

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO PAULO LOBO JUNIOR

PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGE<sub>s</sub>-F) E  
POLIMORFISMOS DOS GENES *MIF*, *MTNR1B* E *CDKAL1* NO DIABETES  
GESTACIONAL

CURITIBA

2014

JOÃO PAULO LOBO JUNIOR

PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGE<sub>s</sub>-F) E  
POLIMORFISMOS DOS GENES *MIF*, *MTNR1B* E *CDKAL1* NO DIABETES  
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 a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dayane Alberton

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2014

Lobo Junior, João Paulo

Produtos finais de glicação avançada fluorescentes (AGEs-F) e polimorfismos dos genes *MIF*, *MTNR1B* e *GDKAL1* no diabetes gestacional / João Paulo Lobo Junior – Curitiba, 2014.

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

Orientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs).
3. Produtos de glicação avançada (AGEs). I. Alberton, Dayane. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 616.462

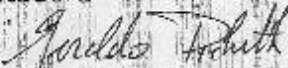
## TERMO DE APROVAÇÃO

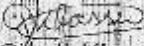
**JOÃO PAULO LOBO JUNIOR**

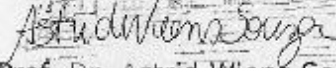
**Título: "PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES E POLIMORFISMOS DOS GENES MIF, MTNR1B E CDKAL1A NO DIABETES GESTACIONAL"**

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dayane Alberton  
Orientadora

  
Prof. Dr. Geraldo Picheth  
Co-orientador

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Giseli Klassen  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Astrid Wiens Souza  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 04 de abril de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais João Paulo Lobo Neto e Leonice Martini Lobo e a minha irmã Mauren Martini Lobo que sempre me incentivaram e deram força para que este trabalho fosse concluído.

Ao professor Geraldo Picheth e a professora Dayane Alberton, meus orientadores aos quais tenho muita admiração e passaram a ser referência de excelência profissional para mim. Muito obrigado pela oportunidade.

A professora Fabiane Gomes de Moraes Rego pela constante dedicação prestada ao grupo de “Pesquisas em Doenças Metabólicas”, o que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

A minha namorada Danielli Cristina da Silva que nunca me deixou desistir e indiretamente contribuiu muito para a realização deste sonho.

Aos meus colegas do grupo de pesquisas: Marciane Welter, Henrique Ravanhol Frigeri, Izabela C. R. dos Santos Weiss, Claudia Dib, Mauren Isfer Anghebem Oliveira, Waldemar Volanski e Priscila Bacarin Herman.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Regional da Lapa São Sebastião.

*“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”*

Albert Einstein

## RESUMO

O *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é uma patologia que afeta cerca de 7% das gestações e está associado à múltiplas complicações para a gestante e para o feto. O diagnóstico precoce e o tratamento do DMG minimizam a morbimortalidade associada à patologia. O objetivo do trabalho foi avaliar polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes *MIF* (fator inibidor da migração de macrófago; rs1007888), *MTNR1B* (receptor de melatonina 1B; rs10830963) e *CDKAL1* (quinase 1 dependente de ciclina; rs7754840) e a associação destes polimorfismos com biomarcadores de controle glicêmico, função renal, perfil lipídico e com os produtos de glicação avançada fluorescentes (AGEs-F) em um estudo do tipo caso-controle. Foram estudadas 442 gestantes Euro-Brasileiras, não relacionadas, sendo 225 gestantes com diabetes gestacional (grupo DMG) e 217 gestantes saudáveis (grupo controle) caracterizadas segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (2010). Os AGEs-F foram quantificados em espectrofluorímetro de placa. As genotipagens dos polimorfismos selecionados para o estudo foram realizadas pela metodologia de sondas fluorescentes (Taqman<sup>®</sup>). O projeto teve aprovação do Comitê de Ética da UFPR (CAAE09664412.4.0000.0101). Gestantes com DMG apresentaram idade, peso, e índice de massa corporal (IMC) significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. As concentrações séricas da glicemia em jejum, colesterol total, LDL-colesterol, triglicerídeos e ácido úrico foram significativamente maiores no grupo DMG. No entanto, o grupo controle apresentou concentrações séricas significativamente maiores quanto à uréia, creatinina, proteínas totais e albumina. As concentrações séricas dos AGEs-F não apresentaram diferença significativa entre os grupos e foram correlacionadas positiva e significativamente ( $r = 0,421$ ;  $P < 0,001$ ) com a creatininemia no grupo DMG. As concentrações séricas de AGEs-F também não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) em quatro períodos gestacionais distintos (12-23; 24-28, 29-32 e  $> 32$  semanas) sugerindo que este biomarcador é pouco influenciado pelas alterações fisiológicas associadas à gestação ou ao DMG. Todos os polimorfismos em estudo estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o grupo controle, os alelos de menor frequência apresentaram, respectivamente, 46,8% (95%IC 41-52) para o rs1007888; 20,2 (95%IC 16-24) para o rs10830963 e 28,0% (95%IC, 23-33) para o rs7754840 dos genes *MIF*, *MTNR1B* e *CDKAL1*. Os polimorfismos rs1007888 e rs7754840, respectivamente, nos genes *MIF* e *CDKAL1*, não foram associados ao DMG. O polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* foi associado à concentração sérica de LDL-colesterol no grupo DMG. No grupo DMG, portadoras do alelo de risco G em homozigose (GG) apresentaram concentração de LDL-colesterol, um marcador para risco cardiovascular, cerca de 20 mg/dL maior do que as portadoras do genótipo CC. As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) entre os grupos em estudo, sendo associadas ao diabetes gestacional. Portadoras do alelo de risco (G) do rs10830963 apresentaram cerca de 1,4 vezes (OR; 95%IC, 1,02-2,02) mais chance em desenvolver DMG quando comparadas às portadoras do alelo C. Em síntese, o polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* está associado ao DMG e a concentração sérica de AGEs-F não apresenta sensibilidade como biomarcador para esta patologia.

Palavras chave: diabetes gestacional, polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), produtos de glicação avançada (AGEs).

## ABSTRACT

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is a condition that affects about 7 % of pregnancies and is associated with multiple complications for the mother and the fetus. Early diagnosis and treatment of GDM minimize the morbidity and mortality associated with this disease. The objective of this study was to evaluate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes *MIF* (macrophage migration inhibitory factor; rs1007888), *MTNR1B* (melatonin receptor 1B; rs10830963) and *CDKAL1* (cyclin dependent kinase1; rs7754840) and their association with biomarkers of glycemic control, renal function, lipid profile and the fluorescent advanced glycation end products (F-AGEs) in a study of the case-control type. Were studied 442 unrelated Euro-Brazilian pregnant women and the subjects were classified as healthy pregnant women (control, n=217) and gestational diabetic patients (GDM, n=225) according to the American Diabetes Association criteria (2010). F-AGEs were measured in the spectrofluorimeter plate. The genotyping of the three polymorphisms were performed by the method of fluorescent probes (Taqman®). The project was approved by the Ethics Committee UFPR (CAAE09664412.4.0000.0101). Pregnant women with GDM presented age, weight, and body mass index (BMI) significantly ( $P < 0.05$ ) higher compared to the control group. Serum concentrations of fasting glucose, total cholesterol, LDL- cholesterol, triglycerides and uric acid of the GDM group were also significantly higher than control group. However, the control group had significantly higher serum concentrations of urea, creatinine, total protein and albumin than GDM group. Serum concentrations of F-AGEs showed no significant difference between the groups and were correlated positively and significantly ( $r = 0.421$ ,  $P < 0.001$ ) with serum creatinine in DMG group. Serum concentrations of F-AGEs were not different ( $P > 0.05$ ) in four different gestational periods (12-23, 24-28, 29-32 and  $>32$  weeks), suggesting that this biomarker is little influenced by physiological changes associated with pregnancy or gestational diabetes. The studied variants were in the Hardy-Weinberg equilibrium. For the control group, the frequency of minor alleles frequency showed, respectively, 46.8% (95% CI 41-52) for rs1007888, 20.2 (95% CI 16-24) for rs10830963 and 28.0% (95% CI 23-33) for rs7754840 in the *MIF*, *MTNR1B* and *CDKAL1*. The rs1007888 and rs7754840 polymorphisms, respectively, in the *MIF* and *CDKAL1* genes were not associated with GDM. The rs10830963 polymorphism in the gene *MTNR1B* was associated with serum LDL-cholesterol in the GDM group. In the DMG group, carrying the risk allele in homozygous G (GG) had LDL-cholesterol as a marker for cardiovascular risk, about 20 mg/dL higher than the carrier genotype CC Allele. The genotype frequencies of the rs10830963 polymorphism of the *MTNR1B* gene differed significantly ( $P < 0.05$ ) between the study groups, being associated with gestational diabetes. Carriers of the risk allele (G) of rs10830963 showed 1.4 times (OR, 95% CI, 1.02 to 2.02) chance to develop gestational diabetes when compared to the allele C. In summary, rs10830963 polymorphism of the gene *MTNR1B* is associated with DMG and serum F-AGEs shows no sensitivity as a biomarker for this disease.

Keywords: Gestational diabetes, single nucleotide polymorphisms (SNPs), advanced glycation end products (AGEs).



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA MUNDIAL DO DIABETES PARA O ANO DE 2030.....	18
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DOS NOVOS CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES MANIFESTO E DIABETES GESTACIONAL.....	24
FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>MIF</i> NO CROMOSSOMO 22.....	29
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>MTNR1B</i> NO CROMOSSOMO 11 .....	32
FIGURA 5 - REGULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL.....	33
FIGURA 6 - SINALIZAÇÃO DE RECEPTORES DA MELATONINA EM CÉLULAS BETA DO PÂNCREAS .....	35
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>CDKAL1</i> NO CROMOSSOMO 6. ....	36
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE GLICAÇÃO E FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADOS (AGEs). ...	39
FIGURA 9 - MECANISMO DA REAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN.....	49
FIGURA 10 - CURVAS ROC PARA CONCENTRAÇÕES DE AGEs FLUORESCENTES EXPRESSOS EM UA/mL e UA/g DE PROTEÍNA....	61
FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE AGEs FLUORESCENTES EM DIFERENTES PERÍODOS DA GESTAÇÃO PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	63
FIGURA 12 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE CREATININA E AGEs FLUORESCENTES SÉRICOS PARA O GRUPO DMG. ....	65
FIGURA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O POLIMORFISMOS rs10830963 DO GENE <i>MTNR1B</i> E CONCENTRAÇÕES DE LDL-COLESTEROL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO .....	48
TABELA 2 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES NA PCR EM TEMPO REAL .....	50
TABELA 3 - PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....	51
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS ANTOPOMÉTRICAS E CLÍNICAS DAS AMOSTRAS EM ESTUDO .....	54
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DOS BIOMARCADORES E AGES FLUORESCENTES PARA OS GRUPOS EM ESTUDO. ....	56
TABELA 6 - CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ( $P < 0,05$ ) ENTRE AGES FLUORESCENTES E BIOMARCDORES PARA OS GRUPOS EM ESTUDO .....	64
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs1007888 DO GENE <i>MIF</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	67
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1007888 DO GENE <i>MIF</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	67
TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs10830963 DO GENE <i>MTNR1B</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	70
TABELA 10 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10830963 DO GENE <i>MTNR1B</i> COM DADOS DA LITERATURA .....	71
TABELA 11 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs7754840 DO GENE <i>CDKAL1</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO .....	75
TABELA 12 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7754840 DO GENE <i>CDKAL1</i> COM DADOS DA LITERATURA .....	76

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - PCR em tempo real para o gene <i>MTNR1B</i> (SNP rs10830963).....	98
ANEXO 2 - PCR em tempo real para o gene <i>CDKAL1</i> (SNP rs7754840).....	99
ANEXO 3 - PCR em tempo real para o gene <i>MIF</i> (SNP rs1007888).....	100
ANEXO 4 - Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR .....	101
ANEXO 5 - Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo Controle).....	104
ANEXO 6 - Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo Gestacional).....	106



## LISTA DE ABREVIATURAS

2-h 75g de glicose - dosagem de glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose

ADA – American Diabetes Association; Associação Americana de Diabetes

AGEs – Advanced Glycation End Products; Produtos finais de glicação avançada

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosine

CDK – Quinase dependente de ciclina

CDK5RAP1 - Proteína 1 associada a subunidade reguladora de cdk5

CDKAL1 - Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CML - Carboximetil-lisina

DM – Diabetes *Mellitus*; Diabetes Melito

DM1 - *Diabetes Mellitus* tipo 1

DM2 - *Diabetes Mellitus* tipo 2

DMG - *Diabetes Mellitus* Gestacional

DNA - Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FTO - Fat mass and obesity-associated protein; proteína da obesidade e de massa de gordura associada

GAD - Glutamic acid decarboxylase

GCKR - Glucokinase regulatory protein

GCS - Gânglio cervical superior

GLP1 – Glucagon Like Peptide 1

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

HAPO - Hyperglycemia and Adverse Pregnancy outcome

HBA1C - Hemoglobina Glicada fração A1C

HC - Hospital de Clínicas

HDL-C - HDL- colesterol; High Density Lipoprotein – cholesterol

HPLC -High Performance Liquid Chromatography; cromatografia líquida de alta performance

H-W - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IADPSG - International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups

IDE - Insulin-degrading enzyme

IDF - International Diabetes Federation; Federação Internacional de Diabetes

IGF2BP2 - Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2

IMC - Índice de Massa Corporal

IRS1 - Insulin receptor substrate 1

KCNQ1 - Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1

KLF14 - Krüppel-like factor 14

LDL-C - LDL-colesterol; Low Density Lipoprotein – cholesterol

MIF - Macrophage migration inhibitory factor; fator inibidor da migração do macrófago

MODY - Maturity-Onset Diabetes of the Young; Diabetes da maturidade de início precoce

MTNR1B - Melatonin receptor 1B; receptor de melatonina 1B

NICE - National Institute for Health and Clinical Excellence

NPV - núcleo paraventricular

P – probabilidade

PBS – Phosphate buffered saline; tampão salina fosfatado

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PPARG - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

primers - oligonucleotídeos iniciadores

r - coeficiente de correlação

RAGE - Receptor for advanced glycation end products

RNA - Ribonucleic acid ; Ácido ribonucleico

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SLC30A8 - Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8

SNP - Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de único nucleotídeo

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TOTG - Teste Oral de Tolerância à Glicose

UFPR - Universidade Federal do Paraná

VLDL-C - VLDL-colesterol; Very Low Density Lipoprotein - cholesterol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1 DIABETES .....	17
3.1.1 Classificação do Diabetes Mellitus .....	19
3.1.2 Sintomas do Diabetes Mellitus .....	20
3.2 DIABETES GESTACIONAL .....	20
3.2.1 Critérios para o diagnóstico do Diabetes Gestacional (DMG) .....	22
3.2.2 Tratamento do Diabetes Gestacional .....	25
3.3 ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS AO DIABETES .....	26
3.3.1 Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) .....	26
3.3.2 Polimorfismos associados ao diabetes gestacional.....	27
3.4 GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPS).....	28
3.4.1 Gene MIF: fator inibidor da migração de macrófago .....	28
3.4.2 Gene MTNR1B: Receptor de melatonina tipo 1B.....	32
3.4.3 Gene CDKAL1: quinase 1 dependente de ciclina .....	36
3.5 PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES) .....	38
3.5.1 Formação dos AGes .....	38
3.5.2 Mecanismo de ação dos AGes .....	40
3.5.3 Receptores para os AGes.....	41
3.5.4 AGes como biomarcadores de patologias .....	41
3.5.5 Alternativas terapêuticas associadas aos AGes .....	43
3.5.6 Métodos para a detecção de AGes.....	45

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
4.1 AMOSTRAS .....	46
4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra .....	46
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA .....	47
4.3 GENOTIPAGENS DOS POLIMORFISMOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO .....	48
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES .....	50
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGES-F) .....	51
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	54
5.2 BIOMARCADORES E PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGES-F) .....	55
5.2.1 Marcadores para controle glicêmico .....	56
5.2.2 Perfil lipídico .....	57
5.2.3 Proteínas totais e albumina .....	58
5.2.4 Uréia e creatinina .....	58
5.2.5 Ácido Úrico .....	59
5.3 CONCENTRAÇÕES DE AGES FLUORESCENTES (AGES-F) E DIABETES GESTACIONAL .....	60
5.4 GENOTIPAGEM COM SONDAS FLUORESCENTES .....	66
5.4.1 Polimorfismo rs1007888 do gene <i>MIF</i> .....	66
5.4.2 Polimorfismo rs10830963 do gene <i>MTNR1B</i> .....	69
5.4.2.1 Correlação entre rs10830963 no gene <i>MTNR1B</i> com LDL colesterol .....	73
5.4.3 Polimorfismo rs7754840 do gene <i>CDKAL1</i> .....	75
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	81





## 1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas que são caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina ou em ambos, concomitantemente (ADA, 2014). Como consequência, a hiperglicemia em curto prazo vem acompanhada por complicações que podem ser fatais ao paciente como a cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica e em longo prazo as complicações estão associadas com disfunção e falência de vários órgãos, principalmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014).

O *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), foco do presente estudo, acomete cerca de 7% das gestações e está associado às múltiplas complicações para a gestante e para o feto (ADA, 2014). A hiperglicemia crônica e progressiva, características do diabetes gestacional, estão diretamente relacionadas com a ocorrência de efeitos perinatais adversos e, portanto, o diagnóstico e tratamento precoces são essenciais para essas gestações (HAPO, 2008).

No presente, as causas dos principais tipos de diabetes não são completamente conhecidas e as alterações metabólicas da patologia carecem de explicações que se apliquem a todos os casos. O envolvimento de genes e variabilidade genética (polimorfismos) são reconhecidos a muito no diabetes. No entanto, excluído o diabetes de origem monogênico, que explica apenas uma pequena fração dos tipos de diabetes, o envolvimento de múltiplos genes (poligênico) é proposto como forma predominante.

Portanto, pesquisas que promovam ou ampliem o conhecimento da fisiopatologia do diabetes são relevantes. Estudos de variações genéticas associadas ao diabetes, com ênfase nos polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*; SNPs) tem tido destaque. Nas últimas décadas, uma variedade de polimorfismos genéticos foi descrita associada aos diferentes tipos de diabetes (TANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; ZHANG, C. *et al.*, 2013). Estes estudos necessitam ser replicados em diferentes populações, pois as frequências genótípicas e alélicas desses polimorfismos podem variar conforme a composição étnica da população estudada (GUPTA *et al.*, 2012).

O Brasil, um país miscigenado, possui poucos estudos referentes aos polimorfismos associados ao *Diabetes mellitus*, o que dificulta a busca por marcadores genéticos para a população brasileira.

Este trabalho busca por biomarcadores para identificar risco para o diabetes gestacional avaliando os produtos de glicação avançada fluorescentes (AGEs-F) e polimorfismos em genes associados ao controle glicêmico neste processo patológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Associar variações genéticas com o *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e biomarcadores relacionados ao controle glicêmico com ênfase na concentração sérica de produtos de glicação avançada fluorescentes (AGEs-F), ao perfil lipídico e a função renal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os Produtos de Glicação Avançada fluorescentes (AGEs-F) em pacientes com diabetes gestacional e gestantes saudáveis.
- Determinar as frequências genótípicas e alélicas de polimorfismos dos genes *MIF* rs1007888, *MTNR1B* rs10830963 e *CDKAL1* rs7754840 na busca de associação com o diabetes gestacional.
- Identificar as frequências genótípicas e alélicas de variações genéticas associadas ao diabetes gestacional em uma amostra da população brasileira e comparar com outras populações.
- Correlacionar às variações genéticas, identificadas nos grupos estudados, às características clínicas dos pacientes estudados e com biomarcadores séricos de controle glicêmico, perfil lipídico, função renal e com a concentração de AGEs-F .

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DIABETES

A Associação Americana de Diabetes define o *Diabetes mellitus* (DM) como sendo um conjunto de doenças metabólicas, caracterizadas por hiperglicemia, as quais interferem no mecanismo de produção/secreção da insulina e/ou na ação deste hormônio em tecidos periféricos (ADA, 2014).

O Diabetes é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo e acomete cerca de 8,3% da população mundial (GUARIGUATA, 2012). A prevalência desta patologia vem crescendo rapidamente nos últimos anos, sendo, portanto, considerada uma epidemia (WILD *et al.*, 2004; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010; GUARIGUATA *et al.*, 2011). Uma projeção do número de diabéticos para o ano de 2030 (FIGURA 1) a partir levantamentos obtidos em 2011 estima que cerca de 552 milhões de indivíduos no mundo serão diabéticos neste período, o que corresponde a um aumento de 51%, do quadro atual (GUARIGUATA, 2012). Neste contexto, o continente africano passará de 14,7 milhões de diabéticos para 28 milhões, totalizando um aumento de 90% de casos. A Europa apresenta o menor aumento, passando de 52,8 milhões em 2011 para 64,2 milhões em 2030, representando um aumento de 22%. O aumento significativo da prevalência de diabetes na África é atribuído às mudanças ambientais aceleradas provocadas pela rápida urbanização e modernização, bem como aumento da expectativa de vida. Na América Latina a expectativa de aumento é de 59% passando de 25,1 milhões de diabéticos para 39,9 milhões (GUARIGUATA, 2012).

Diante deste quadro, novas pesquisas são necessárias para melhor caracterizar a interação de fatores genéticos e ambientais sobre a ocorrência do diabetes (KENGNE *et al.*, 2013). Paralelamente a epidemia de diabetes, está a epidemia de obesidade, a qual é um conhecido fator de risco para o diabetes. Entre os anos de 1980 a 2008 o índice de massa corpórea (IMC) aumentou a cada 10 anos, cerca de 0,4kg/m<sup>2</sup> para homens e 0,5kg/m<sup>2</sup> para mulheres no mundo e para o continente africano, o aumento foi maior que a média mundial (FINUCANE *et al.*, 2011).

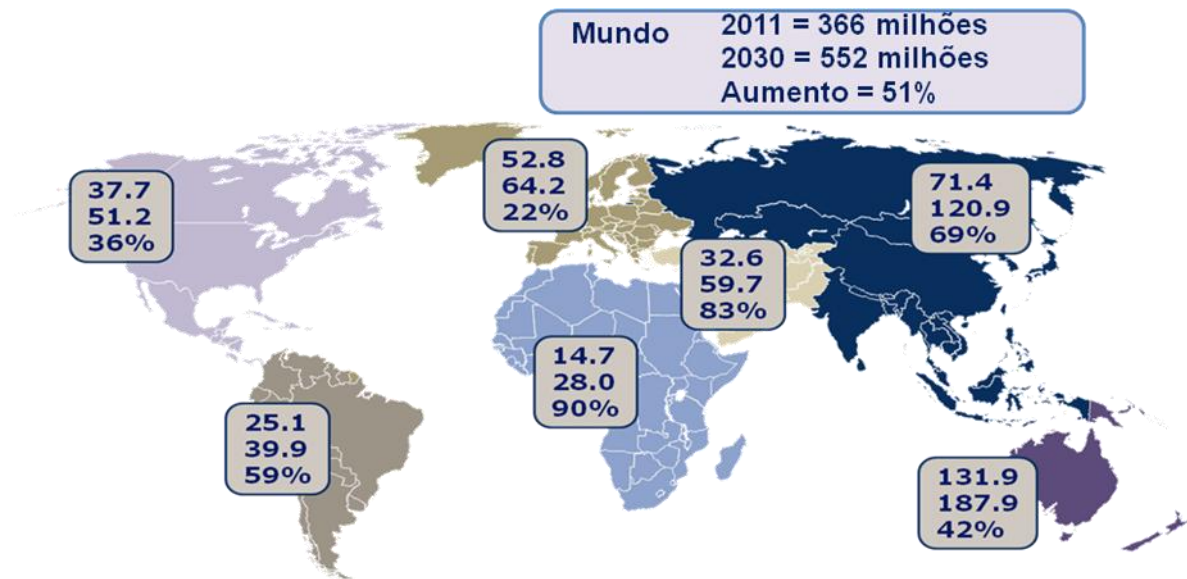


FIGURA 1 - PROJEÇÃO DA PREVALÊNCIA MUNDIAL DO DIABETES PARA O ANO DE 2030.

A figura mostra o número total de indivíduos com diabetes em 2011, a expectativa para 2030 e a porcentagem correspondente ao aumento de casos por continente (IDF, 2013).

Fatores genéticos reconhecidamente estão envolvidos com o diabetes, porém, os fatores ambientais associados à alteração no estilo de vida de muitas populações explicam o aumento expressivo na prevalência desta patologia para os próximos anos. Entre os fatores ambientais destaca-se a obesidade, o sedentarismo, a alimentação, a urbanização e o aumento na expectativa de vida (WILD *et al.*, 2004; GUARIGUATA *et al.*, 2011).

O aumento da incidência do diabetes tem impacto relevante para o planejamento da Saúde Pública. O diabético sem diagnóstico ou com tratamento ineficaz apresenta complicações crônicas severas como a nefropatia, a retinopatia (cegueira), a hipertensão, a aterosclerose e a neuropatia. Estas complicações de riscos estão associadas aos procedimentos de custo elevado ao sistema de saúde como os incrementos nos exames laboratoriais, nas ocupações de leitos hospitalares, no uso de diferentes medicações e nas internações em unidades de emergências e de terapias intensivas. (ZHANG, *et al.*, 2010).

### 3.1.1 Classificação do Diabetes Mellitus

A Associação Americana de Diabetes tem classificado esta doença em quatro grandes grupos (ADA, 2014):

- a) Diabetes tipo 1 (DM1): representa de 5-10% dos casos de diabetes. Na maioria dos casos, DM1 é causado pela destruição ou dano das células  $\beta$  pancreáticas devido à ação do sistema imune. Em menor frequência, existe o DM1 de origem idiopática. Em ambos os casos, a produção da insulina torna-se deficiente ou ausente. O DM1 é comum na infância e adolescência, mas pode ocorrer em todas as faixas etárias;
- b) Diabetes tipo 2 (DM2): representa 90-95% dos casos de diabetes. O DM2 está associado à resistência da ação da insulina e a redução lenta e progressiva na produção deste hormônio. Os pacientes com este tipo de diabetes geralmente são obesos e a necessidade de tratamento com insulina exógena ocorre somente após muitos anos de evolução da patologia. Agentes hipoglicemiantes orais representam a terapêutica usual para pacientes com DM2.
- c) Outros tipos específicos de diabetes: esta categoria engloba mais de 56 distintas patologias, com ênfase para o diabetes tipo MODY (*maturity-onset diabetes of the Young*; diabetes da maturidade de início precoce) que resulta de defeitos monogênicos que afetam a função das células  $\beta$ , levando a uma secreção diminuída de insulina. Este tipo de diabetes é detectado geralmente pelo aparecimento de hiperglicemia em idade precoce. Este grupo de diabetes também pode ser causado por mutações genéticas que geram defeitos na ação da insulina, endocrinopatias, drogas e substâncias químicas que induzem o diabetes e alguns tipos de infecções virais.
- d) Diabetes Mellitus Gestacional (DGM) é definido como qualquer grau de intolerância a glicose com início durante a gravidez.

