP Genotyping Assay* (sonda de hidrólise), além de água ultrapura (mili-Q), os quais compõem o Super Master Mix (SMM). Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços, nas quais foram distribuídos o SMM mais as amostras de DNA. Todos os ensaios foram realizados com dois controles negativos sem DNA (apenas o mix de reação - Super Master Mix) para cada SNP em cada placa para monitoramento de contaminações e também realizou-se o preparo das placas em capela de fluxo laminar, a fim de proteger os reagentes de contaminação. A tabela 6 representa os reagentes e seus respectivos volumes utilizados nas reações de PCR em tempo real.

TABELA 6 – PROTOCOLO DEFINIDO PARA A TÉCNICA DE *TAQMAN*[®] PARA PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	VOLUME (µL)
Master Mix*	3,0
SNP Genotyping Assay (sonda <i>TaqMan</i> [®])*	0,1
Água mili-Q (ultra pura)*	1,9
DNA (20 – 40ng/ µL)	3,0

CICLAGENS - 7500FAST (APPLIED BIOSYSTEMS) PCR EM TEMPO REAL

TERMOCICLADOR - ETAPAS DA PCR	TEMPERATURA	TEMPO
1 – Desnaturação inicial	95 °C	600 s
2 – Desnaturação	94 °C	40 s
3 – Hibridização dos <i>primers</i>	TM	40 s
4 – Extensão	60°C	120 s
5 – Repetir 33 vezes as etapas 2, 3 e 4		
6 – Extensão final	72 °C	600 s
7 – Hold (resfriamento, espera)	4 °C	∞

Master Mix (DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão, ativadores, nucleotídeos). * A mistura dos reagentes forma o Super Master Mix, posteriormente adiciona-se a amostra de DNA para ocorrência da reação de amplificação.

TM, temperatura de hibridização (ou *melting*) para o *rs7799039* e para o *rs13266634* = 60°C.

As leituras das fluorescências das reações foram feitas pelo aparelho *7500 FAST*, onde o início do ciclo ocorre a 95°C no primeiro estágio de espera (10 min). Posteriormente, 40 ciclos foram realizados compostos por 2 etapas: Desnaturação a 94°C e hibridização das sondas e extensão da polimerase a 60°C.

Após o fim das reações, o programa *7500 Fast SDS System Software* plota os resultados da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida à amplificação (anexos 2 e 3). As curvas de amplificação estão ilustradas nos anexos 4 e 5.

As genotipagens foram obtidas com mais de 95% de qualidade, dado reportado pelo software de análise de dados.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genóticas e alélicas (com 95% do intervalo de confiança) das amostras e também, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram obtidas com o programa livre *DeFinetti program* (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para estas análises os genótipos foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

As variáveis contínuas foram analisadas para verificação da normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As variáveis altura e IMC (índice de massa corporal) apresentaram distribuição “normal”. As demais variáveis: Idade, peso, semana de gestação, creatinina, albumina, glicemia em jejum, 2 horas após sobrecarga de glicose, história familiar de diabetes e hemoglobina glicada (HbA1C) não apresentaram distribuição normal ($P < 0,01$).

Para as variáveis que apresentaram normalidade, foi realizado o “T” de *Student* (Chi-quadrado), onde os valores foram representados por média e desvio padrão. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal (não-paramétricas), realizou-se o teste “U” de *Mann-Whitney*, onde os resultados foram representados por mediana e intervalo interquartil. As análises foram realizadas com o pacote estatístico *Statistica v.8.0* (*StatSoft, Tulsa, CA*).

Uma probabilidade (P) inferior a 0,05 ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 7 representa as características demográficas e laboratoriais das amostras.

TABELA 7 – DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle, n=180	DMG, n=134	P
Idade (anos)	30 (28-33)	32 (28-36)	0.034*
Peso (kg)	66 (58-73)	82 (71-93)	<0,001*
Altura (m)	1,61 ± 0,06	1,60 ± 0,06	0,109
IMC (kg/m ²)	26,1 ± 5,1	32,6 ± 6,4	<0,001
História familiar de diabetes (%)	-	66.7	-
Glicemia em jejum (mg/dL)	84 (79-88)	87 (82.5-97.5)	<0,001*
Glicose 2-h, 75g (mg/dL)	86 (99-88)	162 (149-175)	<0,001*
HbA1c (%)	-	5,8 (5,2-6,0)	-
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,8-0,9)	0,7 (0,6-0,8)	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,3 (3,9-4,6)	3,4 (3,1-3.6)	<0,001*

CTRL = Grupo controle de gestantes saudáveis, DMG = Grupo pacientes diabéticas gestacionais.

Os valores são média ± DP (Desvio Padrão), mediana (intervalo interquartil) ou %.

-, nenhuma informação avaliável. HbA1c = Hemoglobina glicada, IMC = Índice de massa corporal. P-valor, teste T Student, *Mann-Whitney U test.

Conforme apresentado na tabela 7, as gestantes saudáveis e diabéticas gestacionais apresentaram diferença significativa na média do parâmetro idade. Como se sabe, o aumento da idade é proporcional com o risco de desenvolvimento de DMG (COUSTAN *et al.*, 1989). Na amostra analisada a mediana obtida foi de 32 anos para as gestantes diabéticas, dado em conformidade com achados na literatura, onde há relatos que a prevalência de Diabetes *mellitus* gestacional aumenta com a idade, tornando-se mais frequente em mulheres a partir dos 30 anos

de idade (MURGIA *et al.*, 2008). É relevante mencionar que a diferença significativa na idade entre os grupos em estudo ($P=0,034$) é pequena, sendo esperado que as variáveis laboratoriais em estudo não sejam afetadas pela idade.

Quando se analisa em conjunto o peso e altura, é expressivo o aumento ponderal no grupo DMG ($P<0,001$), considerando que a mediana da altura não foi diferente entre os grupos ($P=0,109$).

O índice de massa corpórea (IMC), variável que combina as variações de peso em relação à altura, confirma o excesso ponderal no grupo DMG ($P<0,001$). O aumento no IMC é um fator de risco a muito conhecido para o DMG, bem como para o desenvolvimento futuro de diabetes tipo 2 (MURGIA *et al.*, 2008). Gestantes com $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ apresentam maior propensão ao DMG, em concordância com nossos dados, como demonstrado em outras populações (TAKHSHID; ZARE, 2015).

A história familiar de diabetes, reconhecidamente aumenta o risco para o desenvolvimento de DMG (KWAK *et al.*, 2013). O grupo DMG em estudo apresentou cerca de 67% das pacientes com relatos de diabetes na família considerando os pais, irmãos e avós (Tabela 7). COSTA e colaboradores (2015), também em população euro-brasileira, reportaram 52,7% de casos de histórico familiar de diabetes nas gestantes com DMG. A Associação Americana de Diabetes classifica a história familiar de diabetes positiva para o DM2 em parentes de primeiro grau como alto risco para desenvolvimento de DMG (ADA, 2015). Em estudo realizado por Murgia, *et al.* (2008), mulheres com DMG também relataram possuir parentes de primeiro grau com diabetes, confirmando que DMG e Diabetes *mellitus* tipo 2 possuem o mesmo caráter genético. As mães com diabetes gestacional têm maior incidência de desenvolvimento de diabetes tipo 2, enquanto que seus filhos têm maior risco de desenvolver obesidade (HUIDOBRO *et al.*, 2010).

O grupo controle em nosso estudo não disponibiliza a informação sobre história familiar, informação não disponível nos protocolos acessados. Estudos com gestantes saudáveis em Euro-descendentes em Portugal e na França mostraram uma frequência de histórico familiar para diabetes de 16% e 19%, respectivamente (JAFARI-SHOBEIRI *et al.*, 2015; ALI ABDELHAMID *et al.*, 2016). Se considerarmos este contexto, nosso grupo DMG apresenta um histórico familiar (66,7%) cerca de 3 a 4 vezes superior a gestantes saudáveis.

As determinações da glicemia de jejum e 2-horas após sobrecarga de 75 g de glicose anidra via oral confirmam a presença de diabetes gestacional (Tabela 7),

considerando os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015), que preconiza concentrações diagnósticas ≥ 92 e < 126 mg/dL para o jejum e ≥ 153 mg/dL para 2-h, 75g, após sobrecarga (Figura 4). O principal discriminador foi a glicemia após 2-h, 75g ou pós-sobrecarga; a OMS recomenda o emprego deste teste como método ideal para o diagnóstico do diabetes, tanto em bases individuais como em estudos epidemiológicos, pois é mais sensível para identificar indivíduos com diabetes e alterações da tolerância à glicose (GROSS, *et al.* 2002). É relevante ressaltar que gestantes com glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, classificadas como diabetes pré-gestacional, não foram incluídas no presente estudo.

A hemoglobina glicada é um marcador de controle glicêmico, usado como uma ferramenta de triagem de diabetes (ARNOLD; WANG, 2014). Concentrações superiores a 6,5% indicam controle glicêmico inadequado ou a presença de diabetes (SBD, 2015). A mediana da HbA1c para o grupo DMG de 5,8% (Tabela 7) sugere bom controle glicêmico nestas pacientes. As concentrações para o grupo controle não estão disponíveis. O uso da HbA1c no diabetes gestacional para diagnóstico ou controle é controverso (ARNOLD; WANG, 2014). Como a patologia se desenvolve em período relativamente curto (máximo de 9 meses), a hiperglicemia resultante, usualmente moderada, pode não permitir a formação de quantidade expressiva da HbA1c, cujo tempo de meia-vida é cerca de 2 meses (ROOHK; ZAIDI, 2008), afetando a sensibilidade deste biomarcador para o diagnóstico do DMG.

Os parâmetros IMC, idade e HbA1C dos grupos de gestantes em questão se assemelham aos grupos de mulheres grávidas de estudos similares realizados por Huopio *et al.* (2013) e Takhshid; Zare (2015), onde houve diferença significativas nesses parâmetros em estudo entre o grupo de gestantes saudáveis e gestantes diabéticas, corroborando o fato de que a obesidade e também o aumento da idade podem exercer influência no desenvolvimento do DMG.

A creatinina sérica é um marcador de filtração glomerular (BAJWA *et al.*, 2013; CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, 2013). As medianas das concentrações de creatinina foram significativamente diferentes, sendo que o grupo saudável apresentou maior concentração (Tabela 7). Uma possível explicação reside no aumento do fluxo urinário das pacientes com DMG, decorrente da hiperglicemia (diurese osmótica). Este aumento do fluxo urinário favorece a excreção (ou *clearance*) da creatinina, resultando em sua redução sérica (POWE e THADHANI, 2011).

É relevante pontuar que em ambos os grupos estudados a concentração da creatinina sérica se encontra no intervalo de referência (0,6-1,3 mg/dL), sugerindo que as pacientes em estudo não apresentam lesão renal manifesta (SBN, 2011).

A concentração da albumina sérica, no contexto do presente estudo, é um marcador de perda proteica, principalmente pelo sistema renal e nutricional (BIESENBACH e ZAZGORNİK, 1989). Está descrito na literatura que mulheres com diabetes e albumina normal apresentam um aumento de 3 a 4 vezes na excreção urinária de albumina após a 20ª semana de gestação (MCCANCE *et al.*, 1989).

O grupo DMG apresenta mediana da albumina sérica significativamente menor ($P < 0,001$) quando comparado a controles saudáveis (Tabela 7). Resultados similares foram descritos para gestantes com diabetes gestacional (WEISS, 2014). Esta redução da albuminemia na presença do DMG pode ser explicada por um aumento de perda proteica nestas pacientes associada a um maior fluxo urinário decorrente da hiperglicemia (discutido na creatinina). Outro elemento que pode ter contribuído para a redução da albumina é o aumento da pressão arterial, frequente no DMG, que favorece a perda proteica. Durante a gestação há um aumento de 50% no sangue circulante (DAVISON e DUNLOP, 1980; CARPENTER, 2007), que ocorre devido à vasodilatação induzida por vários elementos. Como há um aumento no sangue circulante, há a presença de maior quantidade de água, o que pode explicar a diminuição na concentração da proteína total e albumina.

Nosso estudo não permite descartar, que as pacientes com DMG, majoritariamente obtidas no HC-UFPR, pertençam a uma classe social menos favorecida e, portanto, com aporte proteico insuficiente em sua dieta. Esta redução na albumina pode ser decorrente do favorecimento do crescimento fetal utilizando as reservas maternas, não supridas pela dieta (KAYSEN, *et al.*, 1986).

As tabelas 8 e 9 apresentam as frequências genótípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg das variantes *rs7799039* e *rs13266634* dos genes LEP e SLC30A8, respectivamente.

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE LEP NAS AMOSTRAS EM ESTUDO

Gene/Polimorfismo		Controle, n=180	DMG, n=134	P
<i>LEP</i> , rs7799039				0,627
	G/G	67 (37,2%)	57 (42,5%)	
	G/A	81 (45,0%)	56 (41,8%)	
	A/A	32 (17,8%)	21 (15,7%)	
FAM	A-alelo	40,3%	36,6%	0,345*
	[95%IC]	[35-45%]	[31-42%]	
Dominante	GG vs GA+AA	67/113	57/77	0,341
Recessivo	AA vs GG+GA	32/148	21/113	0,622

Os valores são n(%).

FAM, frequência do alelo menor ou raro. As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) para os polimorfismos nos dois grupos.

P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*.

95% IC- intervalo de confiança de 95%.

TABELA 9 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO GENE SLC30A8 NAS AMOSTRAS EM ESTUDO

Gene/Polimorfismo		Controle, n=180	DMG, n=134	P
<i>SLC30A8</i> , rs13266634				0,522
	C/C	99 (55,1%)	82 (61,2%)	
	C/T	62 (34,4%)	41 (30,6%)	
	T/T	19 (10,5%)	11 (8,2%)	
FAM	T-alelo	27,8%	23,5%	0,227*
	[95%IC]	[23-32%]	[18-29%]	
Dominante	CC vs GT+TT	99/81	82/52	0,272
Recessivo	TT vs CC+CT	19/161	11/123	0,484

Os valores são n(%).

FAM, frequência do alelo menor ou raro. As frequências genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) para os polimorfismos nos dois grupos.

P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*.

95% IC- intervalo de confiança de 95%.

Tanto o gene LEP quanto o SLC30A8 apresentaram um $P > 0,05$, isto mostra que não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para os polimorfismos em questão.

As frequências dos polimorfismos analisados estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A frequência do alelo menos comum (A) do polimorfismo *rs7799039* do gene LEP (40% - grupo controle e 37% - grupo DMG) foi semelhante à população caucasiana em geral (49%), porém diferente da população africana, onde a frequência do alelo menos frequente (A) é cerca de 11% e ainda diferente da população japonesa, onde o alelo menos frequente é o G (23%), de acordo com o HapMap (<http://www.hapmap.org/>). A frequência do alelo menos comum (T) do polimorfismo *rs13266634* do gene SLC30A8 (28% - grupo controle e 24% - grupo DMG) foi semelhante às populações caucasiana e africana, porém diferente da

população japonesa (24, 18% e 45%, respectivamente), de acordo com o HapMap (<http://www.hapmap.org/>), conforme apresentado na tabela 10:

TABELA 10 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS *rs7799039* E *rs13266634* DOS GENES LEP E SLC30A8, RESPECTIVAMENTE, COM DADOS DA LITERATURA

GENE/ VARIANTE	GRUPO ÉTNICO	ALELO MENOS FREQUENTE	FAM	ESTUDO
LEP/ <i>rs7799039</i>	Euro-brasileiros			
	CTRL	A	40%	Presente estudo
	DMG	A	37%	Presente estudo
	Nigerianos (Yoruban)	A	99%	HapMap
	Caucasianos alemães	A	58%	(OPGEN-RHEIN <i>et al.</i> , 2010)
	Caucasianos (CEU)	A	49%	HapMap
	Euro-brasileiros			
	CTRL	A	44%	
	DM2	A	39%	(FRIGERI, 2015)
	Euro-Brasileiros	A	41%	(LUPERINI <i>et al.</i> , 2015)
	Egípcios	A	40%	(MEHANNA <i>et al.</i> , 2016)
	Asiáticos da China	A	30%	(WU <i>et al.</i> , 2011)
	Japoneses (JPT)	G	23%	HapMap
Africanos (ASW)	A	11%	HapMap	
SLC30A8/ <i>rs13266634</i>	Euro-brasileiros			
	CTRL	T	28%	Presente estudo
	DMG	T	24%	Presente estudo
	Han Chineses	T	46%	(ZHANG, Y. <i>et al.</i> , 2015)
	Japoneses (JPT)	T	45%	HapMap
	Asiáticos da China	T	43%	(ZHENG, X. <i>et al.</i> , 2012)
	Caucasianos da Polônia	T	33%	(KURZAWSKI <i>et al.</i> , 2012)
	Euro-brasileiros			
	CTRL	T	26%	
	DM2	T	23%	(FRIGERI, 2015)
Caucasianos (CEU)	T	24%	HapMap	
Africanos (ASW)	T	18%	HapMap	

Destacado em negrito a frequência do alelo menos frequente da população japonesa (JPT) do gene LEP, cujo alelo é o (G).

FAM - Frequência do alelo menos frequente. CTRL - Grupo de gestantes controle. DMG - Grupo de gestantes diabéticas. DM2 - Diabéticos tipo 2. CEU - Residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. ASW - Africanos com ascendência no sudoeste dos

EUA. JPT- Japoneses em Tóquio, Japão. (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r3_B36/#search).

A busca de associação entre genótipos e biomarcadores foi realizada com análise de variância (*one-way ANOVA*), onde os genótipos foram classificados como 1 = homozigoto frequente, 2 = heterozigoto e 3 = homozigoto raro. As análises de variância para o polimorfismo *rs13266634* com os genótipos, concentrações séricas dos biomarcadores do grupo controle (CTRL) e dados clínicos das pacientes com DMG mostram associação entre o gene *SLC30A8* com as concentrações de creatinina e ureia séricas. Os alelos T e C mostraram associação com creatinina ($P=0,021$) e ureia ($P=0,003$) apenas no grupo CTRL. As comparações com os genótipos CC, CT e TT são apresentadas na figura 13.

FIGURA 13 – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *rs13266634* DO GENE SLC30A8 COM AS CONCENTRAÇÕES DE CREATININA E UREIA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

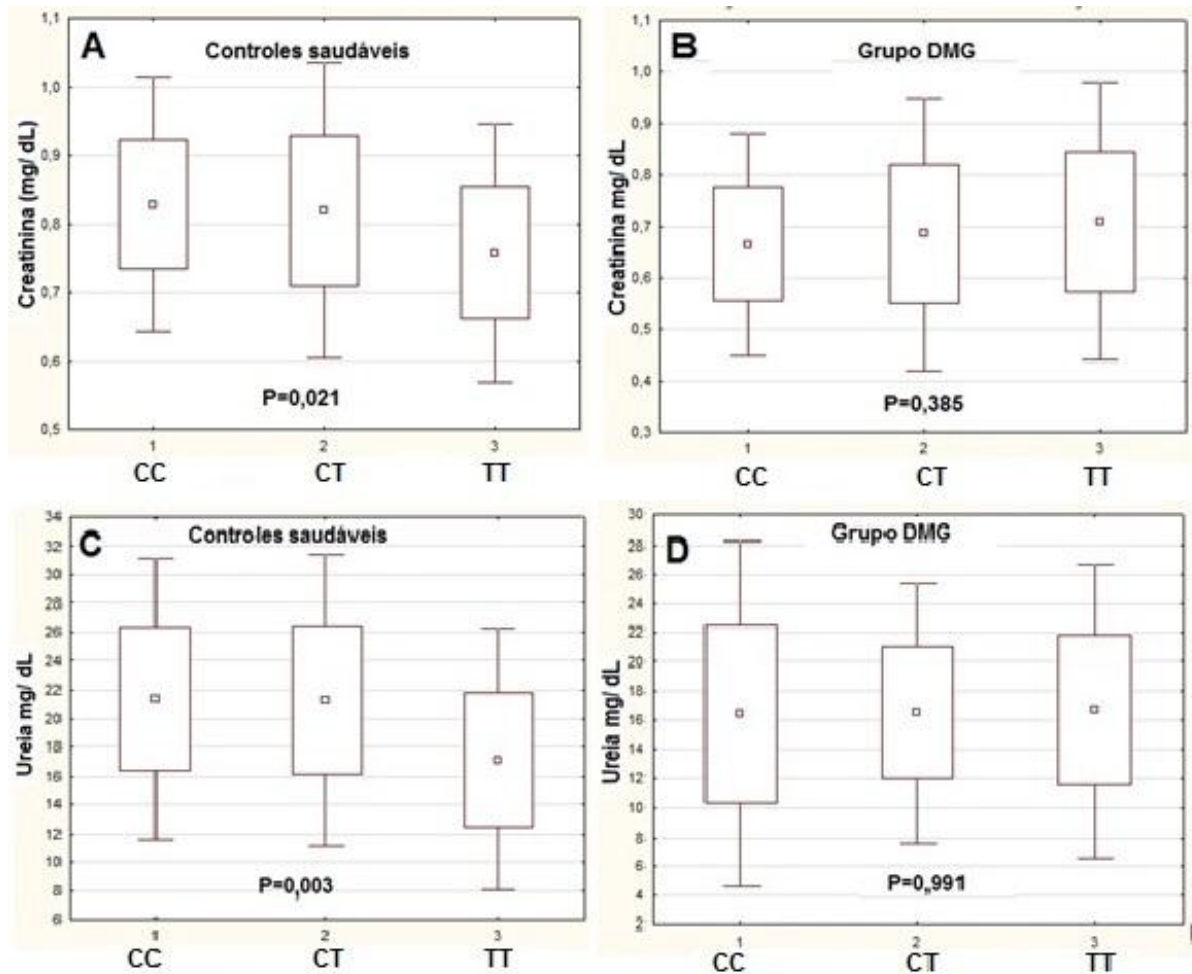


Fig 13 A e B: Associação da creatinina sérica com os genótipos CC, CT TT dos grupos controle e DMG.

Fig 13 C e D: Associação da ureia sérica com os genótipos CC, CT TT dos grupos controle e DMG.

Os valores são média (quadrado), 1-DP (caixas), e 2-DP (barras verticais); P probabilidade, Análise de variância (ANOVA).

Comparações entre os genótipos CC vs TT, $P < 0,05$, para os grupo controle e $P > 0,05$ para o grupo DMG.

Portadores do alelo T em homozigose (TT) do polimorfismo *rs13266634* do gene SLC30A8 apresentaram menor concentração de creatinina e ureia, marcadores de função de filtração renal (Figura 13) na ausência de DMG. Este processo é frequentemente associado ao aumento do fluxo renal, propiciando maior eliminação de urina e clearance maior de creatinina e ureia.

Em gestantes com DMG o efeito não foi observado, sugerindo ser sutil. O aumento do fluxo urinário associado a hiperglicemia (diabetes) pode ter mascarado este efeito sutil neste grupo.