A classificação do diabetes pode ser uma tarefa difícil, pois uma paciente classificada para o diabetes gestacional pode continuar a ter diabetes após a gestação e passar a ser classificada com diabetes tipo 2. Portanto, mais importante do que classificar ou rotular o tipo de diabetes é conhecer a patogênese da hiperglicemia e tratá-la de forma eficaz (ADA, 2014).

### 3.1.2 Sintomas do Diabetes Mellitus

Os principais sintomas de diabetes são poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva persistente), perda de peso e em alguns casos com polifagia (fome excessiva) e visão turva. Em curto prazo, a hiperglicemia com cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica são complicações do diabetes que trazem risco de vida para o paciente. Em longo prazo, a hiperglicemia crônica do diabetes está associada à disfunção e falência de vários órgãos e tecidos principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (FOWLER,2007).

## 3.2 DIABETES GESTACIONAL

O *Diabetes Mellitus Gestacional* (DMG) pode ser definido como qualquer grau de intolerância a glicose com aparecimento ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (CHENG; LAU, 2013)

Este tipo de diabetes acomete cerca de 7% das gestações, variando de 1-14% dependendo dos critérios usados para o diagnóstico e da população em estudo (ADA, 2014). A obesidade tem sido considerada o fator de maior risco para o desencadeamento desta patologia e a expectativa é de um aumento significativo da prevalência deste tipo específico de diabetes diante da presente epidemia da obesidade (WERNER *et al.*, 2012).

Em mulheres que desenvolvem o DMG, a resistência à insulina se apresenta de duas formas: a resistência fisiológica no final da gravidez e a resistência crônica. A resistência fisiológica à insulina no final da gravidez é ocasionada principalmente pela mudança do estado hormonal da mulher grávida, sendo o hormônio de crescimento placentário e o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , os principais fatores que induzem a esta resistência (METZGER *et al.*, 2007). As concentrações de cortisol, prolactina, estrógenos e progesterona também estão aumentadas durante a gestação e contribuem para a diminuição da sensibilidade a insulina. Além disso, a produção hepática de glicose aumenta entre 15% a 30% durante a gestação e a ingestão calórica e o aumento do peso corporal ajudam a descompensar os níveis glicêmicos. Esta condição tende a voltar ao normal no prazo de um ano após o parto em mulheres que possuem uma tolerância normal à glicose. (INTURRISI; LINTNER; SOREM, 2011). A forma crônica de resistência à insulina está presente antes da

gravidez e é exacerbada pelas mudanças fisiológicas durante a gravidez. Portanto, a maioria dos casos de diabetes gestacional é uma consequência da combinação entre a resistência adquirida e crônica à insulina (CHENG; LAU, 2013).

Cabe ressaltar que casos de diabetes gestacional ocasionados por disfunção autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, estão descritos na literatura e são raros. Este tipo de diabetes foi evidenciado devido à presença de anticorpos anti-citoplasma das células das ilhotas pancreáticas e anticorpos anti-GAD65, anti-tirosina fosfatases de membrana e anti-insulina. Estes anticorpos vêm sendo utilizados para identificar indivíduos com risco elevado em desenvolver diabetes autoimune (METZGER *et al.*, 2007). Outras formas de diabetes como o diabetes tipo MODY e diabetes mitocondrial, parecem contribuir de forma relativamente pequena, menor que 5%, dos casos de diabetes gestacional (ADA, 2014).

O DMG é um fator que aumenta o risco de complicações para o feto e para a gestante. Entre as complicações obstétricas decorrente do DMG, as mais frequentes são a pré-eclâmpsia (insuficiência renal aguda associada à proteinúria, hipertensão e edema), parto prematuro, hiperbilirrubinemia neonatal, necessidade de cesariana e distócia de ombro (WERNER *et al.*, 2012). Mulheres com histórico de diabetes gestacional tem maior probabilidade em desenvolver DM2 e doenças cardiovasculares após a gravidez, quando comparadas com mulheres com glicemia normal durante a gestação (ENGLAND *et al.*, 2009). De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (USA, 2011), 5% a 10% das mulheres norte-americanas que tiveram DMG, desenvolveram DM2 imediatamente após o parto. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2010, 40% das mulheres que tiveram DMG se tornarão diabéticas em até 10 anos após o parto.

Outro ponto que desperta interesse dos pesquisadores é a avaliação dos malefícios que podem ser causados em longo prazo nos bebês que nasceram de mães que tiveram diabetes durante a gestação. No entanto, devido à dificuldade em manter um acompanhamento pós-parto por muitos anos, poucos estudos foram realizados neste contexto (CHENG; LAU, 2013). Dabelea e colaboradores (2000) mostraram que filhos de mães que desenvolveram DMG tinham uma incidência significativamente maior de obesidade e diabetes tipo 2 quando comparadas com filhos de mães saudáveis (DABELEA; KNOWLER; PETTITT, 2000). Demais trabalhos realizados com este objetivo, concordam que estes indivíduos têm maior risco de obesidade e anormalidades metabólicas na infância, adolescência e início

da idade adulta (HUANG *et al.*, 2011; LAWLOR; LICHTENSTEIN; LANGSTROM, 2011).

### 3.2.1 Critérios para o diagnóstico do Diabetes Gestacional (DMG)

Os critérios para o diagnóstico do DMG foram inicialmente propostos para identificar mulheres que após a gestação apresentavam risco para o DM2. No entanto, nos últimos anos, tais critérios sofreram algumas modificações a fim de identificar gestantes com risco elevado para eventos perinatais adversos (WERNER *et al.*, 2012).

O HAPO (*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*), grupo que avalia os efeitos adversos da hiperglicemia nas gestações, publicou em 2008, um estudo multinacional com aproximadamente 25 mil gestantes, e concluiu que existe uma relação diretamente proporcional entre a hiperglicemia e o aparecimento de complicações perinatais durante a gestação. Além disso, este estudo evidenciou a existência de riscos para complicações perinatais em gestantes anteriormente classificadas normoglicêmicas (HAPO, 2008). Resultados similares foram encontrados em outros estudos (RAY *et al.*, 2001; LANDON *et al.*, 2009), indicando a necessidade da elaboração de novos critérios para o diagnóstico do DMG. Baseado nestes resultados, a *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG), uma associação fundada em 1998 e composta por representantes de várias organizações obstétricas e do diabetes, incluindo a Associação Americana de Diabetes (ADA), desenvolveu recomendações revisadas para o diagnóstico do DMG (IADPSG, 2010).

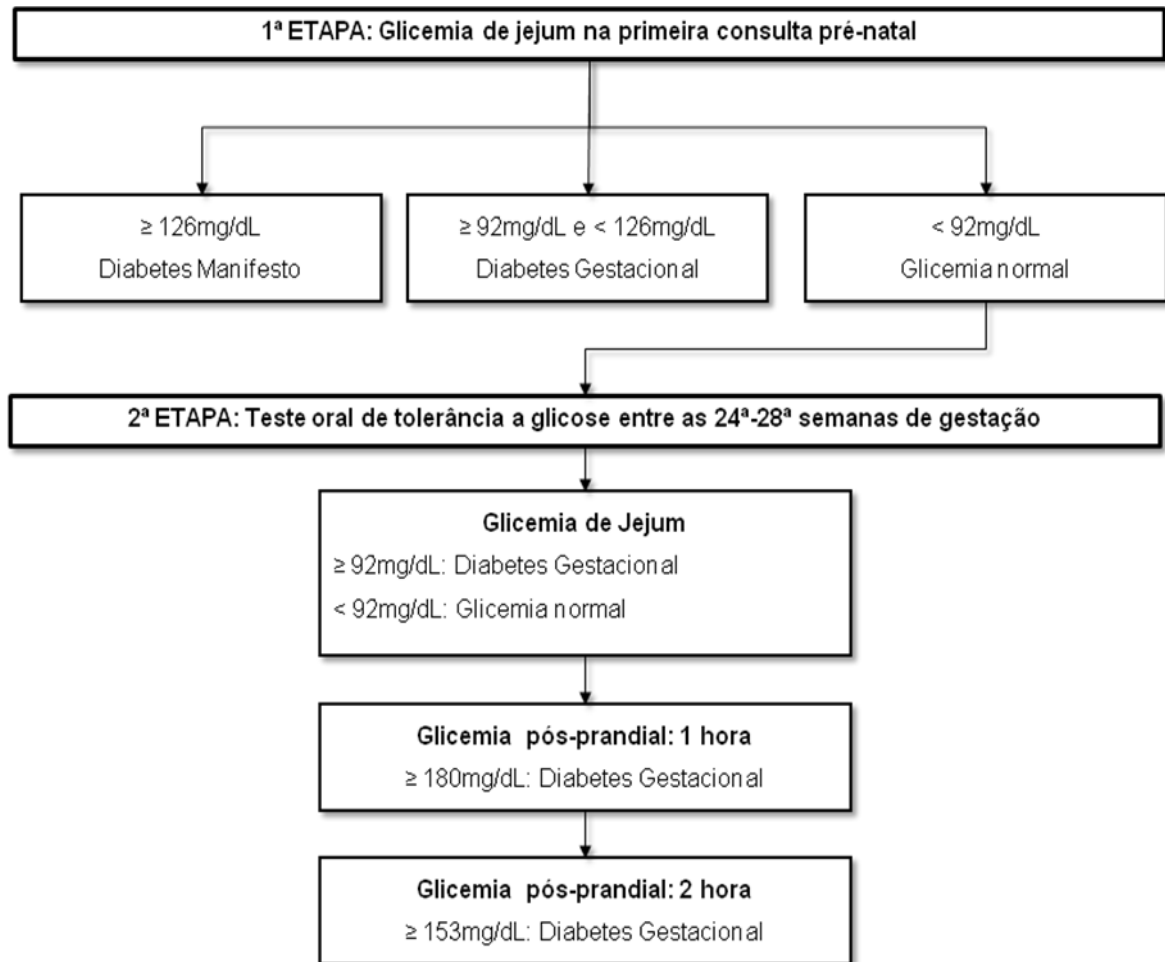
Dentre estas recomendações, o IADPSG criou uma nova categoria para identificar gestantes com provável diabetes pré-gestacional denominada de “*Overt Diabetes*” ou diabetes manifesto (IADPSG, 2010). A inclusão desta nova categoria é justificada devido à necessidade de identificar estas gestantes com diabetes manifesto para que recebam o tratamento adequado nas primeiras semanas da gestação, tendo em vista que a hiperglicemia mais severa que afeta essas gestantes está associada ao aumento do risco de anomalias congênitas na prole, aumento do risco de complicações do diabetes como a nefropatia e retinopatia (IADPSG, 2010).

Com base nas duas categorias de diabetes, o diabetes manifesto e o diabetes gestacional, o IADPSG recomenda que o diagnóstico do diabetes

gestacional ou manifesto seja feito em duas etapas (FIGURA 2). A primeira etapa consiste na dosagem de glicemia de jejum na primeira consulta do pré-natal. Caso o resultado para esta dosagem seja maior ou igual a 126mg/dL, a paciente é diagnosticada para o diabetes manifesto. Se o valor da glicemia de jejum for maior ou igual a 92mg/dL e menor que 126mg/dL, a paciente apresenta diabetes gestacional, mas se o valor for inferior a 92mg/dL, a paciente possui glicemia normal (FIGURA 2). Na segunda etapa do protocolo para o diagnóstico do diabetes gestacional, o IADPSG recomenda que aquelas gestantes com glicemia normal sejam submetidas ao teste oral de tolerância a glicose com 75g (TOTG 75g) entre a 24<sup>a</sup> e a 28<sup>a</sup> semana de gestação. O diagnóstico de Diabetes Gestacional é confirmado se o valor de glicemia em jejum for igual ou superior 92mg/dL ou se após o teste oral de tolerância a glicose (TOTG), a glicemia pós-prandial de 1 hora for igual ou superior a 180mg/dL ou a glicemia pós-prandial de 2 horas for igual ou superior a 153mg/dL (FIGURA 2).

A detecção da hiperglicemia no início da gestação, antes da 24<sup>a</sup> semana, é de extrema importância tendo em vista que estas gestantes podem iniciar o tratamento assim que for detectada a hiperglicemia, diminuindo assim o risco de abortos espontâneos e anomalias congênitas que são complicações da hiperglicemia neste período (STARIKOV *et al.*, 2013).

Com a mudança nos critérios para o diagnóstico, a prevalência do diabetes gestacional deverá aumentar significativamente, principalmente porque apenas uma concentração acima dos critérios de corte resulta em diagnóstico do DMG. Critérios anteriores requeriam que pelo menos duas medidas na curva estivessem acima do critério de corte para estabelecer o diagnóstico (ADA, 2013). Nos Estados Unidos, a expectativa é de que o número de gestantes com diagnóstico de diabetes gestacional aumente de 2-5% para aproximadamente 16% e conseqüentemente, os custos com a execução de exames também aumentará. No entanto, os benefícios da adoção deste protocolo proposto pela IADPSG sobrepõem os custos envolvidos, pois se estima que melhorará os desfechos maternos e neonatais e conseqüentemente reduzirá os gastos futuros associados ao DMG (IADPSG, 2010; MISSION *et al.*, 2012; WERNER *et al.*, 2012).



**FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DOS NOVOS CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES MANIFESTO E DIABETES GESTACIONAL**

De acordo com os novos critérios para o diagnóstico do diabetes manifesto e gestacional, na primeira consulta pré-natal, a gestante fará o exame da glicemia em jejum (1ª etapa) e dependendo dos valores desta glicemia, a gestante poderá apresentar o diabetes manifesto ( $\geq 126\text{mg/dL}$ ), que é caracterizado como um diabetes pré-gestacional, ou diabetes gestacional ( $92\text{ mg/dL} \leq \text{glicemia} < 126\text{mg/dL}$ ) ou a paciente pode apresentar uma glicemia normal ( $< 92\text{ mg/dL}$ ). Se o resultado apontar para uma glicemia normal, a gestante deverá entre as 24ª-28ª semanas de gestação, realizar o teste oral de tolerância à glicose (75g) (2ª etapa), no qual é determinado a glicemia de jejum e a glicemia no tempo de 1 e 2 horas após a ingestão da solução de glicose 75g. Os mesmos valores da glicemia em jejum da 1ª etapa são considerados na 2ª etapa. Os valores de glicemia pós-prandial de 1 hora e 2 horas que caracterizam o diagnóstico para o diabetes gestacional são  $\geq 180\text{mg/dL}$  ou  $\geq 153\text{mg/dL}$  (IADPSG, 2010; ADA, 2013).

O protocolo da IADPSG para o rastreamento do diabetes gestacional foi elaborado com a participação de várias organizações obstétricas e de diabetes, mas não é universalmente aceito. A Associação Canadense de Diabetes, por exemplo, recomenda que seja realizada uma triagem utilizando o TOTG com 50g de glicose e

para o diagnóstico, recomenda o TOTG utilizando 75g de glicose onde os valores de corte são: glicemia de jejum  $\geq 90\text{mg/dL}$ , glicemia após 1 hora  $\geq 180\text{mg/dL}$  e 2 horas  $\geq 162\text{mg/dL}$ , sendo que um valor acima dos limites é suficiente para o diagnóstico (CHENG; LAU, 2013).

### 3.2.2 Tratamento do Diabetes Gestacional

Toda gestante deve receber orientações nutricionais com o objetivo de ter um ganho de peso apropriado, ingestão nutricional adequada para suprir as necessidades da gestante e do bebê e manter os níveis esperados normais de glicemia para a gestação. Além disso, a prática de atividade física deve ser incentivada a menos que exista alguma contraindicação (CHENG; LAU, 2013).

O tratamento de primeira escolha para o diabetes gestacional consiste em dieta com redução calórica balanceada, caso este tratamento falhe e a gestante não atinja os níveis normais de glicemia em até duas semanas, indica-se a aplicação da terapia farmacológica (FARACI *et al.*, 2011).

A glibenclamida, que atua estimulando a produção da insulina na célula  $\beta$  pancreática, tem se mostrado como uma alternativa segura e eficaz para o tratamento do diabetes gestacional (KREMER; DUFF, 2004) e possui a vantagem de não atravessar a barreira placentária (ELLIOTT *et al.*, 1994). Um estudo recente mostrou que a glibenclamida é tão eficiente quanto a insulina para o controle glicêmico no diabetes gestacional (TEMPE; MAYANGLAMBAM, 2013).

A metformina, que atua aumentando a sensibilidade periférica à insulina e a utilização celular de glicose, inibindo a gliconeogênese hepática e retardando a reabsorção intestinal de glicose, também tem se mostrado eficaz no controle da hiperglicemia no diabetes gestacional (LAUTATZIS; GOULIS; VRONTAKIS, 2013; MESDAGHINIA *et al.*, 2013). Quando comparada com a glibenclamida, a metformina mostrou um menor ganho de peso para a gestante e baixa frequência de hipoglicemia neonatal (SPAULONCI *et al.*, 2013). A metformina atravessa a barreira placentária (HUGHES *et al.*, 2006), mas ainda faz-se necessário estudos com tamanho amostral maior e um acompanhamento dos recém nascidos por um longo período de tempo para avaliar os efeitos a longo prazo (MESDAGHINIA *et al.*, 2013).

O uso da terapia com insulina subcutânea é utilizada em aproximadamente 30% dos casos de gestantes com diabetes gestacional que precisam de tratamento

farmacológico. No entanto, a terapia com insulina subcutânea está frequentemente associada a episódios de hipoglicemia e ganho de peso, além do alto custo e requerimento de tratamento especializado (FARACI *et al.*, 2011; CHENG; LAU, 2013).

Em síntese, ainda não existe um consenso sobre o tratamento farmacológico para o diabetes gestacional. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) sugere a insulina como tratamento farmacológico padrão, o *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) recomenda o uso de metformina e a *International Diabetes Federation* (IDF) indica a metformina e a glibenclamida como opção (WEINERT *et al.*, 2011).

Em relação às pacientes diagnosticadas com diabetes gestacional, a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2014) recomenda que estas mulheres sejam avaliadas entre 6 a 12 semanas após o parto, para verificar se o diabetes persiste. Caso não haja persistência, essas mulheres deverão monitorar a glicemia ao longo da vida, pelo menos a cada 3 anos, para averiguar a possibilidade do desenvolvimento de diabetes ou pré diabetes.

### 3.3 ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS AO DIABETES

A busca por novos biomarcadores que possam ser utilizados para obtenção de um diagnóstico precoce e preciso, no monitoramento do tratamento e progressão da doença, tem se tornado um dos focos principais a ser alcançado pela comunidade científica (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011). Neste contexto, os estudos de associação genômica tornaram-se uma ferramenta importante para descobrir as bases genéticas das doenças nos seres humanos (RISCH; MERIKANGAS, 1996) e muitos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) foram descritos em estar associados aos diferentes tipos de diabetes (DAIMON *et al.*, 2005; ANGEL *et al.*, 2009; BURACZYNSKA *et al.*, 2011).

#### 3.3.1 Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs)

Os polimorfismos de único nucleotídeo ou SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) são a forma mais abundante de variações genéticas nos seres humanos, representam uma posição no DNA em que duas, ou em alguns casos

mais que duas bases ocorrem alternadamente com uma frequência considerável (>1%) (RISCH; MERIKANGAS, 1996). A estimativa da ocorrência dos SNPs é de aproximadamente 1 a cada 100-300 bases no genoma humano (THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2010).

Os polimorfismos podem ocorrer em diferentes sítios do DNA e podem produzir alterações fenotípicas. Polimorfismos que ocorrem em uma região gênica que promova a alteração da estrutura ou a função da proteína codificada por este gene, são a causa das principais doenças monogênicas conhecidas, que podem ser de característica dominante ou recessiva. Esses polimorfismos são geralmente avaliados com o interesse no diagnóstico de patologias de origem genética (SYVANEN, 2001). Alguns polimorfismos alteram a estrutura primária das proteínas envolvidas no metabolismo das drogas e podem ser alvos de análises farmacogenéticas (EVANS; RELLING, 1999). Outros polimorfismos estão associados com fatores de risco ou proteção para diferentes patologias. No entanto, a maioria dos polimorfismos conhecidos ocorrem em região não codificadora e não tem impacto direto no fenótipo do indivíduo, estas variações genéticas são úteis para estudos evolutivos das populações (RISCH; MERIKANGAS, 1996).

O interesse na pesquisa de polimorfismos genéticos está atrelado a busca de marcadores para identificar genes que predisõem os indivíduos a doenças multifatoriais como o diabetes (SYVANEN, 2001). Nos últimos anos, muitos polimorfismos foram descritos associados aos diferentes tipos de diabetes (TANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; ZHANG, C. *et al.*, 2013).

### 3.3.2 Polimorfismos associados ao diabetes gestacional

Mulheres com diabetes gestacional apresentam características fisiológicas e genéticas similares as encontradas no diabetes fora da gravidez, e não surpreendentemente, as mulheres com DMG possuem maior risco em desenvolver DM2 após a gestação. Portanto, estudar DMG é uma boa maneira de estudar patogênese precoce do diabetes e possivelmente, desenvolver um tratamento para a doença. No entanto, enquanto os estudos genéticos sobre DM2 são muito robustos, há relativamente poucos estudos genéticos para o DMG (CHO *et al.*, 2009; ZHANG, C. *et al.*, 2013).

KWAK e colaboradores (2012) avaliaram polimorfismos (SNPs) associados ao diabetes tipo 2 em mulheres com diabetes gestacional e concluíram que dentre os genes associados ao diabetes tipo 2, aqueles que são conhecidos por regular a função da célula  $\beta$  (*CDKAL1*, *MTNR1B*, *IGF2BP2*, *CDKN2A/2B*, *SLC30A8*, *IDE*, *KCNQ1* e *CENTD2*) foram preferencialmente associados ao diabetes gestacional, enquanto que genes associados a resistência a insulina como (*FTO*, *PPARG*, *IRS1*, *KLF14* e *GCKR*), não foram significativamente associados ao diabetes gestacional. Portanto, o defeito da célula  $\beta$  em compensar o aumento da resistência a insulina na gestação pode ser o principal efeito fisiopatológico do diabetes gestacional (KWAK *et al.*, 2012).

Zhang e colaboradores realizaram recentemente uma revisão sistemática e identificaram polimorfismos em 7 genes significativamente associados com maior risco de diabetes gestacional. Dentre eles, 5 estão relacionados com a função da células  $\beta$ . Os polimorfismos e genes identificados neste estudo foram: rs7903146 e rs12255372 (*TCF7L2*), 1799884 (*GCK*), rs5219 (*KCNJ11*), rs7754840 (*CDKAL1*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs10830963 e 1387153 (*MTNR1B*) e 1801278 (*IRS1*) sendo que os polimorfismos no gene *TCF7L2* foram os mais fortemente associados (ZHANG, C. *et al.*, 2013).

Apesar do crescimento deste tipo de estudo nos últimos anos, impulsionado pela melhoria das metodologias e pela diminuição dos custos para realizá-las, o conhecimento sobre os loci genéticos associados ao diabetes gestacional ainda é limitado, e mais estudos envolvendo polimorfismos e este subtipo de diabetes são necessários (KWAK *et al.*, 2012).

Neste trabalho foram estudados três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que estão presentes, respectivamente, em três genes, sendo eles: rs1007888 (*MIF*), rs7754840 (*CDKAL1*) e rs10830963 (*MTNR1B*).

### 3.4 GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPS)

#### 3.4.1 Gene *MIF*: fator inibidor da migração de macrófago

O gene do fator inibidor da migração de macrófago (*MIF*) está localizado no braço longo do cromossomo 22 na posição 22q11.2, e é composto de 3 éxons e 2

íntrons (YUAN *et al.*, 2013) (FIGURA 3). Este gene é transcrito para um único RNA mensageiro de, aproximadamente 0,8Kb, que codifica para uma proteína não glicosilada composta por 114 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 12,5kDa e estrutura homotrimérica (CALANDRA; ROGER, 2003).

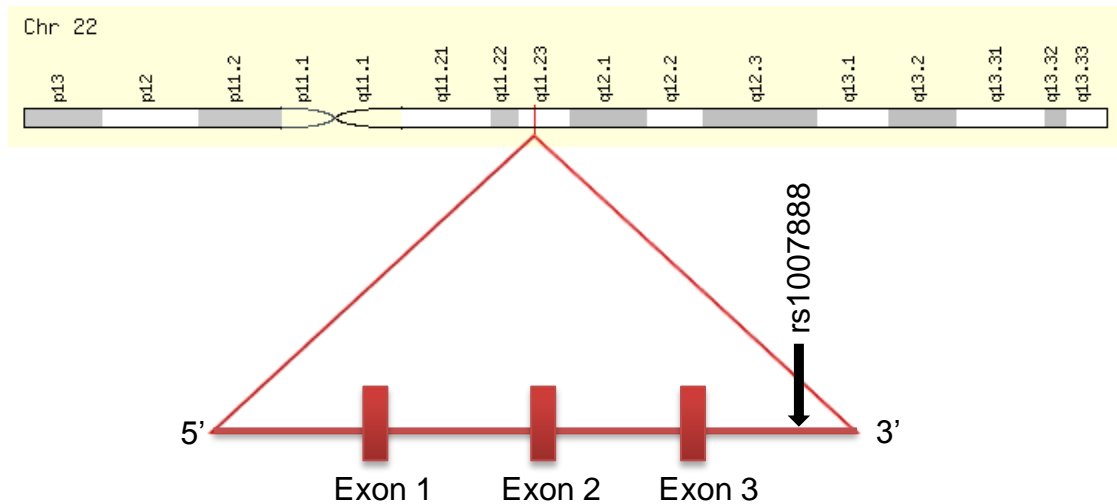


FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *MIF* NO CROMOSSOMO 22

A marcação em vermelho no cromossomo indica que este gene está localizado no braço longo (q) posição 11.23. A ampliação da região, mostra que o gene *MIF* é composto por 3 éxons e 2 íntrons e o SNP rs 1007888, alvo do presente estudo, está localizado a uma distância de 3807 pares de base (pb) do códon de terminação da tradução.

Fonte: [www.genecards.org](http://www.genecards.org). Acesso em 19/11/2013.

O MIF foi uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias a ser descrita como um inibidor de migração de macrófagos em teste realizados *in vitro* (DAVID, 1966). Inicialmente, MIF era considerado um fator solúvel liberado apenas pelos linfócitos T. No entanto, ao contrário da maioria das citocinas, *MIF* é constitutivamente expresso em vários tipos de tecidos, como pulmão, pele, trato gastrointestinal e urinário (MAASER *et al.*, 2002), glândulas endócrinas, células  $\beta$  pancreáticas, ovários, testículos, hipotálamo, adrenais, pituitária, células do sistema imune (células T e B, monócitos, macrófagos) (CALANDRA *et al.*, 1994), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células dendríticas (MURAKAMI *et al.*, 2002).

MIF tem um papel central como mediador na resposta de imunidade inata e resposta inflamatória (CALANDRA; ROGER, 2003). Uma das suas principais funções é recrutar células da resposta imune inata e adaptativa para o local da

inflamação, bem como amplificar a produção de outros mediadores pró inflamatórios como, Interleucinas, Interferon- $\gamma$ , Fator de necrose tumoral- $\alpha$  e Óxido Nítrico (CALANDRA; ROGER, 2003).

Além do seu conhecido papel em respostas imunes, MIF influencia o metabolismo da glicose, afetando a produção da insulina nas células  $\beta$  pancreáticas, bem como, as células-alvos deste hormônio (WAEBER *et al.*, 1999). A proteína MIF é produzida nas células  $\beta$  e colocalizada com a insulina nos grânulos secretórios (WAEBER *et al.*, 1997; WAEBER *et al.*, 1999). A expressão de *MIF* nas células  $\beta$  e seus níveis plasmáticos seguem o ritmo circadiano, com elevados níveis durante o dia (PETROVSKY *et al.*, 2003; ALLAMAN-PILLET *et al.*, 2004).

De acordo com Waeber e colaboradores (1997), a expressão do gene *MIF*, nas células  $\beta$  pancreáticas, é regulada por concentrações de glicose extracelular e, como a insulina, altas concentrações de glicose, elevam a concentração de MIF nestas células. Além disso, a função de MIF nas células pancreáticas seria potencializar a secreção de insulina por meio de uma ativação autócrina positiva (PLAISANCE *et al.*, 2002). No entanto, o papel de *MIF* nas células  $\beta$  pancreáticas não se restringe apenas às condições de homeostasia fisiológica, MIF também é participante ativo nas disfunções destas células (LUE *et al.*, 2002; CVETKOVIC; STOSIC-GRUJICIC, 2006).

Na patogênese do DM1, MIF pode estar envolvido como um propagador da inflamação autoimune (CVETKOVIC *et al.*, 2005). Durante a patogênese do diabetes, as ilhotas pancreáticas são expostas à elevados níveis de citocinas e outros mediadores inflamatórios que induzem a deterioração das células pancreáticas e a apoptose. Considerando que MIF é uma citocina produzida nas células  $\beta$  pancreáticas e que atua no início e no desenvolvimento de várias doenças imunoinflamatórias e controla a apoptose, Stojanovic e colaboradores (2012) investigaram, *in vitro*, o papel de MIF na indução da apoptose de células pancreáticas oriundas da linhagem de camundongos MIF-KO, deficiente em gene MIF. Após incubar por 24 e 48 horas, ilhotas e células pancreáticas de MIF-KO, observou-se um decréscimo na viabilidade celular comparado ao controle, sugerindo um potencial papel de MIF na propagação da morte das ilhotas pancreáticas (STOJANOVIC; SAKSIDA; STOSIC-GRUJICIC, 2012). Demais estudos mostraram que a incidência de DM1 em ratos não obesos e não diabéticos tratados com MIF recombinante foi altamente aumentada, enquanto a deficiência ou inibição de MIF

protegia os ratos do diabetes induzido por estreptozotocina (BOJUNGA *et al.*, 2003; CVETKOVIC *et al.*, 2005; STOSIC-GRUJICIC *et al.*, 2008).

Estudos com células  $\beta$  pancreáticas mostraram uma relação do aumento da expressão de *MIF* com a concentração elevada de glicose e um aumento na secreção de insulina. Estes resultados sugerem que níveis elevados da proteína MIF podem ser parte de um mecanismo compensatório de um início de insuficiência da célula  $\beta$  ou uma resistência da insulina em manter os níveis de insulina, indicando um aumento no risco para o desenvolvimento do diabetes (VOZAROVA *et al.*, 2002; HERDER *et al.*, 2008).

Estudos têm mostrado a relação entre *MIF* e DM2 (YABUNAKA *et al.*, 2000; HERDER *et al.*, 2006; HERDER *et al.*, 2008). Vozarova e colaboradores (2002) avaliaram a concentração de MIF no plasma de indianos Pima que apresentam elevada propensão para o desenvolvimento de DM2. Os resultados indicaram que as concentrações plasmáticas da proteína MIF bem como a resistência à insulina foram maiores no grupo de indianos Pima quando comparados com o grupo controle (caucasianos não diabéticos) (VOZAROVA *et al.*, 2002). A concentração da proteína MIF também foi significativamente maior em pacientes com diabetes tipo 2 em relação a um grupo de indivíduos saudáveis (HERDER *et al.*, 2006).

Apesar das evidências da relação entre o Fator Inibidor da Migração de Macrófagos, MIF, e o diabetes, poucos trabalhos envolvendo polimorfismos no gene *MIF* com amostras de pacientes diabéticos foram realizados. Herder e colaboradores (2008) mostraram que a presença do alelo G no polimorfismo rs1007888, localizado a uma distância de 3807 pares de base (pb) do códon de terminação da tradução, está associada à elevadas concentrações da proteína MIF, porém o mecanismo pelo qual isto ocorre não é conhecido (HERDER *et al.*, 2008).

Em 2011, Aslani e colaboradores foram os primeiros a detectar associação do polimorfismo rs1007888 com o risco para o desenvolvimento do diabetes gestacional, em uma população iraniana (ASLANI *et al.*, 2011). Zhan e colaboradores (2013) também detectaram associação entre o rs1007888 com o diabetes gestacional em um estudo realizada com mulheres chinesas (ZHAN *et al.*, 2013). Porém, outros estudos com outras populações são necessários para melhor avaliar esta associação.

### 3.4.2 Gene *MTNR1B*: Receptor de melatonina tipo 1B

O gene *MTNR1B* está localizado no cromossomo 11 posição q21-q22 (NAGORNY; LYSENKO, 2012) (FIGURA 4). Este gene expressa um dos receptores de melatonina (MTNR1B) (LIU, C. *et al.*, 2010).

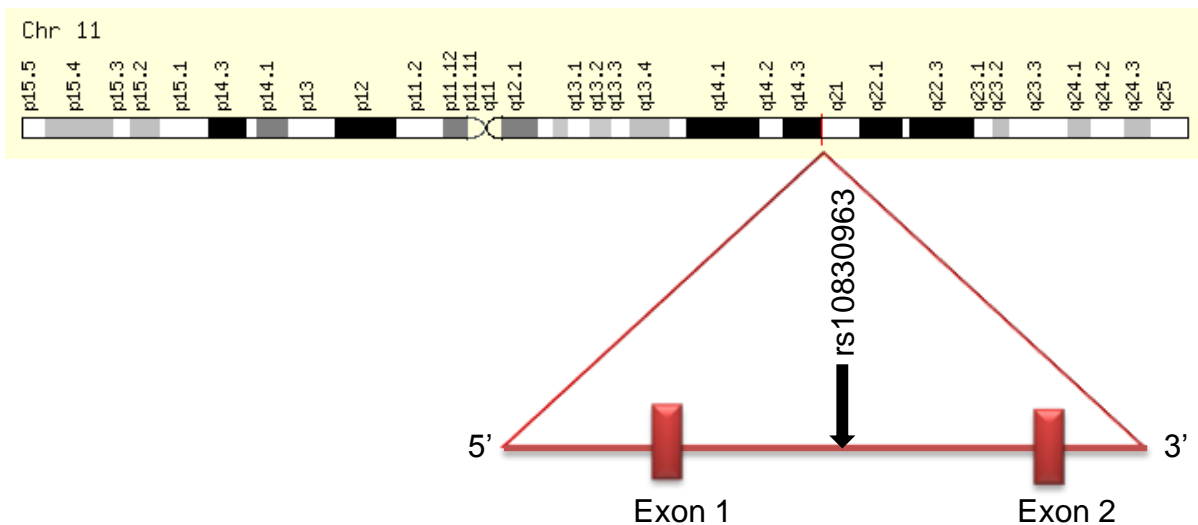


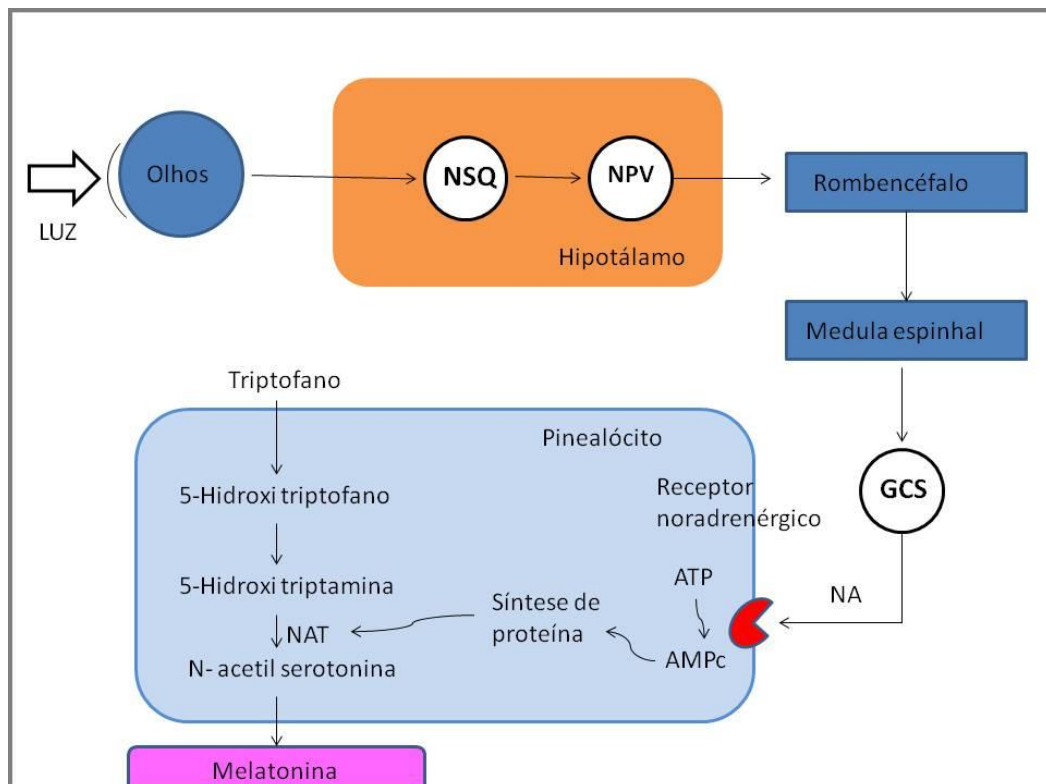
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *MTNR1B* NO CROMOSSOMO 11

A marcação em vermelho no cromossomo indica que o gene *MTNR1B* está localizado no braço longo (q) posição 21. A ampliação da região mostra que o gene *MTNR1B* é composto por 2 éxons 1 íntron e o SNP rs 100830963, alvo do presente estudo, está localizado no íntron. Fonte: [www.genecards.org](http://www.genecards.org). Acesso em 19/11/2013.

A melatonina é um hormônio secretado predominantemente pela glândula pineal, mas também é produzido pelas células neuroendócrinas da retina, trato gastrointestinal e pâncreas (KVETNOY, 1999). A função da glândula pineal é sinalizar para o meio interno, se é dia ou noite no meio exterior, via produção e secreção da melatonina (DUBOCOVICH, 2010). A produção de melatonina é baixa durante o dia e elevada durante a noite, sendo que pico dos níveis circulantes de melatonina é aproximadamente 200pg/mL durante o período noturno e diminui para 10 pg/mL durante o dia (ARENDDT, 1998). Aproximadamente 70% da melatonina no sangue encontra-se ligada a albumina (MORIN *et al.*, 1997).

A luz é o fator mais importante na regulação da síntese da melatonina (FIGURA 5) (ZEE; MANTHENA, 2007). No período diurno, a luz provoca impulsos

luminosos excitando os neurônios da retina que fazem conexão com o núcleo supraquiasmático, do qual partem projeções gabaérgicas inibitórias para o núcleo paraventricular. As fibras eferentes do núcleo paraventricular fazem sinapses com neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal. Estes se conectam a neurônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio cervical superior que por sua vez enviam fibras noradrenérgicas à glândula pineal (ZEE; MANTHENA, 2007). Na glândula pineal, o reconhecimento da noradrenalina pelos receptores noradrenérgicos, eleva o AMP cíclico nos pinealócitos que induzem a síntese de melatonina (SCHEER; CZEISLER, 2005). Portanto, o hormônio melatonina atua no controle do ritmo circadiano, modulando uma série de funções neuroendócrinas, como sono-vigília, atividade reprodutora e atividade metabólica (SCHEER; CZEISLER, 2005).

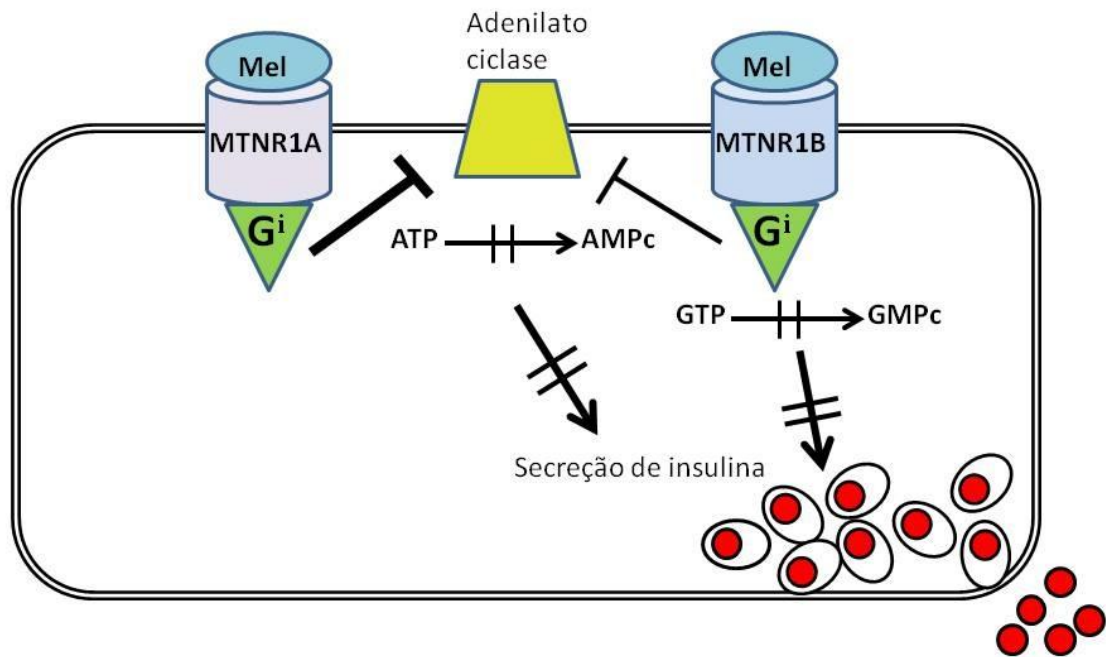


**FIGURA 5 - REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL**

O relógio circadiano no núcleo supraquiasmático (NSQ) é controlada por fotorreceptores da retina que são ativados pela luz. O sinal passa para o núcleo paraventricular (NPV), rombencéfalo, medula espinhal, gânglio cervical superior (GCS) para receptores noradrenérgicos (NA) presentes nos pinealócitos. A serotonina N acetil transferase (NAT) é a enzima que participa da etapa limitante da síntese de melatonina e esta aumentada cerca de 30 a 70 vezes durante a noite devido a estimulação noradrenérgica. Adaptado de (SCHEER; CZEISLER, 2005).

Em mamíferos, existem dois receptores funcionais da melatonina, o MTNR1A e MTNR1B, que apresentam 60% de homologia (REPPERT; WEAVER; GODSON, 1996). A maioria dos receptores estão presentes no cérebro, sendo o MTNR1A mais abundante do que o MTNR1B. Estes receptores de melatonina também estão presentes nas ilhotas de Langherans, com MTNR1B predominando nas células  $\beta$ , enquanto MTNR1A localiza-se nas células  $\alpha$  pancreáticas (RAMRACHEYA *et al.*, 2008)

Os receptores MTNR1A e MTNR1B são membros da família de receptores acoplados a proteína G, especificamente a proteína G inibitória (FIGURA 6) (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2008). A resposta da ocupação dos receptores de melatonina é a inibição da adenilato ciclase e consequente queda na concentração celular dos níveis de AMP cíclico (VON GALL; STEHLE; WEAVER, 2002). Nas células  $\beta$  pancreáticas, ambos os receptores também sinalizam para a via inibitória da proteína G, o que acarreta na redução da secreção da insulina e umas hipóteses seria a diminuição da expressão dos hormônios incretinas, GLP-1(peptídeo semelhante ao glucagon 1) e GIP (peptídeo trópico insulínico dependente de glicose) que atuam no estímulo à secreção da insulina (LYSSENKO *et al.*, 2009). Além desta via, MTNR1A ocupado pela melatonina sinaliza a ativação da fosfolipase C, via proteína G, acarretando no aumento dos níveis de cálcio ionizado e consequentemente na secreção da insulina. Já o MTNR1B ocupado por melatonina sinaliza a inibição da formação de GMPc e consequentemente reduz a secreção das vesículas de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas (DUBOCOVICH *et al.*, 2010).



**FIGURA 6 - SINALIZAÇÃO DE RECEPTORES DA MELATONINA EM CÉLULAS BETA DO PÂNCREAS**

Ambos os receptores (MTNR1A e MTNR1B) de melatonina (Mel) são expressos em células  $\beta$  do pâncreas e sinalizam para a via inibitória da proteína G ( $G_i$ ), que inativa a adenilato-ciclase, reduzindo os níveis de AMPc na célula resultando na redução da secreção de insulina. Este efeito é resultado, principalmente, de sinalização MTNR1A. A sinalização MTNR1B inibe a formação de GMPc com conseqüente redução da secreção de insulina em células beta do pâncreas. Adaptado de (DUBOCOVICH *et al.*, 2010).

Estudos sobre a interação funcional do hormônio melatonina, via receptores MTNR1A e MTNR1B, sobre o metabolismo da glicose, mostram que a melatonina diminui a secreção de insulina das células  $\beta$  pancreáticas (BAZWINSKY-WUTSCHKE *et al.*, 2014) e conseqüentemente este hormônio está envolvido na patogênese do diabetes mellitus. A comparação entre os níveis de RNAm dos genes *MTNR1A* e *MTNR1B* indicou que pacientes com DM2 apresentavam uma elevada expressão de RNAm quando comparado com indivíduos saudáveis e que a expressão relativa para o receptor MTNR1A foi de 12.8 e para MTNR1B foi de 28.8 vezes maior em indivíduos com DM2 em relação aos indivíduos saudáveis (PESCHKE *et al.*, 2007). Elevados níveis de expressão de RNAm de MTNR1B também foram detectados em grupos de risco para o DM2 (LYSSENKO *et al.*, 2009).

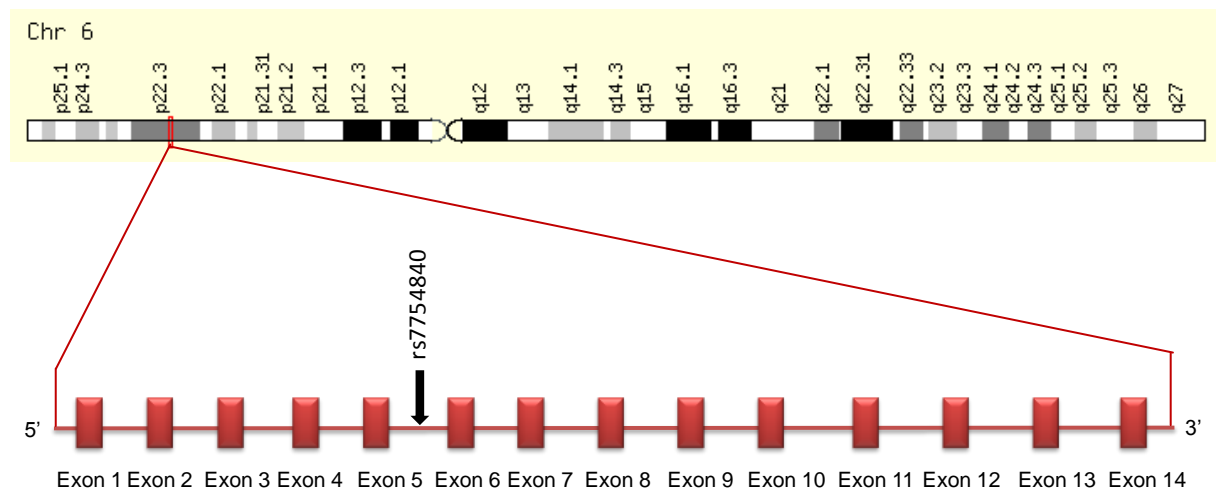
Além disso, estudos amplos do genoma têm mostrado que variações no gene do *MTNR1B* estão associadas com o risco para o desenvolvimento do DM2 e com o DM2 propriamente dito (STAIGER *et al.*, 2008; LYSSENKO *et al.*, 2009;

PROKOPENKO *et al.*, 2009). O polimorfismo rs10830963 se mostrou associado ao diabetes tipo 2 (SPARSO *et al.*, 2009; OLSSON *et al.*, 2011). Em uma recente meta-análise incluindo 18 artigos envolvendo 227.436 indivíduos, o alelo G do polimorfismo rs10830963 foi significativamente associado ao aumento do risco de diabetes tipo 2 (WANG, H. *et al.*, 2013).

Devido ao fato do diabetes gestacional compartilhar características fisiopatológicas com o diabetes tipo 2, o polimorfismo rs10830963 foi avaliado e se mostrou associado ao diabetes gestacional em diferentes populações, porém outros estudos em diferentes populações, são relevantes para melhor avaliar esta associação (LI, C. *et al.*, 2013; VLASSI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013).

### 3.4.3 Gene *CDKAL1*: quinase 1 dependente de ciclina

Este gene está localizado no cromossomo 6p22.3 (FIGURA 7) e abrange 697.948 pares de bases que codificam para proteína *CDKAL1* de 65 kD (DEHWAH; WANG; HUANG, 2010).



**FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENE *CDKAL1* NO CROMOSSOMO 6.**

A marcação vermelha no cromossomo indica que este gene está localizado no braço curto (p) posição 22.3. A ampliação da região, mostra que o gene *CDKAL1* é composto por 14 éxons e 13 íntrons e o SNP rs1007888, alvo do presente estudo, está localizado no íntron 5.

Fonte: [www.genecards.org](http://www.genecards.org). Acesso em 19/11/2013.

As proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK) têm como principal função a atuação no ciclo celular, promovendo a progressão para a replicação do DNA. Estas enzimas são controladas por associações transitórias com subunidades reguladoras de ciclina, ligações com polipeptídeos inibitórios e reações reversíveis de fosforilação (MORGAN, 1997). Complexos de CDK-ciclina fosforilam proteínas necessárias para a ativação de genes envolvidos na síntese do DNA, bem como de componentes da maquinaria de replicação do DNA. Subsequentemente, um conjunto diferente de complexos de CDK-ciclina, desencadeia a fosforilação de várias proteínas para promover as reorganizações estruturais que acompanham a entrada de células em mitose (NIGG, 1995).

A CDK5 é uma CDK atípica, que não tem função no ciclo celular, a atuação da CDK5 é na cito arquitetura do sistema nervoso central. No cérebro, a CDK5 está envolvida no desenvolvimento neuronal e na neurogênese e defeitos na sua regulação levam a doenças como Alzheimer e mal de Parkinson (JESSBERGER *et al.*, 2009).

Ubeda e colaboradores mostraram que a CDK5 e o seu ativador p35 também são expressos nas células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina (UBEDA; KEMP; HABENER, 2004). Ainda no trabalho de Ubeda, foi constatado que a hiperglicemia leva aumento da concentração de RNAm e da proteína p35, que proporciona maior atividade do complexo p35/CDK5. A CDK5 ativada por p35 aumenta a secreção da insulina nas células  $\beta$  pancreáticas (WEI *et al.*, 2005).

A função da proteína codificada pelo gene *CDKAL1* é desconhecida, porém sabe-se que esta proteína apresenta similaridade com a proteína 1 associada a subunidade regulatória de CDK5, a qual é codificada pelo gene *CDK5RAP1* (DEHWAH; WANG; HUANG, 2010). A *CDK5RAP1* é expressa no tecido neuronal e tem função de inibir a atividade de CDK5 (CHING *et al.*, 2002). Portanto, a *CDKAL1* tem sido relatada como um inibidor da CDK5, a qual é expressa nas células  $\beta$  pancreáticas e tem a função de regular a liberação de insulina. Estudos mostram uma correlação direta com a diminuição dos níveis de insulina e a expressão de CDK5 (DAVAL *et al.*, 2011).

O polimorfismo no gene *CDKAL1* rs7754840 foi encontrado associado ao diabetes tipo 2 em diferentes populações (SCOTT *et al.*, 2007; STANCAKOVA *et al.*, 2008). Devido a forte correlação genética entre o diabetes tipo 2 e o diabetes gestacional, é interessante avaliar este polimorfismo com o diabetes gestacional.

Kwak e colaboradores (2012) realizaram um estudo e concluíram que existe correlação do polimorfismo rs7754840 neste gene, com o diabetes gestacional em uma população Koreana. Porém, mais estudos com outras populações são necessários (KWAK *et al.*, 2012).