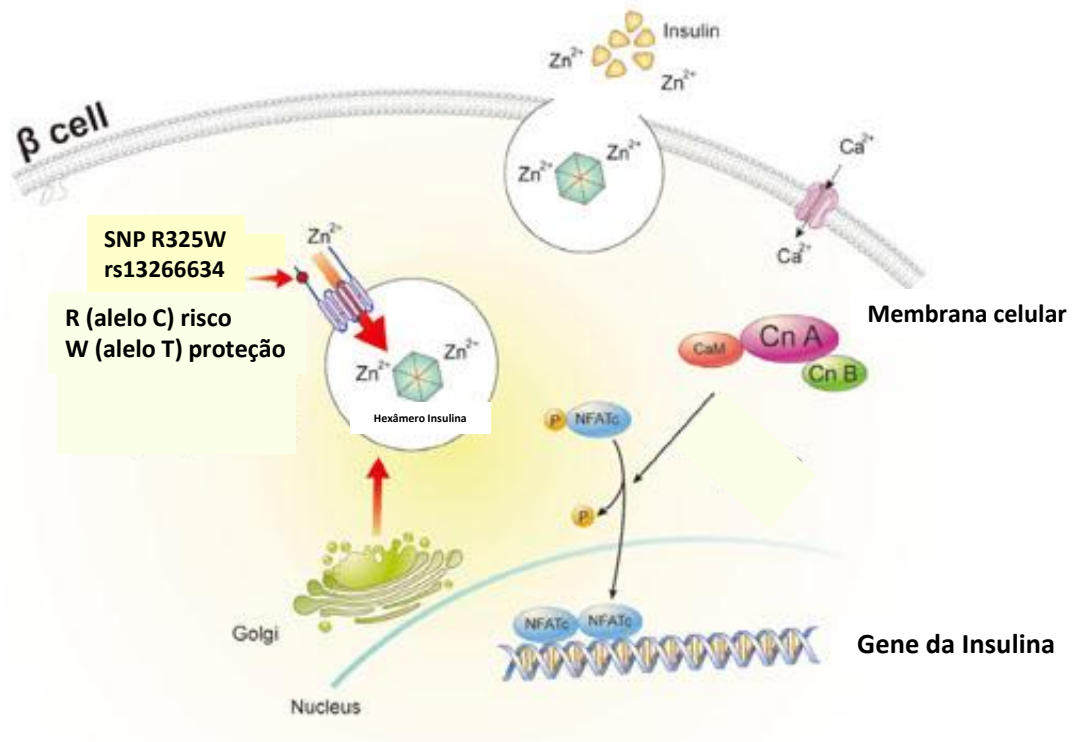
O Zn pode contribuir para a preservação da função renal já que esse oligoelemento é necessário para a atividade de enzimas antioxidantes citosólicas, como a superóxido dismutase (SOD), que protegem a célula da toxicidade de espécies reativas de oxigênio (HAMASAKI; KAWASHIMA; YANAI, 2016).

O gene SLC30A8 é ativo somente na célula β -pancreática e apesar de esforços, não foi possível estabelecer uma relação causal entre o polimorfismo *rs13266634* com os achados da Figura 13. O polimorfismo não-sinônimo promove uma alteração entre triptofano e arginina na posição 325 da proteína ZnT8, sendo também designado como R325W.

O alelo mais frequente C (ou R) foi associado a aumento do risco de DM2 em população francesa (SLADEK *et al.*, 2007).

A figura 14 representa de forma esquemática a ação da proteína ZnT8 no transporte de zinco e estocagem dos grânulos de insulina (hexâmetros de insulina) no interior da célula β .

FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DA AÇÃO DA PROTEÍNA ZNT8 E SÍTIO DO POLIMORFISMO *rs13266634*, NA ESTOCAGEM DOS GRÂNULOS DE INSULINA NA CÉLULA β -PANCREÁTICA



A presença do polimorfismo R325W no gene SLC30A8 que codifica para o ZnT8 pode influenciar o mecanismo de secreção da insulina. O alelo W codifica um transportador de zinco mais ativo em relação ao alelo R.

Fonte: Adaptado de Kim *et al.*, Pharmacogenomics J, 11:191-8, 2011.

No presente não há uma hipótese consolidada sobre o efeito do polimorfismo *rs13266634* e sua susceptibilidade ao diabetes. A sugestão de Kang *et al.*, (2008) de que o alelo T, especialmente na forma homocigota (TT), promove uma proteína com maior atividade no transporte de zinco, e conseqüentemente maior disponibilidade deste hormônio, atuaria como um fator de proteção ao DM2, tem base frágil, com análise da relação insulina-glicemia (SALGADO *et al.*, 2010).

Também a hipótese de que o polimorfismo *rs13266634* se encontra em próximo a região C-terminal da proteína e a variante rara (WW) apresentar motivo proteico suscetível a regulação por fosforilases, necessita de comprovação.

Em síntese, no presente, não há uma explicação ou mesmo uma hipótese consistente que explique a redução nas concentrações séricas de ureia e creatinina observadas em nosso estudo. Como hipóteses alternativas, não é possível descartar que o polimorfismo em questão esteja em desequilíbrio de ligação com outro gene,

este sim, responsável pelo efeito observado. Também não é possível descartar que este seja um achado fortuito decorrente do tamanho amostral empregado.

Certamente novos estudos precisam ser desenhados e implementados para responder sobre o efeito do *rs13266634* nos marcadores de filtração renal estudados.

CONCLUSÕES

- Os polimorfismos *rs7799039* do gene LEP e *rs13266634* do gene SLC30A8 não foram associados ao Diabetes *mellitus* gestacional na população em estudo.
- As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *rs7799039* do gene LEP das amostras em estudo foram similares às outras populações caucasianas em outros estudos prévios.
- A frequência do polimorfismo *rs7799039* do gene LEP das amostras deste estudo foi significativamente maior em relação à população africana quando comparada a outros estudos realizados.
- O alelo raro do polimorfismo *rs7799039* do gene LEP da população deste estudo foi o alelo (A), diferentemente da população japonesa onde o alelo menos comum foi o (G) em estudos anteriores.
- As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *rs13266634* do gene SLC30A8 das amostras em estudo foram similares às outras populações caucasianas e africanas.
- A frequência do polimorfismo *rs13266634* do gene SLC30A8 das amostras deste estudo foi significativamente menor em relação população japonesa quando comparada a outros estudos realizados, onde a etnia pode ser um fator diferencial nas frequências alélicas/genotípicas.
- O genótipo TT do polimorfismo *rs13266634* (R325W) foi associado a redução nas concentrações séricas de creatinina e ureia, somente no grupo de gestantes saudáveis.

REFERÊNCIAS

ABI-ABIB *et al.* DIABETES NA GESTAÇÃO. **Revista HUPE**. v. 13, n.3, p. 40-47. 2014.

ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 33, p. S62-S69. 2010.

ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 37, n.1, p. S81-90. 2014.

ADA. American Diabetes Association - Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers. **Clin Diabetes**. v. 33, n.2, p. 97-111. 2015.

ADA. American Diabetes Association - Standards of medical care. **Diabetes Care**. v. 39 Suppl 1, p. S1-2. 2016.

ALHARBI, K. K. *et al.* Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) Gly927Arg: correlation with gestational diabetes mellitus in Saudi women. **Biomed Res Int**. v. 2014, p. 146495. 2014.

ALI ABDELHAMID, Y. *et al.* Survivors of intensive care with type 2 diabetes and the effect of shared care follow-up clinics: study protocol for the SWEET-AS randomised controlled feasibility study. **Pilot Feasibility Stud**. v. 2, p. 62. 2016.

ANDERSON, J. L. *et al.* Progress in unraveling the genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. **Curr Atheroscler Rep**. v. 9, n.3, p. 179-86. 2007.

APPLIEDBIOSYSTEMS. Allelic Discrimination Getting Started Guide
AppliedBiosystems 7300/7500/7500 Fast Real Time PCR System. 2005.

ARNOLD, L. W.; WANG, Z. The HbA1c and All-Cause Mortality Relationship in Patients with Type 2 Diabetes is J-Shaped: A Meta-Analysis of Observational Studies. v. 11, n.2, p. 138-152. 2014.

BAJWA, S. J. S. *et al.* Renal diseases during pregnancy: Critical and current perspectives. **Journal of obstetrics anaesthesia and critical care**. v. 3, n.1, p. 7-15. 2013.

BALSELLS, M. *et al.* Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 350, p. h102. 2015.

BALTAR; ANDRADE. DIABETES GESTACIONAL: IMPORTÂNCIA DE MAIOR INFORMAÇÃO À GESTANTE DE BAIXA RENDA. **Promoção da saúde**. v. 1, s/p. 2005.

BASSO *et al.* Insulinoterapia, controle glicêmico materno e prognóstico perinatal – Diferença entre o diabetes gestacional e o clínico. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 29, p. 253-9. 2007.

BIESENBACH, G.; ZAZGORNIK, J. Incidence of transient nephrotic syndrome during pregnancy in diabetic women with and without pre-existing microalbuminuria. **BMJ**, v. 299, n. 6695, p. 366–7, 1989.

BRORSSON, C. *et al.* A non-synonymous variant in SLC30A8 is not associated with type 1 diabetes in the Danish population. **Mol Genet Metab**. v. 94, n.3, p. 386-8. 2008.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; PAGE, K. A. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. **Nature Reviews Endocrinology**. v. 8, n.11, p. 639-649. 2012.

CARLIN, A.; ALFIREVIC, Z. Physiological changes of pregnancy and monitoring. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. v. 22, n.5, p. 801-23. 2008.

CARPENTER, M. W. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S246–50, 2007.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Diabetes and women's health across the life stages: A public health perspective. 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/women.pdf>>. Acesso em: 11/09/15.

CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, R. A. Renal physiology of pregnancy. **Adv Chronic Kidney Dis**. v. 20, n.3, p. 209-14. 2013.

CHIMIANTI, F. *et al.* In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. **J Cell Sci**. v. 119, n.Pt 20, p. 4199-206. 2006.

CONTEXTEUROGENTEC, Q. P. Q. A. T. G. T. G. P. M. A. A. R. I. T. C. B. qPCR guide. 64. Disponível em: <www.eugentec.com>. Acesso em: 11/09/15.

COSTA, C. D. D. **VARIABILIDADE DOS GENES *FTO*, *RAGE* E *MMP9* NO DIABETES GESTACIONAL**. 94 f. - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, 2015.

COUSTAN, D. R. *et al.* Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. **Obstet Gynecol**. v. 73, n.4, p. 557-61. 1989.

DAHER, S. *et al.* Inflammatory mediator gene polymorphisms and gestational diabetes: a review of the literature. **J Reprod Immunol**. v. 90, n.1, p. 111-6. 2011.

DAVIDSON, H. W.; WENZLAU, J. M.; O'BRIEN, R. M. Zinc transporter 8 (ZnT8) and beta cell function. **Trends Endocrinol Metab**. v. 25, n.8, p. 415-24. 2014.

DAVISON, J. M.; DUNLOP, W. Renal hemodynamics and tubular function normal human pregnancy. **Kidney Int**, v. 18, n. 2, p. 152–61, 1980.

FAGHIH, H. *et al.* SLC30A8 gene polymorphism (rs13266634 C/T) and type 2 diabetes mellitus in south Iranian population. **Mol Biol Rep**. v. 41, n.5, p. 2709-15. 2014.

FLANNICK, J. *et al.* Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 46, n.4, p. 357-63. 2014.

FLORES LE-ROUX, J. A.; BENAIGES BOIX, D.; PEDRO-BOTET, J. [Gestational diabetes mellitus: importance of blood glucose monitoring]. **Clin Investig Arterioscler.** v. 25, n.4, p. 175-81. 2013.

FRIEDMAN, J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. **Nutr Rev.** v. 60, n.10 Pt 2, p. S1-14; discussion S68-84, 85-7. 2002.

FRIGERI, H. R. **Variabilidade Genética e Sequenciamento de Genes associados ao Diabetes *mellitus* tipo 2 e à Obesidade.** 129 f. - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba - PR, 2015.

GASPAR, C. N.; NASCIMENTO, M. D. J. P. D. Repercussões da Diabetes materna para o neonato. **Rev. Enferm. UNISA.** v. 5, p. 57-61. 2004.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 46. n. 1. P. 16-26. 2002.

HAMASAKI, H.; KAWASHIMA, Y.; YANAI, H. Serum Zn/Cu Ratio Is Associated with Renal Function, Glycemic Control, and Metabolic Parameters in Japanese Patients with and without Type 2 Diabetes: A Cross-sectional Study. **Front Endocrinol (Lausanne).** v. 7, p. 147. 2016.

HOFFSTEDT, J. *et al.* A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. **Hormone and Metabolic Research.** v. 34, n.7, p. 355-9. 2002.

HOLLEGAARD, M. V.; BIDWELL, J. L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. **Genes Immun.** v. 7, n.4, p. 269-76. 2006.

HUIDOBRO, A. *et al.* Gestational diabetes, comparison of women diagnosed in second and third trimester of pregnancy with non GDM women: Analysis of a cohort study. **Revista Medica De Chile**. v. 138, n.3, p. 316-321. 2010.

HUNSBERGER, M.; ROSENBERG, K. D.; DONATELLE, R. J. Racial/ethnic disparities in gestational diabetes mellitus: findings from a population-based survey. **Womens Health Issues**. v. 20, n.5, p. 323-8. 2010.

HUOPIO, H. *et al.* Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. **Eur J Endocrinol**. v. 169, n.3, p. 291-7. 2013.

IDF. **Internacional Diabetes Federation - Diabetes Atlas - Sixth edition (2013), The Book**. Disponível em:
<https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf>. Acesso em: 10/09/2015.

IDF. **International Diabetes Federation - Diabetes Atlas - 2014 update - Sixth edition, Regional fact sheets, Data for the seven regions of IDF**. Disponível em:
<http://www.idf.org/sites/default/files/DA-regional-factsheets-2014_FINAL.pdf>. Acesso em: 10/09/2015.

IDF. **Internacional Diabetes Federation - Sign and symptoms of diabetes**. 2015.

IMS. **Health Diabetes Mellitus Overview**. 2014. Disponível em:
<http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/EMEA/Portugal/Diabetes%20overview_2014_v2.pdf>. Acesso em: 11/09/2015.

INTURRISI, M.; LINTNER, N. C.; SOREM, K. A. Diagnosis and treatment of hyperglycemia in pregnancy. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 40, n.4, p. 703-26. 2011.

JAFARI-SHOBEIRI, M. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Gestational Diabetes in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Iran J Public Health**. v. 44, n.8, p. 1036-44. 2015.

KANG, E. S. *et al.* A polymorphism in the zinc transporter gene SLC30A8 confers resistance against posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients. **Diabetes**. v. 57, n.4, p. 1043-7. 2008.

KAYSEN, G. A. Effect of dietary protein intake on albumin homeo stasis in nephrotic patients. **Kidney International**. v. 29. p. 572-577. 1986.

KHODAEIAN, M. *et al.* Association between Genetic Variants and Diabetes Mellitus in Iranian Populations: A Systematic Review of Observational Studies. **J Diabetes Res**. v. 2015, p. 585917. 2015.

KIM, C.; BERGER, D. K.; CHAMANY, S. Recurrence of gestational diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes Care**. v. 30, n.5, p. 1314-9. 2007.

KURZAWSKI, M. *et al.* Analysis of common type 2 diabetes mellitus genetic risk factors in new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant patients medicated with tacrolimus. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 68, n.12, p. 1587-94. 2012.

KWAK, S. H. *et al.* Clinical and Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes at Early or Late Post Partum After Gestational Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 98, n.4, p. E744-E752. 2013.

KWAK, S. H. *et al.* A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women. **Diabetes**. v. 61, n.2, p. 531-41. 2012.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.

LEHNINGER, M. M. C. N. D. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. 2014.

LIAO, P. Y.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**. v. 49, n.2, p. 149-158. 2010.

LIM, A. Diabetic nephropathy - complications and treatment. **Int J Nephrol Renovasc Dis.** v. 7, p. 361-81. 2014.

LUPERINI, B. C. *et al.* Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. **Mutat Res.** v. 776, p. 111-7. 2015.

MALERBI, D. A. *et al.* Multicenter Study of the Prevalence of Diabetes-Mellitus and Impaired Glucose-Tolerance in the Urban Brazilian Population Aged 30-69 Yr. **Diabetes Care.** v. 15, n.11, p. 1509-1516. 1992.

MAMMES, O. *et al.* Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. **Diabetes.** v. 47, n.3, p. 487-9. 1998.

MARCELLO, M. A. *et al.* Polymorphism in LEP and LEPR May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Thyroid Cancer. **Int J Endocrinol.** v. 2015, p. 173218. 2015.

MARUTHUR, N. M. *et al.* Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. **Diabetologia.** v. 58, n.2, p. 295-303. 2015.

MCCANCE, D. R. *et al.* Urinary albumin excretion in diabetic pregnancy. **Diabetologia,** v. 32, n. 4, p. 236–9, 1989.

MEHANNA, E. T. *et al.* Association of chemerin Rs17173608 and vaspin Rs2236242 gene polymorphisms with metabolic syndrome in Egyptian women. **Endocr Res.** v. 41, n.1, p. 43-8. 2016.

METZGER, B. E. *et al.* Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v. 30 Suppl 2, p. S251-60. 2007.

MURGIA, C. *et al.* Risk assessment does not explain high prevalence of gestational diabetes mellitus in a large group of Sardinian women. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 26. 6. 1-7. 2008.

NAKA, Y. *et al.* RAGE axis - Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. v. 24, n.8, p. 1342-1349. 2004.

NCBI. **LEP**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952>>. Acesso em: 31/10/2016.

NCBI. **SLC30A8**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=SLC30A8>>. Acesso em: 31/10/2016.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962. **Bull World Health Organ**. v. 77, n.8, p. 694-703; discussion 692-3. 1999.

NICOLSON, T. J. *et al.* Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. **Diabetes**. v. 58, n.9, p. 2070-83. 2009.

NISWENDER, K. D.; MAGNUSON, M. A. Obesity and the beta cell: lessons from leptin. **J Clin Invest**. v. 117, n.10, p. 2753-6. 2007.

NOVAIS, C. M. P.-A., MELISSA. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. n.33, p. 10 - 13. 2004.

OKPECHI, I. G. *et al.* Genetic Variation at Selected SNPs in the Leptin Gene and Association of Alleles with Markers of Kidney Disease in a Xhosa Population of South Africa. **Plos One**. v. 5, n.2, p. 2010.

OPGEN-RHEIN, C. *et al.* Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. **Pharmacogenomics**. v. 11, n.6, p. 773-780. 2010.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity (Silver Spring)**. v. 18, n.2, p. 221-9. 2010.

PAPPA, K. I. *et al.* Gestational diabetes mellitus shares polymorphisms of genes associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Greek population. **Gynecological Endocrinology**. v. 27, n.4, p. 267-272. 2011.

PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. **Am J Epidemiol**. v. 162, n.2, p. 101-14. 2005.

PETRY, C. J. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. **Br J Nutr**. v. 104, n.6, p. 775-87. 2010.

POWE, C. E.; THADHANI, R. Diabetes and the kidney in pregnancy. **Semin Nephrol**, v. 31, n. 1, p. 59-69, 2011.

PRATIPANAWATR, W. *et al.* Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. **Diabetes**. v. 50, n.11, p. 2572-2578. 2001.

RAW, I. Mecanismo de ação da insulina. **Rev Med**. v. 85, n.4, p. 124-129. 2006.

REECE, E. A.; LEGUIZAMON, G.; WIZNITZER, A. Gestational diabetes: the need for a common ground. **Lancet**. v. 373, n.9677, p. 1789-97. 2009.

ROBITAILLE, J.; GRANT, A. M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. **Genetics in Medicine**. v. 10, n.4, p. 240-250. 2008.

ROMANOWSKI, M. *et al.* Adiponectin and leptin gene polymorphisms in patients with post-transplant diabetes mellitus. **Pharmacogenomics**. v. 16, n.11, p. 1243-1251. 2015.

ROOHK, H. V.; ZAIDI, A. R. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. **J Diabetes Sci Technol**. v. 2, n.6, p. 1114-21. 2008.

SALGADO, A. L. *et al.* Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. **Arq Gastroenterol**. v. 47, n.2, p. 165-9. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 400p. 3.ed. Itapevi – SP: A. Araújo Silva Farmacêutica. 2009.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes - **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014 - 2015**. São Paulo - SP: AC farmacêutica. 2015. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf>>.

SBEM, S. B. D. E. E. M.-. Diabetes mellitus gestacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 54, n.6, p. 2008.

SBN. Sociedade Brasileira de Nefropatia – **Biomarcadores na nefrologia**. São Paulo – SP: Roche. 2011.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. **Methods Mol Biol**. v. 700, p. 77-87. 2011.

SCHMIDT, E. A. Prevalence of gestational diabetes mellitus - do the new WHO criteria make a difference? **Diabetic Medicine**. v. 17, p. 376 - 380. 2000.

SEMAN, N. A. *et al.* Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. **Clin Epigenetics**. v. 7, n.1, p. 30. 2015.

SHEN, J. *et al.* Leptin -2548g/a gene polymorphism in association with antipsychotic-induced weight gain: a meta-analysis study. **Psychiatr Danub**. v. 26, n.2, p. 145-51. 2014.

SINGH, A. K.; SINGH, R. Metformin in gestational diabetes: An emerging contender. **Indian J Endocrinol Metab**. v. 19, n.2, p. 236-44. 2015.

SLADEK, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**. v. 445, n.7130, p. 881-5. 2007.

STAIGER, H. *et al.* Polymorphisms within Novel Risk Loci for Type 2 Diabetes Determine beta-Cell Function. **Plos One**. v. 2, n.9, p. 2007.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

STRASSER, B.; PESTA, D. Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms. **Biomed Res Int**. v. 2013, p. 805217. 2013.

STUEBE, A. M. *et al.* Maternal genotype and gestational diabetes. **Am J Perinatol**. v. 31, n.1, p. 69-76. 2014.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutat Res**. v. 573, n.1-2, p. 41-53. 2005.

TAKHSHID, M. A.; ZARE, Z. Resistin - 420 C/G polymorphism and serum resistin level in Iranian patients with gestational diabetes mellitus. **J Diabetes Metab Disord**. v. 14, p. 37. 2015.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** v. 27, n.6, p. 791-802. 2013.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI, A. M.; STEFANADIS, C. Diabetes mellitus and vascular endothelial dysfunction: current perspectives. **Curr Vasc Pharmacol.** v. 10, n.1, p. 19-32. 2012.

TRICK, M. *et al.* Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid *Brassica napus* using Solexa transcriptome sequencing. **Plant Biotechnology Journal.** v. 7, n.4, p. 334-346. 2009.

TUOMILEHTO, J. A glucose tolerance test is important for clinical practice. **Diabetes Care.** v. 25, n.10, p. 1880-2. 2002.

VASKU, J. A. *et al.* Association of leptin genetic polymorphism -2548 G/A with gestational diabetes mellitus. **Genes Nutr.** v. 1, n.2, p. 117-23. 2006.

WANG, D. G. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science.** v. 280, n.5366, p. 1077-1082. 1998.

WANG, L.; LUHM, R.; LEI, M. SNP and mutation analysis. **Adv Exp Med Biol.** v. 593, p. 105-16. 2007.

WAUTIER, J. L.; SCHMIDT, A. M. Protein glycation - A firm link to endothelial cell dysfunction. **Circulation Research.** v. 95, n.3, p. 233-238. 2004.

WEIJERS, R. N. Three-dimensional structure of beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, predicted from the type 2 diabetes-associated gene variant SLC30A8 R325W. **Diabetol Metab Syndr.** v. 2, n.1, p. 33. 2010.

WEISS, I. C. R. D. S. **Variabilidade Genética e Biomarcadores Associados ao Diabetes Gestacional.** 179 f. - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba - PR, 2014.

WHO. DEFINITION AND DIAGNOSIS OF DIABETS MELLITUS AND INTERMEDIATE HYPERGLYCEMIA. **SUMMARY OF TECHNICAL REPORT AND RECOMMENDATIONS**. v.41, 2006.

WHO. Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus. **Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus**. 1-82. 2009.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, n.5, p. 1047-53. 2004.

WU, R. *et al.* Genetic predictors of antipsychotic-induced weight gain: a case-matched multi-gene study. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**. v. 36, n.8, p. 720-3. 2011.