### 3.5 PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)

As proteínas humanas estão sujeitas às modificações pós traducionais ao longo do tempo e estas modificações podem alterar suas propriedades estruturais e biológicas provocando danos ao organismo. Dentre as reações responsáveis pelas modificações de proteínas, a glicação é a mais frequente e mais importante do ponto de vista biológico (JAISSON; GILLERY, 2010).

Além das proteínas, os lipídios e ácidos nucleicos podem sofrer glicação dando origem aos chamados produtos de glicação avançada, os AGEs (do inglês, *Advanced Glycation End-Products*). Esta reação acontece progressivamente de maneira fisiológica durante o envelhecimento, mas é intensificada em condições de hiperglicemia e estresse oxidativo (JAISSON; GILLERY, 2010).

A interação de AGEs com receptores celulares, como o RAGE (do inglês, *Receptor for Advanced Glycation End-products*), desencadeia processos pró-inflamatórios e pró-coagulantes que geram estresse oxidativo e disfunção endotelial, que por sua vez, estão associados às condições patológicas como a hipertensão, complicações micro e macrovasculares do diabetes, problemas cardiovasculares, nefropatia e a retinopatia (SINGH *et al.*, 2001; KOYAMA *et al.*, 2008; YAMAGISHI *et al.*, 2012).

#### 3.5.1 Formação dos AGEs

A reação de glicação ou reação de *Maillard* tem início quando os grupamentos aldeído ou cetona de açúcares redutores reagem com grupamento amino das proteínas, formando uma base instável denominada de base de *Schiff*. A Figura 8 ilustra as etapas da reação de *Maillard* com formação de diferentes AGEs. A base de *Schiff* para se tornar uma estrutura quimicamente mais estável, sofre um rearranjo dando origem a uma estrutura denominada de produtos de *Amadori*, a hemoglobina glicada e a frutossamina são exemplos destes produtos. Os produtos de

*Amadori* sofrem uma série de reações irreversíveis incluindo fragmentação, ciclização e oxidação, dando origem aos produtos de glicação avançada (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004).

Alguns AGEs são formados de maneira independente através de reações envolvendo compostos di-carbonílicos reativos como o glicoxal, metilglicoxal e 3-deoxiglicosona. Estes compostos podem ser produzidos no meio intracelular através da auto-oxidação da glicose. Portanto, os AGEs podem ser formados tanto no meio intra como no meio extracelular (BROWNLIE, 2001).

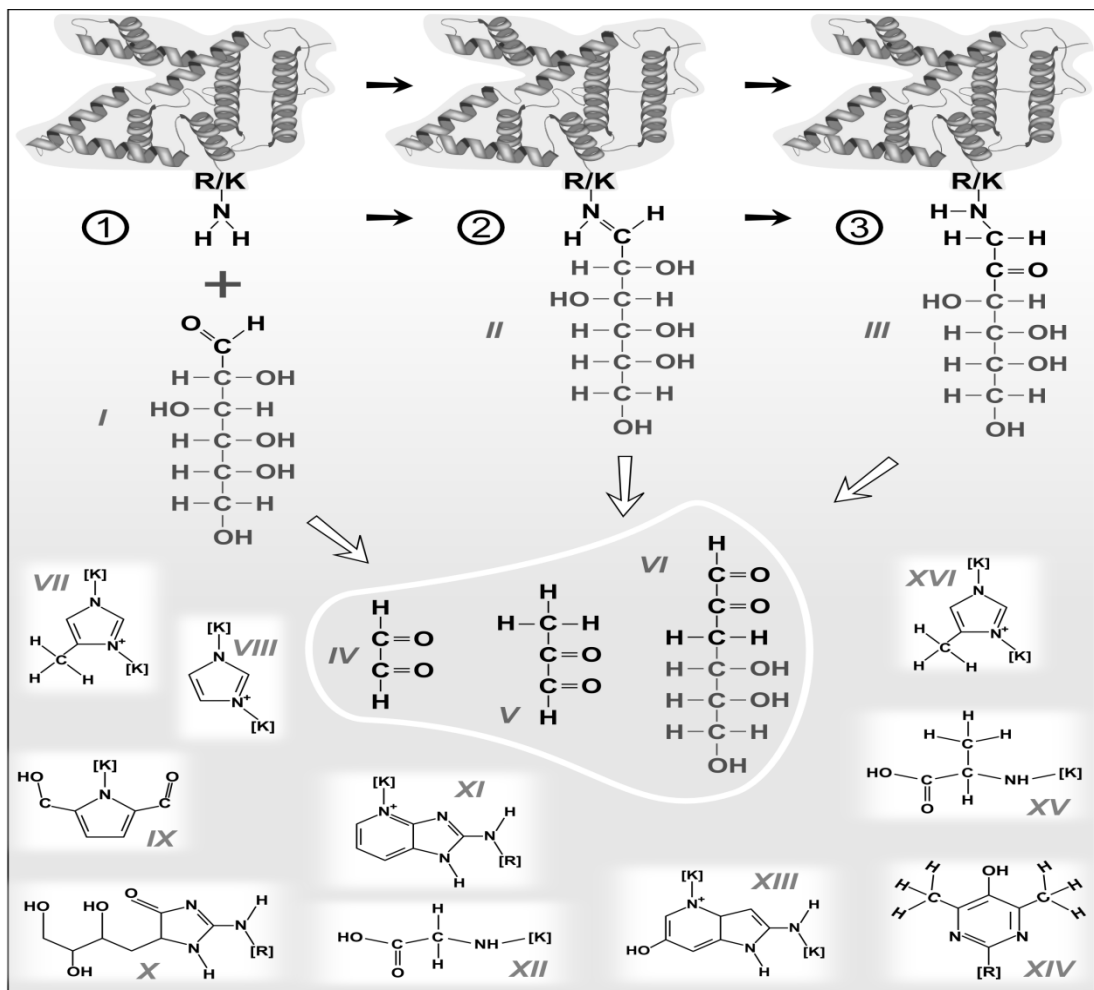


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE GLICAÇÃO E FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs).

Resíduos (-NH<sub>2</sub>) de lisina (K) e arginina (R) de proteínas reagem de forma não enzimática com carboidratos resultando na formação dos produtos de glicação avançada (AGEs).

I. Ligação do grupamento aldeído da glicose com grupamento amino dos aminoácidos Lisina e Arginina. II. Formação da base de Schiff, III. Produtos de Amadori. Compostos dicarbonílicos reativos como: IV. Glicoxal. V. Metil Glicoxal. VI. 3-deoxi-glicosone, também sofrem reações dando origem aos AGEs. VII. MOLD. VIII. GOLD. IX. Pirralina. X. Imidazolona A, X.I Pentosidina. XII. Carboximetil lisina, XIII. Vesperlisina A, XIV. Argpirimidina, XV. Carboxietil lisina. Fonte: o Autor, 2013.

Além da formação endógena de AGEs, existem fontes exógenas que contribuem para um aumento da sua concentração nos organismos. A dieta, o tabaco e a poluição do ar são exemplos destes fatores (CERAMI *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001; GURSINSKY *et al.*, 2006). Dietas ricas em AGEs podem contribuir de maneira significativa para um aumento dos AGEs circulantes (LIN, R. Y. *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2008). Estima-se que 10% dos AGEs ingeridos na dieta sejam absorvidos e um terço do que foi absorvido é eliminado pelos rins na urina (KOSCHINSKY *et al.*, 1997).

Altas concentrações de AGEs foram encontradas em alimentos de origem animal, ricos em gorduras e proteínas em comparação com legumes, cereais integrais e leite, que são alimentos ricos em carboidratos. Alguns métodos de preparação como: grelhar, fritar, assar e cozinhar por longo período de tempo, favorecem a formação de AGEs nos alimentos (URIBARRI *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Mecanismo de ação dos AGEs

Os AGEs exercem efeitos patológicos através de diferentes mecanismos que podem ser divididos em extracelulares e intracelulares (SCHMIDT *et al.*, 1994). No meio extracelular, os AGEs podem promover uma série de modificações na matriz extracelular modificando a sinalização entre a matriz e a célula. As proteínas, principalmente as de longa vida, como colágeno e laminina podem ter suas funções alteradas pelos AGEs através da formação de ligações cruzadas e interagirem anormalmente com outros componentes da matriz, estando relacionado com o processo de envelhecimento e rigidez da vasculatura (SCHMIDT *et al.*, 1994). No meio intracelular, os AGEs podem provocar alterações genômicas por meio de ligações com nucleotídeos, histonas e proteínas envolvidas no processo de transcrição gênica (BROWNLEE, 2001).

As proteínas plasmáticas modificadas por AGEs se ligam a receptores de AGEs, gerando um aumento na produção de citocinas inflamatórias (BROWNLEE, 2001).

### 3.5.3 Receptores para os AGEs

Dentre a variedade de receptores de AGEs que tem sido descrito na literatura, o receptor RAGE é o melhor caracterizado bem como os efeitos proporcionados pela ligação dos AGEs a este receptor (TAKEUCHI; TAKINO; YAMAGISHI, 2010).

Os receptores RAGE são expressos em uma grande quantidade de células e tecidos como pulmão, fígado, endotélio vascular, monócitos, neurônios e células dendríticas (LIN, L.; PARK; LAKATTA, 2009). Sua expressão é regulada positivamente pela presença de AGEs como um mecanismo de *feedback* positivo (NEEPER *et al.*, 1992). Este mecanismo pode contribuir para o desenvolvimento de patologias associadas à inflamação crônica (LIN, L.; PARK; LAKATTA, 2009).

Além do RAGE expresso na superfície das células, várias isoformas tem sido descritas, principalmente a forma solúvel encontrada no plasma, denominada de sRAGE. O sRAGE parece ter maior facilidade em fixar ligantes que o RAGE e desempenhar um papel de antagonista dos AGEs, por competir com o receptor da membrana celular, evitando assim os efeitos deletérios da sinalização mediada por RAGE (HANFORD *et al.*, 2004; BUCKLEY; EHRHARDT, 2010).

A interação dos AGEs com o RAGE promove a ativação de uma série de produtos de transcrição que levam a produção de citocinas inflamatórias, incluindo a transcrição do fator nuclear kB (NF-kB), o qual possui uma forte atividade pró inflamatória amplamente descrita na literatura (GOLDIN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

### 3.5.4 AGEs como biomarcadores de patologias

Os AGEs têm sido associados a várias patologias, dentre elas o Alzheimer (THOME *et al.*, 1996), a artrite reumatoide (MATSUMOTO *et al.*, 2007) e a insuficiência cardíaca (WILLEMSEN *et al.*, 2012), além do diabetes.

A hiperglicemia crônica do *Diabetes mellitus* favorece a formação de AGEs, que se acumulam na maior parte dos sítios alvo das complicações vasculares do diabetes, como os rins, a retina e a placa aterosclerótica. Concentrações elevadas de pentosidina, um AGE fluorescente, têm sido encontradas em pacientes com doença renal (GOH; COOPER, 2008). A excreção renal é a principal via de

eliminação dos AGEs, portanto os danos renais contribuem para o aumento da concentração de AGEs circulantes que, interagindo com o RAGE ativariam processos envolvidos na disfunção endotelial vascular (GOH; COOPER, 2008; KERKENI *et al.*, 2013).

Concentrações diminuídas de sRAGE (RAGE solúvel) no soro de pacientes com nefropatia diabética foram correlacionadas com aumento da excreção de albumina na urina, sugerindo que sRAGE pode ser um marcador precoce para esta patologia (HUMPERT *et al.*, 2006).

A glicação também está implicada em doenças neurológicas e neurodegenerativas desempenhando, em alguns casos, um papel chave na patogênese destas doenças e, em outros casos, atuando como coadjuvante de alterações degenerativas e acumulação de proteína. O tempo de meia vida longo das proteínas que compõem os emaranhados neurofibrilares no cérebro, sugerem que este tecido pode ser alvo dos AGEs (SATO *et al.*, 2006).

A doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de placas amilóides no cérebro e por uma demência progressiva de seus portadores. O tempo de meia vida dos componentes amilóides estão prolongados na presença de AGEs e sugere-se que este efeito é resultante da capacidade de alguns AGEs promoverem crosslink de proteínas (VITEK *et al.*, 1994). Além disso, existem evidências que a progressão da doença de Alzheimer é induzida pelo grande número de citocinas pró-inflamatórias expressas através da ligação de AGEs, principalmente os derivados de gliceraldeído, com seu receptor RAGE (SATO *et al.*, 2006). Portanto, os AGEs derivados de gliceraldeído foram sugeridos como promissores biomarcadores precoces para a doença de Alzheimer (YAMAGISHI *et al.*, 2005).

Os AGEs também estão associados a doenças que envolvem processo inflamatório crônico, como a artrite reumatóide. As concentrações séricas de AGEs estão elevadas em pacientes com esta condição (RODRIGUEZ-GARCIA; REQUENA; RODRIGUEZ-SEGADE, 1998; CHEN, J. R. *et al.*, 1999; DE GROOT *et al.*, 2011). A concentração de AGEs no soro de pacientes com artrite reumatóide foi correlacionada com marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR) e a velocidade de hemossedimentação (VHS), sendo sugerido portanto, como um biomarcador de processo inflamatório (MIYATA *et al.*, 1998) e de atividade da doença (TAKAHASHI *et al.*, 1997). Porém, trabalhos recentes mostraram

discrepância destes resultados, e a utilização dos AGEs como biomarcadores em doenças inflamatórias continua incerto (VYTASEK; SEDOVA; VILIM, 2010).

### 3.5.5 Alternativas terapêuticas associadas aos AGEs

Um dos primeiros inibidores da formação de AGEs identificados foi a aminoguanidina (BROWNLEE *et al.*, 1986), e desde então esta substância tem se mostrado eficiente neste contexto, em estudos realizados com animais (HAMMES *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2011). A alta toxicidade desta droga é uma das principais barreiras para a sua utilização como opção terapêutica preventiva das patologias mediadas pelos AGEs (THORNALLEY, 2003).

A piridoxamina é um derivado da vitamina B6 e inibe a formação dos AGEs a partir das proteínas glicadas (GOH; COOPER, 2008). Estudos com animais demonstraram que esta substância inibiu o aumento da creatinina plasmática e da albuminúria em ratos diabéticos, sugerindo a piridoxamina como promissora no combate à nefropatia diabética (DEGENHARDT *et al.*, 2002). Estudos clínicos preliminares envolvendo pacientes com diabetes tipos 1 e 2 mostraram que a piridoxamina é eficiente no combate a formação de AGEs porém, resultados adversos referentes a segurança da sua utilização foram observados (WILLIAMS *et al.*, 2007; CHEN, J. L.; FRANCIS, 2012).

O LR-90 mostrou ser um inibidor da formação de AGEs mais potente que a aminoguanidina e a piridoxamina. Em um estudo com ratos diabéticos foi observado uma melhora significativa da função renal dos animais tratados com esta substância em comparação com os ratos não tratados, utilizando a proteinúria e a creatinina urinária como marcadores. Além disto, uma diminuição dos AGEs plasmáticos foi verificada. Porém, um aumento de tecido adiposo foi observado entre alguns ratos que utilizaram o LR-90 sugerindo que esta substância possa ter algum outro efeito metabólico ainda desconhecido (FIGAROLA *et al.*, 2003).

O ALT-711 ou *Alagebrium* é uma droga em estudo com capacidade de quebrar as ligações cruzadas já produzidas pelos AGEs em proteínas. Diversos estudos clínicos estão em andamento e tem mostrado efeitos promissores relacionados à doença vascular e ao diabetes e suas complicações (SUSIC *et al.*, 2004; LITTLE *et al.*, 2005; PEPPA *et al.*, 2006).

O peptídeo semelhante ao glucagon, GLP-1 (do inglês *Glucagon-Like Peptide-1*), é um hormônio produzido no intestino que desempenha um papel importante na homeostase da glicose. Recentemente o GLP-1 tem mostrado ser uma molécula com potencial terapêutico no manuseio de pacientes com diabetes tipo 2 por estimular a secreção de insulina e inibir a secreção do glucagon. Além do controle glicêmico o GLP-1 pode proporcionar proteção aos efeitos deletérios ocasionados pelos AGEs através do aumento da defesa antioxidante e do bloqueio do efeito de *feedback* positivo dos AGEs na expressão do RAGE (PUDDU *et al.*, 2013).

Outras substâncias mostraram-se eficientes no combate à formação e ação dos AGEs por diferentes mecanismos (HAMMES *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005; YAMAGISHI *et al.*, 2007). A inibição das ligações cruzadas entre proteínas (*crosslinks*) proporcionadas pelos AGEs é uma das estratégias para a terapia anti-AGEs e algumas substâncias com esta propriedade foram testadas em estudos com animais. O brometo de fenacil tiazolo, PTB (do inglês, *N-Phenacyl Thiazolium Bromide*), diminuiu o acúmulo de AGEs nos tecidos (COOPER *et al.*, 2000). O Alagebrium, também conhecido como ALT-711, se mostrou eficiente na diminuição dos parâmetros morfológicos característicos da nefropatia diabética, além de diminuir a CML no soro em 41% e aumentar em 138% a excreção urinária de CML (PEPPA *et al.*, 2006). O ALT-946 (*N-2-Acetamidoethyl hydrozine carboximidamide hydrochloride*) foi sugerido como grande potencial terapêutico para a nefropatia diabética (FORBES *et al.*, 2001).

Recentemente foi demonstrado que os AGEs derivados do gliceraldeído, são os principais componentes de um grupo denominado de AGEs tóxicos (TAGEs) e desempenham um papel importante no desenvolvimento das complicações do diabetes, principalmente através da sua interação com receptores RAGE que leva a um aumento de citocinas pró-inflamatórias e promove o estresse oxidativo em vários tipos de células. A inibição da formação de TAGEs e o bloqueio da ligação dos TAGEs com RAGE foram citados como uma nova estratégia terapêutica contra complicações do diabetes (TAKEUCHI; TAKINO; YAMAGISHI, 2010).

Existe um esforço da comunidade científica em buscar alguma alternativa terapêutica para os efeitos maléficos proporcionados pelos AGEs nos seres humanos, a prova disto é a grande variedade de estudos realizados com este objetivo. Apesar da grande maioria destes estudos estarem em fase pré-clínica, a

expectativa é de que nos próximos anos antagonistas da formação e/ou ação dos AGEs sejam utilizados na prática clínica em doenças associadas com esses produtos, principalmente o diabetes mellitus (GOH; COOPER, 2008).

### 3.5.6 Métodos para a detecção de AGEs

A elevada heterogeneidade estrutural dos AGEs é um fator que dificulta o desenvolvimento de um método único para este grupo de moléculas. Alguns AGEs como a carboximetil-lisina (CML) e a pentosidina possuem técnicas bem definidas para as suas quantificações. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) pode ser utilizada para dosar a pentosidina; e a carboximetil-lisina (CML) é comumente medida através da espectrometria de massas. Ensaio imunoenzimático (ELISA) com anticorpos específicos também são utilizadas para quantificar estes AGEs, em particular a CEL (carboxietil-lisina) e a CML, AGEs de maior concentração no soro (TANEDA; MONNIER, 1994; TEERLINK *et al.*, 2004; SCHEIJEN *et al.*, 2009).

Alguns AGEs emitem fluorescência em comprimentos de onda específicos e podem ser quantificados através desta propriedade. Métodos que utilizam esta fluorescência estão bem caracterizados, porém apresentam baixa especificidade em geral (MAKITA *et al.*, 1992). Recentemente a autofluorescência na pele (AF) vem sendo muito utilizada em pesquisas para quantificar AGEs neste tecido. Já foi demonstrada correlação positiva entre a AF com as concentrações de CML, CEL e pentosidina (MEERWALDT *et al.*, 2004). Esta autofluorescência foi demonstrada ser maior em indivíduos com presença de microalbuminúria, um indicador de lesão renal precoce, e disfunção endotelial em comparação com indivíduos saudáveis (SKRHA *et al.*, 2013). Diferentes estudos mostraram que a AF é maior em pacientes diabéticos em comparação com não diabéticos (GERRITS *et al.*, 2008; GENEVIEVE *et al.*, 2013). Este método tem a vantagem de ser simples, rápido e não invasivo, mas passível de múltiplas interferências. (BOS; DE RANITZ-GREVEN; DE VALK, 2011; DE RANITZ-GREVEN *et al.*, 2012).

Entre as principais dificuldades na quantificação dos AGEs, está a falta de um padrão rastreável e no estabelecimento de um método de referência que permita ancorar e normalizar as diferentes metodologias disponíveis.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS e foi aprovado sob o CAAE: 09664412.4.0000.0101.

### 4.1 AMOSTRAS

Para a dosagem de AGEs, o tamanho amostral foi de 442 (n=442) gestantes, classificadas em gestantes saudáveis (grupo controle normal, n= 217) e gestantes portadoras de diabetes gestacional (DMG, n=225).

Para os ensaios moleculares de triagem com marcadores genéticos (genotipagens) foram selecionadas aleatoriamente 282 amostras entre as amostras em estudo, sendo 141 amostras para o grupo controle e 141 amostras para o grupo DMG.

Para o polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B*, após os ensaios de triagem genotípica, o tamanho amostral foi ampliado para 366 amostras, sendo 183 em cada grupo estudado. O aumento do tamanho amostral de aproximadamente 30% foi realizado para aumentar o poder estatístico e consolidar os resultados obtidos.

As amostras de sangue das 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) coordenado pela Doutora Rosângela R. Réa. As amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba.

#### 4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos, descritos na sequência, estão de acordo com as recomendações da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2010).

- a) Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/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 à tomada da dose de glicose.

- b) Grupo Controle para Diabetes Gestacional: gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL.

As amostras de sangue (EDTA<sub>K3</sub>, Vacutainer, Becton Dickinson) e soro (Tubo Gel SST<sup>®</sup> II Advance, Becton Dickinson) das pacientes foram coletadas, durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante, não sendo necessária coleta específica para o projeto em tela. As amostras de soro foram separadas e mantidas em freezer a -20°C.

Pacientes que apresentaram insuficiência renal e doença cardiovascular não foram incluídas na amostra (critérios de exclusão).

#### 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico, obtido de leucócitos, foi extraído, com o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art. 28-9042-65) ou pelo método de *salting out* (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5 a 2,0%) com identificação dos fragmentos com brometo de etídeo e fotodocumentado com câmara CCD em sistema *BioChemi* (UVP). A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260nm e 280nm (*NanoDrop*). Amostras com concentração inferior a 20 ng/ $\mu$ L de DNA ou razão  $A_{260}/A_{280}$  menor que 1,7 ou superior a 2,1, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra, foram novamente extraídas até atingirem o padrão estabelecido.

Todas as amostras foram diluídas a uma concentração de 100 ng/ $\mu$ L com água ultrapura e estocadas em freezer a -20°C. Para as análises de genotipagem com o sistema *TaqMan*<sup>®</sup>, as amostras foram diluídas à concentração final de 20 ng/ $\mu$ L com água ultrapura estéril e mantidas em freezer a -20°C.

### 4.3 GENOTIPAGENS DOS POLIMORFISMOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

A TABELA 1 apresenta os polimorfismos estudados neste trabalho e seus respectivos genes.

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Designação OMIN	Cromossomo Posição	Localização Região	Gene	Polimorfismos		TaqMan
153620	20q11.23	3807 pb do códon de terminação da tradução	<i>MIF</i>	rs1007888	G/A	C___2448251_1_
600804	11q21-q22	Íntron 1	<i>MTNR1B</i>	rs10830963	C/G	C___3256858_10
611259	6p22.3	Íntron 5	<i>CDKAL1</i>	rs7754840	C/G	C__29246232_10

rs: dbars: reference SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

OMIN, Online Mendelian Inheritance in Man®, <http://omim.org/>

TaqMan: sonda específica para cada polimorfismo

As genotipagens foram realizadas utilizando a PCR em tempo real com sondas fluorescentes específicas do sistema TaqMan® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Este sistema é utilizado para amplificar sequências alvo e simultaneamente gerar um sinal do genótipo (MEIJERMAN *et al.*, 2007).

O sistema TaqMan® utiliza dois oligonucleotídeos específicos (*forward e reverse*) para amplificar a região polimórfica em estudo. Sondas fluorescentes específicas TaqMan® para os dois alelos em estudo, marcados com fluoróforos VIC e FAN, estão ligadas a um silenciador (*quencher*). Enquanto a sonda não estiver ligada ao DNA, o sinal da fluorescência é baixo devido à presença do *quencher*. A sonda que anelar no DNA, é clivada pela DNA polimerase e o *quencher* é liberado, permitindo que o fluoróforo seja medido e quantificado (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011). A Figura 9 mostra a reação com sondas fluorescentes de forma esquemática.

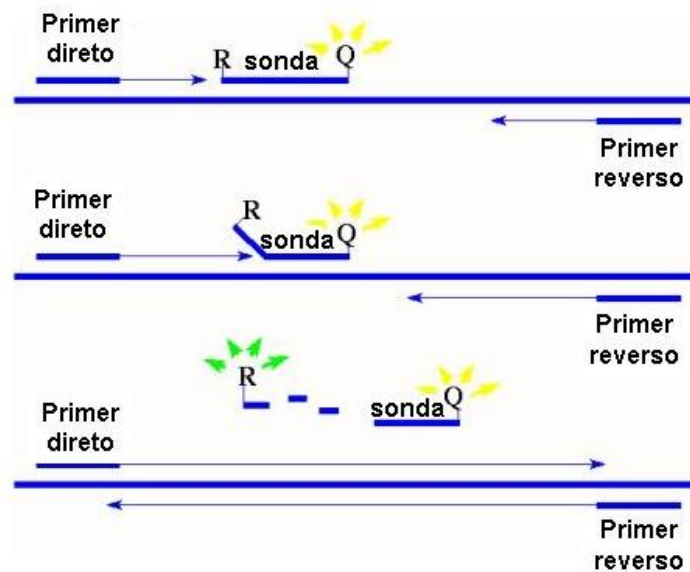


FIGURA 9 - MECANISMO DA REAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN

Sondas (*probes*), marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, ligadas a um silenciador (*quencher*), um para cada alelo, desenhadas para anelar especificamente na região do polimorfismo (SNP) de interesse, anela no DNA molde. Em paralelo, oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificar a região de estudo também anelam ao DNA molde. Pela ação exonuclease (5'→3') da polimerase a sonda anelada ao DNA é clivada, liberando o fluoróforo. Conforme a fluorescência emitida, se identificam os alelos em estudo ou a presença de ambos (heterozigotos) utilizando equipamento de PCR com tempo real. Adaptado de (HUI; DELMONTE; RANADE, 2008).