YANG, M. *et al.* Relationships between plasma leptin levels, leptin G2548A, leptin receptor Gln223Arg polymorphisms and gestational diabetes mellitus in Chinese population. **Scientific Reports**. v. 6, p. 2016.

ZHANG, C. *et al.* Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. **Hum Reprod Update**. v. 19, n.4, p. 376-90. 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Role of high-risk variants in the development of impaired glucose metabolism was modified by birth weight in Han Chinese. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 31, n.8, p. 790-5. 2015.

ZHENG, J. *et al.* Correlation of high-molecular-weight adiponectin and leptin concentrations with anthropometric parameters and insulin sensitivity in newborns. **Int J Endocrinol**. v. 2014, p. 435376. 2014.

ZHENG, X. *et al.* Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population. **Mol Biol Rep**. v. 39, n.1, p. 17-23. 2012.

ZHOU, B. *et al.* Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **Lancet**. v. 387, n.10027, p. 1513-1530. 2016.

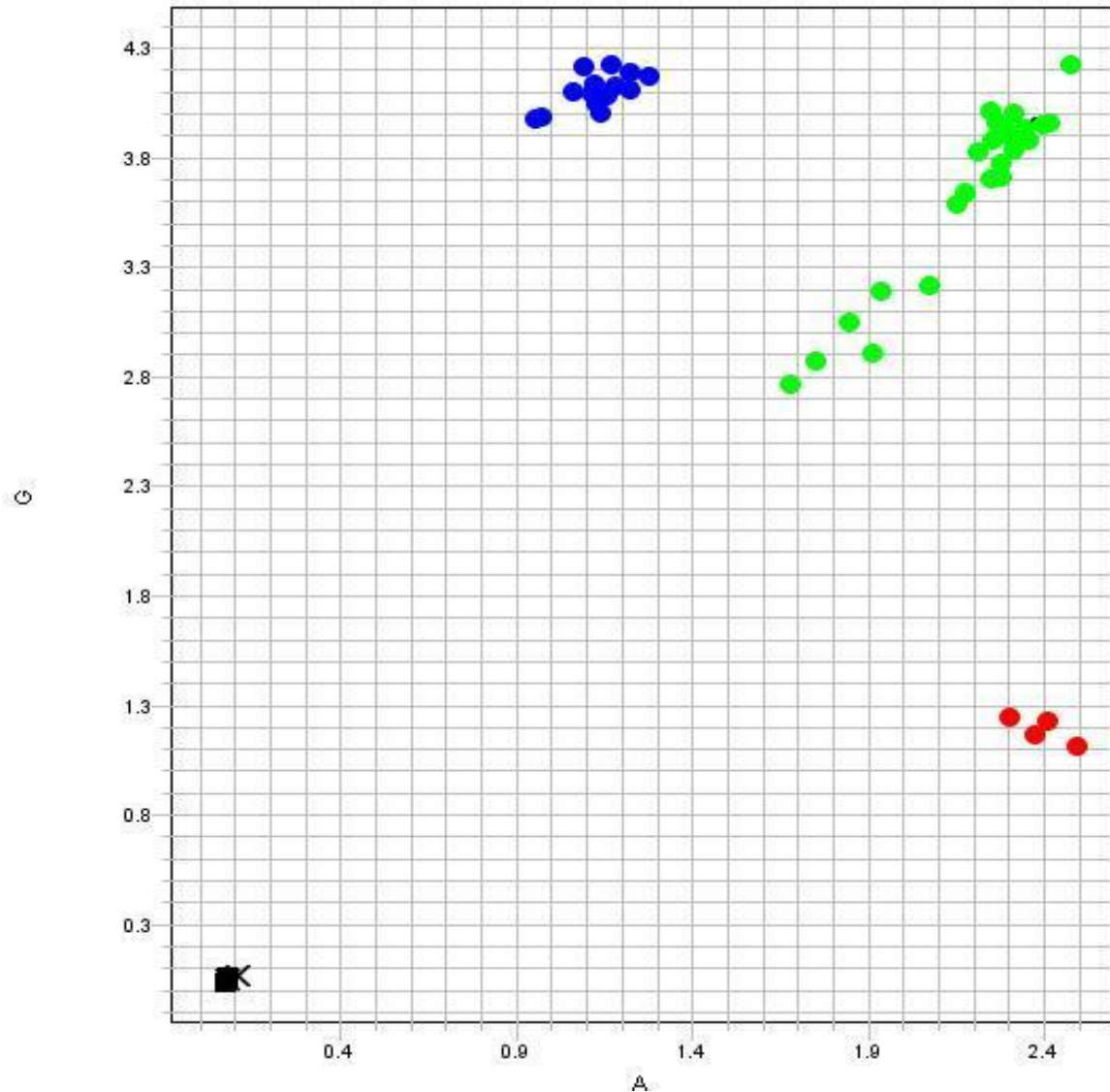
ANEXOS

ANEXO 1 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO - MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE LAHIRI E NURBERGER, 1991

ETAPAS	AÇÕES
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA; Centrifugar o tubo de sangue por 10 minutos a 4.000 rpm; Remover o plasma; Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>).
2	Em tubo Eppendorf colocar 900 µL de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5%; Adicionar 250 µL do <i>buffy coat</i> ; Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm; Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 µL.
3	Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100); Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm; Desprezar todo o sobrenadante; Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo.
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura; Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm; Desprezar todo o sobrenadante.
5	Adicionar ao sedimento: 40 µL de tampão de proteinase K; 20 µL de proteinase K; 10 µL de SDS 20%; 120 µL de água ultra pura; Homogeneizar em vórtex; Colocar em banho-maria a 65°C por 40 minutos; Em 20 minutos de banho-maria homogeneizar novamente os tubos em vórtex.
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente; Adicionar 100 µL de Cloreto de Sódio 6M; Homogeneizar; Centrifugar por 10 minutos a 13.00 rpm.
7	Transferir o sobrenadante para um novo tubo Eppendorf; Adicionar 700 µL de etanol absoluto; Homogeneizar por inversão; Centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm; Desprezar o sobrenadante.
8	Adicionar 700 µL de etanol 70%; Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 2 minutos a 13.00 rpm; Desprezar o sobrenadante; Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C.
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 µL de água ultra pura; Homogeneizar em vórtex; Deixar por 1 hora a 65C.

ANEXO 2 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO *rs7799039* DO GENE LEP EM
PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

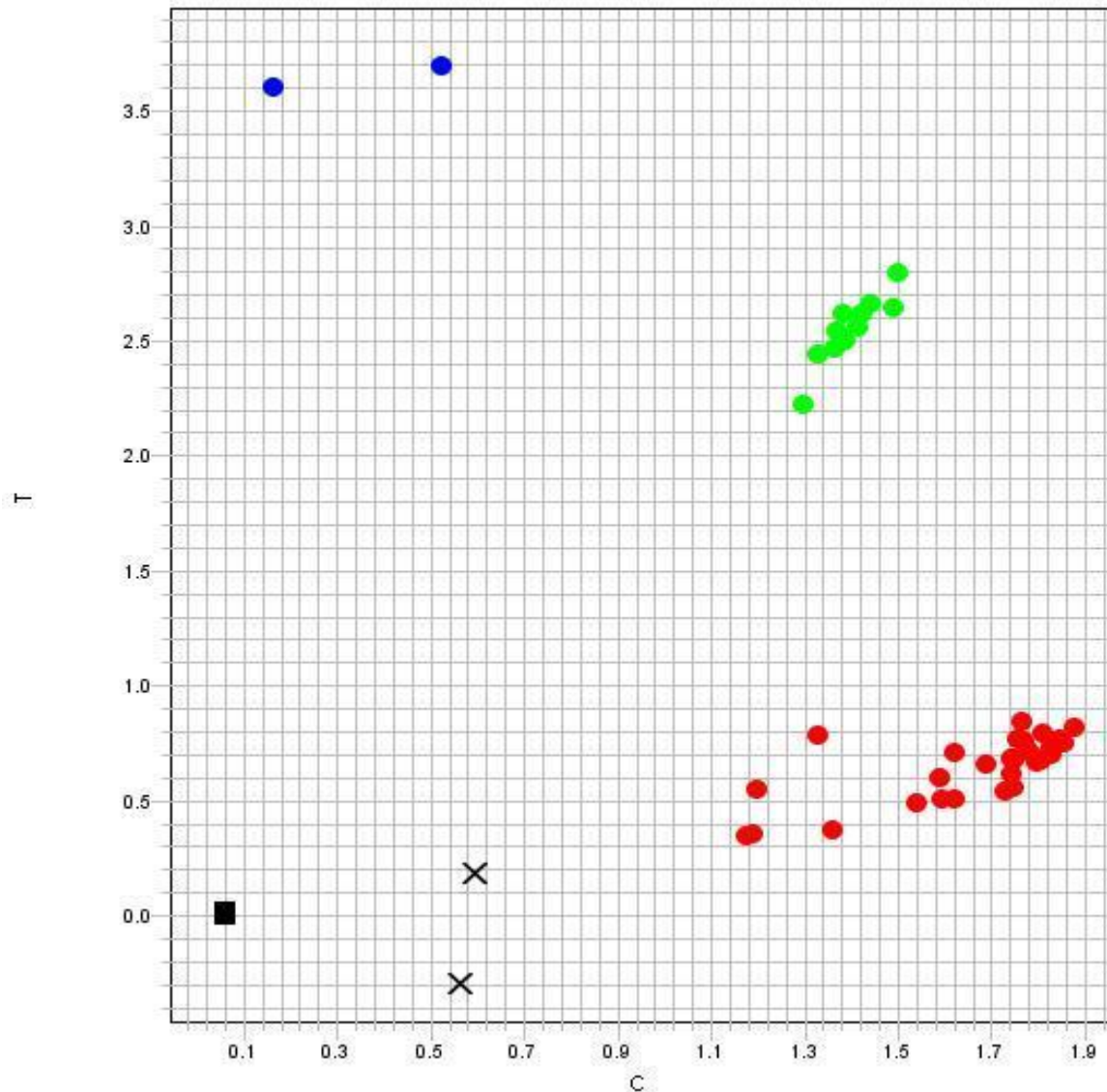
Allelic Discrimination Plot



Legenda: ● A/G - Heterozigoto VIC/FAM, ● G/G - Homozigoto FAM/FAM, ● A/A - Homozigoto VIC/VIC, ✕ - Genotipagem inconclusiva, ■ - Controle negativo.

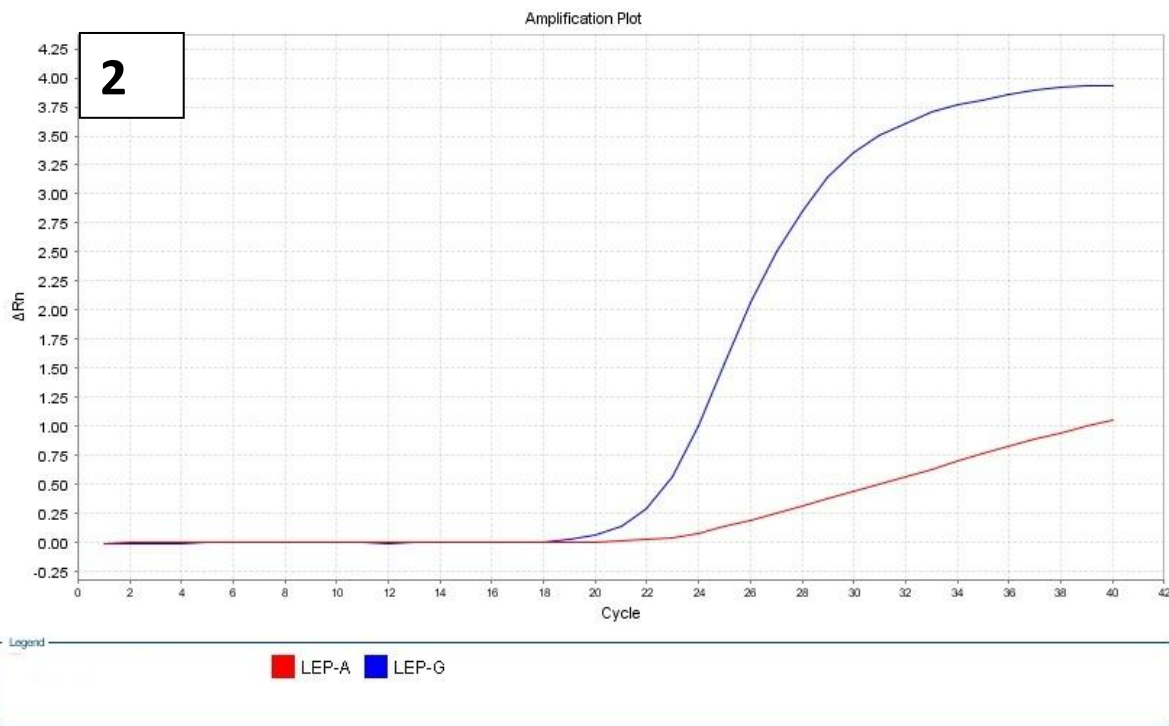
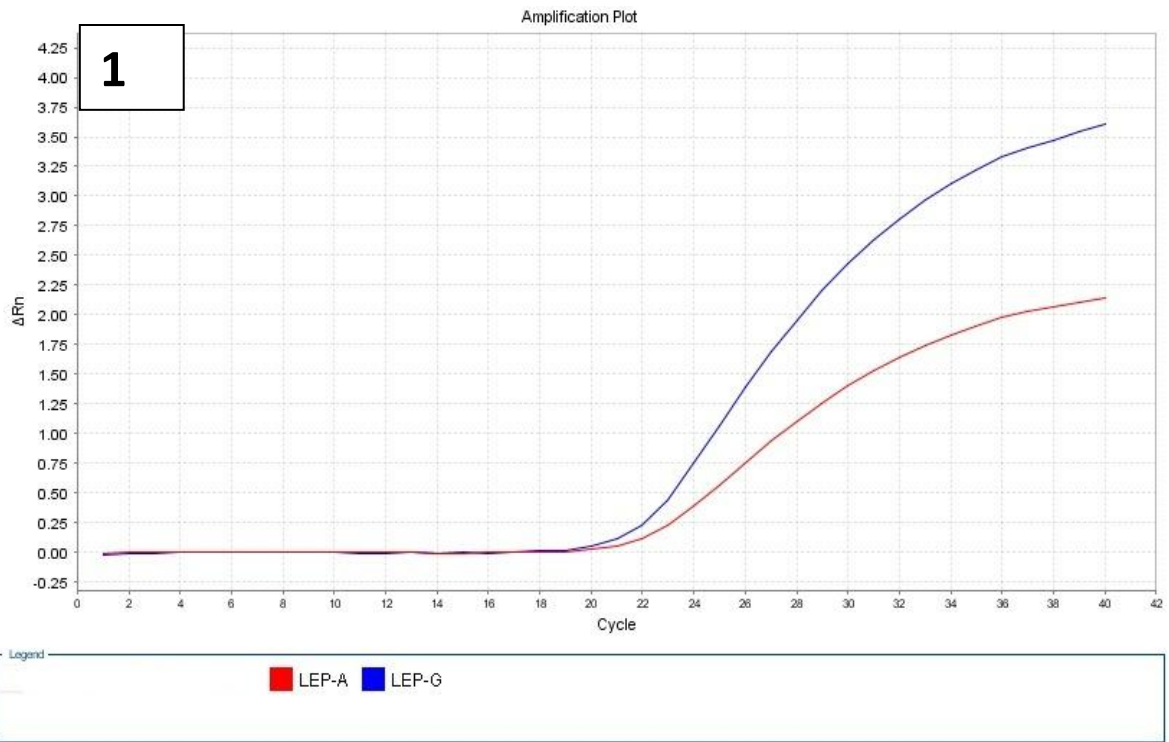
ANEXO 3 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO *rs13266634* DO GENE SLC30A8 EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

Allelic Discrimination Plot



Legenda: ● C/T - Heterozigoto VIC/FAM, ● T/T - Homozigoto FAM/FAM, ● C/C - Homozigoto VIC/VIC, x - Genotipagem inconclusiva, ■ - Controle negativo.

ANEXO 4 – GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO – DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (rs 7799039 DO GENE LEP)

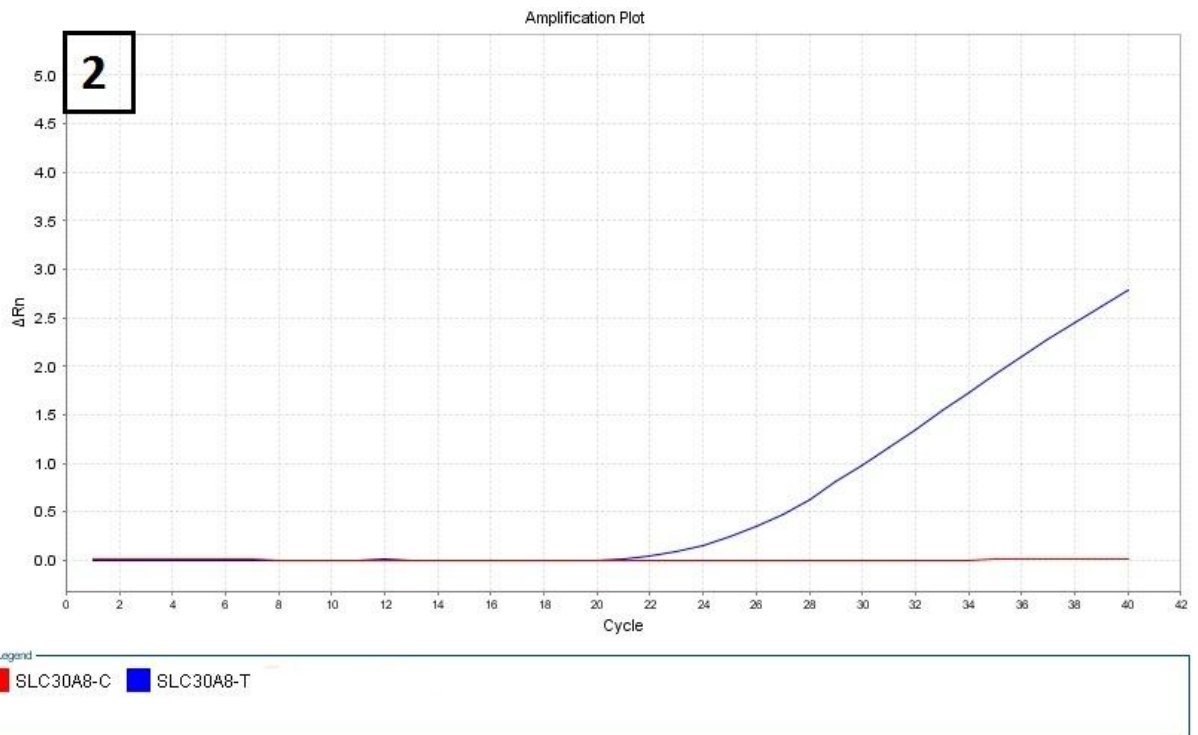
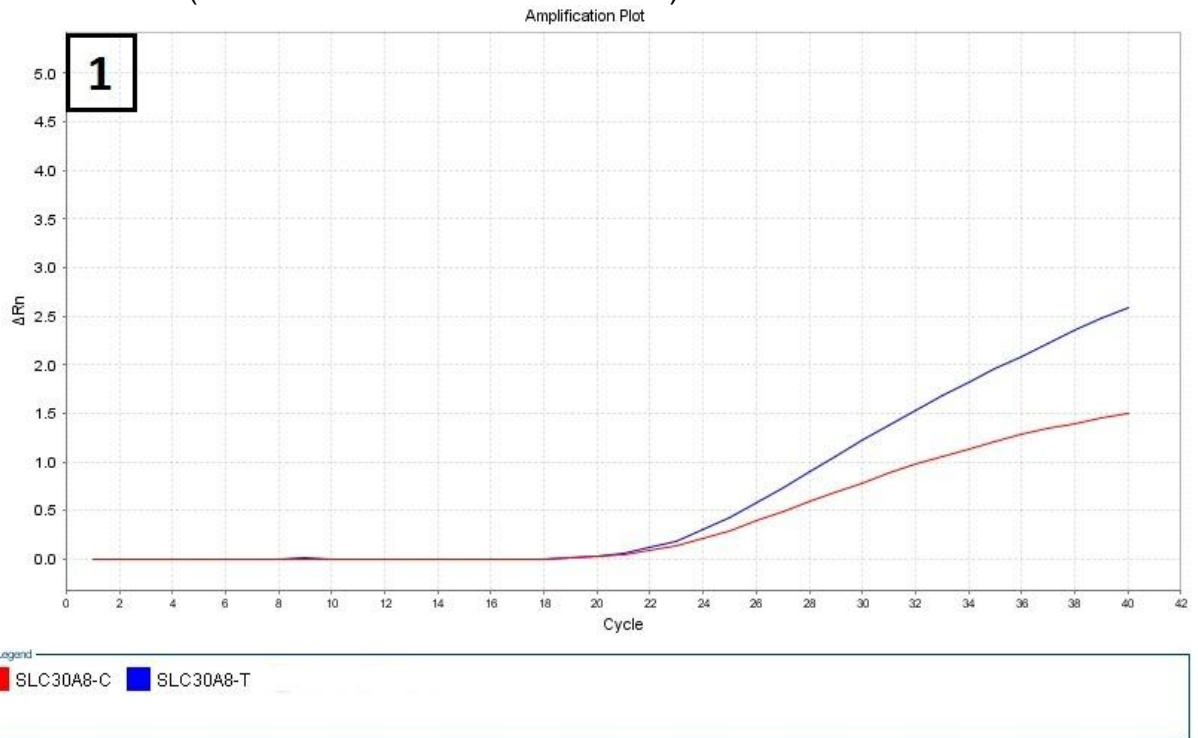


Legenda: ■ VIC A, ■ FAM G

1 = HETEROZIGOTO (A/G) - Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, A e G.

2 = HOMOZIGOTO (G/G) - Verifica-se a amplificação somente do alelo G.

ANEXO 5 – GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO – DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA (rs13266634 DO GENE SLC30A8)

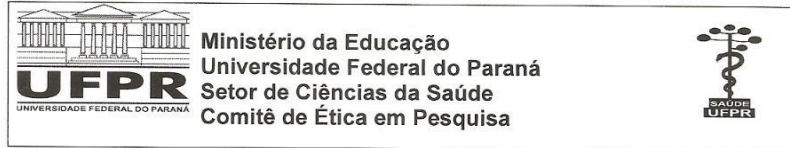


Legenda: ■ VIC C, ■ FAM T

1 = HETEROZIGOTO (C/T) - Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, C e T.

2 = HOMOZIGOTO (T/T) - Verifica-se a amplificação somente do alelo T.

ANEXO 6 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR



Curitiba, 07 de julho de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Variações no DNA mitocondrial e biomoléculas marcadoras no diabetes gestacional**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de maio de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 07 de julho de 2010.

Registro CEP/SD: 927.052.10.05 CAAE: 1924.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 07/01/2011.

Atenciosamente

Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SCHEPP

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 7 – CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO GMR9515



Ribeirão Preto, 30 de Janeiro de 2017

Prezados autores,

Informamos que o artigo "Leptin (rs7799039) and solute carrier family 30 zinc transporter (rs13266634) polymorphisms in Euro-Brazilian pregnant women with gestational diabetes

" GMR9515, de autoria A. Teleginski, M. Welter, H. R. Frigeri., R. R. Réa, E. M. Souza, D. Alberton, F. G. M. Rego and G. Picheth, foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research (GMR).

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 63 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 0,768, segundo JCR - junho 2016.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Francine Muniz'. The signature is fluid and cursive.