Os experimentos de genotipagem foram realizados no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), utilizando-se reagentes (*Master Mix®, SNP Genotyping Assay®*) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*Applied Biosystems*). As reações, em placas de 96-poços, foram realizadas em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação (TABELA 2). A placa foi coberta com filme específico e posteriormente centrifugada (centrífuga eppendorf 5810R) por 4 minutos a 4000rpm para remoção de uma eventual formação de bolhas no fundo dos poços.

Em cada placa foram utilizados dois poços como controle negativo, contendo apenas o *Super Master Mix*, para avaliar a contaminação no sistema. As amostras do grupo controle e diabéticas foram inseridas nas placas de maneira aleatória.

Para todas as análises, a qualidade da genotipagem superior a 98% identificada pelo software do sistema 7500 Fast™.

TABELA 2 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES NA PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	VOLUMES
Master Mix®*	3 µL
SNP Genotyping Assay®	0,3 µL
Água ultrapura	1,7 µL
DNA molde (20ng/µL)	1,0 µL
Volume final	6,0µL
CICLAGEM	TEMPERATURA → TEMPO
1 ciclo	60°C → 30 s
1 ciclo	95°C → 10 min (ativação polimerase)
50 ciclos	95°C → 15 s (desnaturação)
	60°C → 90 s (anelamento/extensão)
1 ciclo	60°C → 30 s

*Master Mix®*: sistema de reação composto pela DNA polimerase, Mg<sup>++</sup>, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas *TaqMan®*. *SNP Genotyping Assay®*, sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC e FAN.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES

A Tabela 3 descreve os analitos e métodos para a quantificação dos biomarcadores empregados neste projeto. Os analitos foram quantificados no sistema automatizado Architect (Abbott Diagnostics), com calibradores e controles obtidos do fabricante do equipamento.

**TABELA 1 - PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**

<b>Dosagem</b>	<b>Princípio metodológico</b>	<b>Reagentes</b>
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico (TBHB).	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Albumina	Verde de bromocresol	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Colesterol total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Creatinina	Picrato alcalino cinético	Biosys Ltda.
Glicemia	Hexoquinase U.V.	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
HbA1C	Imunoturbidimetria	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	Labtest Diagnóstica S/A.
LDL-colesterol*	Cálculo pela equação de Friedewald	V Diretrizes Brasileira
Proteínas Totais	Reação do Biureto	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase com reação de Trinder.	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Uréia	Ensaio cinético com urease, glutamato desidrogenase (GLD), nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH).	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.

\*LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGES-F)

A quantificação dos AGEs fluorescentes (AGES-F) foi baseada no método descrito por Henle e colaboradores (HENLE *et al.*, 1999) e Kalousová e colaboradores (KALOUSOVA; SKRHA; ZIMA, 2002), com modificações.

As amostras de soro foram diluídas (volume final 300 µL), imediatamente antes da dosagem, com tampão fosfato salina PBS pH 7,4 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,06 mmol/L, NaCl 155,1 mmol/L e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,97 mmol/L) em uma proporção de 1:50 (6 µL de soro + 296 µL de PBS). As amostras diluídas foram transferidas para placas pretas de poliestireno com 96-poços e volume de 360µL cada poço.

A intensidade de fluorescência emitida foi medida em fluorímetro de placa (TECAN Infinite® 200 PRO series) utilizando os comprimentos de onda de 350 nm (excitação) e 440nm (emissão).

Como controle negativo da reação (branco da reação), foram utilizados os poços A1 e A2 contendo 300 µL de PBS. A intensidade de fluorescência emitida foi registrada no *software* do equipamento como Unidades Arbitrárias (UA) e a concentração de AGEs-F séricos foi expressa em duas formas:

1) Unidades Arbitrárias por mL de soro (UA/mL)

O valor de unidades arbitrárias (UA) do controle negativo foi subtraído dos valores obtidos e o valor resultante foi multiplicado pelo fator 166,66, que converte os valores em UA/mL de soro. O resultado final foi expresso em (UA/mL) x10<sup>4</sup>.

2) Unidades Arbitrárias por grama de proteína total (UA/g de proteína)

A concentração de AGEs-F (UA/mL) foi normalizada pela concentração de proteína total, medida pelo método do biureto no soro, de cada paciente para minimizar alterações hemodinâmicas associadas à gestação. Portanto, os AGEs-F foram expressos em Unidades Arbitrárias de fluorescência (UA) por grama de proteína total (UA/g de proteína), conforme a equação descrita na sequência. O resultado final foi expresso em (UA/g de proteína) x10<sup>5</sup>

$$\text{UA/g de proteína} = (\text{UA/mL})/\text{PT (g/dL)} \times 0,01$$

Onde:

UA/mL: concentração de AGEs fluorescentes em UA/mL de soro;

PT: concentração de proteínas totais no soro expressa em g/dL;

0,01: fator para converter PT em g/dL em g/mL.

A quantificação fluorométrica dos AGEs-F séricos com a metodologia descrita neste estudo apresentou coeficiente de imprecisão analítico para amostras de pacientes saudáveis de 8,9% (Coeficiente de variação analítico; n=20).

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade para as variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de *Student* (não pareado) ou análise de variância (ANOVA) quando na presença de mais de dois grupos. Estas variáveis foram representadas pela média  $\pm 1$ -Desvio Padrão.

Variáveis contínuas sem distribuição normal foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis, quando mais de dois grupos foram comparados.

Para as comparações com variáveis categóricas, foram utilizados os testes de *Chi-quadrado* ( $\chi^2$ ) ou o teste Exato de *Fischer* bidirecional, conforme apropriado.

Para as análises de correlação, o modelo descrito por *Pearson* (correlação linear) foi utilizado para variáveis com distribuição normal e *Spearman* foi empregado para aquelas sem normalidade.

Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA, os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, cálculos das frequências genotípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência foram realizados com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando a frequência do alelo menos frequente se encontra dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

O programa *Statística* para Windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

Para os estudos com curvas ROC e obtenção da área sob a curva, e dados associados, foi utilizado o programa MedCalc v.7.12.7.2.0 (MedCal Software bvba).

Uma probabilidade inferior a 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerada significativa em todas as análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra em estudo foi composta por cerca de 85% de gestantes euro-brasileiras, sendo as demais representantes minoritárias afro-brasileiras.

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos em estudo (grupo controle e grupo diabetes gestacional) é apresentada na Tabela 4.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E CLÍNICAS DAS AMOSTRAS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=217)	DMG (n=225)	P
Idade (anos)	29 (27-33)	32 (28-36)	<b>&lt;0,001*</b>
Peso (kg)	66,1 (58,5-73,8)	80,3 (70-93)	<b>&lt;0,001*</b>
Altura (m)	1,61±0,06	1,60±0,07	<b>0,003</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,4 (22,5-28,3)	32,0 (27,7-36,4)	<b>&lt;0,001*</b>
Período Gestacional (semanas)	17,8±8,7	30,1±9,5	<b>&lt;0,001</b>
História familiar para diabetes (%)	-	68	

Os resultados são apresentados como média±1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil).

P: probabilidade teste t-Student, e \*P: probabilidade teste U de Mann-Whitney.

-: dados não disponíveis.

Os resultados mostram que houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros idade, peso, altura, IMC e período gestacional.

A idade foi maior no grupo DMG, sendo a mediana 32 anos contra 29 anos para o grupo controle. Este resultado pode ser atribuído ao fato do risco para o diabetes gestacional aumentar com a idade (CHENG; LAU, 2013).

O peso e o IMC também foram maiores no grupo DMG sendo as medianas 80,3g e 32kg/m<sup>2</sup>, respectivamente, contra 66,1g e 25,4kg/m<sup>2</sup>. A obesidade é fator de risco para diabetes gestacional, portanto estes resultados estão de acordo com o esperado segundo a literatura (CHENG; LAU, 2013). Torloni e colaboradores

publicaram em 2009 uma meta-análise envolvendo 671.945 mulheres, avaliando a obesidade materna e o risco para DMG em comparação com mulheres com IMC normal. A razão de chance (*odds ratio*, OR) de uma mulher com IMC normal desenvolver DMG foi de OR=0,75, enquanto que para mulheres com sobrepeso foi de OR=1,97; para mulheres moderadamente obesas, OR=3,01 e para mulheres com obesidade mórbida, OR=5,55. Para cada 1kg/m<sup>2</sup> acrescentado ao IMC, o risco para DMG aumenta em 0,92% (TORLONI *et al.*, 2009).

Para a altura, nós encontramos diferença significativa entre os grupos ( $p=0,003$ ) sendo que para o grupo DMG, a altura foi menor (1,60m) em comparação com o grupo controle (1,61m). Estes resultados estão de acordo com o esperado segundo a literatura, pois a correlação entre o DMG e a altura é de ordem inversa conforme descrito por outros autores (TABAK *et al.*, 2002; RUDRA *et al.*, 2007). Brite e colaboradores (2013) avaliaram a altura e o risco para DMG em gestantes de diferentes etnias, e concluíram que a correlação inversa entre a altura e o risco para o DMG é válida para todas as raças, sendo mais fortemente correlacionada em asiáticos (BRITE *et al.*, 2013).

A história familiar para diabetes foi de 68% para o grupo DMG e para o grupo controle, estes dados não foram disponibilizados. A história familiar para o diabetes é um conhecido fator de risco para o DMG, neste contexto, alguns autores comprovaram esta associação (SOLOMON *et al.*, 1997; CARR *et al.*, 2006). A Associação Americana de Diabetes classifica a história familiar positiva para o *diabetes mellitus* como alto risco associado ao DMG (ADA, 2013).

## 5.2 BIOMARCADORES E PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA FLUORESCENTES (AGES-F)

Os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos e dos AGES-F são apresentados na Tabela 5.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DOS BIOMARCADORES E AGES FLUORESCENTES (AGE-F) PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=217)	DMG (n=225)	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	84 (80-88)	86,5 (82-97)	<0,001*
Glicemia 2-h, 75g glicose	-	162 (148-181)	
HbA1C (%)	-	5,6 (5,3-6,1)	
Colesterol (mg/dL)	193 (171-228)	223 (194-264)	<0,001*
HDL-C (mg/dL)	54,5±15,0	56,2±13,9	0,220
LDL-C (mg/dL)	112,6 (92,6-141,8)	124,8 (98-153)	<0,001*
Triglicérides (mg/dL)	117 (88-153)	221 (183-278)	<0,001*
Proteína Total (g/dL)	6,9 ± 0,7	6,3 ± 0,5	<0,001
Albumina (g/dL)	4,3 (3,8-4,6)	3,4 (3,2-3,6)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,5 (3,0-4,0)	4,4 (3,8-5,1)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,7-0,9)	0,7 (0,6-0,8)	<0,001*
Uréia (mg/dL)	21,0 (17-25)	16,0 (13-19)	<0,001*
AGE (UA/mL)x10 <sup>4</sup>	2,50 ±0,86	2,42 ±0,72	0,262
AGE (UA/g)x10 <sup>5</sup>	3,65 ±1,15	3,84 ±1,36	0,114

Os resultados são apresentados como média±1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil).

UA/mL: Unidades Arbitrárias por mL de soro; UA/g: Unidades Arbitrárias por grama de proteína total; P, probabilidade teste t-Student, e \*P, probabilidade, teste U de Mann-Whitney.

### 5.2.1 Marcadores para controle glicêmico

A glicemia de jejum foi significativamente maior no grupo DMG em comparação ao grupo controle e este resultado já era esperado tendo em vista os critérios de seleção das amostras que teve a glicemia como elemento central (Tabela 5). A glicemia de 2h, em média superior ao valor de corte de 140 mg/dL, substancia o diagnóstico do DMG. A HbA1C com média de 5,6% sugere um grupo DMG com bom controle glicêmico. As concentrações de HbA1C devem ser avaliadas com cautela, pois gestantes em tratamento medicamentoso podem refletir concentrações deste parâmetro menores, propiciando interpretações incorretas quanto ao controle glicêmico do grupo em estudo. Também é relevante ressaltar

que, a concentração de HbA1C reduz ao longo da gestação, o que pode dificultar a interpretação do *status* glicêmico durante a gravidez (NIELSEN *et al.*, 2004).

Catalano e colaboradores (1993) mostraram que a produção basal endógena de glicose está aumentada durante a gestação, tanto para o grupo controle como para o grupo com DMG e isto leva a um aumento da resposta da insulina em ambos os grupos, porém esta resposta é maior para o grupo controle. No final da gravidez, a supressão de insulina em resposta a produção hepática de glicose é menor no grupo DMG (80%) em comparação com o grupo controle (96%) (CATALANO *et al.*, 1993).

### 5.2.2 Perfil lipídico

Durante a gestação devido às alterações metabólicas, há uma alteração significativa nos lipídios para garantir o fornecimento de nutrientes ao feto. O cortisol, estrógeno e a progesterona promovem a lipogênese e o armazenamento de gordura. O início da gestação é marcado por uma diminuição nas concentrações de lipídios com conseqüente aumento progressivo (BUTTE, 2000).

Nossos resultados mostram que houve diferença significativa entre o colesterol total, LDL colesterol e triglicerídeos entre os grupos, sendo os valores mais elevados no grupo DMG em comparação com o grupo controle.

Os resultados das pesquisas relacionadas com os lipídios e o diabetes gestacional são conflitantes. Na pesquisa de Meyers e colaboradores (1996), as concentrações de triglicerídeos e LDL colesterol foram significativamente maiores no grupo DMG em comparação com o grupo controle (MEYERS-SEIFER; VOHR, 1996). Toescu e colaboradores (2004) não encontraram diferenças nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos entre os grupos DMG e controle, e neste mesmo trabalho, as concentrações de LDL colesterol foram significativamente maiores no grupo DMG (TOESCU *et al.*, 2004). Na pesquisa de Koukkou e colaboradores (1996), as concentrações de triglicerídeos foram maiores no grupo DMG, porém as concentrações de LDL colesterol foram menores no grupo DMG e nas concentrações de colesterol total e HDL colesterol não houve diferenças significativas entre os grupos (KOUKKOU; WATTS; LOWY, 1996).

O tamanho amostral e as diferenças metodológicas relacionadas ao período gestacional são uma hipótese para explicar essas diferenças nos resultados entre os

estudos. No nosso trabalho, existe uma diferença no período gestacional entre os grupos, sendo que as gestantes do grupo controle foram avaliadas aproximadamente na 18ª semana de gestação enquanto que as gestantes com DMG foram avaliadas na 30ª semana de gestação. Portanto, este fato explica os resultados encontrados, em vista que há uma alteração nos lipídios ao longo da gestação conferindo um aumento nas concentrações séricas no segundo semestre da gestação. Além disso, o grupo DMG teve o IMC significativamente maior que o grupo controle e este fato têm influencia nas concentrações séricas dos lípides, tendo em vista que o aumento do IMC provoca um aumento nas concentrações de lípides (SINAIKO *et al.*, 1999).

### 5.2.3 Proteínas totais e albumina

As dosagens de proteínas totais e albumina foram significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) entre os grupos, sendo essas concentrações menores no grupo DMG em comparação ao grupo controle.

Gungor e colaboradores (2006) avaliaram as concentrações de albumina entre pacientes com DMG e gestantes saudáveis durante a 24ª e 28ª semana de gestação e não encontraram diferença significativa nessas concentrações (GUNGOR; DANISMAN; MOLLAMAHMUTOGLU, 2006).

Uma hipótese para os resultados divergentes encontrados entre o nosso trabalho e o de Gungor, é que no trabalho em tela os grupos divergem no período gestacional, e o volume sanguíneo aumenta a medida em que a gestação se aproxima do final (LINDHEIMER; TALER; CUNNINGHAM, 2009). Portanto, diferenças na hemodiluição entre os grupos podem ter ocasionado esta diferença nos resultados destes biomarcadores.

### 5.2.4 Uréia e creatinina

As gestantes passam por alterações hemodinâmicas durante a gestação, sendo que o volume plasmático aumenta cerca de 50% na metade da gestação (CARLIN; ALFIREVIC, 2008). As concentrações de uréia e creatinina são menores em gestantes saudáveis em comparação com mulheres não gestantes. Este fato se

deve principalmente por alterações na taxa de filtração glomerular que está aumentada em 35-50% e a maior hemodiluição nas gestantes (BAJWA *et al.*, 2013).

Palma-Reis e colaboradores (2013) destacaram a diminuição nas concentrações de creatinina, aumento do fluxo sanguíneo renal, aumento da taxa de filtração glomerular e o aumento de 1 centímetro no tamanho dos rins como sendo as principais adaptações renais durante a gestação (PALMA-REIS *et al.*, 2013).

McClelland e colaboradores (1997) mostraram que existem alterações na produção de uréia ao longo da gestação. A produção de uréia foi significativamente menor na 31<sup>a</sup> semana da gestação em comparação com a 24<sup>a</sup> semana (MCCLELLAND; PERSAUD; JACKSON, 1997).

Egwuatu e colaboradores (1983) mostraram que as concentrações de uréia e creatinina diminuem do 2<sup>o</sup> trimestre da gestação para o 3<sup>o</sup> trimestre, voltando a aumentar após o parto (EGWUATU, 1983).

No presente estudo, as concentrações de uréia e creatinina foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo as concentrações desses analitos maiores no grupo controle (Tabela 5). A avaliação das gestantes do grupo DMG em um período mais avançado da gestação e a hemodiluição progressiva que ocorre ao longo da gestação são uma hipótese que podem explicar os resultados encontrados. Cabe ressaltar que não foi identificada nenhuma participante desta pesquisa com doença renal manifesta avaliada pelas concentrações destes marcadores.

#### 5.2.5 Ácido Úrico

As concentrações de ácido úrico foram significativamente maiores no grupo DMG em comparação ao grupo controle, 4,4 mg/dL vs 3,5mg/dL, respectivamente (Tabela 5). Yoo e colaboradores (2005) sugerem que o aumento do ácido úrico no DMG está associado à resistência à insulina e a hipertensão arterial, fatores que as gestantes em estudo estão submetidas (YOO *et al.*, 2005).

Nossos resultados também são similares aos descritos em outro trabalho (GUNGOR; DANISMAN; MOLLAMAHMUTOGLU, 2006). Estes autores descrevem concentrações de ácido úrico maiores no grupo DMG (4,4±1,1 mg/dL) quando comparado ao grupo das gestantes saudáveis (4,1±0,84 mg/dL).

Tem sido sugerida uma relação importante entre o ácido úrico e o diabetes gestacional. Em estudo envolvendo 53477 mulheres não gestantes, as concentrações de ácido úrico foram associadas com maior glicemia de jejum e resistência à insulina (YOO *et al.*, 2005). Outros estudos mostraram que concentrações elevadas de ácido úrico estão associadas a risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (NAKANISHI *et al.*, 2003; DEGHAN *et al.*, 2008).

Laughon e colaboradores (2012) foram os pioneiros na avaliação das concentrações de ácido úrico e o desenvolvimento de DMG. Eles mostraram que concentrações elevadas de ácido úrico durante o primeiro trimestre da gestação estão associadas ao desenvolvimento de diabetes gestacional e concentrações  $\geq 3,6$  mg/dL desta molécula estão associadas a um risco 3 vezes maior para o DMG (LAUGHON *et al.*, 2009), o que foi corroborado em outro estudo (WOLAK *et al.*, 2012).

### 5.3 CONCENTRAÇÕES DE AGES FLUORESCENTES (AGES-F) E DIABETES GESTACIONAL

A concentração de AGes fluorescentes (AGES-F) foi comparada entre os grupos de gestantes saudáveis e DMG. Como mostrado na Tabela 5, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de AGes fluorescentes entre diabéticas e gestantes saudáveis ( $P=0,114$ ). Também a normalização da concentração de AGes fluorescentes pela proteína total não ofereceu vantagens em termos de discriminação dos grupos.

Os grupos em estudo, também foram comparados com curva ROC, como mostrado na Figura 10.

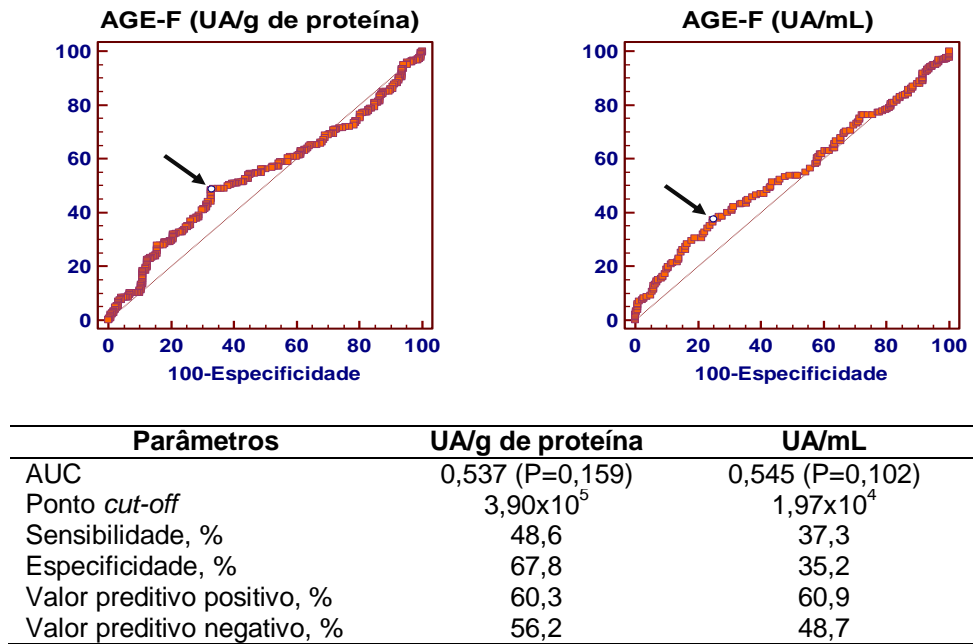


FIGURA 10 - CURVAS ROC PARA CONCENTRAÇÕES DE AGEs FLUORESCENTES (AGEs-F) EXPRESSOS EM UA/mL e UA/g DE PROTEÍNA TOTAL

AUC, área sob a curva. As setas indicam o ponto de corte (*cut-off*). Este ponto apresenta o índice de *Youden* maior, efeito combinado da maior especificidade e sensibilidade para uma determinada concentração. A tabela abaixo da figura identifica os principais parâmetros associados aos AGEs-F relacionados à separação dos grupos. ROC: *receiver operating characteristic*.

Ao contrário dos demais tipos de diabetes, cuja exposição aos efeitos da glicemia é estabelecida em vários anos, como no diabetes tipo 2, a hiperglicemia associada ao diabetes gestacional é restrita a alguns meses. Provavelmente, este menor tempo de exposição à hiperglicemia é responsável pelos valores similares das concentrações de AGE-F encontrados para o grupo de gestantes saudáveis e para o grupo de gestantes diabéticas, conforme apresentado na Tabela 5. Estes resultados também refutam a hipótese de que o quadro de elevado estresse oxidativo associado ao DMG possa provocar um aumento na formação de AGEs-F, como descrito por outros autores (DE RANITZ-GREVEN *et al.*, 2012).

No entanto, vale ressaltar que o método escolhido para dosagens de AGEs neste trabalho possui algumas limitações. A metodologia identifica exclusivamente os AGEs-F e não compostos como a carboximetilisina (CML), não fluorescente, que representa o AGE de maior concentração sérica (SINGH *et al.*, 2001). O ensaio fluorescente sofre interferência de outros elementos presentes no soro como a

hemoglobina, o NADH, o ácido fólico e a biopterina, moléculas que emitem fluorescência em condições próximas a dos AGEs, porém com interferência de pouca significância (MUNCH *et al.*, 1997).

A associação entre a concentração de AGEs séricos com outros tipos de diabetes é bem estabelecida na literatura (SU *et al.*, 2011; VAN EUPEN *et al.*, 2013), porém para o diabetes gestacional poucos trabalhos estão disponíveis. Em trabalho recente, a captura da fluorescência transdérmica foi utilizada para quantificar os AGEs em pacientes com DMG ( $1,74 \pm 0,31$  UA) e gestantes saudáveis ( $1,76 \pm 0,32$  UA), e não foi capaz de identificar uma diferença significativa, portanto, produzindo conclusões similares ao nosso estudo (DE RANITZ-GREVEN *et al.*, 2012).

Para identificar o efeito do período da gestação sobre a concentração de AGEs fluorescentes, os grupos em estudo foram subclassificados em 4 períodos da gestação. A Figura 11 mostra as concentrações de AGEs fluorescentes para os grupos em estudo.

No trabalho em tela, os diferentes períodos gestacionais não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de AGEs-F, sugerindo que estas biomoléculas não sofreram significativa mudança de concentração ao longo da gestação. Em síntese, a concentração dos AGEs-F, quantificados pela metodologia apresentada neste trabalho, simples e de baixo custo, não permitiu diferenciar as pacientes com DMG de gestantes saudáveis. Portanto, a hiperglicemia presente nas gestantes com DMG parece não interferir de maneira significativa nas concentrações de AGEs-F durante a gestação.

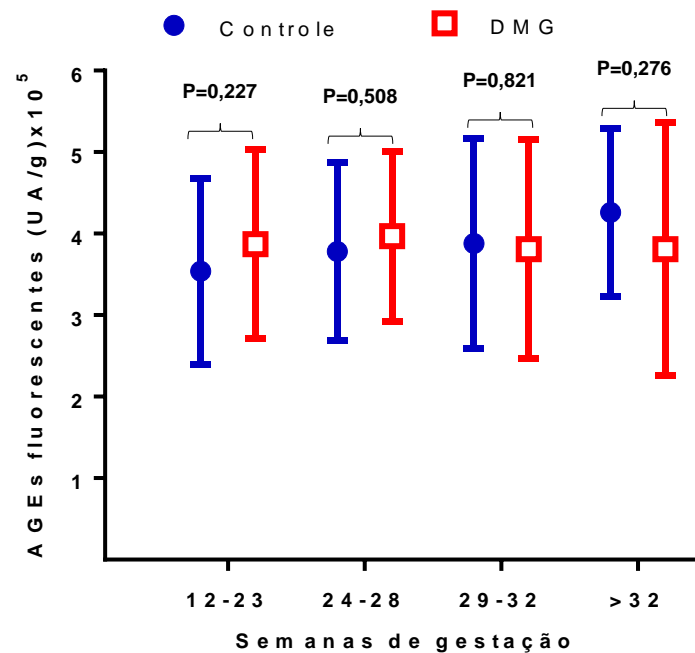


FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE AGEs FLUORESCENTES (AGEs-F) EM DIFERENTES PERÍODOS DA GESTAÇÃO PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Concentrações de AGEs fluorescentes expressos em UA/g de proteína, foram comparados em 4 períodos da gestação. Em azul (círculo fechado), o grupo controle e em vermelho (quadrado aberto), o grupo DMG. As barras verticais representam 1-Desvio Padrão. Os valores de P (teste t-Student) comparam as concentrações de AGEs-F no mesmo período gestacional. Análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença para ambos os grupos, controles (P=0,076) e DMG (0,928).