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

APÉNDICE

APÊNDICE A - ARTIGO GMR9515 – “LEPTIN (*rs7799039*) AND SOLUTE CARRIER FAMILY 30 ZINC TRANSPORTER (*rs13266634*) POLYMORPHISMS IN EURO-BRAZILIAN PREGNANT WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES”

Leptin (*rs7799039*) and solute carrier family 30 zinc transporter (*rs13266634*) polymorphisms in Euro-Brazilian pregnant women with gestational diabetes

A. Teleginski et al.

LEP and SLC30A8 SNPs in gestational diabetes

A. Teleginski¹, M. Welter¹, H.R. Frigeri^{1,2}, R.R. Réa³, E.M. Souza⁴, D. Alberton¹, F.G.M. Rego¹ and G. Picheth¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

²Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

³Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Paraná, Hospital de Clínicas, Curitiba, PR, Brasil

⁴Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Corresponding author: G. Picheth

E-mail: geraldopicheth@gmail.com / gpicheth@ufpr.br

ABSTRACT

Leptin (LEP), a protein that plays a fundamental role in the metabolism of energy reserves, and the solute carrier family 30 A8 zinc transporter (SLC30A8) have been consistently associated with diabetes. Women with gestational diabetes are at moderate risk of developing diabetes type 1 and 2 after pregnancy, in addition to complications to the fetus. We investigated the association of the polymorphisms *rs7799039* (LEP) and *rs13266634* (SLC30A8) in a case-control study in Euro-Brazilians with gestational diabetes (GDM, N = 134) and healthy pregnant women (control, N = 180). Real-time PCR with fluorescent probes (TaqMan system) was applied to genotyping. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The minor allele frequencies, for healthy and GDM, respectively, for the A-allele (LEP gene *rs7799039*) were 40.3% [95%CI = 35-45%] vs 36.6% [95%CI = 31-42%], P = 0.345; and for the T-allele (SLC30A8 gene *rs13266634*) were 27.8% [95%CI = 23-32%] vs 23.5% [95%CI = 18-29%], P = 0.227. Genotype comparisons for both polymorphisms showed no significant difference (P > 0.05). The

polymorphisms *rs7799039* and *rs13266634* were not associated with GDM in the population studied ($P > 0.05$). The minor allele frequencies for both polymorphisms were similar to those of other Caucasian populations.

Key words: Gestational diabetes; Solute carrier family 30 (zinc transporter) member 8; Leptin; Genetic susceptibility; SNP; Mutation

INTRODUCTION

The number of adults with diabetes worldwide increased from 108 million in 1980 to about 422 million by the year 2014 (Zhou et al., 2016), and this number is estimated to increase to 592 million by 2035 (IDF, 2014).

Diabetes *mellitus* is a group of metabolic diseases that has a defect in insulin secretion, insulin action, or both, resulting in chronic hyperglycemia. Women with a history of gestational diabetes mellitus (GDM) are at increased risk of developing type 2 diabetes mellitus (T2D) compared to those whose pregnancy is normoglycemic (Kwak et al., 2013).

Glucose metabolism and insulin sensitivity always change in pregnant women who are usually able to meet the increased insulin demand, but in some cases, these requirements are not met, resulting in poor glycemic control (Liu et al., 2015).

GDM is usually diagnosed in the last half of pregnancy when insulin resistance increases progressively until birth. Risk factors for this disorder include obesity, advanced maternal age, and a family history of diabetes. Although GDM occurs frequently, its pathophysiology is not completely understood. Little is known about the gene expression profile in GDM. However, GDM is a common metabolic disorder affecting 1-14% of all pregnancies, and each year, the incidence of cases increases (Singh and Singh, 2015).

One of the most frequent types of genetic variation in the human genome is the single nucleotide polymorphism (SNP), which may contribute to differences between individuals in susceptibility to hereditary diseases. Polymorphisms in different genes have been associated with GDM (Huopio et al., 2013).

The LEP gene (Leptin, OMIM: 164160) is located on chromosome 7, in area 7q31.3, is 16,352 bp in length, and contains 3 exons. Leptin is a hormone secreted by adipocytes that promote a reduction in fuel uptake and an increase in energy expenditure when fat reserves are sufficient, thus controlling body weight and regulating energy balance (Jequier and Tappy, 1999). Reduction in the leptin level reverses the process of thermogenesis, allowing fuel conservation (Jequier and Tappy, 1999).

In addition to regulating appetite and metabolism, this adipokine is important in insulin secretion (Romanowski et al., 2015).

Insulin resistance is an important feature of gestational diabetes mellitus. Several adipokines, including leptin, are involved in the development of this resistance (Takhshid and Zare, 2015).

The hormone leptin was first identified in adipose tissue and is known to be expressed in the placenta and fetal tissues (Vasku et al., 2006). Leptin is considered a fetal growth factor able to maintain energy and metabolic balance during pregnancy (Xu et al., 2014). Polymorphisms in the leptin gene have been associated with obesity, a risk factor for GDM and T2D. The polymorphism *rs7799039* is located in the promoter region of the LEP gene and can alter dynamic methylation, affecting LEP expression at the transcriptional level to increase or reduce leptin expression (Marcello et al., 2015).

The SLC30A8 gene (Solute Carrier Family 30 zinc transporter, OMIM 611145) is 226,442 bp in length and is located in the region 8q24.11 of chromosome 8 (Seman et al., 2015).

SLC30A8 is associated with the secretion of human insulin and encodes a specific zinc transporter (ZnT8) for β cells of the pancreas (Maruthur et al., 2015). The presence of zinc in the secretory insulin vesicles stabilizes the insulin hexamer, making it less susceptible to degradation (Dereke et al., 2016). This insulin packed into secretory vesicles becomes available for immediate release upon stimulation by glucose (Maruthur et al., 2015). The polymorphism *rs13266634* is a non-synonymous C \rightarrow T mutation in exon 9 of the SLC30A8 gene, causing a non-conservative change of arginine (R) to tryptophan (W) at position 325 (R325W) (Dereke et al., 2016).

The polymorphisms *rs7799039* and *rs13266634* affecting the expression of the LEP and SLC30A8 genes, respectively, have been considered likely to be associated with diabetes risk. Insufficient production of leptin is usually related to human obesity and with altered glucose metabolism. The negative regulation of the zinc transporter is thought to destabilize insulin molecules (Seman et al., 2015).

The aim of this study was to determine if the polymorphisms *rs7799039* and *rs13266634* were associated with gestational diabetes in a case-control study with healthy and diabetic Euro-Brazilian pregnant women.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects

A sample of 314 unrelated Euro-Brazilian pregnant women was classified as healthy (control, N = 180) or with gestational diabetes (GDM, N = 134) according to the Brazilian Diabetes Society (SBD, 2009). Briefly, GDM diagnosis was defined at 24-28 weeks of gestation by fasting glucose ≥ 6.1 mM, and by a glucose level > 7.8 mM, 2-h after an oral glucose load of 75 g.

Clinical and anthropometric data were obtained from all patients. The study was approved by the University's Human Research Ethics Committee.

DNA extraction

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes (buffy coat) by the salting-out method (Lahiri and Nurnberger, 1991). DNA samples with an A_{260}/A_{280} ratio between 1.6 and 1.9 were used, and the concentrations of all samples were normalized to 20 ng/ μ L.

TaqMan SNP Genotyping Assays[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizing fluorescent probes in the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were used for genotyping. The TaqMan probe codes used were C_1328079_10 (*rs7799039*; LEP) and C_3578888_10 (*rs13266634*, SLC30A8). Briefly, the genotyping protocol involved the addition of 3 μ L DNA (20 ng/ μ L), 3 μ L TaqMan Genotyping Master Mix, 0.1 μ L of each fluorescent probe and 1.9 μ L water to each well of a 96-well plate. The cycling protocol was as recommended by the manufacturer (1 cycle: 95°C for 10 min, and 40 cycles: 95°C for 15 s and 60°C for 60 s). The Genotyping quality was 98% or higher in all samples measured by the software (7500 Fast SDS system software).

Biochemical markers

Biochemical parameters such as fasting glucose, glucose 2 h after 75 g oral glucose load, creatinine, and albumin were quantified using the Architect Ci 8200 automated system (Abbott Diagnostics) with reagents, calibrators, and controls from the equipment manufacturer. Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured only in diabetic pregnant women by using a high-performance liquid chromatography (HPLC) machine equipped with a cation exchange column (Varian II, Bio-Rad).

Statistical analysis

Continuous variables with normal distribution, verified with Kolmogorov-Smirnov test, were compared with a two-tailed Student *t*-test for independent variables. The Mann-Whitney U-test was used for non-normal distribution variables. The chi-square test was used to compare categorical variables. Hardy-Weinberg equilibrium and allele comparisons were calculated with the DeFinetti program (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Statistical analyses were performed using the Statistica for Windows version 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). A P value lower than 5% ($P < 0.05$) was considered significant.

RESULTS

Patient characteristics are shown in Table 1. GDM patients were older (median age 32 vs 30 years) and heavier (BMI 32.6 vs 26.1 kg/m²) compared with healthy pregnant controls. A history of family diabetes was high in the GDM group (66.7%) when compared to other Euro-descendent healthy pregnant women from Portugal (16%) (Ribeiro et al., 2015) and France (16%) (Mialhe et al., 2015). This information for the control group was not available.

Table 1. Anthropometric and laboratory data for healthy and gestational diabetic pregnant women.

Parameters	Control, n=180	GDM, n=134	P
Age (years)	30 (28-33)	32 (28-36)	0.034*
Weight (kg)	66 (58-73)	82 (71-93)	<0.001*
Height (m)	1.61 ± 0.06	1.60 ± 0.06	0.109
BMI (kg/m ²)	26.1 ± 5.1	32.6 ± 6.4	<0.001
Family history of Diabetes (%)	-	66.7	-
Fasting glucose (mmol/L)	4.6 (4.4-4.9)	4.8 (4.0-5.4)	<0.001*
Glucose 2-h, 75g (mmol/L)	4.8 (4.4-5.7)	9.0 (8.3-9.7)	<0.001*
HbA1c (%)	-	5.8 (5.2-6.0)	-
Creatinine (µmol/L)	70.7 (70.3-79.6)	61.9 (53.0-70.7)	<0.001*
Albumin (g/L)	43.0 (39-46)	34.0 (31-36)	<0.001*

Control, healthy pregnant and GDM, gestational diabetic pregnant women

Values are mean±SD, median (interquartile range) or %. -, no information evaluable.

P-value, Student t-test independent (two-sided), *Mann-Whitney U test

Fasting glucose, and the glucose level 2 h after a 75-g glucose load, were high in the GDM group as expected ($P < 0.001$). Glycated hemoglobin, measured only in the GDM group (median 5.8%), suggested good glycemic control, and none of these patients were receiving insulin therapy. Serum creatinine and albumin were lower in the GDM than in the control group, but both markers were in the reference range.

Genotypes and allele frequencies of both polymorphisms showed no differences between the studied groups (Table 2). The polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) in both groups. For both polymorphisms, the genotype comparison in the modules dominant (frequent homozygous vs others) and recessive (rare homozygous vs others) did not show significance ($P > 0.05$).

Table 2. Genotype and allele frequencies for LEP and SLC30A8 genes polymorphisms in health (Control) and diabetic pregnant women (GDM).

Gene/Polymorphisms		Control, n=180	DMG, n=134	P
<i>LEP</i> , rs7799039				0.627
	G/G	67 (37.2%)	57 (42.5%)	
	G/A	81 (45.0%)	56 (41.8%)	
	A/A	32 (17.8%)	21 (15.7%)	
MAF	A-allele [95% CI]	40.3% [35-45%]	36.6% [31-42%]	0.345*
<i>SLC30A8</i> , rs13266634				0.522
	C/C	99 (55.1%)	82 (61.2%)	
	C/T	62 (34.4%)	41 (30.6%)	
	T/T	19 (10.5%)	11 (8.2%)	
MAF	T-allele [95% CI]	27.8% [23-32%]	23.5% [18-29%]	0.227*

MAF, minor allele frequency. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium.
 P-value, Chi-square test for genotype and *allele frequencies
 95%CI- 95% confidence interval

For Euro-Brazilian healthy pregnant women, the minor allele frequency for *rs7799039* (A-allele; LEP gene) was 40.3% [95%CI, 35– 45%] and for *rs13266634* (T-allele; SLC30A8 gene) 27.8% [95%CI, 23 – 32%].

DISCUSSION

The number of cases of gestational diabetes mellitus in Brazil reaches 7% of pregnancies, similar to the rate in the United States (Schmidt, 2000). The prevalence varies in different populations and ethnic groups (Zhang et al., 2013).

In this study, diabetic pregnant women were older than healthy controls. Increasing age is known to correlate with the risk of developing GDM. In the sample analyzed, the median age for diabetic pregnant women was 32 years, in accordance with the literature, where there are reports that the prevalence of gestational diabetes increases with age, becoming more frequent in women from the age of 30 onward (Murgia et al., 2008).

Regarding weight and BMI, the group of diabetic women had significantly higher values than the control group. This was as expected given that being overweight and having obesity (BMI >30 kg/m²) are factors that contribute to the development of GDM (Murgia et al., 2008; Takhshid and Zare, 2015).

A family history of diabetes also influences the development of GDM. Almost 67% of gestational diabetic patients in the study reported a family history of diabetes. In a study by Murgia et al. (2008), women with GDM also reported having first-degree relatives with diabetes, confirming that GDM and T2D have similar genetic character. Mothers with gestational diabetes have a higher incidence of T2D development, while their children are at greater risk of developing obesity (Huidobro et al., 2010).

The glycated hemoglobin is a biomarker of glycemic control (Arnold and Wang, 2014). Concentrations greater than 6.5% indicate inadequate glycemic control (SBD, 2009). Average concentrations of HbA1c for the GDM group of 5.8% suggest good glycemic control in these patients (Table 1).

The BMI, age, and HbA1c parameters of pregnant women in the groups in question were similar to those in pregnant women in groups of similar studies (Huopio et al., 2013; Takhshid and Zare, 2015).

There were significant differences in mean serum albumin and creatinine concentrations between the two groups. The GDM group showed lower concentrations of both markers compared to concentrations in the control group (Table 1). This reduction may be explained by increased protein loss in these patients and increased urine flow resulting from hyperglycemia, suggesting a

reason for the decreased serum creatinine. Nevertheless, none of these biomarkers point to overt kidney failure or hypertension problems since they were in the reference range (Lim, 2014).

Leptin gene polymorphisms are associated with obesity, insulin resistance, and diabetes mellitus, as demonstrated in a study by (Romanowski et al., 2015). The association of polymorphisms in the leptin gene with GDM is controversial. Vasku et al. (2006) showed an association of leptin polymorphism -2548G>A with preeclampsia in GDM, but Yang et al. (2016) failed to associate this polymorphism with GDM in a Chinese population.

The minor allele frequency (MAF) of the LEP gene polymorphism *rs7799039* (A-allele) for the control group (~40%) was similar to the frequency in Bulgaria (45%), Egypt (39.5%), and India (41.1%), as shown in Table 3. Caucasians from Finland and Germany showed slightly higher frequencies (50-58%). Different African populations showed dramatically different frequencies, such as 4% in one African study compared with 98.7% for Nigerians. A different Euro-Brazilian population, studied by Luperini et al. (2015), showed a frequency (41.1%) consistent with that observed in our study.

Studies using diabetic mice have shown that the gene expression level of SLC30A8 is repressed in the pancreas of animals that present this pathology, suggesting an involvement in diabetes (Semán et al., 2015).

The MAF of the SLC30A8 gene *rs13266634* (T-allele) for the control group (~28%) was similar to that found in Indian (23%), Mayan (25%), American (26.2%), and Polish (33%) populations. Orientals showed a higher frequency (~46%) and Africans a lower frequency (6-8%) as presented in Table 3. No studies were found for Brazilian populations.

Our findings should be confirmed with a larger sample size.

In summary, the studied polymorphisms (*rs7799039*; LEP and *rs13266634*; SLC30A8) were not associated with gestational diabetes in a Euro-Brazilian population.

Table 3. Comparison of minor allele frequency of rs7799039 and rs13266634 with other populations.

Ethnic group	MAF (%) [95% CI]	References
<i>LEP</i> /rs7799039 (A-allele)		
Euro-Brazilian	40.3 [35-45]	This work
Nigerians (Yoruban)	98.7	HapMap
Caucasians (Germany)	58.3 [50-67]	(OPGEN-RHEIN <i>et al.</i> , 2010)
Indian Obese	53.9	(DASGUPTA <i>et al.</i> , 2015)
Caucasians (Finland)	50.0	(DOUGKAS <i>et al.</i> , 2013)
Bulgarian	45.0	(NIKOLOVA <i>et al.</i> , 2015)
Indian Lean	43.2	(DASGUPTA <i>et al.</i> , 2015)
Euro-Brazilian	41.1	(LUPERINI <i>et al.</i> , 2015)
Egyptians	39.5	(MEHANNA <i>et al.</i> , 2016)
Asian (China)	30.0 [23-37]	(WU <i>et al.</i> , 2011)
African	4.0	(OKPECHI <i>et al.</i> , 2010)
<i>SLC30A8</i> /rs13266634 (T-allele)		
Euro-Brazilian	27.8 [23-32]	This work
East Asian	46.0	(LARA-RIEGOS <i>et al.</i> , 2015)
Han Chinese	45.5	(ZHANG, Y. <i>et al.</i> , 2015)
Asian (China)	43.4 [38-49]	(ZHENG, X. <i>et al.</i> , 2012)
Caucasians (Poland)	33.0 [28-38]	(KURZAWSKI <i>et al.</i> , 2012)
European	28.6	(LARA-RIEGOS <i>et al.</i> , 2015)
American	26.2	(LARA-RIEGOS <i>et al.</i> , 2015)
Maya	25.0	(LARA-RIEGOS <i>et al.</i> , 2015)
Indian	23.0	(KHAN <i>et al.</i> , 2015)
African	8.3	(LARA-RIEGOS <i>et al.</i> , 2015)
Nigerians (Yoruban)	6.1	HapMap

MAF, minor allele frequency (%); 95%CI, confidence interval.

HapMap (<http://www.hapmap.org/>)

In bold MAF outside the 95%CI obtained in our study

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Araucária Foundation.

REFERENCES

- Arnold LW and Wang Z (2014). The HbA1c and all-cause mortality relationship in patients with type 2 diabetes is J-shaped: A meta-analysis of observational studies. *Rev. Diabet. Stud.* 11: 138-152.
- Dasgupta S et al. (2015). Genetic variants in leptin: Determinants of obesity and leptin levels in South Indian population. *Adipocyte.* 4: 135- 140.
- Dereke J et al. (2016). The prevalence and predictive value of the SLC30A8 R325W polymorphism and zinc transporter 8 autoantibodies in the development of GDM and postpartum type 1 diabetes. *Endocrine.* 53: 740-746.
- Dougkas A et al. (2013). The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. *Br J Nutr.* 110: 1151-1156.
- Huidobro A et al. (2010). Gestational diabetes, comparison of women diagnosed in second and third trimester of pregnancy with non GDM women: Analysis of a cohort study. *Rev. Med.Chile.* 138: 316-321.
- Huopio H et al. (2013). Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. *Eur J Endocrinol.* 169: 291- 297.
- IDF. International Diabetes Federation - Diabetes Atlas - 2014 update - Sixth edition, Regional fact sheets, Data for the seven regions of IDF. Available in: <http://www.idf.org/sites/default/files/DA-regional-factsheets-2014_FINAL.pdf>.
- Jequier E and Tappy L (1999). Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev.* 79: 451-80.
- Khan IA et al. (2015). Type 2 Diabetes Mellitus and the Association of Candidate Genes in Asian Indian Population from Hyderabad, India. *J Clin Diagn Res.* 9: 1-5.
- Kurzawski M et al. (2012). Analysis of common type 2 diabetes mellitus genetic risk factors in new-onset diabetes after transplantation in kidney

transplant patients medicated with tacrolimus. *Eur J Clin Pharmacol.* 68: 1587- 1594.

Kwak SH et al. (2013). Clinical and Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes at Early or Late Post Partum After Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 98: 744-752.

Lahiri DK and Nurnberger JI Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.

Lara-Riegos J C et al. (2015). Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4alpha, KCNJ11, PPARgamma, CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes. *Gene.* 565: 68-75.

Lim A. (2014). Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 7: 361-81.

Liu Q et al. (2015). Relationship between melatonin receptor 1B (rs10830963 and rs1387153) with gestational diabetes mellitus: a case-control study and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 294: 55-61.

Luperini BC et al. (2015). Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. *Mutat Res.* 776: 111-117.

Marcello MA et al. (2015). Polymorphism in LEP and LEPR May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Thyroid Cancer. *Int J Endocrinol.* 2015: 1-8.

Maruthur NM et al. (2015). Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. *Diabetologia.* 58: 295-303.

Mehanna ET et al. (2016). Association of chemerin Rs17173608 and vaspin Rs2236242 gene polymorphisms with metabolic syndrome in Egyptian women. *Endocr Res.* 41: 43- 48.

Miailhe G et al. (2015). Selective rather than universal screening for gestational diabetes mellitus? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 191: 95-100.

Murgia C et al. (2008). Risk assessment does not explain high prevalence of gestational diabetes mellitus in a large group of Sardinian women. *Reprod Biol Endocrinol.* 26: 1-7.

Nikolova S et al. (2015). Role of the IL-6 gene in the etiopathogenesis of idiopathic scoliosis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2015: 1- 5.

Okpechi I G et al. (2010). Genetic Variation at Selected SNPs in the Leptin Gene and Association of Alleles with Markers of Kidney Disease in a Xhosa Population of South Africa. *Plos One.* 5: 1-7.

Opgen-Rhein C et al. (2010). Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. *Pharmacogenomics.* 11: 773-780.

Ribeiro AMC et al. (2015). Diabetes gestacional: determinação de fatores de risco para diabetes mellitus. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab.* 10: 8-13.

Romanowski M et al. (2015). Adiponectin and leptin gene polymorphisms in patients with post-transplant diabetes mellitus. *Pharmacogenomics.* 16: 1243-1251.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 3. Itapevi, SP: 2009.

Schmidt MI et al. (2000). Prevalence of gestational diabetes mellitus - do the new WHO criteria make a difference? *Diabet Med.* 17: 376 - 380.

Seman NA et al. (2015). Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. *Clin Epigenetics.* 7: 1-7.

Singh AK and Singh R. (2015). Metformin in gestational diabetes: An emerging contender. *Indian J Endocrinol Metab.* 19: 236-244.

Takhshid MA and Zare Z. (2015). Resistin - 420 C/G polymorphism and serum resistin level in Iranian patients with gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Metab Disord.* 14: 1-7.

Vasku JA et al. Association of leptin genetic polymorphism -2548 G/A with gestational diabetes mellitus. *Genes Nutr.* 1: 117-123.

Wu R et al. (2011). Genetic predictors of antipsychotic-induced weight gain: a case-matched multi-gene study. *J Med Sci.* 36: 720-723.

Xu XY et al. (2014). Placental leptin gene methylation and macrosomia during normal pregnancy. *Mol Med Rep.* 9: 1013-1018.

Yang M et al. (2016). Relationships between plasma leptin levels, leptin G2548A, leptin receptor Gln223Arg polymorphisms and gestational diabetes mellitus in Chinese population. *Sci Rep.* 6: 1- 6.

Zhang C et al. (2013). Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 19: 376-90.

Zhang Y et al. (2015). Role of high-risk variants in the development of impaired glucose metabolism was modified by birth weight in Han Chinese. *Diabetes Metab Res Rev.* 31: 790- 795.

Zheng X et al. (2012). Association of type 2 diabetes susceptibility genes (TCF7L2, SLC30A8, PCSK1 and PCSK2) and proinsulin conversion in a Chinese population. *Mol Biol Rep.* 39: 17-23.

Zhou B et al. (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet.* 387: 1513-1530.