A existência de correlação entre os AGEs-F, corrigidos pela proteína total, e os parâmetros bioquímicos de cada grupo em estudo foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (“r”) e probabilidade para correlação linear de *Pearson*. A Tabela 6 mostra as correlações significativas (P<0,05) dos AGEs-F com os biomarcadores séricos em estudo.

É relevante ressaltar que não foi observada correlação significativa entre os AGEs-F e marcadores para o controle glicêmico, glicemia de jejum (r= -0,021, P=0,766) e HbA1C (r= -0,052; P=0,448) para o grupo DMG, ou com a glicemia de jejum para o grupo controle (r= -0,059; p=0,383). Uma correlação positiva seria esperada se os AGEs-F apresentassem sua formação atrelada positivamente ao marcadores de controle glicêmico.

TABELA 4 - CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ( $P < 0,05$ ) ENTRE AGES FLUORESCENTES (AGES-F) E BIOMARCADORES PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Biomarcadores	Coeficiente de correlação - r	
	Controles (P)	DMG (P)
Albumina	-	0,279 (<0,001)
Creatinina	-	0,421 (<0,001)
Colesterol	0,330 (<0,001)	
HDL-Colesterol	0,323 (<0,001)	
LDL-Colesterol	0,210 (0,002)	
Triglicérides	0,209 (0,002)	

Comparações com AGEs fluorescentes corrigidos por proteína total (UA/g de proteína).

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) representa o grau da correlação, sendo “0” uma correlação nula; 0-0,3 correlação fraca; 0,3-0,6 correlação regular e acima de 0,6 uma correção forte (ZOU; TUNCALI; SILVERMAN, 2003).

As correlações significativas observadas, para quase todos os analitos, foram fracas ( $r \sim 0,3$ ), sugerindo que os resultados observados tem pouca expressão em termos fisiológicos e podem ser achados fortuitos. Neste contexto, o tamanho amostral utilizado no projeto, pode ter afetado esta análise.

A concentração de creatinina sérica no grupo DMG apresentou coeficiente do correlação linear ( $r > 0,4$ ), considerado como correlação de grau regular, e foi explorada em mais detalhes, como mostrado na Figura 12.

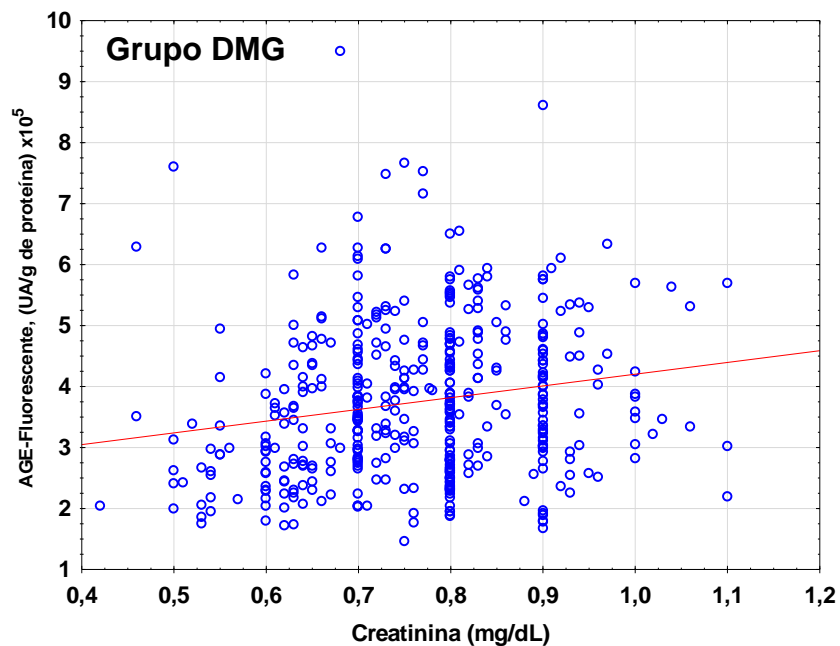


FIGURA 12 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE CREATININA E AGEs FLUORESCENTES SÉRICOS PARA O GRUPO DMG.

Correlação linear de Pearson ( $r=0,421$ ;  $P<0,001$ ). Linha horizontal representa a reta de regressão.

As concentrações séricas de AGEs-F e creatinina tem sido correlacionadas em pacientes com diabetes em outros estudos (MAKITA *et al.*, 1991; ONO *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 2001). Makita e colaboradores (1991), estudando diabéticos tipo 1 e tipo 2, mostraram uma correlação forte ( $r=0,84$ ;  $p<0,001$ ) entre AGEs peptídeos de baixa massa molecular e creatinina séricos. No mesmo sentido, Ono e colaboradores (1998) reportaram correlação similar ( $r=0,748$ ;  $p<0,001$ ) entre estes mesmos parâmetros para diabéticos tipo 2.

Temos como hipótese, que a correlação positiva observada entre creatinina e AGEs-F reflete a redução na filtração renal destas moléculas que se acumulam no soro. Gestantes com DMG podem apresentar alteração da função renal de forma subclínica, não identificada pelos marcadores séricos em uso. Moléculas de AGEs-F podem apresentar características similares de carga e depuração (*clearance*) em relação a creatinina, de forma que a excreção de ambas apresenta similaridade no curso do diabetes. Esta hipótese explicaria a correlação observada no grupo DMG.

A descrição da correlação positiva entre AGEs-F e creatinina em gestantes com DMG (Figura 12) observada neste trabalho é o primeiro reporte de nosso conhecimento.

Estudos adicionais, quantificando os AGEs-F na urina e biomarcadores específicos de função renal como microalbuminúria, beta-2-microglobulina e *clearance* de creatinina poderiam confirmar a hipótese sugerida em futuros projetos de pesquisa.

A correlação observada no grupo DMG com a creatinina é expressivamente menor que as reportadas para pacientes com diabetes tipos 1 e 2, anteriormente citados. Neste contexto, apontamos que nosso grupo com DMG não apresenta alteração importante da função renal, avaliado pela creatinina. A homeostasia sanguínea é alterada na gestação, sendo a hemodiluição e o aumento do fluxo sanguíneo renal, que aumenta a filtração glomerular, fatores conhecidos (CARLIN; ALFIREVIC, 2008). Estes elementos podem ter contribuído para que correlação dos AGEs com a creatinina no DMG seja minimizado, em relação à outros tipos de diabetes. Também, a exposição à hiperglicemia e ao estresse oxidativo no DMG é substancialmente menor (alguns meses), quando comparado a outros tipos de diabetes, onde os afetados estão expostos a estes fatores por vários anos.

#### 5.4 GENOTIPAGEM COM SONDAS FLUORESCENTES

Todos os polimorfismos em estudo se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). Este princípio estabelece que a variação genética em uma população permaneça constante de uma geração para a seguinte na ausência de fatores desestabilizantes. Desvios do equilíbrio de H-W poderiam indicar casamentos consanguíneos, estratificação populacional ou mesmo problemas na genotipagem (WIGGINTON; CUTLER; ABECASIS, 2005).

##### 5.4.1 Polimorfismo rs1007888 do gene *MIF*

A Tabela 7 mostra os resultados das genotipagens do polimorfismo rs1007888 do gene *MIF* para os grupos controle e DMG. As frequências genotípicas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos e frequências alélicas entre os grupos  $p=0,257$  e  $p=0,446$  respectivamente.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs1007888 DO GENE *MIF* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo	Genótipos	Controle (n= 141)	DMG (n= 141)	P
<b>(rs1007888)</b>				
<b>G&gt;A</b> <b>MIF</b>	G/G	39 (27,7)	50 (35,5)	0,257
	G/A	72 (51,1)	59 (41,8)	
	A/A	30 (21,2)	32 (22,7)	
<b>Frequência do Alelo</b> [95% IC]	A	46,8 [41-53]	43,6 [38-49]	0,446

Genótipos descritos em n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P: probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ). SNP rs1007888 grupo controle (P=0,762) e DMG (P=3,141).

O polimorfismo rs1007888 do gene *MIF* não está associado ao diabetes gestacional na amostra em estudo (Tabela 7).

A Tabela 8 apresenta as comparações das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs1007888 com outras populações.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1007888 DO GENE *MIF* COM DADOS DA LITERATURA

<b>MIF rs1007888</b>			<b>Genótipo (%)</b>			<b>Alelo (%)</b>
<b>Grupo étnico</b>	<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>A</b>
<b>Euro-brasileiros</b>	<b>DMG</b>	<b>141</b>	<b>22,7</b>	<b>41,8</b>	<b>35,5</b>	<b>43,6</b>
	<b>Gestantes Saudáveis</b>	<b>141</b>	<b>21,2</b>	<b>51,1</b>	<b>27,7</b>	<b>46,8</b>
Chineses	DMG	120	16,7	45,8	37,5	39,6
	Gestantes Saudáveis	165	19,4	54,5	26,1	46,7
(ZHAN <i>et al.</i> , 2013)						
Iranianos	DMG	147	7,5	70,7	21,8	42,9
	Gestantes Saudáveis	169	11,2	76,9	11,8	49,7
(ASLANI <i>et al.</i> , 2011)						
Alemães	DM2	502	30,1	47,3	22,6	54,4
	Saudáveis	1632	27,3	48,8	23,9	56,2
(HERDER <i>et al.</i> , 2008)						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMG: diabetes *mellitus* gestacional.

A frequência do alelo menos frequente “A” para o grupo controle (46,8%; 95%IC, 41-53%) observada neste estudo é similar à descrita para Chineses da etnia Han e Caucasionos (HAPMAP, 2014) e outros grupos de etnia caucasóides.

A obesidade é um fator de risco reconhecido para o diabetes tipo 2 e gestacional. Estudos identificaram a associação do gene *MIF* com a obesidade. Dandona e colaboradores (2004), em estudo envolvendo 40 indivíduos obesos (IMC  $37,5 \pm 4,9$  kg/m<sup>2</sup>) e 40 não obesos, encontraram diferença significativa ( $p < 0,001$ ) nas concentrações plasmáticas da proteína MIF ( $2,8 \pm 2,0$  ng/mL vs.  $1,2 \pm 0,6$  ng/mL, respectivamente). Também, uma correlação positiva significativa entre a concentração de MIF e o IMC ( $r=0,52$   $p < 0,001$ ) foi descrita por estes autores (DANDONA *et al.*, 2004). Outros estudos corroboraram estes achados e mostram igualmente uma associação da proteína MIF com a obesidade (SKURK *et al.*, 2005; KOSKA *et al.*, 2009).

Church e colaboradores (2005) em estudo envolvendo indivíduos com obesidade mórbida (IMC  $43 \pm 8,6$  kg/m<sup>2</sup>), em um programa de emagrecimento baseado em dieta e atividade física, observaram redução média da concentração de MIF sérica em cerca de 39% após perda de peso superior a 14 kg (CHURCH *et al.*, 2005). Efeito similar foi observado em 21 mulheres obesas não diabéticas (IMC  $32,5 \pm 1,2$  kg/m<sup>2</sup>) que ao perderem em média 4,4 kg durante 12 semanas, apresentaram uma redução de 67% na concentração sérica da proteína MIF (SHEU *et al.*, 2008). Portanto, a associação de MIF com o IMC e a obesidade está bem consolidada.

A concentração da proteína MIF foi associada ao diabetes. Yabunaka e colaboradores (2000) encontraram concentrações séricas significativamente ( $p < 0,001$ ) aumentadas de MIF em pacientes com DM2 em comparação com grupo controle saudável (YABUNAKA *et al.*, 2000). Herder e colaboradores (2006) também descreveram concentrações séricas maiores da MIF no DM2 e em pacientes com intolerância a glicose, quando comparados com indivíduos normoglicêmicos (HERDER *et al.*, 2006). Os índios Pima americanos, população com alta prevalência de diabetes, possuem concentrações elevadas de MIF em comparação com caucasionos (VOZAROVA *et al.*, 2002).

Estudos com células  $\beta$  pancreáticas mostraram uma relação do aumento da expressão do *MIF* com a concentração elevada de glicose e um aumento na secreção de insulina. Estes resultados sugeriram que concentrações elevadas de MIF podem ser parte de um mecanismo compensatório inicial na insuficiência da

célula  $\beta$ , promovendo um estado hiperinsulinêmico e pró-inflamatório resistente a insulina, elementos associados a um aumento no risco para o desenvolvimento do diabetes (KOLTERMAN *et al.*, 1980; VOZAROVA *et al.*, 2002; HERDER *et al.*, 2008).

Com o objetivo de avaliar a associação entre os genótipos do gene *MIF*, a concentração da proteína MIF sérica e o risco para DM2, Herder e colaboradores (2008) avaliaram 502 indivíduos com DM2 e 1632 indivíduos saudáveis (controle). Estes autores genotiparam quatro polimorfismos (rs755622, rs2070766, rs2070767 e rs1007888) e identificaram o alelo “G” de rs1007888 associado com as mais altas concentrações de MIF e o genótipo “GG” deste polimorfismo associado ao maior risco de DM2 em mulheres (HERDER *et al.*, 2008).

Até o presente, foram identificados apenas dois trabalhos, além do projeto em tela, que avaliaram a associação do polimorfismo rs1007888 com o diabetes gestacional. Aslani e colaboradores (2011) encontraram associação significativa ( $p < 0,04$ ) com o DMG em iranianos, onde o alelo G foi caracterizado como risco para a patologia. Zhan e colaboradores (2013) não encontraram diferenças nos genótipos entre os grupos controle e DMG em chineses, a semelhança do nosso estudo.

A associação entre concentrações elevadas da proteína MIF com o diabetes e obesidade é robusta e o polimorfismo rs1007888 deste gene foi descrito associado ao aumento das concentrações de MIF e associado ao diabetes. Porém, até o momento, apenas estudos prospectivos e com tamanho amostral pequeno foram realizados para avaliar estas associações. Novos estudos com diferentes populações e maior tamanho amostral são necessários para uma avaliação confiável da relação deste polimorfismo com o diabetes.

Análises de associação, utilizando ANOVA, na busca de associação dos genótipos deste polimorfismo com as concentrações séricas dos biomarcadores em estudo não apresentaram significância.

Este estudo reflete as primeiras informações sobre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1007888 do gene *MIF* na população brasileira, ao nosso conhecimento.

#### 5.4.2 Polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B*

A Tabela 9 mostra os resultados das genotipagens do polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* para os grupos controle e DMG. As frequências

genotípicas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs10830963 DO GENE *MTNR1B* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo	Genótipos	Controle (n= 183)	DMG (n= 183)	P
<b>(rs10830963)</b> <b>C&gt;G</b> <b><i>MTNR1B</i></b>	C/C	113 (61,7)	102 (55,7)	<b>0,019</b>
	C/G	66 (36,1)	61 (33,3)	
	G/G	4 (2,2)	20 (11,0)	
<b>Frequência do Alelo</b> [95% IC]	G	20,2 [16-24]	27,6 [23-32]	<b>0,031</b>

Genótipos descritos em n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ). SNP rs10830963 grupo controle (P=0,110) e DMG (P=0,176).

O polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* apresentou uma associação com o diabetes gestacional, com diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos. O alelo G, de menor frequência, é um alelo de risco para DMG, com a razão de chance (*odds ratio*) calculado para a frequência alélica de 1,43 (95%IC; 1,02-2,02). Portanto, portadoras do alelo de risco G apresentam uma chance de cerca de 1,4 vezes maior de apresentar diabetes gestacional.

A Tabela 10 mostra as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs10830963 em outros estudos encontrados na literatura.

TABELA 8 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10830963 DO GENE *MTNR1B* COM DADOS DA LITERATURA

<i>MTNR1B</i> rs10830963			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	CC	CG	GG	G
Euro-brasileiros	DMG	183	56,0	33,3	10,7	27,0
	Gestantes Saudáveis	183	61,7	36,2	2,1	20,2
Dinamarqueses	DM2	1948	51,4	39,8	8,7	28,6
	Saudáveis	4905	53,9	39,0	7,1	26,6
(SPARSO <i>et al.</i> , 2009)						
Gregos	DMG	77	39,0	40,2	20,8	40,9
	Gestantes Saudáveis	98	57,1	30,6	12,2	27,5
(VLASSI <i>et al.</i> , 2012)						
Coreanos	DMG	928	23,9	47,9	28,2	52,1
	Gestantes Saudáveis	990	30,4	48,6	21,0	45,3
(KIM <i>et al.</i> , 2011)						
Chineses	DMG	700	28,4	52,0	19,6	45,6
	Gestantes Saudáveis	1029	32,0	49,5	18,6	43,3
(WANG, Y. <i>et al.</i> , 2011)						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMG: diabetes *mellitus* gestacional.

A frequência do alelo menos frequente “G” para o grupo controle 20,2% (95%IC, 16-24) observado em nosso estudo para uma população brasileira, é menor à descrita na literatura para caucasianos e cerca de duas vezes menor quando comparada a populações orientais (Coreanos e Chineses) como mostrado na Tabela 10.

O receptor de melatonina *MTNR1B* foi associado às maiores concentrações de plasmáticas de glicose em jejum e com o DM2 (STAIGER *et al.*, 2008; LYSSENKO *et al.*, 2009; PROKOPENKO *et al.*, 2009). A ligação da melatonina com seu receptor *MTNR1B* diminui a secreção de insulina na célula  $\beta$  pancreática, e os níveis de RNAm do gene *MTNR1B* estão elevados em indivíduos com DM2 comparados com indivíduos normoglicêmicos (PESCHKE *et al.*, 2007).

Lyssenko e colaboradores (2009) relataram que o alelo de risco “G” para o DM2 do polimorfismo rs10830963 está associado ao aumento da transcrição de *MTNR1B* nas ilhotas pancreáticas (LYSSENKO *et al.*, 2009).

Staiger e colaboradores (2008), em estudo envolvendo 1578 indivíduos não diabéticos e com risco aumentado para o diabetes, mostraram que o polimorfismo rs10830963 está associado ( $p < 0,001$ ) a concentrações elevadas da glicemia em jejum. Além disso, portadores do alelo de risco apresentaram cerca de 20% de redução na secreção de insulina estimulada pela glicose, sugerindo que o efeito deste polimorfismo na função da célula  $\beta$  pode representar o mecanismo patológico pelo qual este polimorfismo aumenta o risco para o diabetes (STAIGER *et al.*, 2008).

Kim e colaboradores (2011), em estudo do tipo caso-controle envolvendo 928 mulheres com DMG e 990 gestantes saudáveis (controle), identificaram associação deste polimorfismo com o DMG ( $p < 0,001$ ) em uma amostra da população coreana. Estes autores, utilizando o modelo de avaliação da homeostase (HOMA, *Homeostatic Model Assessment*) para avaliar a função da célula beta (HOMA-B) e a resistência à insulina (HOMA-IR), verificaram que o polimorfismo rs10830963 está associado a índices de HOMA-B reduzidos e sem alteração no índice HOMA-IR. Estes dados, atrelados à elevação da glicemia de jejum, sugerem que o receptor MTNR1B afeta o metabolismo da glicose através alteração na secreção da insulina (KIM *et al.*, 2011).

Vlassi e colaboradores (2012) realizaram, em uma amostra da população grega, um estudo abrangendo 77 gestantes com DMG e 98 gestantes saudáveis. O alelo G foi associado como risco ao DMG, sem, no entanto apresentar associação com outros parâmetros como idade, IMC, glicemia de jejum e HOMA-IR (VLASSI *et al.*, 2012).

Li e colaboradores (2013), em estudo do tipo caso-controle envolvendo 350 gestantes com DMG e 480 gestantes saudáveis, identificaram associação do rs10830963 com o DMG ( $p < 0,05$ ) em chineses (LI, C. *et al.*, 2013). Porém, estudo similar realizado por Wang e colaboradores (2011) na população chinesa, não evidenciou esta associação com o DMG (WANG, Y. *et al.*, 2011).

A associação do alelo menos frequente "G" do polimorfismo intrônico rs10830963 no gene *MTNR1B* com o aumento da glicemia de jejum, disfunção das células  $\beta$  pancreáticas e o DM2 é contundente na literatura para a população caucasiana. Em asiáticos, resultados divergentes estão publicados. Alguns trabalhos evidenciaram associações do polimorfismo em tela com o diabetes (KAN *et al.*, 2010; LIU, C. *et al.*, 2010; LI, C. *et al.*, 2013), enquanto outros como Ling e colaboradores não encontraram esta associação com o DM2 em chineses Han

(LING *et al.*, 2011). Uma recente meta análise que avaliou 38 artigos totalizando 113.025 indivíduos com DM2 e 199.997 indivíduos saudáveis concluiu que a associação significativa do polimorfismo rs10830963 com o DM2 é limitada a caucasianos (WANG, H. *et al.*, 2013).

Associação entre genótipos do polimorfismo rs10830963 com parâmetros laboratoriais em estudo, em particular com marcadores do controle glicêmico (glicemia de jejum e HbA1C) não apresentaram resultados significativos.

Nossos resultados confirmam a associação do polimorfismo rs10830963 com o DMG em uma amostra da população brasileira. O tamanho amostral para este polimorfismo foi ampliado em 30% em relação aos demais polimorfismos em estudo, com o objetivo de aumentar o poder de significância dos testes estatísticos. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo realizado nesta população, e, portanto mais estudos com tamanho amostral maior serão necessários para robustecer as evidências de associação descritas neste trabalho.

#### 5.4.2.1 Correlação entre rs10830963 no gene *MTNR1B* com LDL colesterol

O polimorfismo rs10830963 no gene *MTNR1B* apresentou associação significativa com o LDL-colesterol ( $p=0,04$ ) para o grupo DMG (Figura 13).

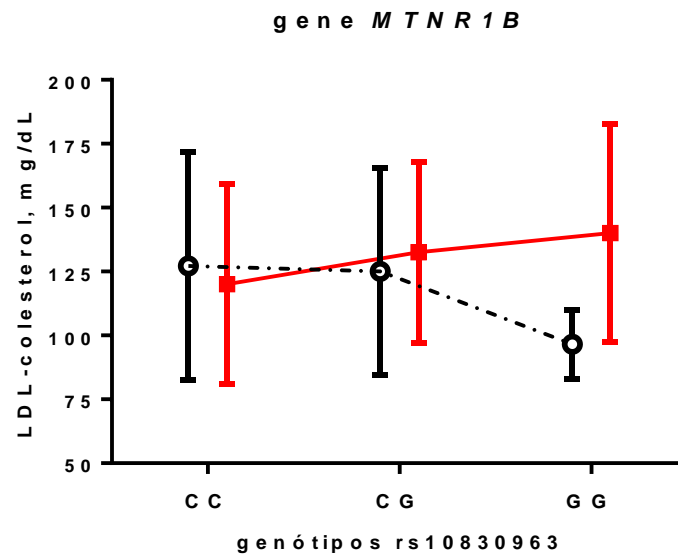


FIGURA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O POLIMORFISMO rs10830963 DO GENE *MTNR1B* E CONCENTRAÇÕES DE LDL-COLESTEROL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Os símbolos são médias e as barras verticais 1-DP. O grupo controle está representado por círculo aberto e linhas pretas e o grupo DMG por quadrado e linhas vermelhas.

Ling e colaboradores (2011) foram os primeiros a descrever associação entre polimorfismos no gene *MTNR1B* com o metabolismo de lipídios. Os portadores do genótipo GG do polimorfismo rs3781637 no gene *MTNR1B* foram associados com maiores concentrações de colesterol total e LDL-colesterol em comparação com portadores dos genótipos AA e AG (LING *et al.*, 2011).

A melatonina desempenha uma função importante no metabolismo dos lipídios. Estudos com animais mostraram que a administração de melatonina melhorou significativamente ( $P < 0,05$ ) a dislipidemia em ratos diabéticos, com redução do LDL-colesterol de  $5,20 \pm 0,4$  para  $4,14 \pm 0,3$  mmol/L (AGIL *et al.*, 2011).

A melatonina foi administrada juntamente com agente antioxidante em pacientes com DM2 tratados com metformina e após 30 e 90 dias deste tratamento uma melhora no perfil lipídico em jejum foi identificada (KADHIM *et al.*, 2006).

Um novo agonista da melatonina (NEU-P11) melhorou o perfil lipídico de ratos obesos, através da diminuição das concentrações de colesterol total e triglicérides e aumento das concentrações de HDL-colesterol (SHE *et al.*, 2009).

Portanto o gene *MTNR1B* que codifica um receptor de alta afinidade pela melatonina pode estar envolvido no metabolismo dos lipídios.

No trabalho em tela, o alelo G do rs10830963 foi associado ao aumento das concentrações de LDL-colesterol, um fator pro-aterogênico, em gestantes com DMG. Esta associação não foi encontrada no grupo de gestantes saudáveis. Uma hipótese para este resultado seria atrelar o efeito fenotípico deste polimorfismo às alterações na secreção de insulina associada ao DMG ou mesmo à possibilidade de interação deste polimorfismo com outros fatores genéticos presentes em pacientes com DMG.

Não foram encontrados outros registros na literatura da associação do rs10830963 com alterações nas concentrações de LDL colesterol, portanto mais estudos envolvendo sujeitos de diferentes etnias e com maior tamanho amostral são necessários para substanciar o significado destes resultados.

#### 5.4.3 Polimorfismo rs7754840 do gene *CDKAL1*

A Tabela 11 mostra os resultados das genotipagens do polimorfismo rs7754840 do gene *CDKAL1* para os grupos controle e DMG. As frequências genotípicas para ambos os grupos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs7754840 DO GENE *CDKAL1* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo	Genótipos	Controle (n= 141)	DMG (n=141)	P
<b>(rs1007888)</b> <b>G&gt;C</b> <i>CDKAL1</i>	G/G	72 (51,1)	64 (45,4)	0,478
	G/C	59 (41,8)	69 (48,9)	
	C/C	10 (7,1)	8 (5,7)	
<b>Frequência do Alelo</b> [95% IC]	C	28,0 [23-33]	30,1 [25-35]	0,577

Genótipos descritos em n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de  $\chi^2$ .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ). SNP rs7754840 grupo controle (P=0,198) e DMG (P=0,054).

As frequências genotípicas e alélicas não diferiram entre os grupos, mostrando que este polimorfismo não está associado ao DMG na população em estudo (Tabela 11).

A frequência do alelo de menos frequente “C” para o rs7754840 foi 28,0% (IC95%, 23-33) para o grupo controle. Esta frequência é similar à encontrada na literatura para europeus de origem caucasóide (33%) (HAPMAP, 2014), discretamente menor quando comparada a caucasianos (Finlandeses) e cerca de 1,5 vezes menor quando comparada a orientais (Tabela 12).

TABELA 10 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7754840 DO GENE *CDKAL1* COM DADOS DA LITERATURA

<i>CDKAL1</i> rs7754840			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	GG	GC	CC	C
<b>Euro-brasileiros</b>	<b>DMG</b>	<b>141</b>	<b>45,4</b>	<b>48,9</b>	<b>5,7</b>	<b>30,1</b>
	<b>Gestantes Saudáveis</b>	<b>141</b>	<b>51,1</b>	<b>41,8</b>	<b>7,1</b>	<b>28,0</b>
Finlandeses	DM2	2305	37,6	47,5	14,9	38,7
	Saudáveis	2339	40,5	46,9	12,6	36,0
(SCOTT <i>et al.</i> , 2007)						
Chineses	DM2	1912	31,2	46,9	21,9	45,3
	Saudáveis	2014	36,8	47,2	16,0	39,6
(LIU, Y. <i>et al.</i> , 2008)						
Chineses	DMG	697	28,6	48,6	22,8	47,1
	Gestantes Saudáveis	1020	30,5	50,2	19,3	44,4
(WANG, Y. <i>et al.</i> , 2011)						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; DMG: diabetes *mellitus* gestacional.

O gene *CDKAL1* codifica para uma proteína de 65kD e abrange 37kb que codificam 579 aminoácidos e embora a função do gene *CDKAL1* seja ainda desconhecida, sabe-se que a proteína codificada por este gene apresenta similaridade com a produto de proteína codificada pelo gene *CDK5RAP1*, uma proteína neuronal que inibe especificamente a ativação de CDK5 (LI, Y. Y. *et al.*, 2013). A CDK5 tem sido implicada na função da célula  $\beta$  pancreática, regulando

negativamente a liberação de insulina (WEI *et al.*, 2005; UBEDA; RUKSTALIS; HABENER, 2006).

Polimorfismos no gene *CDKAL1* vêm sendo associados ao risco para o DM2 em diferentes populações (SAXENA *et al.*, 2007; STEINTHORSDOTTIR *et al.*, 2007; ZEGGINI *et al.*, 2007).

A presença do alelo de risco C, nos genótipos GC e CC do polimorfismo rs7754840 foram associados à redução da liberação de insulina de primeira fase em 11 e 24%, respectivamente, em europeus, bem como com DM2 (STANCAKOVA *et al.*, 2008).

No trabalho de Saxena e colaboradores (2007), o alelo “C” do rs7754840 conferiu uma diminuição na secreção de insulina em indivíduos não diabéticos, e outro polimorfismo (rs7756992) neste mesmo gene *CDKAL1* foi associado à redução (22%) da resposta a insulina ao estímulo de glicose, comprovando o efeito deste gene na liberação da insulina e, conseqüentemente como bom candidato ao DM2 (SAXENA *et al.*, 2007).

Para Kirchhoff e colaboradores (2008) o alelo de risco “C” do rs7754840 também está associado ( $p < 0,05$ ) com a redução na concentração de secreção da insulina durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e com a menor conversão da pró-insulina em insulina (KIRCHHOFF *et al.*, 2008). Apesar das evidências, o mecanismo molecular pelo qual o gene *CDKAL1* modula a liberação da insulina pela célula  $\beta$  pancreática permanece desconhecido (OHARA-IMAIZUMI *et al.*, 2010).

Kwak e colaboradores (2012) realizaram um estudo composto por duas etapas, sendo a primeira um estudo prospectivo abrangendo 468 mulheres com DMG e 1242 mulheres saudáveis (grupo controle) e na segunda etapa foi realizado um estudo do tipo caso-controle com tamanho amostral de 1714 sendo 931 do grupo caso (DMG) e 783 do grupo controle na população coreana. A partir deste estudo, os autores encontraram associação do rs7754840 ao DMG com a razão de chance (*Odds Ratio*, OR) de 1.518 (KWAK *et al.*, 2012).

No presente estudo, o polimorfismo rs7754840 não foi associado ao diabetes gestacional. A divergência dos nossos resultados com os resultados obtidos por Kwak e colaboradores (2012) pode ser explicada pelas diferenças genéticas entre os grupos envolvidos, brasileiros e coreanos, nas respectivas pesquisas. Kwak e colaboradores (2012) foram os primeiros a divulgar a associação

entre o polimorfismo rs7754840 e DMG e nosso trabalho relata pela primeira vez a pesquisa realizada para averiguar a associação deste polimorfismo com gestantes diabéticas brasileiras. Portanto, mais estudos são necessários para melhor interpretar estes resultados e avaliar a associação do rs7754840 no DMG.

As análises de variância foram realizadas para este polimorfismo na busca de associações com os parâmetros bioquímicos em estudo. No entanto, as associações não foram identificadas (ANOVA) e nenhuma correlação foi significativa com os dados antropométricos, biomarcadores de controle de controle glicêmico, perfil lipídico, função renal e AGEs-F.

## 6 CONCLUSÕES

- A concentração sérica dos produtos de glicação avançada fluorescentes (AGEs-F), quantificados por espectrofluorimetria, não diferenciou gestantes saudáveis de portadoras do diabetes gestacional;
- As concentrações séricas de AGEs-F não foram diferentes ( $P>0,05$ ) em quatro períodos gestacionais distintos (12-23; 24-28, 29-32 e  $> 32$  semanas) sugerindo que este biomarcador é pouco influenciado pelas alterações fisiológicas associadas à gestação ou ao diabetes gestacional;
- A concentração de AGEs-F foi correlacionada positiva e significativamente ( $r=0,421$ ;  $P<0,001$ ) com a creatinina no grupo com diabetes gestacional;
- Os polimorfismos rs1007888 e rs7754840, respectivamente, nos genes *MIF* e *CDKAL1*, não foram associados ao diabetes gestacional na amostra em estudo;
- As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* diferiram significativamente ( $P<0,05$ ) entre os grupos em estudo. Portadoras do alelo de risco (G) apresentaram cerca de 1,4 vezes mais chance em desenvolver diabetes gestacional (OR 1,42; 95%IC, 1,02-2,02) quando comparadas às portadoras do alelo C;
- A frequência (95%IC) do alelo menos frequente “A” para o polimorfismo rs1007888 do gene *MIF* 46,8% (41-53%) foi similar à encontrada na literatura para chineses de etnia Han e caucasianos;
- A frequência do alelo menos frequente “G” do polimorfismo rs10830963 no gene *MTNR1B* para o grupo controle 20,2% (95%IC, 16-24) observado em nosso estudo para uma população Brasileira, foi menor à descrita na literatura para caucasianos e cerca de duas vezes menor quando comparada à populações orientais;

- O polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B* foi associado à concentração sérica de LDL-colesterol no grupo DMG. Pacientes com diabetes gestacional portadoras do alelo de risco G em homozigose (GG) apresentaram concentração de LDL-colesterol, um marcador para risco cardiovascular, cerca de 20mg/dL maior do que as portadoras do genótipo CC;
- A frequência (95%IC) do alelo menos frequente "C" para o polimorfismo rs7754840 do gene *CDKAL1* 28,0% (23-33%) em gestantes saudáveis foi similar à descrita em outras populações de origem caucasóide e menor quando comparada a população de origem asiática.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 36, p. S67-S74. 2013.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S81-90. 2014.
- AGIL, A. *et al.* Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res**. v. 50, n.2, p. 207-12. 2011.
- ALLAMAN-PILLET, N. *et al.* Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. **Mol Cell Endocrinol**. v. 226, n.1-2, p. 59-66. 2004.
- ANGEL, B. *et al.* Associations of the CTLA-4 polymorphisms with type 1 diabetes in a Chilean population: case-parent design. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 85, n.3, p. e34-6. 2009.
- ASLANI, S. *et al.* Genetic variation in macrophage migration inhibitory factor associated with gestational diabetes mellitus and metabolic syndrome. **Horm Metab Res**. v. 43, n.8, p. 557-61. 2011.
- 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.
- BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**. v. 63, n.4, p. 582-92. 2004.
- BAZWINSKY-WUTSCHKE, I. *et al.* Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. **J Pineal Res**. v. 56, n.1, p. 82-96. 2014.
- BOJUNGA, J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice. **Cytokine**. v. 21, n.4, p. 179-86. 2003.
- BOS, D. C.; DE RANITZ-GREVEN, W. L.; DE VALK, H. W. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. **Diabetes Technol Ther**. v. 13, n.7, p. 773-9. 2011.
- BRITE, J. *et al.* Height and the risk of gestational diabetes: variations by race/ethnicity. **Diabet Med**. v. p. 2013.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, n.6865, p. 813-20. 2001.
- BROWNLEE, M. *et al.* Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science**. v. 232, n.4758, p. 1629-32. 1986.

BUCKLEY, S. T.; EHRHARDT, C. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. **J Biomed Biotechnol.** v. 2010, p. 917108. 2010.

BURACZYNSKA, M. *et al.* Renalase gene polymorphisms in patients with type 2 diabetes, hypertension and stroke. **Neuromolecular Med.** v. 13, n.4, p. 321-7. 2011.

BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr.** v. 71, n.5 Suppl, p. 1256S-61S. 2000.

CAI, W. *et al.* Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. **Am J Pathol.** v. 173, n.2, p. 327-36. 2008.

CALANDRA, T. *et al.* The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. **Journal of Experimental Medicine.** v. 179, n.6, p. 1895-902. 1994.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 3, n.10, p. 791-800. 2003.

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

CARR, D. B. *et al.* Gestational diabetes mellitus increases the risk of cardiovascular disease in women with a family history of type 2 diabetes. **Diabetes Care.** v. 29, n.9, p. 2078-83. 2006.

CARVALHO, V. F. *et al.* Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. **Eur J Pharmacol.** v. 669, n.1-3, p. 143-8. 2011.

CATALANO, P. M. *et al.* Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. **American Journal of Physiology.** v. 264, n.1 Pt 1, p. E60-7. 1993.

CERAMI, C. *et al.* Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 94, n.25, p. 13915-20. 1997.

CHEN, J. L.; FRANCIS, J. Pyridoxamine, advanced glycation inhibition, and diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** v. 23, n.1, p. 6-8. 2012.

CHEN, J. R. *et al.* Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford).** v. 38, n.12, p. 1275-8. 1999.

CHENG, A. Y.; LAU, D. C. The canadian diabetes association 2013 clinical practice guidelines-raising the bar and setting higher standards! **Can J Diabetes.** v. 37, n.3, p. 137-8. 2013.

CHING, Y. P. *et al.* Identification of a neuronal Cdk5 activator-binding protein as Cdk5 inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n.18, p. 15237-40. 2002.

CHO, Y. M. *et al.* Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. **Diabetologia**. v. 52, n.2, p. 253-61. 2009.

CHURCH, T. S. *et al.* Obesity, macrophage migration inhibitory factor, and weight loss. **Int J Obes (Lond)**. v. 29, n.6, p. 675-81. 2005.

COOPER, M. E. *et al.* The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. **Diabetologia**. v. 43, n.5, p. 660-4. 2000.

CVETKOVIC, I. *et al.* Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. **Endocrinology**. v. 146, n.7, p. 2942-51. 2005.

CVETKOVIC, I.; STOSIC-GRUJICIC, S. Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders. **Int Immunopharmacol**. v. 6, n.10, p. 1527-34. 2006.

DABELEA, D.; KNOWLER, W. C.; PETTITT, D. J. Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. **J Matern Fetal Med**. v. 9, n.1, p. 83-8. 2000.

DAIMON, M. *et al.* Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 329, n.1, p. 205-10. 2005.

DANDONA, P. *et al.* Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n.10, p. 5043-7. 2004.

DAVAL, M. *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic beta-cell survival via Fak-Akt signaling pathways. **Diabetes**. v. 60, n.4, p. 1186-97. 2011.

DE GROOT, L. *et al.* Advanced glycation endproducts are increased in rheumatoid arthritis patients with controlled disease. **Arthritis Res Ther**. v. 13, n.6, p. R205. 2011.

DE RANITZ-GREVEN, W. L. *et al.* Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, at diagnosis in gestational diabetes mellitus compared with normal pregnancy. **Diabetes Technol Ther**. v. 14, n.1, p. 43-9. 2012.

DEGENHARDT, T. P. *et al.* Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney International**. v. 61, n.3, p. 939-50. 2002.

DEHGHAN, A. *et al.* High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 31, n.2, p. 361-2. 2008.

DEHWAH, M. A.; WANG, M.; HUANG, Q. Y. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. **Genet Mol Res**. v. 9, n.2, p. 1109-20. 2010.

DUBOCOVICH, M. L. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. **Pharmacol Rev**. v. 62, n.3, p. 343-80. 2010.

EGWUATU, V. E. Plasma urate, urea and creatinine levels during pregnancy and after the puerperium in normal primigravid Nigerians. **Br J Obstet Gynaecol**. v. 90, n.1, p. 21-5. 1983.

ELLIOTT, B. D. *et al.* Comparative placental transport of oral hypoglycemic agents in humans: a model of human placental drug transfer. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 171, n.3, p. 653-60. 1994.

ENGLAND, L. J. *et al.* Preventing type 2 diabetes: public health implications for women with a history of gestational diabetes mellitus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 200, n.4, p. 365 e1-8. 2009.

EVANS, W. E.; RELLING, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. **Science**. v. 286, n.5439, p. 487-91. 1999.

FARACI, M. *et al.* Treatment of gestational diabetes: oral hypoglycemic agents or insulin? **J Prenat Med**. v. 5, n.3, p. 63-4. 2011.

FIGAROLA, J. L. *et al.* LR-90 a new advanced glycation endproduct inhibitor prevents progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**. v. 46, n.8, p. 1140-52. 2003.

FINUCANE, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**. v. 377, n.9765, p. 557-67. 2011.

FORBES, J. M. *et al.* Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. **Diabetologia**. v. 44, n.1, p. 108-14. 2001.

FOWLER, M. J. Classification of diabetes: not all hyperglycemia is the same. **Clin. Diabetes**, v. 25, p. 74-76. 2007

GENEVIEVE, M. *et al.* Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism**. v. p. 2013.

GERRITS, E. G. *et al.* Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. **Diabetes Care**. v. 31, n.3, p. 517-21. 2008.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 93, n.4, p. 1143-52. 2008.

GOLDIN, A. *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation.** v. 114, n.6, p. 597-605. 2006.

GUARIGUATA, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 98, n.3, p. 524-5. 2012.

GUARIGUATA, L. *et al.* The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 94, n.3, p. 322-32. 2011.

GUNGOR, E. S.; DANISMAN, N.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Relationship between serum uric acid, creatinine, albumin and gestational diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** v. 44, n.8, p. 974-7. 2006.

GUPTA, V. *et al.* Association analysis of 31 common polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in Indian sib pairs. **Diabetologia.** v. 55, n.2, p. 349-57. 2012.

GURSINSKY, T. *et al.* Air pollution-associated fly ash particles induce fibrotic mechanisms in primary fibroblasts. **Biol Chem.** v. 387, n.10-11, p. 1411-20. 2006.

HAMMES, H. P. *et al.* Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. **Diabetologia.** v. 37, n.1, p. 32-5. 1994.

HAMMES, H. P. *et al.* Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nature Medicine.** v. 9, n.3, p. 294-9. 2003.

HANFORD, L. E. *et al.* Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). **Journal of Biological Chemistry.** v. 279, n.48, p. 50019-24. 2004.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=7754840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=7754840)>. Acesso em: 19/02/2014.

HAPO. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med.** v. 358, n.19, p. 1991-2002. 2008.

HENLE, T. *et al.* Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. **Nephrol Dial Transplant.** v. 14, n.8, p. 1968-75. 1999.

HERDER, C. *et al.* Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene variants and MIF serum concentrations on the risk of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Case-Cohort Study, 1984-2002. **Diabetologia**. v. 51, n.2, p. 276-84. 2008.

HERDER, C. *et al.* Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4). **Diabetes Care**. v. 29, n.2, p. 368-71. 2006.

HUANG, R. C. *et al.* Lifecourse childhood adiposity trajectories associated with adolescent insulin resistance. **Diabetes Care**. v. 34, n.4, p. 1019-25. 2011.

HUGHES, R. C. *et al.* Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of metformin. **Diabet Med**. v. 23, n.3, p. 323-6. 2006.

HUI, L.; DELMONTE, T.; RANADE, K. Genotyping using the TaqMan assay. **Curr Protoc Hum Genet**. v. Chapter 2, p. Unit 2 10. 2008.

HUMPERT, P. M. *et al.* Plasma sRAGE is independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, n.5, p. 1111-3. 2006.

IADPSG. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**. v. 33, n.3, p. 676-82. 2010.

IDF. **International Diabetes Federation**. Disponível em: <<http://www.idf.org>> Acesso em: 19/12/2014.

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.

JAISSON, S.; GILLERY, P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. **Clinical Chemistry**. v. 56, n.9, p. 1401-12. 2010.

JESSBERGER, S. *et al.* Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis. **Trends Neurosci**. v. 32, n.11, p. 575-82. 2009.

KADHIM, H. M. *et al.* Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. **J Pineal Res**. v. 41, n.2, p. 189-93. 2006.

KALOUSOVA, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiol Res**. v. 51, n.6, p. 597-604. 2002.

- KAN, M. Y. *et al.* Two susceptible diabetogenic variants near/in MTNR1B are associated with fasting plasma glucose in a Han Chinese cohort. **Diabet Med.** v. 27, n.5, p. 598-602. 2010.
- KENGNE, A. P. *et al.* New insights on diabetes mellitus and obesity in Africa-part 1: prevalence, pathogenesis and comorbidities. **Heart.** v. 99, n.14, p. 979-83. 2013.
- KERKENI, M. *et al.* Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Diab Vasc Dis Res.** v. 10, n.3, p. 239-45. 2013.
- KIM, J. Y. *et al.* Melatonin receptor 1 B polymorphisms associated with the risk of gestational diabetes mellitus. **Bmc Medical Genetics.** v. 12, p. 82. 2011.
- KIRCHHOFF, K. *et al.* Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. **Diabetologia.** v. 51, n.4, p. 597-601. 2008.
- KOLTERMAN, O. G. *et al.* A defect in cell-mediated immune function in insulin-resistant diabetic and obese subjects. **J Lab Clin Med.** v. 96, n.3, p. 535-43. 1980.
- KOSCHINSKY, T. *et al.* Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 94, n.12, p. 6474-9. 1997.
- KOSKA, J. *et al.* mRNA concentrations of MIF in subcutaneous abdominal adipose cells are associated with adipocyte size and insulin action. **Int J Obes (Lond).** v. 33, n.8, p. 842-50. 2009.
- KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational diabetes mellitus: a cross-sectional and prospective study. **Journal of Clinical Pathology.** v. 49, n.8, p. 634-7. 1996.
- KOYAMA, Y. *et al.* Soluble Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure. **J Card Fail.** v. 14, n.2, p. 133-9. 2008.
- KREMER, C. J.; DUFF, P. Glyburide for the treatment of gestational diabetes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** v. 190, n.5, p. 1438-9. 2004.
- 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 Res.** v. 19, n.19, p. 5444. 1991.
- LANDON, M. B. *et al.* A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. **N Engl J Med.** v. 361, n.14, p. 1339-48. 2009.

LAUGHON, S. K. *et al.* Elevated first-trimester uric acid concentrations are associated with the development of gestational diabetes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 201, n.4, p. 402 e1-5. 2009.

LAUTATZIS, M. E.; GOULIS, D. G.; VRONTAKIS, M. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. **Metabolism**. v. 62, n.11, p. 1522-34. 2013.

LAWLOR, D. A.; LICHTENSTEIN, P.; LANGSTROM, N. Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. **Circulation**. v. 123, n.3, p. 258-65. 2011.

LI, C. *et al.* Association between genetic variations in MTNR1A and MTNR1B genes and gestational diabetes mellitus in Han Chinese women. **Gynecol Obstet Invest**. v. 76, n.4, p. 221-7. 2013.

LI, F. *et al.* Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. **Diabetes**. v. 54, n.5, p. 1514-22. 2005.

LI, Y. Y. *et al.* CDKAL1 gene rs7756992 A/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 62,567 subjects. **Sci Rep**. v. 3, p. 3131. 2013.

LIN, L.; PARK, S.; LAKATTA, E. G. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. **Front Biosci**. v. 14, p. 1403-13. 2009.

LIN, R. Y. *et al.* Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**. v. 168, n.2, p. 213-20. 2003.

LINDHEIMER, M. D.; TALER, S. J.; CUNNINGHAM, F. G. ASH position paper: hypertension in pregnancy. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. v. 11, n.4, p. 214-25. 2009.

LING, Y. *et al.* A common polymorphism rs3781637 in MTNR1B is associated with type 2 diabetes and lipids levels in Han Chinese individuals. **Cardiovasc Diabetol**. v. 10, p. 27. 2011.

LITTLE, W. C. *et al.* The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. **J Card Fail**. v. 11, n.3, p. 191-5. 2005.

LIU, C. *et al.* MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired beta-cell function in Chinese Hans from Shanghai. **Bmc Medical Genetics**. v. 11, p. 59. 2010.

LIU, Y. *et al.* Positive association between variations in CDKAL1 and type 2 diabetes in Han Chinese individuals. **Diabetologia**. v. 51, n.11, p. 2134-7. 2008.

LUE, H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect.** v. 4, n.4, p. 449-60. 2002.

LYSSENKO, V. *et al.* Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. **Nature Genetics.** v. 41, n.1, p. 82-8. 2009.

MAASER, C. *et al.* Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. **Gastroenterology.** v. 122, n.3, p. 667-80. 2002.

MAKITA, Z. *et al.* Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. **N Engl J Med.** v. 325, n.12, p. 836-42. 1991.

MAKITA, Z. *et al.* Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. **Journal of Biological Chemistry.** v. 267, n.8, p. 5133-8. 1992.

MATSUMOTO, T. *et al.* Measurement of advanced glycation endproducts in skin of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and dialysis-related spondyloarthropathy using non-invasive methods. **Rheumatol Int.** v. 28, n.2, p. 157-60. 2007.

MCCLELLAND, I. S.; PERSAUD, C.; JACKSON, A. A. Urea kinetics in healthy women during normal pregnancy. **Br J Nutr.** v. 77, n.2, p. 165-81. 1997.

MEERWALDT, R. *et al.* Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. **Diabetologia.** v. 47, n.7, p. 1324-30. 2004.

MEIJERMAN, I. *et al.* Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. **Drug Metab Rev.** v. 39, n.1, p. 45-60. 2007.

MESDAGHINIA, E. *et al.* Comparison of newborn outcomes in women with gestational diabetes mellitus treated with metformin or insulin: a randomised blinded trial. **Int J Prev Med.** v. 4, n.3, p. 327-33. 2013.

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.

MEYERS-SEIFER, C. H.; VOHR, B. R. Lipid levels in former gestational diabetic mothers. **Diabetes Care.** v. 19, n.12, p. 1351-6. 1996.

MISSION, J. F. *et al.* Gestational diabetes screening with the new IADPSG guidelines: a cost-effectiveness analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** v. 207, n.4, p. 326 e1-9. 2012.

MIYATA, T. *et al.* Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 244, n.1, p. 45-9. 1998.

- MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 13, p. 261-91. 1997.
- MORIN, D. *et al.* Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. **Pharmacology.** v. 54, n.5, p. 271-5. 1997.
- MUNCH, G. *et al.* Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. **Eur J Clin Chem Clin Biochem.** v. 35, n.9, p. 669-77. 1997.
- MURAKAMI, H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. **Clinical and Experimental Immunology.** v. 128, n.3, p. 504-10. 2002.
- NAGORNY, C.; LYSSSENKO, V. Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story? **Curr Diab Rep.** v. 12, n.6, p. 667-72. 2012.
- NAKANISHI, N. *et al.* Serum uric acid and risk for development of hypertension and impaired fasting glucose or Type II diabetes in Japanese male office workers. **Eur J Epidemiol.** v. 18, n.6, p. 523-30. 2003.
- NEEPER, M. *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **Journal of Biological Chemistry.** v. 267, n.21, p. 14998-5004. 1992.
- NIELSEN, L. R. *et al.* HbA1c levels are significantly lower in early and late pregnancy. **Diabetes Care.** v. 27, n.5, p. 1200-1. 2004.
- NIGG, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. **Bioessays.** v. 17, n.6, p. 471-80. 1995.
- OHARA-IMAIZUMI, M. *et al.* Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. **PLoS One.** v. 5, n.12, p. e15553. 2010.
- OLIVEIRA, M. I. A. *et al.* RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **J Bras Patol Med Lab.** v. 49, n.2, p. 97-118. 2013.
- OLSSON, L. *et al.* No effect by the common gene variant rs10830963 of the melatonin receptor 1B on the association between sleep disturbances and type 2 diabetes: results from the Nord-Trøndelag Health Study. **Diabetologia.** v. 54, n.6, p. 1375-8. 2011.
- ONO, Y. *et al.* Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 41, n.2, p. 131-7. 1998.
- PALMA-REIS, I. *et al.* Renal disease and hypertension in pregnancy. **Clin Med.** v. 13, n.1, p. 57-62. 2013.

PANDI-PERUMAL, S. R. *et al.* Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog Neurobiol.** v. 85, n.3, p. 335-53. 2008.

PEPPA, M. *et al.* Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). **Am J Nephrol.** v. 26, n.5, p. 430-6. 2006.

PESCHKE, E. *et al.* Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? **J Pineal Res.** v. 42, n.4, p. 350-8. 2007.

PETROVSKY, N. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. **Immunol Cell Biol.** v. 81, n.2, p. 137-43. 2003.

PLAISANCE, V. *et al.* The mif gene is transcriptionally regulated by glucose in insulin-secreting cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 295, n.1, p. 174-81. 2002.

PROCOPIOU, M. [HbA1c: review and recent developments]. **Rev Med Suisse.** v. 2, n.68, p. 1473-4, 1476-9. 2006.

PROKOPENKO, I. *et al.* Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. **Nature Genetics.** v. 41, n.1, p. 77-81. 2009.

PUDDU, A. *et al.* An emerging role of glucagon-like peptide-1 in preventing advanced-glycation-end-product-mediated damages in diabetes. **Mediators Inflamm.** v. 2013, p. 591056. 2013.

RAMRACHEYA, R. D. *et al.* Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. **J Pineal Res.** v. 44, n.3, p. 273-9. 2008.

RAY, J. G. *et al.* Maternal and neonatal outcomes in pregestational and gestational diabetes mellitus, and the influence of maternal obesity and weight gain: the DEPOSIT study. Diabetes Endocrine Pregnancy Outcome Study in Toronto. **QJM.** v. 94, n.7, p. 347-56. 2001.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol Sci.** v. 17, n.3, p. 100-2. 1996.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science.** v. 273, n.5281, p. 1516-7. 1996.

RODRIGUEZ-GARCIA, J.; REQUENA, J. R.; RODRIGUEZ-SEGADE, S. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. **Clinical Chemistry.** v. 44, n.2, p. 250-5. 1998.

RUDRA, C. B. *et al.* Weight characteristics and height in relation to risk of gestational diabetes mellitus. **American Journal of Epidemiology.** v. 165, n.3, p. 302-8. 2007.

SATO, T. *et al.* Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen.** v. 21, n.3, p. 197-208. 2006.

SAXENA, R. *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science.** v. 316, n.5829, p. 1331-6. 2007.

SCHEER, F. A.; CZEISLER, C. A. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. **Sleep Med Rev.** v. 9, n.1, p. 5-9. 2005.

SCHEIJEN, J. L. *et al.* Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 877, n.7, p. 610-4. 2009.

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

SCHMIDT, A. M. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n.19, p. 8807-11. 1994.

SCOTT, L. J. *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science.** v. 316, n.5829, p. 1341-5. 2007.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 87, n.1, p. 4-14. 2010.

SHE, M. *et al.* NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. **Pharmacol Res.** v. 59, n.4, p. 248-53. 2009.

SHEU, W. H. *et al.* Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. **Obesity (Silver Spring).** v. 16, n.5, p. 1033-8. 2008.

SINAIKO, A. R. *et al.* Relation of weight and rate of increase in weight during childhood and adolescence to body size, blood pressure, fasting insulin, and lipids in young adults. The Minneapolis Children's Blood Pressure Study. **Circulation.** v. 99, n.11, p. 1471-6. 1999.

SINGH, R. *et al.* Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia.** v. 44, n.2, p. 129-46. 2001.

SKRHA, J., JR. *et al.* Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. **J Diabetes Res.** v. 2013, p. 650694. 2013.

SKURK, T. *et al.* Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. **Endocrinology.** v. 146, n.3, p. 1006-11. 2005.

SOLOMON, C. G. *et al.* A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. **JAMA**. v. 278, n.13, p. 1078-83. 1997.

SPARSO, T. *et al.* G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans. **Diabetes**. v. 58, n.6, p. 1450-6. 2009.

SPAULONCI, C. P. *et al.* Randomized trial of metformin vs insulin in the management of gestational diabetes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 209, n.1, p. 34 e1-7. 2013.

STAIGER, H. *et al.* Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. **PLoS One**. v. 3, n.12, p. e3962. 2008.

STANCAKOVA, A. *et al.* Single-nucleotide polymorphism rs7754840 of CDKAL1 is associated with impaired insulin secretion in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects and in a large sample of men with normal glucose tolerance. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 93, n.5, p. 1924-30. 2008.

STARIKOV, R. *et al.* Hemoglobin A1c in pregestational diabetic gravidas and the risk of congenital heart disease in the fetus. **Pediatr Cardiol**. v. 34, n.7, p. 1716-22. 2013.

STEINTHORSDOTTIR, V. *et al.* A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**. v. 39, n.6, p. 770-5. 2007.

STOJANOVIC, I.; SAKSIDA, T.; STOSIC-GRUJICIC, S. Beta cell function: the role of macrophage migration inhibitory factor. **Immunol Res**. v. 52, n.1-2, p. 81-8. 2012.

STOSIC-GRUJICIC, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus. **J Cell Physiol**. v. 215, n.3, p. 665-75. 2008.

SU, X. D. *et al.* Elevated serum levels of advanced glycation end products and their monocyte receptors in patients with type 2 diabetes. **Archives of Medical Research**. v. 42, n.7, p. 596-601. 2011.

SUSIC, D. *et al.* Cardiovascular and renal effects of a collagen cross-link breaker (ALT 711) in adult and aged spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**. v. 17, n.4, p. 328-33. 2004.

SYVANEN, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nat Rev Genet**. v. 2, n.12, p. 930-42. 2001.

TABAK, A. G. *et al.* Height and gestational diabetes mellitus. **Diabet Med**. v. 19, n.4, p. 344-5. 2002.

TAKAHASHI, M. *et al.* Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**. v. 36, n.6, p. 637-42. 1997.

TAKEUCHI, M.; TAKINO, J.; YAMAGISHI, S. Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. **Curr Drug Targets**. v. 11, n.11, p. 1468-82. 2010.

TANEDA, S.; MONNIER, V. M. ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. **Clinical Chemistry**. v. 40, n.9, p. 1766-73. 1994.

TANG, S. *et al.* Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes Res Clin Pract**. v. p. 2012.

TEERLINK, T. *et al.* Measurement of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**. v. 50, n.7, p. 1222-8. 2004.

TEMPE, A.; MAYANGLAMBAM, R. D. Glyburide as treatment option for gestational diabetes mellitus. **J Obstet Gynaecol Res**. v. 39, n.6, p. 1147-52. 2013.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population scale sequencing. **Nature**. v. 467, n.7319, p.161-73. 2010.

THOME, J. *et al.* [New hypothesis on etiopathogenesis of Alzheimer syndrome. Advanced glycation end products (AGEs)]. **Nervenarzt**. v. 67, n.11, p. 924-9. 1996.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Arch Biochem Biophys**. v. 419, n.1, p. 31-40. 2003.

TOESCU, V. *et al.* Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clin Sci (Lond)**. v. 106, n.1, p. 93-8. 2004.

TORLONI, M. R. *et al.* Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Obes Rev**. v. 10, n.2, p. 194-203. 2009.

UBEDA, M.; KEMP, D. M.; HABENER, J. F. Glucose-induced expression of the cyclin-dependent protein kinase 5 activator p35 involved in Alzheimer's disease regulates insulin gene transcription in pancreatic beta-cells. **Endocrinology**. v. 145, n.6, p. 3023-31. 2004.

UBEDA, M.; RUKSTALIS, J. M.; HABENER, J. F. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n.39, p. 28858-64. 2006.

URIBARRI, J. *et al.* Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**. v. 110, n.6, p. 911-16 e12. 2010.

VAN EUPEN, M. G. *et al.* Plasma levels of advanced glycation endproducts are associated with type 1 diabetes and coronary artery calcification. **Cardiovasc Diabetol.** v. 12, n.1, p. 149. 2013.

VITEK, M. P. *et al.* Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n.11, p. 4766-70. 1994.

VLASSI, M. *et al.* The rs10830963 variant of melatonin receptor MTNR1B is associated with increased risk for gestational diabetes mellitus in a Greek population. **Hormones (Athens).** v. 11, n.1, p. 70-6. 2012.

VON GALL, C.; STEHLE, J. H.; WEAVER, D. R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. **Cell Tissue Res.** v. 309, n.1, p. 151-62. 2002.

VOZAROVA, B. *et al.* Plasma concentrations of macrophage migration inhibitory factor are elevated in Pima Indians compared to Caucasians and are associated with insulin resistance. **Diabetologia.** v. 45, n.12, p. 1739-41. 2002.

VYTASEK, R.; SEDOVA, L.; VILIM, V. Increased concentration of two different advanced glycation end-products detected by enzyme immunoassays with new monoclonal antibodies in sera of patients with rheumatoid arthritis. **BMC Musculoskelet Disord.** v. 11, p. 83. 2010.

WAEBER, G. *et al.* A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 15, n.1, p. 47-54. 1999.

WAEBER, G. *et al.* Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 94, n.9, p. 4782-7. 1997.

WAGNER, Z. *et al.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. **American Journal of Kidney Diseases.** v. 38, n.4, p. 785-91. 2001.

WANG, H. *et al.* Large scale meta-analyses of fasting plasma glucose raising variants in GCK, GCKR, MTNR1B and G6PC2 and their impacts on type 2 diabetes mellitus risk. **PLoS One.** v. 8, n.6, p. e67665. 2013.

WANG, Y. *et al.* Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. **PLoS One.** v. 6, n.11, p. e26953. 2011.

WEI, F. Y. *et al.* Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. **Nature Medicine.** v. 11, n.10, p. 1104-8. 2005.

WEINERT, L. S. *et al.* [Gestational diabetes management: a multidisciplinary treatment algorithm]. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 55, n.7, p. 435-45. 2011.

- WERNER, E. F. *et al.* Screening for gestational diabetes mellitus: are the criteria proposed by the international association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups cost-effective? **Diabetes Care**. v. 35, n.3, p. 529-35. 2012.
- WIGGINTON, J. E.; CUTLER, D. J.; ABECASIS, G. R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. **American Journal of Human Genetics**. v. 76, n.5, p. 887-93. 2005.
- 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.
- WILLEMSEN, S. *et al.* Advanced glycation end-products, a pathophysiological pathway in the cardiorenal syndrome. **Heart Fail Rev**. v. 17, n.2, p. 221-8. 2012.
- WILLIAMS, M. E. *et al.* Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. **Am J Nephrol**. v. 27, n.6, p. 605-14. 2007.
- WOLAK, T. *et al.* High uric acid level during the first 20 weeks of pregnancy is associated with higher risk for gestational diabetes mellitus and mild preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**. v. 31, n.3, p. 307-15. 2012.
- YABUNAKA, N. *et al.* Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 23, n.2, p. 256-8. 2000.
- YAMAGISHI, S. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochim Biophys Acta**. v. 1820, n.5, p. 663-71. 2012.
- YAMAGISHI, S. *et al.* Serum or cerebrospinal fluid levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) may be a promising biomarker for early detection of Alzheimer's disease. **Med Hypotheses**. v. 64, n.6, p. 1205-7. 2005.
- YAMAGISHI, S. *et al.* Oral administration of AST-120 (Kremezin) is a promising therapeutic strategy for advanced glycation end product (AGE)-related disorders. **Med Hypotheses**. v. 69, n.3, p. 666-8. 2007.
- YANG, L. *et al.* Association between KCNJ11 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in East Asian populations: a meta-analysis in 42,573 individuals. **Mol Biol Rep**. v. 39, n.1, p. 645-59. 2012.
- YOO, T. W. *et al.* Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**. v. 69, n.8, p. 928-33. 2005.
- YUAN, T. *et al.* Influence of human MIF promoter polymorphism on hepatocellular carcinoma prognosis. **Genet Mol Res**. v. 12, n.AOP, p. 2013.
- ZEE, P. C.; MANTHENA, P. The brain's master circadian clock: implications and opportunities for therapy of sleep disorders. **Sleep Med Rev**. v. 11, n.1, p. 59-70. 2007.

ZEGGINI, E. *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science**. v. 316, n.5829, p. 1336-41. 2007.

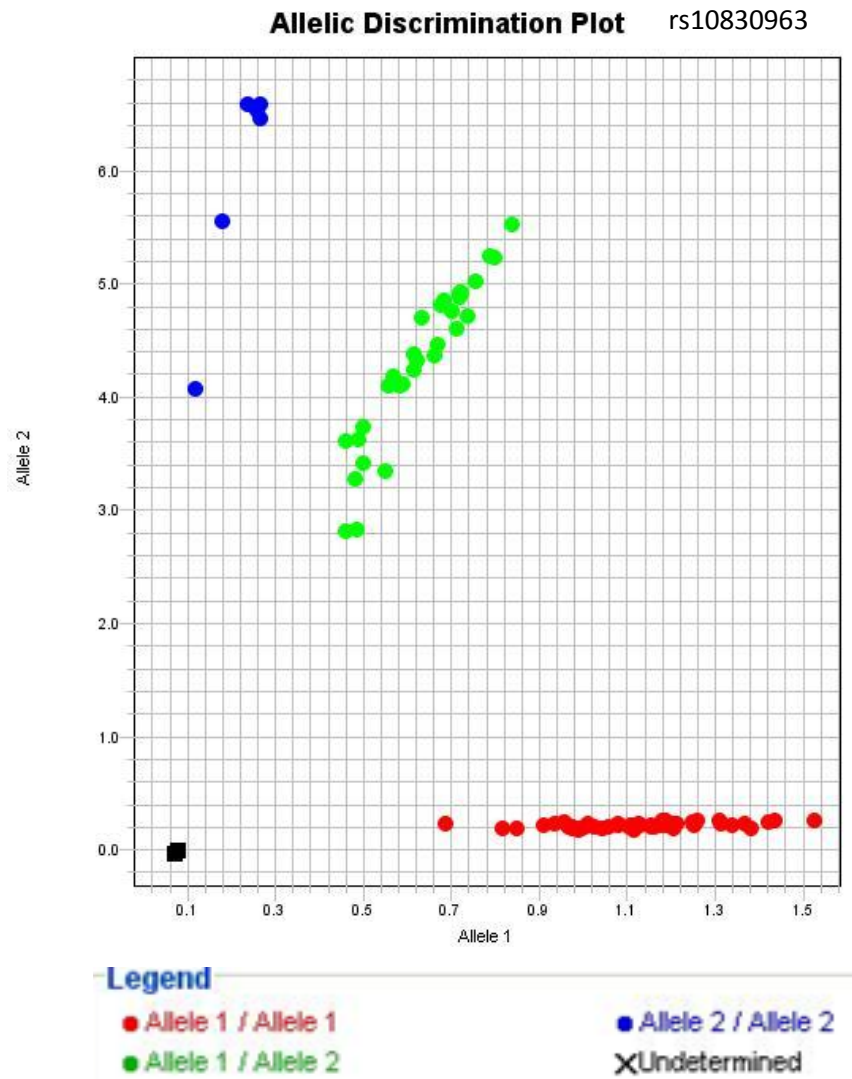
ZHAN, Y. *et al.* [Association between single nucleotide polymorphism of macrophage migration inhibitory factor-rs1007888 and the pathogenesis of gestational diabetes mellitus]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**. v. 48, n.5, p. 326-9. 2013.

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, P. *et al.* Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 87, n.3, p. 293-301. 2010.

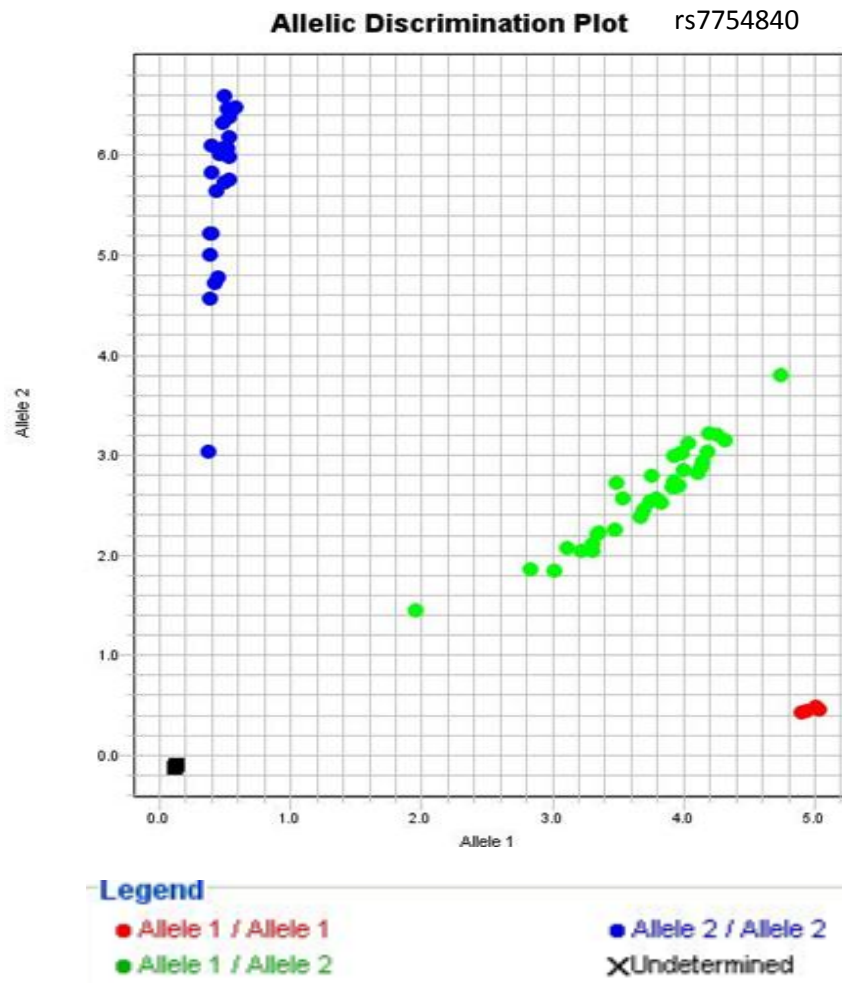
ZOU, K. H.; TUNCALI, K.; SILVERMAN, S. G. Correlation and simple linear regression. **Radiology**. v. 227, n.3, p. 617-22. 2003.

## ANEXO 1



PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *MTNR1B* (SNPs rs10830963).  
 Gráfico de discriminação alélica SNP rs10830963. Em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo C/C); em verde, amostras heterocigotas (genótipo C/G) e em azul, amostras homocigotas (genótipo G/G).

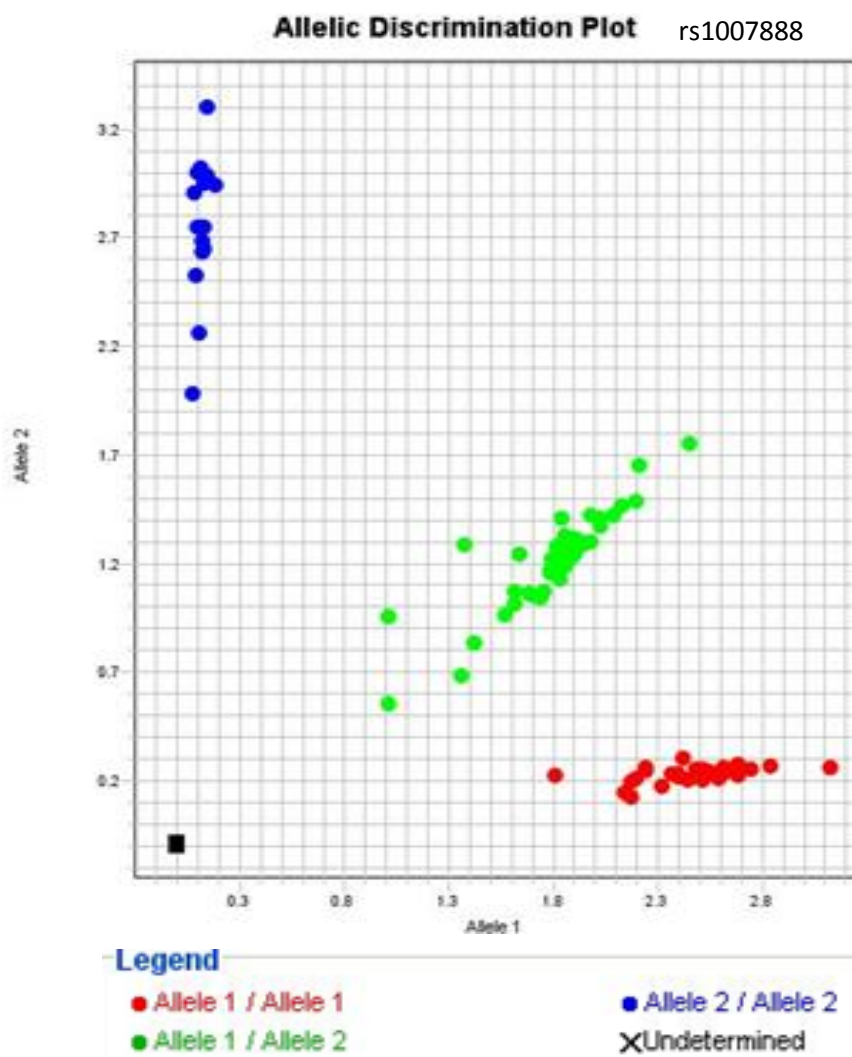
## ANEXO 2



PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *CDKAL1* (SNPs rs7754840).

Gráfico de discriminação alélica SNP rs7754840. Em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo C/C); em verde, amostras heterocigotas (genótipo C/G) e em azul, amostras homocigotas (genótipo G/G).

## ANEXO 3



PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *MIF* (SNPs rs1007888).

Gráfico de discriminação alélica SNP rs1007888. Em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo G/G); em verde, amostras heterocigotas (genótipo G/A) e em azul, amostras homocigotas (genótipo A/A).

## ANEXO 4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** BIOMARCADORES DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL

**Pesquisador:** João Paulo Lobo Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 09664412.4.0000.0102

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

**Patrocinador Principal:** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 362.752

**Data da Relatoria:** 14/08/2013

**Apresentação do Projeto:**

Equipe da Pesquisa: Orientador:Geraldo Picheth, Co orientadora:Dayane Alberton.

Trata-se de estudo caso-controle no qual serão avaliados o efeito de variações genéticas, descritas na literatura, associadas ao Diabetes mellitus gestacional. O estudo será realizado com um tamanho amostral de 500 (n=500) pacientes adultas. Estas serão divididos em dois grupos. Um será composto por 300 pacientes com diabetes gestacional e o outro consistirá de 200 gestantes não diabéticas (grupo controle). As amostras de sangue das gestantes diabéticas serão oriundas de num Hospital Público(Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia) enquanto as amostras para o grupo controle serão obtidas no Laboratório do Município. Não haverá restrições quanto a grupos sociais ou etnias. Dados como idade, peso, altura e resultados de exames bem como histórico clínico serão obtidos com o médico. As amostras de sangue e soro das pacientes serão coletadas, durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante, não sendo necessária coleta específica para o projeto em tela. Os pesquisadores referem a criação de biorrepositório e a possibilidade de pesquisas futuras mediante nova solicitação de TCLE.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 280

**Bairro:** 2º andar

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**CEP:** 80.060-240

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 362.752

**Objetivo da Pesquisa:**

GERAL

Pesquisar variações genéticas associadas ao Diabetes Gestacional e correlacionar com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

O pesquisador relaciona os benefícios como indiretos e incluiu riscos relacionados com a coleta de sangue.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O pesquisador relaciona os benefícios como indiretos e incluiu riscos relacionados com a coleta de sangue.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa está bem descrita e é relevante. Os autores informam que os sujeitos da pesquisa de ambos os grupos (diabetes e controle), serão abordados e convidados a participar da pesquisa durante o procedimento de coleta para seus exames de rotina nos estabelecimentos citados. Caberá ao funcionário do estabelecimento que irá realizar a coleta, a tarefa de convidar os sujeitos da pesquisa, bem como a apresentação e explicação do TCLE.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados todos os termos inclusive os de concordância do Laboratório de Bioquímica Clínica e da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital.

**Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 362.752

participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondendo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS);

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Por se tratar de pesquisa envolvendo Instituição da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, o pesquisador poderá iniciar a pesquisa somente após a análise de viabilidade emitida pelo CEP/SMS. Após análise do CEP da SMS, favor anexar o Parecer de Viabilidade no Sistema PB, modo: notificação.

CURITIBA, 16 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Claudia Seely Rocco**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 280

**Bairro:** 2º andar

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

## ANEXO 5

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo Controle)

Nós, João Paulo Lobo Junior, Dayane Alberton e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você gestante que veio ao Laboratório Municipal de Curitiba, a participar de um estudo intitulado “BIOMARCADORES DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL”, que vai pesquisar a variabilidade genética de alguns genes (descritos na literatura) associados ao Diabetes Gestacional. Esta pesquisa pretende comparar os aspectos laboratoriais e genéticos entre gestantes sem Diabetes como você e gestantes com Diabetes Gestacional. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes gestacional e ainda conhecer os fatores que levam a gestante diabética a ter maior ou menor risco para complicações na gestação ocasionadas por esta doença.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante a realização de exames de rotina do Laboratório Municipal de Curitiba - (Rua Padre Antônio Parolin Júnior, 1000, Curitiba-PR), sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) O estudo não apresenta nenhum risco em potencial para os participantes da pesquisa, a amostra de sangue que será utilizada, será separada da amostra colhida para exames de rotina, portanto não necessita de coleta específica para a pesquisa.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitas gestantes como o Diabetes Gestacional 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o Diabetes Gestacional, 3) novas associações entre os genes estudados com o Diabetes Gestacional. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o Diabetes Gestacional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: João Paulo Lobo Junior (jotapejunior@yahoo.com.br), Dayane Alberton (dayanealberton@ufpr.br) e Geraldo Picheth (greraldopicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento no Laboratório Municipal de Curitiba, que está assegurado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

**Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.**

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

## ANEXO 6

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Diabetes Gestacional)

Nós, João Paulo Lobo Junior, Dayane Alberton e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você gestante com diabetes gestacional que veio ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado “BIOMARCADORES DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL”, que vai pesquisar sobre esta doença. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes gestacional e ainda conhecer os fatores que levam a gestante diabética a ter maior ou menor risco para complicações na gestação ocasionadas por esta doença.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) O estudo não apresenta nenhum risco em potencial para os participantes da pesquisa, a amostra de sangue que será utilizada, será separada da amostra colhida para exames de rotina, portanto não necessita de coleta específica para a pesquisa.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitas gestantes como o Diabetes Gestacional 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o Diabetes Gestacional, 3) novas associações entre os genes estudados com o Diabetes Gestacional. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o Diabetes Gestacional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: João Paulo Lobo Junior (jotapejunior@yahoo.com.br), Dayane Alberton (dayanealberton@ufpr.br) e Geraldo Picheth (greraldopicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: manchas roxas na pele e dor no local da picada da agulha para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

**Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.**

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador