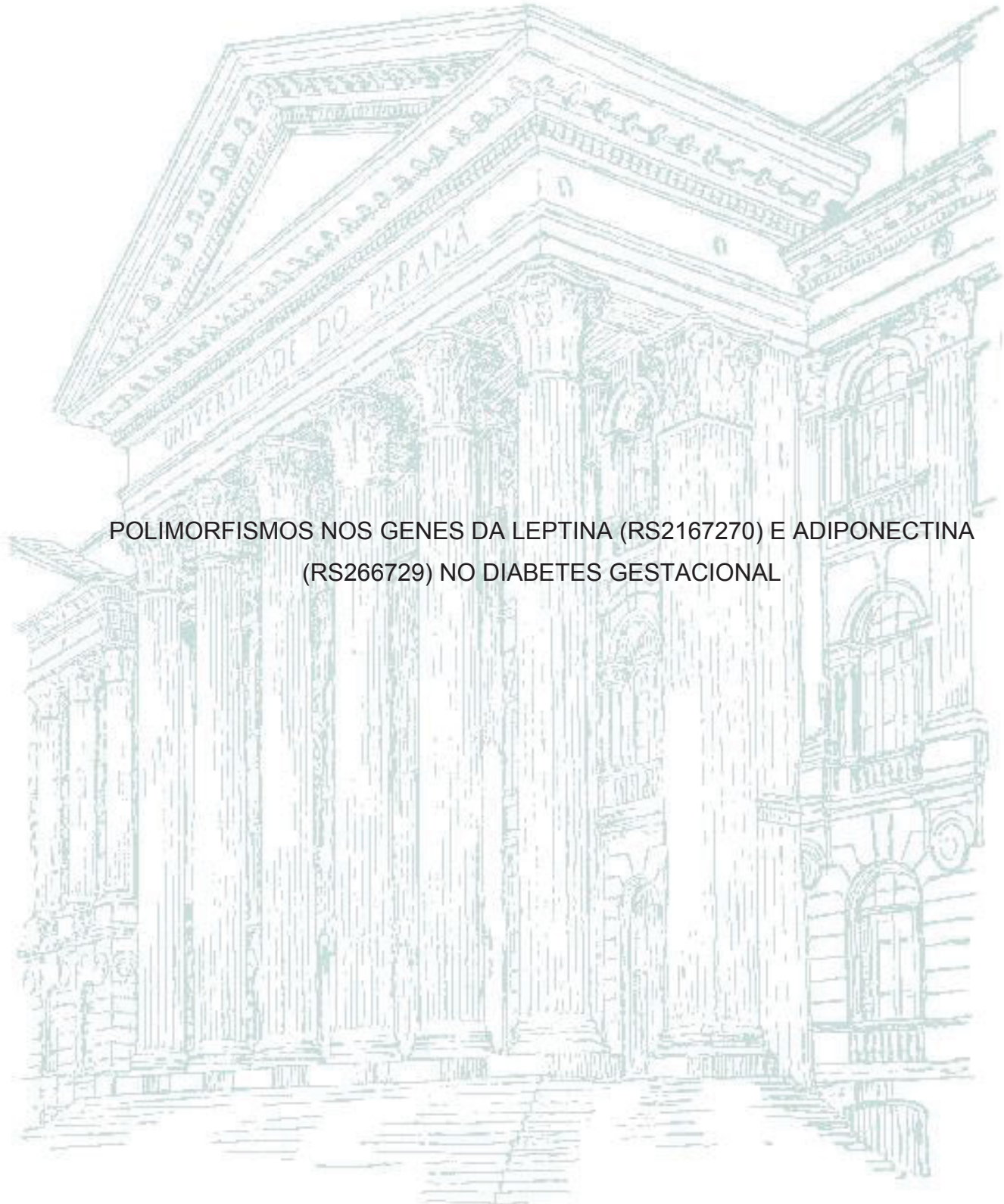


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
FABIANA SANTOS PEREIRA



POLIMORFISMOS NOS GENES DA LEPTINA (RS2167270) E ADIPONECTINA
(RS266729) NO DIABETES GESTACIONAL

CURITIBA
2020

FABIANA SANTOS PEREIRA

POLIMORFISMOS NOS GENES DA LEPTINA (RS2167270) E ADIPONECTINA
(RS266729) 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 obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth.
Coorientadora: Profa. Dra. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss.

CURITIBA

2020

Pereira, Fabiana Santos

Polimorfismos nos genes da Leptina (RS2167270) e Adiponectina (RS266729) no diabetes gestacional [recurso eletrônico] / Fabiana Santos Pereira – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Profa. Dra. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss

1. Diabetes. 2. Gestação. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Picheth, Geraldo. II. Santos-Weiss, Izabella Castilhos Ribeiro dos. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FABIANA SANTOS PEREIRA** intitulada: **POLIMORFISMOS NOS GENES DA LEPTINA (RS2167270) E ADIPONECTINA (RS266729) NO DIABETES GESTACIONAL**, sob orientação do Prof. Dr. GERALDO PICHETH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 10:24:58.0

GERALDO PICHETH

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 10:00:49.0

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 13:57:21.0

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA BENETTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento mais íntimo e sincero aos meus pais, Edson Carlos Pereira e Iveth da Luz Santos Pereira, que pousam suas mãos sobre minha cabeça em sinal de amor, cuidado e vigilância. São o farol constante, ubíquo e definitivamente robusto para todos os meus passos.

Agradeço à Me. Zenith da Luz Santos Ribas, reitora do Centro Universitário Católico do Sudoeste do Paraná pelo período de 2000 a 2007. Tia querida, não tenho como retribuir todo o carinho, a preocupação, o interesse, os almoços, a cama sempre pronta e quentinha, os risos, o acolhimento, o companheirismo e a sua benção constante.

Agradeço à Me. Ana Carolina Santos Ribas Ceruti, Autoridade Sanitária pela Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba. O auxílio em relação aos prontuários médicos foi essencial: obrigada por atender as ligações em horário impróprio apenas para sanar minhas dúvidas. Prima, as risadas e a sua cumplicidade são um presente advindo na idade adulta.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Picheth pela educação e paciência constantes.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss, pela delicadeza e educação em toda abordagem e auxílio realizado. Pela gentileza constante, sua presença foi simples, mas determinante para o fechamento deste ciclo.

Agradeço à Mestre e doutoranda Adriana Teleginski, amiga e parceira de jornada. Não houve um dia sem sorrisos e sem realizações. Um dia de cada vez e sempre com uma conquista diária através do auxílio mútuo. O mote era “*sem enroscó*”.

Agradeço à Dra. Helba Cirino de Souza Barbosa, amiga de mais de uma década, pela calma que sua presença incansável me proporcionou na conclusão deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade ofertada.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, responsável pelo auxílio imprescindível cedido para esta aluna na consolidação desta pós-graduação.

Agradeço à Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Curitiba pela disposição das amostras de gestantes com diabetes gestacional e de gestantes saudáveis.

Agradeço ao laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico.

Este agradecimento é o mais espontâneo e surpreendentemente natural: João Guilherme Ribas Ceruti. O período de realização deste trabalho me proporcionou meios de presenciar a sua primeira infância. A sua alegria e entrega substituem, rapidamente, o cansaço pelo ânimo e impulso.

Agradeço à espiritualidade amiga, testemunha presente em todos os acontecimentos.

“A educação de um povo não se faz com entretenimentos frívolos, mas com a preparação cuidadosa de sua cultura.”

Cecília Meireles

RESUMO

O diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é a principal complicação associada à gestação. O DMG está associado a várias complicações de risco para mãe e para o feto. No Brasil a frequência do DMG é estimada em 18% das gestações, e segue crescendo, associada ao aumento da obesidade. A variabilidade em genes, como polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), tem sido relacionada ao DMG. Estudamos a possível associação entre polimorfismos nos genes da Leptina (LEP) e Adiponectina (ADIPOQ) com o DMG em estudo do tipo caso-controle. O gene LEP (OMIM 164160) codifica uma proteína chamada leptina, que desempenha função importante na regulação do peso corporal por inibir a ingestão de alimentos e estimular o gasto energético, entre outras. O polimorfismo LEP rs2167270 (G> A) está localizado no exon 1 em região 5' não traduzida, é descrito como afetando o processo de tradução do mRNA. A adiponectina, codificada pelo gene ADIPOQ (OMIM 605441), é uma adipocina que modula uma série de processos metabólicos através da ativação de 5'-adenosina monofosfato-proteína quinase ativada (AMPK) e proliferador de peroxissomo ativado por receptor- α . Está associada ao metabolismo dos lípidos e à regulação da glicose no sangue. O polimorfismo rs266729 (C> G) está localizado na região promotora proximal do gene ADIPOQ e tem sido reportado associado a concentrações menores de adiponectina e relacionado à obesidade. Estudos mostraram que o polimorfismo rs266729 está associado a níveis diminuídos de adiponectina sérica no DMG, bem como no DM2. O projeto teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 2.128.753 e CAAE: 68027317.7.0000.0102. Os polimorfismos rs2167270 e rs266729 foram genotipados com sondas fluorescentes (TaqMan™) com PCR em tempo real (RT-qPCR). Gestantes portadoras de DMG (n=188) e gestantes sem diabetes (grupo controle, n=401), segundo os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (2019-2020), não relacionadas e majoritariamente Euro-brasileiras, e, em período similar da gestação (24-28 semanas) foram comparadas. As gestantes apresentaram mediana da idade e IMC de 26 anos e 26,8 kg/m², e 31 anos e 30,5 kg/m², respectivamente, para os grupos controle e DMG. Os polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as genotipagens. As frequências genotípicas e alélicas para rs2167270 (LEP) e rs266729 (ADIPOQ) não foram diferentes nos grupos em estudo (P>0,05). As frequências para os alelos de menor frequência (MAF), respectivamente para controles e DMG, foram para o gene LEP, 37,7% (95%IC, 34-41), e 41,0% (36-46), e para o gene ADIPOQ, 25,7% (95%IC, 23-29) e 23,4% (19-28). As frequências MAF, para o alelo-A (rs2167270) e alelo-G (rs266729) apresentam frequências similares a outras de populações Europeias. Os genótipos em estudo não foram associados a indicadores de obesidade e biomarcadores (peso, IMC, glicemia, creatinina e albumina). Em síntese, os polimorfismos rs2167270 no gene LEP e rs266729 no gene ADIPOQ, não foram associados ao DMG na população em estudo.

Palavras-chave: Diabetes. Gestação. Polimorfismos. SNPs. Caso-controle. LEP. ADIPOQ. População brasileira.

ABSTRACT

Gestational diabetes *mellitus* (GDM) is the main complication associated with pregnancy. GDM is associated with several risk complications for the mother and the fetus. In Brazil, the frequency of GDM is estimated at 18% of pregnancies and continues to grow, associated with the increase in obesity. Variability in genes, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), has been linked to GDM. We studied the possible association between polymorphisms in the Leptin (LEP) and Adiponectin (ADIPOQ) genes with GDM in a case-control study. The LEP gene (OMIM 164160) encodes a protein called leptin, which plays an important role in regulating body weight by inhibiting food intake and stimulating energy expenditure, among others. The LEP rs2167270 (G> A) polymorphism is in exon 1 in a 5' untranslated region and is described as affecting the mRNA translation process. Adiponectin, encoded by the ADIPOQ gene (OMIM 605441), is an adipokine, which modulates a series of metabolic processes through the activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferator activated by α -receptor and is associated to lipid metabolism and blood glucose regulation. The rs266729 (C> G) polymorphism is in the proximal promoter region of the ADIPOQ gene and has been reported to be associated with lower adiponectin concentrations and is related to obesity. Several studies have shown that the rs266729 polymorphism is associated with decreased levels of serum adiponectin in DMG, as well as in type 2 diabetes. The project was approved by the Research Ethics Committees of the Health Sciences Sector at UFPR under the CEP / SD Registry: 2.128.753 and CAAE: 68027317.7.0000.0102. The rs2167270 and rs266729 polymorphisms were genotyped with fluorescent probes (TaqMan™) in a real-time PCR (RT-qPCR) system. Pregnant women with GDM (n = 188) and pregnant women without diabetes (control group, n = 401), according to the criteria of the Brazilian Diabetes Society (2019-2020), unrelated and mostly Euro-Brazilian, and, in a similar period of pregnancy (24-28 weeks of gestation) were compared. The pregnant women had a median age and BMI of 26 years and 26.8 kg/m², and 31 years and 30.5 kg/m², respectively, for the control and GDM groups. Polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium in all genotyping. The genotype and allele frequencies for rs2167270 (LEP) and rs266729 (ADIPOQ) were not different in the studied groups (P> 0.05). The minor allele frequencies (MAF), respectively for controls and GDM, were for the LEP gene, 37.7% (95% CI, 34-41), and 41.0% (36-46), and for the ADIPOQ gene, 25.7% (95% CI, 23-29) and 23.4% (19-28). The MAF frequencies, for the A-allele (rs2167270) and the G-allele (rs266729) present frequencies like those of European populations. The genotypes under study were not associated with obesity indicators and biomarkers (weight, BMI, blood glucose, creatinine and albumin). In summary, the polymorphisms rs2167270 in the LEP gene and rs266729 in the ADIPOQ gene were not associated with GDM in the study population.

Keywords: Diabetes. Pregnancy. Polymorphisms. SNPs. Case-control. LEP. ADIPOQ. Brazilian population.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ALGORITMO PARA RASTREAMENTO DE DMG PROPOSTO EM 2010 E ADOTADO PELA ADA EM 2012	21
FIGURA 2 - PAPEL DA LEPTINA NOS DIVERSOS PROCESSOS METABÓLICOS.....	26
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE LEP E LOCALIZAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2167270 ESTUDADO.....	28
FIGURA 4 - MODELO HIPOTÉTICO PARA A AÇÃO DA ADIPONECTINA NA SENSIBILIDADE À INSULINA E GASTO DE ENERGIA.....	29
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO GENE ADIPOQ.....	30
FIGURA 6 – ANELAMENTO ESPECÍFICO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE SONDAS MARCADAS COM FLUORÓFOROS VIC [®] E FAM [®] EM UM ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.....	33
FIGURA 7 – GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs1267270 (G>A) DO GENE LEP EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA	35
FIGURA 8 – GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs266729 (C>G) DO GENE ADIPOQ EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DIABETES TIPO 1 E 2.....	20
QUADRO 2 – DIAGNÓSTICO DE DMG COM TOTG (INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE).....	21
QUADRO 3 – PROTOCOLO DEFINIDO PARA A TÉCNICA DE <i>TAQMAN</i> [®] PARA PCR EM TEMPO REAL.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CASOS DE DIABETES EM POPULAÇÃO ADULTA (20 - 79 ANOS) EM 2019	17
TABELA 2 – DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO.....	38
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2167290 DO GENE DA LEPTINA.....	42
TABELA 4 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs266729 DO GENE DA ADIPONECTINA.....	42
TABELA 5 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM OUTRAS POPULAÇÕES, ESTUDADAS NO PROJETO 1000 GENOMAS EM SUA FASE 3.....	45
TABELA 6 - COMPARAÇÕES COM ANOVA ENTRE PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS COM GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	- <i>American Diabetes Association</i> ; Associação Americana de Diabetes
AVC	- Acidente Vascular Cerebral
DM	- Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	- Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	- Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	- Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
HbA1c	- Hemoglobina Glicada fração A1c
IAM	- Infarto Agudo do Miocárdio
IDF	- <i>International Diabetes Federation</i> ; Federação Internacional de Diabetes
LEP	- Leptina
SBD	- Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Polimorfismo de único nucleotídeo
TOTG	- Teste Oral de Tolerância à Glicose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2.	JUSTIFICATIVA	14
3.	OBJETIVOS	15
3.1.	OBJETIVO GERAL	15
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.	REVISÃO DE LITERATURA	155
4.1.	DIABETES	155
4.2.	CLASSIFICAÇÃO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	17
4.2.1.	Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1).....	17
4.2.2.	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	18
4.2.3.	Outros tipos específicos de diabetes	18
4.2.4.	<i>Diabetes melitus</i> gestacional (DMG).....	18
4.3.	DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	19
4.3.1.	Critérios de diagnóstico do <i>diabetes mellitus</i> tipo 1 e tipo 2 (DM1 e DM2)..	19
4.3.2.	Critérios de diagnóstico do Diabetes <i>mellitus</i> Gestacional (DMG).....	20
4.4.	TRATAMENTO DO DMG	22
4.5.	VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES	23
4.5.1.	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	24
4.6.	GENE LEP (LEPTINA).....	24
4.6.1.	Polimorfismo rs2167270 (G> A).....	27
4.7.	ADIPONECTINA	28
4.7.1.	Polimorfismo rs266729 (C> G)	300
5.	MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1.	COMITÊ DE ÉTICA	31
5.2.	AMOSTRAS.....	31
5.2.1.	Caracterização das amostras	32
5.3.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	32
5.4.	REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS <i>TAQMAN</i> ®	322
5.5.	QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	36
5.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1.	Caracterização da amostra.....	37
6.2.	Análises Moleculares.....	42

6.3.	Comparações entre genótipos e concentrações de biomarcadores.....	45
7.	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXO 01.....	644

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma patologia que afeta grande número de indivíduos na população mundial. Trata-se de uma doença crônica complexa que requer cuidados médicos contínuos com estratégias multifatoriais de redução de risco além do controle glicêmico (ADA, 2020). Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) estimou que 8,8% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 7,2 a 11,3) da população mundial com 20 a 79 anos de idade (424,9 milhões de pessoas) vivia com diabetes. Se as tendências atuais persistirem, o número de pessoas com diabetes foi projetado para ser superior a 628,6 milhões em 2045. Cerca de 79% dos casos estão localizados em países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de diabetes nas próximas décadas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que glicemia elevada é o terceiro fator, em importância, da causa de mortalidade prematura, superada apenas por pressão arterial aumentada e uso de tabaco. O baixo desempenho dos sistemas de saúde e a falta de conscientização entre a população unem-se ao início insidioso dos sintomas ou a progressão do diabetes tipo 2 fazendo com que a condição permaneça não detectada por vários anos (SBD, 2020). Acredita-se que apenas 50% dos pacientes com diabetes tenham conhecimento e diagnóstico da patologia na população brasileira (IDF, 2020).

Tradicionalmente, as complicações do diabetes resultam em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, cerebrovascular e arterial periférica. Tem, ainda, relação para a contribuição de agravos ao sistema musculoesquelético, digestório e função cognitiva (SBD, 2020).

O diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como o diabetes que tem seu primeiro diagnóstico no segundo ou terceiro trimestre da gestação, e não é claramente outro tipo de diabetes preexistente (diabetes pré gestacional) como o tipo 1 ou o tipo 2 (SBD, 2020; ADA, 2020). Entre os fatores de risco atrelados ao DMG e diabetes pré-gestacional, estão o risco de aborto precoce, aumento de defeitos congênitos, retinopatia, nefropatias e vasculopatias (ANAND; ANAND; MAHAJAN, 2017).

Um em seis nascimentos foram afetados pelo diabetes gestacional. 20 milhões, ou 16%, dos nascidos vivos tiveram alguma influência de hiperglicemia na gestação e há a estimativa de que 84% ocorreu devido ao diabetes gestacional (IDF, 2020). No Brasil, os estudos em frequência do DMG são escassos. Relato publicado em 1999, com

critérios que não estão mais em uso, mostraram uma frequência de 7,6% (SCHMIDT *et al.*, 2001; SHAAT; GROOP, 2007), sendo que os mesmos dados revisitados em 2015 apontaram para uma frequência de 18,0% (TRUJILLO *et al.*, 2015). A prevalência varia em diferentes populações ou grupos étnicos (ZHANG, *et al.*, 2013).

O aumento da obesidade e do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) em nossa população brasileira sugerem que a frequência de casos de DMG também aumentou (REICHELDT *et al.*, 2017).

As mulheres com elevada concentração de glicose durante a gravidez apresentam maior risco futuro para desenvolverem o diabetes tipo 2 (DM2) (KIM; NEWTON; KNOPP, 2002).

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

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

Um dos tipos mais frequentes de variação genética no genoma humano é representado pelo Polimorfismo de Único Nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism – SNP*), o qual pode contribuir para as diferenças interindividuais. O mecanismo molecular da origem ou da suscetibilidade de doenças hereditárias pode ser identificado através dos estudos dos polimorfismos (STRACHAN; READ, 2013).

O diabetes gestacional é um período interessante para estudos genéticos pois o estresse produzido pelo processo fisiológico da gestação favorece a manifestação de fenótipos e alterações hormonais importantes. Poucos estudos populacionais envolvendo variações genéticas e diabetes gestacional estão disponíveis para a população brasileira.

Determinar a frequência e o perfil polimórfico dos componentes genéticos em gestantes da população brasileira é relevante para o desenvolvimento de políticas públicas relacionadas ao diabetes, assim como para ampliar o conhecimento científico

sobre esta patologia. Neste trabalho propomos estudar variações genéticas de genes que estão associados ao diabetes ou às suas complicações.

2. JUSTIFICATIVA

O diabetes *mellitus* é uma síndrome que apresenta diferentes fenótipos. O conhecimento das variações genéticas associadas ao diabetes gestacional pode permitir a identificação precoce de mulheres em risco e elucidar novos alvos de tratamento, permitindo a seleção de terapia sob medida para as vulnerabilidades individuais das pacientes (STUEBE *et al.*, 2014).

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

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

O objetivo deste estudo foi examinar a associação entre polimorfismos nos genes adiponectina e leptina e o desenvolvimento de diabetes gestacional.

A plataforma TaqMan® (*Applied Biosystems; Foster City, CA*) é uma técnica conveniente para genotipagem, utilizando reação de amplificação em cadeia da polimerase e discriminação alélica de forma fácil e eficiente, gerando dados de genótipo de uma maneira custo-efetiva (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011). Neste contexto, resolvemos estudar os genes LEP e ADIPOQ e os respectivos polimorfismos: rs2167270 e rs266729, utilizando a plataforma TaqMan® para a genotipagem.

A evidência genética do efeito dos polimorfismos rs2167270 e rs266729 no DMG tem sido investigado.

Assim, esses resultados nos motivaram a realizar um estudo de replicação e avaliar a relação entre o SNP rs2167270 do Gene LEP e do SNP rs266729 na região promotora do gene ADIPOQ com o DMG na população de Curitiba - PR. Também

estimamos os efeitos potenciais de suas associações com outros parâmetros clínicos e antropométricos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

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

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as frequências genótípicas e alélicas das variantes rs2167270 do gene LEP e rs266729 do gene ADIPOQ, através de PCR em tempo real (RT - qPCR) em amostras de indivíduos saudáveis (grupo controle) e em gestantes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional;
- Verificar se há associação dos polimorfismos rs2167270 (LEP) e rs266729 (ADIPOQ) com DMG;
- Identificar marcadores de risco e/ou proteção para o diabetes gestacional bem como avaliar biomarcadores de rotina para o seu diagnóstico;
- Verificar se há associação os polimorfismos encontrados nos grupos de estudo com biomarcadores de função glicêmica, idade, altura, peso, além de marcadores de função renal como albumina e creatinina.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. DIABETES

O diabetes *mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina ou na ação da insulina por células beta de ilhotas de Langerhans, ou resistência à ação da insulina (KHODAEIAN *et al.*, 2015).

Os processos patológicos envolvidos no desenvolvimento do diabetes incluem a destruição autoimune das células β pancreáticas produzindo desde deficiência de

insulina até anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina; e a ação deficiente de insulina nos tecidos alvos, provocando anormalidades no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (ADA, 2020).

Os sintomas clássicos que caracterizam a hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, e em algumas situações, polifagia e visão turva (ADA, 2020). A hiperglicemia crônica pode ser acompanhada de maior susceptibilidade a certas infecções. Complicações a longo prazo do diabetes incluem retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando a insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés e amputações, sintomas gastrintestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunção sexual (FLORES-LE ROUX *et al.*, 2011; SPIJKERMAN *et al.*, 2003).

O diabetes é uma das doenças mais comuns não comunicáveis do mundo e é a quarta causa de morte na maioria dos países em desenvolvimento (IDF, 2020).

Em 2000, a estimativa global de adultos com diabetes era de 151 milhões. Em 2009, havia crescido 88%, chegando a 285 milhões. Hoje, calculamos que 9,3% dos adultos de 20 a 79 anos - assombrosos 463 milhões de pessoas - vivem com diabetes. Outros 1,1 milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos vivem com diabetes tipo 1. Em 2010, a projeção mundial para diabetes em 2025 era de 438 milhões. Com mais cinco anos pela frente, essa previsão já foi superada em 25 milhões (IDF, 2020). O diabetes constitui desafio à sociedade e governantes.

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

A IDF estima que mundialmente 232 milhões de pessoas não saibam que tem diabetes em 2019. Em alguns países da África a proporção de pessoas com diabetes e que não tem diagnóstico pode chegar a 90% (EVARISTO-NETO; FOSS-FREITAS; FOSS, 2010). Mesmo em países desenvolvidos cerca de 1/3 da população não tem sido diagnosticada. Na América Central e do Sul este número chega a 44,7%. Quanto mais precocemente o diagnóstico for feito e o tratamento iniciado, melhores são as chances de prevenir os danos e as complicações bem como os custos relacionados à doença (IDF, 2020).

Segundo o IDF, até o ano de 2019, o Brasil ocupava o quarto lugar no *ranking* mundial entre os países com maiores populações diabéticas (IDF, 2020). A Tabela 1 apresenta os países com maior número de casos de diabetes em população adulta.

A perspectiva é que no Brasil perfaça 2,5 vezes (4,6 milhões) o número de diabéticos reportado para o ano de 2000 (WILD *et al.*, 2004; MALTA; *et al.*, 2014).

TABELA 1 - PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CASOS DE DIABETES EM POPULAÇÃO ADULTA (20 - 79 ANOS) EM 2019

<i>País</i>	<i>Número estimado de pacientes diabéticos (milhões)</i>
<i>China</i>	114,4
<i>Índia</i>	72,7
<i>EUA</i>	30,2
<i>Brasil</i>	12,5
<i>México</i>	12,0

FONTE: Adaptado de IDF (2020).

4.2. CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES *MELLITUS*

A classificação com base na etiologia dos tipos de diabetes é amplamente aceita na comunidade científica. Sendo assim, o diabetes *mellitus* pode ser classificado em quatro grandes categorias ou tipos, de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2020).

4.2.1. Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1)

Resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição autoimune das células- β pancreáticas (ilhas de Langerhans). Essa condição foi comumente designada “insulinodependente” ou “diabetes juvenil” no passado e é responsável por 5-10% dos casos de diabetes. Os subtipos 1A (presença de auto-anticorpos contra estruturas do pâncreas), muito frequente, se contrapõe ao tipo 1B (sem anticorpos) ou idiopático (ADA, 2020).

4.2.2. Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2)

Causado pela combinação da resistência à insulina e a deficiência na produção deste hormônio, com o aumento da produção hepática de glicose. O diabetes tipo 2 (DM2) acomete cerca de 90-95% das pessoas com diabetes, anteriormente referido como “diabetes do adulto não-insulino-dependente”, englobando os indivíduos que têm resistência à insulina e/ou relativa deficiência de sua secreção ou ação. A obesidade está presente em cerca de aproximadamente 90% dos portadores desta doença (ADA, 2020). A secreção de insulina diminuída nestes pacientes é insuficiente para compensar a progressiva resistência à insulina. Faz-se necessário então o uso de antidiabéticos orais para o controle glicêmico, e após longos períodos, é necessário o uso de insulina exógena. Embora as etiologias específicas não sejam totalmente conhecidas, a destruição autoimune das células β não ocorre. O DM2 resulta da interação entre uma predisposição genética e fatores comportamentais e/ou ambientais. Há fortes evidências de que entre os fatores de risco estão a obesidade e o sedentarismo, sendo os principais determinantes não genéticos (ADA, 2020).

4.2.3. Outros tipos específicos de diabetes

São reconhecidos mais de 56 tipos específicos de diabetes. Como principais grupos, destacam-se: os defeitos genéticos na função das células β pancreática; defeitos genéticos que alteram a ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune; e síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos (ADA, 2020).

4.2.4. Diabetes *mellitus* gestacional (DMG)

O diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é o tipo de diabetes que é diagnosticado pela primeira vez durante a gestação e chega a atingir de 3% a 25% das gestantes em todo o mundo (EGAN *et al.*, 2017; SBD, 2020). No Brasil, os estudos em frequência do DMG são escassos, dados revisitados em 2015 apontaram para uma frequência de 18% (TRUJILLO *et al.*, 2015).

O DMG guarda similaridades com o DM2 e traz riscos para a mãe e para o recém-nascido fortemente associados ao grau de hiperglicemia, mas também relacionados às complicações crônicas e comorbidades do diabetes (ADA, 2020). Em geral os riscos específicos do diabetes na gestação incluem aborto espontâneo, anormalidades fetais, pré-eclâmpsia, morte fetal, macrossomia, hiperglicemia neonatal, hiperbilirrubinemia e síndrome do desconforto respiratório neonatal, entre outras. Além destes fatores, o diabetes na gestação pode predispor o desenvolvimento de obesidade, hipertensão e diabetes tipo 2 nos filhos mais tarde na vida (DABELEA *et al.*, 2000; HOLMES *et al.*, 2011).

Alguns casos de DMG podem representar um tipo pré-existente não diagnosticado de diabetes tipo 2. Mulheres com história de DMG possuem risco aumentado de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e devem ser rastreadas para este tipo de diabetes 6-12 semanas pós-parto, usando critérios de TOTG para não gestantes (KIM; NEWTON; KNOPP, 2002; ADA, 2020).

4.3. DIAGNÓSTICO DO DIABETES *MELLITUS*

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

4.3.1. Critérios de diagnóstico do diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2 (DM1 e DM2)

O controle glicêmico é avaliado pelos resultados obtidos através da glicemia em jejum, após sobrecarga oral de glicose e hemoglobina glicada, de acordo com os critérios especificados no quadro 1 a seguir.

QUADRO 1 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO DIABETES TIPO 1 E 2.

Hemoglobina glicada (HbA1C) \geq 6,5%:	O teste deve ser realizado em laboratório utilizando o método certificado e padronizado pelo Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada (NGSP).
Glicemia de Jejum \geq 126 mg/dL (7,0 mmol/L)	O Jejum é definido como nenhuma ingestão calórica por pelo menos 8 horas antes do teste.
Glicemia 2 horas após 75g glicose oral \geq 200mg/dL (11,1mmol/L)	TOTG: Esse teste deve ser executado segundo descrito pela OMS usando o equivalente a 75 g de glicose anidra solubilizada em água.
Glicemia ao acaso \geq 200mg/dL (11,1mmol/L)	Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas. Sendo que, na ausência de hiperglicemia inequívoca, os 3 primeiros critérios devem ser confirmados, repetindo-se o teste.

TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose. FONTE: Adaptado de *American Diabetes Association* (2020).

4.3.2. Critérios de diagnóstico do Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG)

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) preconiza para as gestantes, que na primeira consulta pré-natal deve ser solicitada a glicemia de jejum. Caso o valor encontrado seja \geq 126 mg/dL, é confirmado o diagnóstico de diabetes *mellitus* manifesto ou pré-gestacional, ou ainda, diabetes preexistente. Se a glicemia plasmática em jejum estiver entre 92 mg/dL e 126 mg/dL, é realizado o diagnóstico de DMG. Este diagnóstico deve ser confirmado com uma segunda dosagem da glicemia de jejum e ainda entre a 24^a e 28^a semana de gestação (ADA, 2020).

Nas gestantes com glicemia normal deve-se realizar o TOTG, teste confirmatório para o diabetes *mellitus* gestacional, que utiliza uma ingesta oral de sobrecarga de 75g de glicose anidra, dieta sem restrição de carboidratos e jejum de 8 horas antecedendo o teste. A investigação de DMG deve ser feita em todas as gestantes sem diagnóstico prévio de diabetes (ADA, 2020).

Em 2010, o *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) definiu que os critérios diagnósticos do DMG teriam como pontos de corte para o TOTG a glicemia plasmática em jejum, 1 e 2 horas pós sobrecarga com 75g de glicose, os valores \geq 92mg/dl, \geq 180mg/dl e \geq 153mg/dl, respectivamente. O diagnóstico de DMG é realizado quando qualquer um dos valores de corte está alterado (IADPSG, 2010; SBD, 2020). O quadro 2 apresenta os critérios diagnósticos

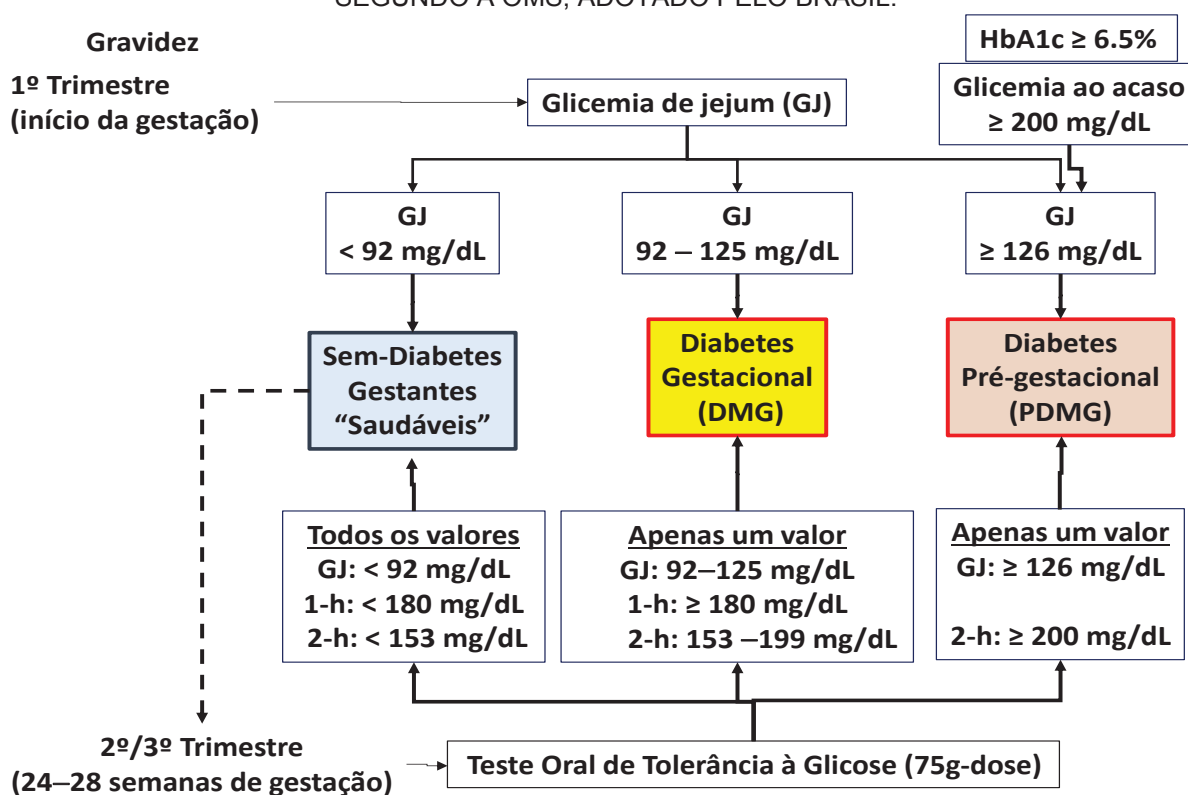
para o DMG segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes e o Consenso IADPSG e a Figura 1 apresenta o algoritmo para o rastreamento do DMG.

QUADRO 2 - DIAGNÓSTICO DE DMG COM TOTG
(INGESTÃO DE 75G DE GLICOSE)

Jejum	≥92 mg/dL (5,1 mmol/L)
1 hora	≥180 mg/dL (10,0 mmol/L)
2 horas	≥153 mg/dL (8,5 mmol/L)

FONTE: Adaptado de Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD 2020).

FIGURA 1 - ALGORITMO PARA DIAGNÓSTICO DO DIABETES *MELLITUS* GESTACIONAL, SEGUNDO A OMS, ADOTADO PELO BRASIL.



No início da gestação (primeiro trimestre), os critérios para identificação do diabetes pré-gestacional (PDMG; ou diabetes manifesto, ou diabetes franco) são similares aqueles aplicados a todos, na ausência da gravidez. Gestantes com glicemia de jejum <92 mg/dL deverão ser testadas com o teste oral de tolerância (dose de 75-g de glicose) no período de 24-28 semanas de gestação. Para os critérios de corte apresentados dos marcadores glicêmicos, basta a alteração de um deles para que o diagnóstico seja estabelecido. Abreviações: GJ: glicemia de jejum; HbA1c: hemoglobina glicada fração A1c; 1-h: glicemia após 1 hora da tomada de 75-g de glicose; 2-h: glicemia 2 horas após a carga de glicose. Adaptado de IADPSG (2010), WHO (2014) e OPAS, MS, FBAGO e SBD (2020). FONTE: Revista Laes & Haes (no prelo, 2020).

4.4. TRATAMENTO DO DMG

Após o diagnóstico de DMG, o tratamento inicia com terapia nutricional, atividade física, controle do peso corporal dependente do peso pré-gestacional, e monitoramento de glicose (ADA, 2020), numa tentativa de gerar menos riscos de complicações perinatais, comuns quando em uso de insulina (BALSELLS *et al.*, 2015).

A orientação nutricional é parte fundamental do tratamento de toda gestante portadora de diabetes. Aproximadamente entre 70 e 85% das mulheres com DMG alcançam o controle glicêmico satisfatório com mudanças no estilo de vida, que incluem dieta e exercício físico (ADA, 2020). Nas demais, a insulina é a terapia de primeira escolha, já que esta não atravessa a placenta e tem segurança conhecida durante a gestação (GASPAR; NASCIMENTO, 2004; ABI-ABIB *et al.*, 2014a, 2014b).

Em relação aos medicamentos antidiabéticos orais, a recomendação que se tem utilizado em alguns países são o uso de metformina e glibenclamida no diabetes gestacional. Porém ainda existem dúvidas dos efeitos a longo prazo para a mãe e o filho em relação ao seu uso durante a gravidez (ACOG, 2018). O uso destes medicamentos falhou em prover controle glicêmico adequado em ensaios randomizados controlados, falhando em 23% e 25-28% das mulheres com DMG, respectivamente (HEBERT *et al.*, 2009; MALEK e DAVIS, 2016). As sulfonilureias atravessam a placenta e foram associadas ao aumento da hipoglicemia neonatal (ADA, 2020).

A SBD sugere o uso de insulina como tratamento padrão. As insulinas ultrarrápidas *lispro* e *aspart* são seguras na gestação e têm a vantagem de proporcionar maior flexibilidade de estilo de vida e melhor controle da glicemia pós-prandial do que a insulina regular, embora com a desvantagem do custo mais elevado (ABI-ABIB *et al.*, 2014; SBD, 2020).

Após o parto, é frequente o retorno à normoglicemia nas mulheres com diabetes gestacional, porém haja visto o DMG ser, frequentemente, indicativo de disfunção das células β subjacente. Além disso, é importante que adotem hábitos saudáveis para redução do risco de adquirir diabetes futuramente, e que sejam submetidas regularmente a exames glicêmicos para avaliação de possível aparecimento de diabetes (ADA, 2020).

4.5. VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES

A contribuição da genética para o desenvolvimento do diabetes *mellitus* gestacional não está bem estabelecida. No entanto, as formas de diabetes autoimune e insulino resistente, alterações para as quais DMG é muitas vezes um precursor, são hereditárias e comprovadamente, variantes genéticas podem contribuir para o diabetes durante a gestação. Ainda existem poucos estudos relacionados a esta área, apesar da importância do DMG na sociedade (METZGER *et al.*, 2007).

Os estudos genéticos em grandes grupos populacionais e o desenvolvimento e melhoramento das tecnologias empregadas nas análises genéticas têm proporcionado maior conhecimento a respeito da genética dos tipos de diabetes (PETRY, 2010). Estes estudos permitiram a detecção de marcadores genéticos de risco nos genes ou próximo a eles (variantes em desequilíbrio de ligação). Como mulheres com DMG apresentam alto risco para o desenvolvimento de DM2 pós-parto e como ambos os tipos de diabetes compartilham características fisiológicas, diversos estudos surgiram a fim de investigar se estes tipos de diabetes partilham também fatores genéticos (CHO *et al.*, 2009; LAUENBORG *et al.*, 2009; KWAK, 2012). Neste contexto vários genes de suscetibilidade ao DM2 foram relacionados ao desenvolvimento de DMG em caucasianos (LAUENBORG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013). Uma vez que a suscetibilidade à intolerância a glicose depende de grupos raciais ou étnicos, o efeito das variantes genéticas de risco de DM2 sobre o DMG pode ser diferente entre as populações (KASUGA *et al.*, 2017).

O diabetes gestacional apresenta forte hereditariedade. Mulheres com diabetes gestacional frequentemente possuem história materna de diabetes, o que sugere um componente genético para a doença (MARTIN *et al.*, 1985). Quando comparado com mulheres grávidas com tolerância normal à glicose, as mulheres com DMG apresentam forte história familiar de DM2 (13,2% vs 30,1%, $p < 0,001$) (JANG *et al.*, 1998).

O progresso no estudo da genética do DMG é imprescindível para uma melhor compreensão da patologia. Até o momento sabe-se que o risco genético para o seu desenvolvimento é poligênico, ou seja, diversos genes podem estar envolvidos em sua manifestação (LAUENBORG *et al.*, 2009).

Uma vez que mulheres com DMG correm alto risco de desenvolvimento futuro de DM2, a informação genética sobre o DMG pode ser útil para a classificação de risco de DM2 (KWAK *et al.*, 2013a; KWAK *et al.*, 2013b).

4.5.1. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

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

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

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

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

4.6. GENE LEP (LEPTINA)

O gene LEP (OMIM 164160) codifica uma proteína chamada leptina, que desempenha um papel importante na regulação do peso corporal por inibir a ingestão de alimentos e estimular o gasto energético. A leptina tem várias outras funções, incluindo a regulação da hematopoiese, da angiogênese, processo de cicatrização, de respostas imunes e inflamatórias (ISSE *et al.*, 1995). Está localizado no cromossomo 7, na região 7q32.1, possui 16.352pb, contém 3 éxons, 2 íntrons e possui 167

aminoácidos e atua na regulação da massa adiposa de modo a estimular o gasto de energia (PARACCHINI; PEDOTTI; TAIOLI, 2005).

A leptina atua no tecido alvo através de seu próprio receptor de membrana (LEPR), o qual é expresso no hipotálamo e em vários tecidos periféricos como rins, fígado, pâncreas e tecido adiposo. Como a leptina e seu receptor controlam o balanço energético, variações genéticas que afetem a proteína ou sítios de sinalização podem influenciar este mecanismo (NG *et al.*, 2014). O gene LEP e LEPR desempenham um papel pertinente no metabolismo da glicose, a leptina modula a secreção de insulina e sua ação através dos receptores de leptina, promovendo aumento da sensibilidade à insulina e da captação de glicose (WAUTERS *et al.*, 2001).

Os adipócitos podem liberar muitos mediadores inflamatórios e levar ao estresse oxidativo e estados pró-inflamatórios. O estresse inflamatório e oxidativo está relacionado com o desenvolvimento das complicações (MARTINEZ-USEROS; CABEZA-MORALES; GARCIA-FONCILLAS, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

A obesidade comum é considerada uma doença de herança multifatorial (ou doença complexa) pois é fortemente influenciada por fatores genéticos e em um grau menor por fatores ambientais. Devido ao crescimento do número de indivíduos obesos ao redor do mundo, o papel dos fatores genéticos na regulação do peso corporal parece difícil de ser compreendido. A quantidade de gordura armazenada não é simplesmente um parâmetro inteiramente pré-determinado geneticamente. Evidências indicam que a obesidade é uma doença oligogênica, cuja expressão pode ser modulada por numerosos genes modificadores, que interagem entre si e interagem com fatores ambientais, como por exemplo, as escolhas alimentares, atividade física e tabagismo (BOUTIN; FROGUEL, 2001).

Leptina e adiponectina são adipocinas que regulam a secreção de insulina, a sensibilidade à insulina e o metabolismo de glicose e lipídios. A leptina, é secretada pelos adipócitos. Essa adipocina regula o metabolismo lipídico e os níveis séricos de leptina se correlacionam positivamente com a massa corporal (SÁINZ *et al.*, 2015). Além disso, a leptina também regula a função do sistema imunológico. A Figura 2 apresenta de forma resumida o papel da leptina nos mais diversos processos metabólicos.

FIGURA 2 – PRINCIPAIS AÇÕES DA LEPTINA EM DIVERSOS PROCESSOS METABÓLICOS.



FONTE: Adaptado de *Designua / Shutterstock*. Disponível em <https://www.news-medical.net/health/Leptin-Mutations.aspx>.

As concentrações circulantes de leptina maternos são elevadas durante uma gestação normal porque a adipocina é secretada pelas células da placenta (NOGUES *et al.*, 2019). Os níveis de adiponectina materna aumentam durante a primeira metade da gestação e então caem na proporção do ganho de peso (MITANCHEZ *et al.*, 2017; LEKVA *et al.*, 2017). Em uma gestação complicada pela obesidade, as concentrações circulantes de leptina são maiores do que o normal, e as concentrações circulantes de adiponectina são ligeiramente menores que o normal durante a gestação (PAGANO *et al.*, 2005). As principais perturbações do equilíbrio materno de leptina/adiponectina têm sido descritas em algumas patologias do aparelho reprodutor feminino, como DMG, pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal intrauterino (MIEHLE, STEPAN e FASSHAUER, 2012).

Mutações raras que inativam os genes que codificam leptina (*LEP*) são responsáveis pelo desenvolvimento de um fenótipo muito grave de obesidade, com início nos primeiros anos de vida e que vem associado a diversas anormalidades endócrinas como o diabetes (KRUDE *et al.*, 2003).

Estudos prévios em diferentes populações têm demonstrado que variantes no gene LEP (rs7799039, -2548G>A, rs2167270, 19G/A) e no LEPR (rs1137101, 668 A/G) têm sido associadas ao DM2 e à obesidade (KOHAN *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2017).

Evidências sustentam um componente genético na etiologia do DMG e sugerem um vínculo forte entre DMG, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e obesidade (STUEBE *et al.*, 2014; ANGUEIRA *et al.*, 2015).

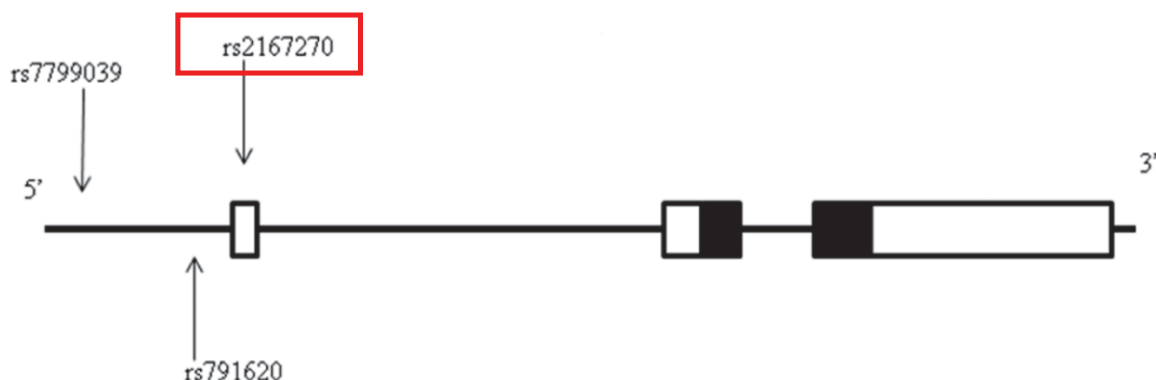
Loci genéticos em vários genes, responsáveis pela secreção da insulina, resistência à insulina, metabolismo dos lípidos, glicose e de outras vias, têm sido associados ao risco de DMG e ganho de peso gestacional (ROBITAILLE; GRANT, 2008; STUEBE *et al.*, 2010; KWAK *et al.*, 2012; MAO; LI; GAO, 2012; HUOPIO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; PAGAN *et al.*, 2014; STUEBE *et al.*, 2014; ZHAN *et al.*, 2018).

Além de poucos estudos publicados sobre a suscetibilidade genética para o DMG, em especial na população brasileira, raros são os que avaliam a relação entre os polimorfismos de nucleotídeo único e as complicações associadas ao DMG. Assim sendo, selecionamos o polimorfismo de nucleotídeo único rs2167270 no gene LEP para estudo.

4.6.1. Polimorfismo rs2167270 (G> A)

O polimorfismo rs2167270 (G> A) do gene LEP é uma substituição de uma adenina por uma guanina e está localizada na região 5' não traduzida do exon 1. A figura 3 apresenta a estrutura do gene da leptina e a localização do polimorfismo estudado.

FIGURA 3 - ESTRUTURA DO GENE LEP E LOCALIZAÇÃO DO POLIMORFISMO RS2167270, EM DESTAQUE, NO CROMOSSOMO 7.



FONTE: Okpechi *et al.*, 2010. As caixas em negro representam as sequencias codificadoras.

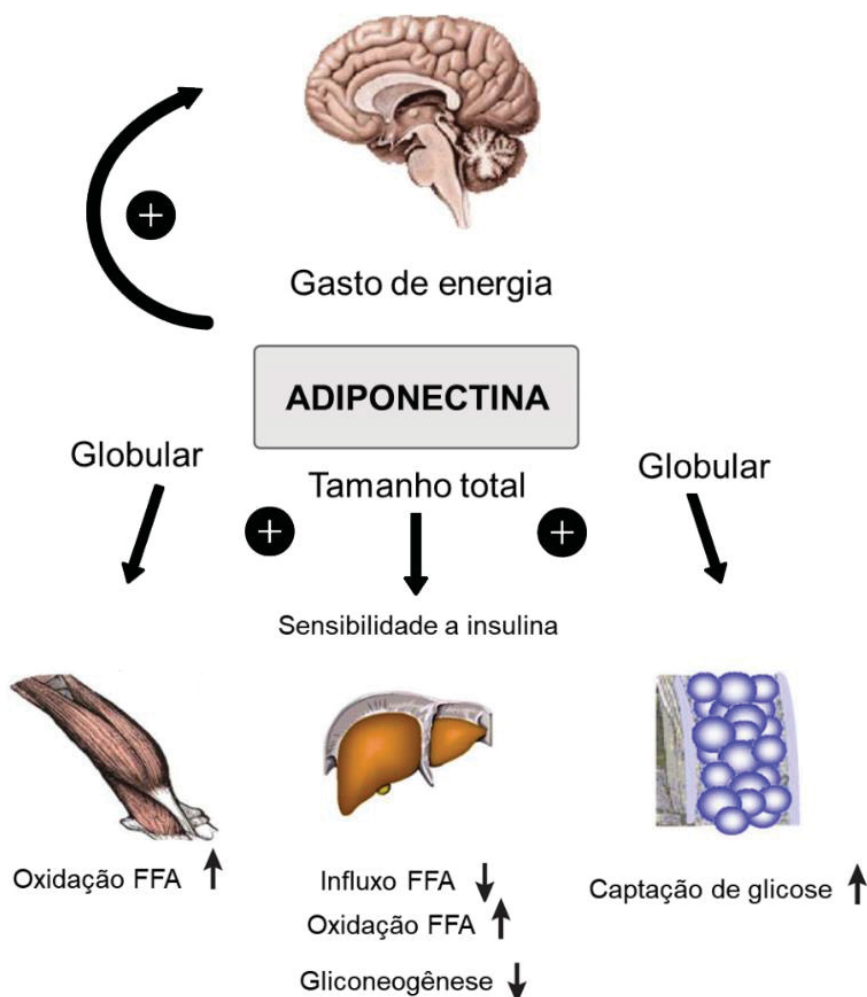
Romanowski e colaboradores (2015) relataram que o polimorfismo LEP rs2167270 (G> A) foi associado ao risco aumentado de diabetes *mellitus* pós-transplante.

O alelo A (rs2167270) foi associado a um risco aumentado de DMG e à necessidade de uso de insulina para tratamento destas pacientes (VASKÚ *et al.*, 2006). Mulheres com o alelo A tiveram um aumento na necessidade diária de insulina (PAWLIK *et al.*, 2017). Sahin e colaboradores (2013), e Mammès e colaboradores (2000) sugerem que o alelo A está associado com aumento na concentração sérica da leptina. A literatura destaca ainda que polimorfismos no gene LEP influenciam a expressão da leptina a nível transcricional, o que afeta consequentemente a secreção deste hormônio (HOFFSTED *et al.*, 2002).

4.7. ADIPONECTINA

O tecido adiposo é conhecido como um órgão endócrino que sintetiza proteínas com propriedades hormonais (SHENG e YANG, 2008). A adiponectina é uma dessas proteínas, que modula uma série de processos metabólicos através da ativação de 5'-adenosina monofosfato-proteína quinase ativada (AMPK) e proliferador de peroxissomo ativado por receptor- α (PPAR- α) (KARIMI *et al.*, 2018). Esta adipocina é um hormônio específico dos adipócitos conhecida por estar envolvida em uma variedade de atividades metabólicas, incluindo metabolismo de lipídios e oxidação de ácidos graxos, regulação dos níveis de glicose no sangue e sensibilidade à insulina; atividades anti-inflamatórias e vasoprotetoras (BOUZID *et al.*, 2016). A figura 4 apresenta um modelo hipotético para a ação da adiponectina na sensibilidade à insulina e gasto de energia.

FIGURA 4 - MODELO HIPOTÉTICO PARA A AÇÃO DA ADIPONECTINA NA SENSIBILIDADE À INSULINA E GASTO DE ENERGIA.



FONTE: Adaptado de FASSHAUER *et al.*, 2004.

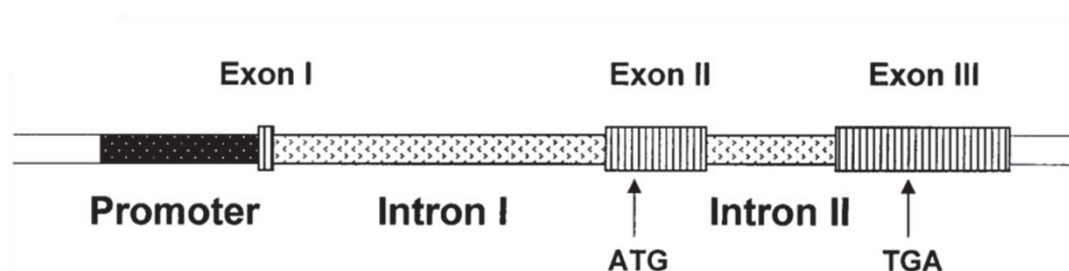
Esse hormônio diminui a resistência à insulina, melhora o metabolismo lipídico e exerce propriedades anti-inflamatórias. Níveis plasmáticos reduzidos de adiponectina foram observados em pacientes com síndrome metabólica, diabetes *mellitus*, dislipidemia, obesidade e doença arterial coronariana (HOTTA *et al.*, 2000; KADOWAKI *et al.*, 2014). Três formas de adiponectina são encontradas no soro: trímero, hexâmero e uma forma de adiponectina de alto peso molecular (OUCHI *et al.*, 2003). Essas formas são diferentemente moduladas em condições de doença (CARDOSO *et al.*, 2018).

Os níveis de adiponectina diferem de acordo com a idade, gênero e índice de massa corporal, com níveis mais baixos em indivíduos obesos. Seu nível é baixo em pacientes com diabetes tipo 2, que normalmente está associado ao diabetes gestacional. Consequentemente, baixos níveis de adiponectina plasmática podem

desempenhar um papel na etiologia da resistência à insulina e do DMG e/ou DM2 (LANG *et al.*, 2011).

Adiponectina é uma proteína com 244 aminoácidos, codificada pelo gene ADIPOQ. Este gene contém três éxons e dois íntrons abrangendo 17 kb. O gene ADIPOQ está localizado na região 3q27 do cromossomo. Esta região é um *locus* de suscetibilidade para o DM2, obesidade e síndrome metabólica (IMPERATORE *et al.*, 1998; VASSEUR *et al.*, 2002; LING *et al.*, 2009; EISSA, 2016). A figura 5 apresenta a estrutura do gene ADIPOQ.

FIGURA 5 - ESTRUTURA DO GENE ADIPOQ.



FONTE: Adaptado de QIAO *et al.*, 2005.

Uma meta-análise realizada na população branca, em asiáticos, índios asiáticos, afro-americanos e nativos americanos associa que o nível superior de adiponectina está associado a menor risco de DM2 (DAVIS *et al.*, 2015).

Estudos anteriores sugerem associações significativas entre polimorfismos do gene da adiponectina e o DM2 em Africanos (OLCKERS *et al.*, 2007), Afro-Americanos (UKKOLA *et al.*, 2005) e na população do norte da Índia (PRAKASH *et al.*, 2015); e a síndrome metabólica e obesidade (JUNG *et al.*, 2014; FOUCAN *et al.*, 2014).

Na China, especialmente na população obesa, foi observado que o rs266729 apresenta forte correlação com o DM2 (LI *et al.*, 2013). Por outro lado, um estudo realizado na população coreana-tailandesa mostrou que não há associação entre o rs266729 e o DM2 (HSIAO *et al.*, 2016).

4.7.1. Polimorfismo rs266729 (C> G)

O SNP rs266729 (C> G) no promotor proximal do gene ADIPOQ tem sido amplamente estudado. Essa variante alélica demonstrou estar relacionada ao DM2

quando acompanhada de obesidade e uma possível explicação é a associação a níveis mais baixos de adiponectina (WANG *et al.*, 2009).

Vários estudos mostraram que o polimorfismo rs266729 está associado a níveis diminuídos de adiponectina sérica no DMG, bem como no DM2 (BELTCHEVA *et al.*, 2014).

O SNP rs266729, a substituição da citosina por guanina na posição nucleotídica -11377 (11377 C> G) e está associado ao DM2 (HSIAO e LIN, 2016).

O alelo G do polimorfismo rs266729 (gene ADIPOQ) parece ser importante nas associações com o risco de DM2 em várias populações (PRIOR *et al.*, 2009).

Beltcheva e colaboradores mostraram uma associação significativa entre a variante rs266729 do gene da adiponectina e o DMG (BELTCHEVA *et al.*, 2014).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COMITÊ DE ÉTICA

O projeto teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 2.128.753 e CAAE: 68027317.7.0000.0102, e da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba para a utilização das amostras de gestantes com diabetes gestacional e de gestantes saudáveis.

5.2. AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram provenientes do Laboratório Municipal de Curitiba. Foram utilizadas 586 amostras de sangue periférico de gestantes, destas 401 amostras são de gestantes saudáveis (grupo controle) e 188 amostras são de pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional (grupo DMG). As amostras foram quantificadas no Laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná, Campus Jardim Botânico.

5.2.1. Caracterização das amostras

As amostras utilizadas para o estudo foram subdivididas em dois grupos designados como grupo com diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e grupo controle (CTRL). Ambos os grupos representam uma população majoritariamente Euro-Brasileira, que reside na região Sul do Brasil, o Estado do Paraná. Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos DMG e CTRL foram as recomendações da Organização Mundial da Saúde e da Sociedade Brasileira de Diabetes (2017), sendo:

- Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): Gestantes apresentando glicemia de jejum entre 92 e 125 mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 180 mg/dL após 1 hora da ingestão da glicose, e/ou glicemia superior a 152 mg/dL após 2 horas da ingestão da glicose.
- Grupo Controle para Diabetes Gestacional (CTRL): Gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 92 mg/dL.

5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos das amostras de sangue periférico pelo método *salting out*, descrito por Lahiri e Nurnberger (1991) com modificações (Anexo 1) e as amostras foram diluídas com água ultrapura estéril até atingirem uma concentração entre 20 e 40 ng/ μ L. A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280nm (A_{260}/A_{280}) através do equipamento Nanodrop/Thermo Scientific (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A pureza da amostra do DNA é estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,8 e 2,0 são considerados adequados e indicam pureza da amostra (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O critério de exclusão das amostras foi a concentração inferior a 20 ng/ μ L, o que caracteriza baixa qualidade.

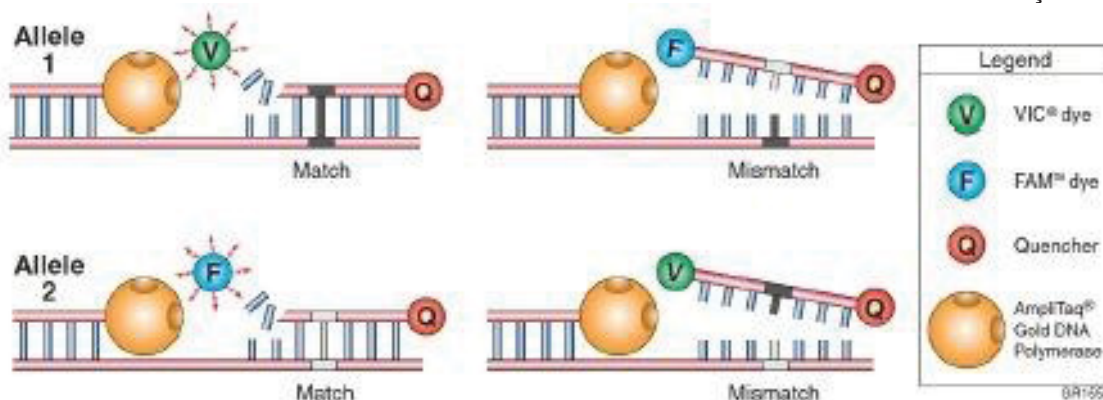
5.4. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS TAQMAN[®]

Através do método de PCR em tempo real utilizando sondas *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*, California, USA), foi utilizado o ensaio de discriminação alélica para

genotipagem dos polimorfismos rs2167270 do gene LEP e do SNP rs266729 na região promotora do gene ADIPOQ.

TaqMan[®] é uma sonda (fragmento de DNA marcado) usada para hibridizar outra molécula de DNA. As sondas fluorescentes (ou fluoróforos) são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, e que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. São necessárias para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. A sonda apresenta numa extremidade um fluoróforo, e na outra um *quencher* - molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor. Os produtos da PCR são detectados através da fluorescência gerada após a atividade da enzima *Taq DNA polimerase* (sentido 5'→ 3') (NOVAIS, 2004). A Figura 6 ilustra a hibridização específica das sondas e a emissão de fluorescência.

FIGURA 6 – ANELAMENTO ESPECÍFICO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE SONDAS MARCADAS COM FLUORÓFOROS VIC[®] E FAM[®] EM UM ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.



FONTE: APPLIEDBIOSYSTEMS, 2005.

Os ensaios de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes do tipo *TaqMan*[®] foram realizados em equipamento de PCR em tempo real 7500 FAST (*Applied Biosystems/Life Technologies*) do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico.

Para cada amostra foi realizado o ensaio *TaqMan*[®] conforme o protocolo apresentado no quadro 3. Na reação estavam presentes os reagentes *TaqMan Master Mix*, *SNP Genotyping Assay* (sonda de hidrólise), água ultrapura (Mili-Q) compondo o *Super Master Mix*. Esta mistura foi distribuída na placa de 96 poços e, posteriormente, cada amostra de DNA (20 ng/μL) foi adicionada ao *Super Master Mix*. Todos os ensaios foram realizados com dois controles negativos (apenas *Super Master Mix*) por

placa para monitoramento de contaminações. Três amostras que foram uma primeira vez discriminadas como sendo cada um dos possíveis genótipos (homozigoto usual, heterozigoto e homozigoto menos frequente- menor) foram consideradas controles positivos e repetidas em todos os ensaios do respectivo polimorfismo para maior confiabilidade. Em todos os ensaios os padrões já obtidos se repetiram e com isso, pôde ser observado consistência nos resultados de discriminação alélica.

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

QUADRO 3 – PROTOCOLO DEFINIDO PARA A TÉCNICA DE *TAQMAN*[®] PARA PCR EM TEMPO REAL.

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

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

Após o fim das reações, o programa *7500 Fast SDS System Software* plota os resultados da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida à amplificação (Figuras 7 e 8).

Após a realização dos ensaios moleculares, biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal foram quantificados para comparação.

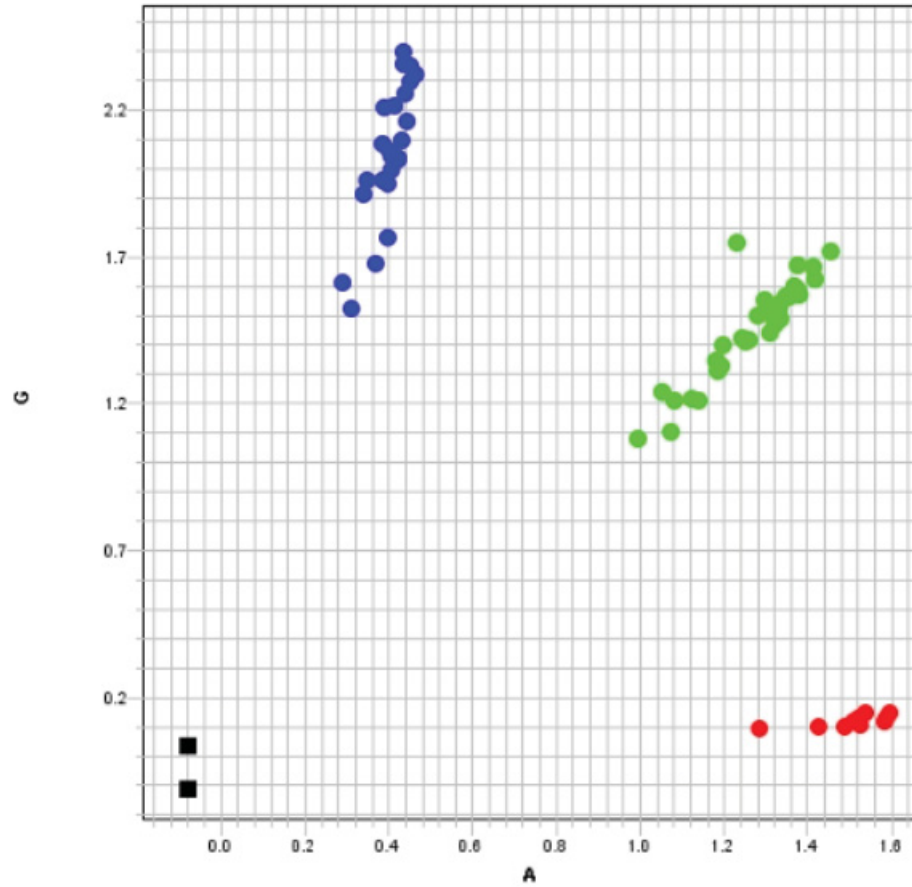
FIGURA 7 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs1267270 (G>A) DO GENE LEP EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

Experiment:132-
212DMG2167270-

Experiment Results Report

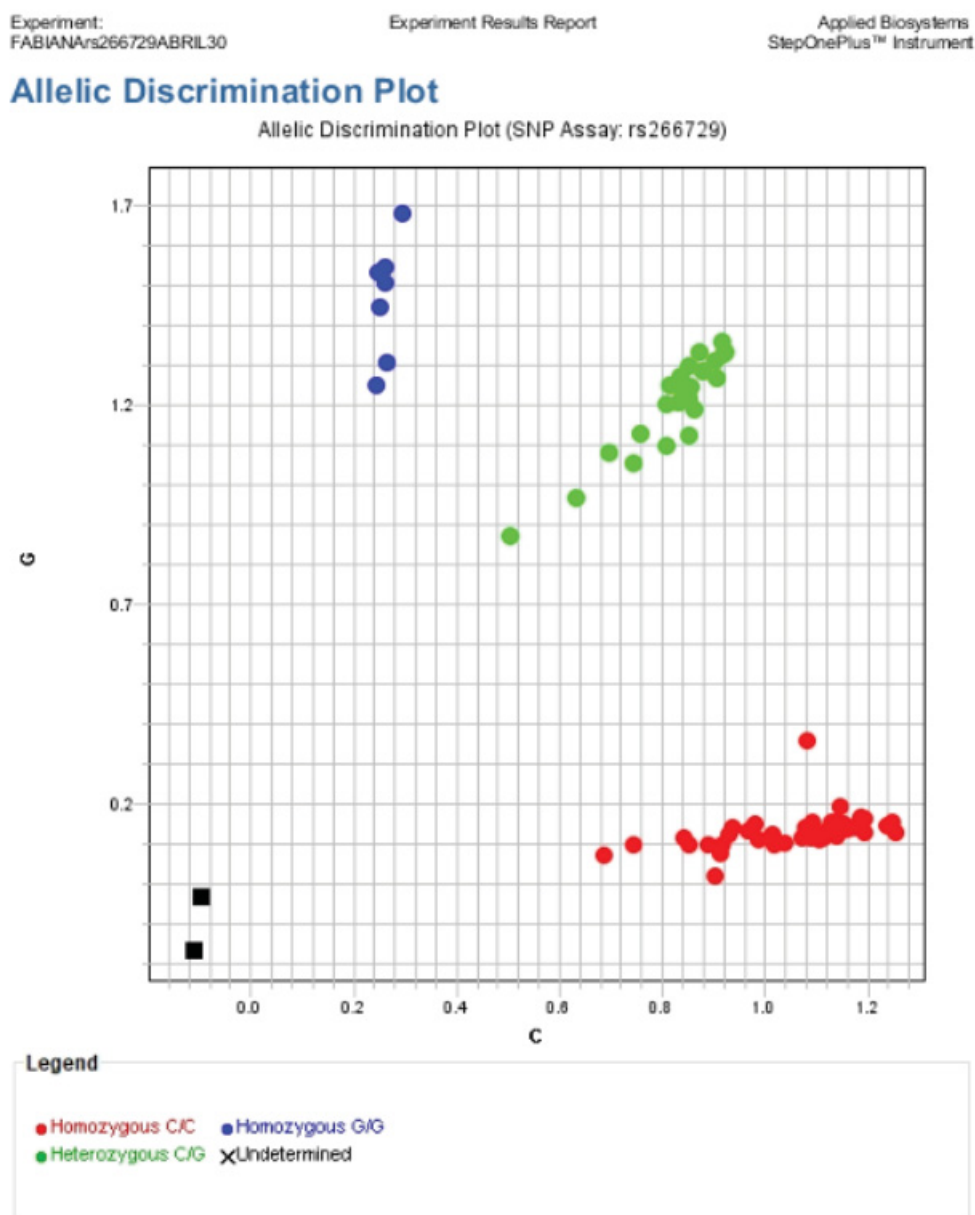
Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument**Allelic Discrimination Plot**

Allelic Discrimination Plot (SNP Assay: 2167270)

**Legend**

- Homozygous A/A
- Homozygous G/G
- Heterozygous A/G
- ✕ Undetermined

FIGURA 8 - GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs266729 (C>G) DO GENE ADIPOQ EM PCR EM TEMPO REAL, ENSAIO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.



5.5. QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

As amostras selecionadas foram quantificadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest®) do Laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná, Campus Jardim Botânico. As determinações da glicemia (glicose oxidase), creatinina (picrato alcalino) e albumina (verde de bromocresol) foram realizadas com reagentes da Labtest, empregando protocolos, controles e calibradores fornecidos pela mesma empresa (https://labtest.com.br/reagentes/linha_de_produto=&produto=calibradores-e-controles).

5.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram apresentadas como média \pm 1-desvio padrão comparadas pelo teste “t” de Student (bidirecional). Variáveis contínuas sem distribuição normal foram apresentadas como mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) e comparadas com o teste U de Mann-Whitney. Variáveis categóricas (como frequências genótípicas e alélicas) foram comparadas com o teste do Chi-quadrado. O intervalo de confiança de 95% (95% IC) e equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Os genótipos foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro). As comparações das frequências alélicas com outras populações foram realizadas com a frequência do alelo menor (MAF, *minor allele frequency*), grupo controle, considerando diferença quando fora do intervalo de confiança de 95% e similar quando dentro do intervalo para nossos achados.

O pacote estatístico Statistica para Windows versão 8.0 (StatSoft, Tulsa, CA) foi utilizado nas análises.

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

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da amostra

A Tabela 2 representa as características laboratoriais e antropométricas das amostras estudadas.

TABELA 2 - DADOS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle n=401	DMG n=188	P
Idade (anos)	26 (21-30)	31 (26-35)	<0,001*
Peso (kg)	70,8 (61-80)	80 (71-90)	<0,001*
Altura (m)	1,58 ± 0,02	1,60 ± 0,02	0,285
IMC (kg/m ²)	26,8(24-30)	30,5(26-35)	<0,001*
Semana gestação	26,1±3,1	25,4±3,7	0,024
Hipertensão arterial (%)	0,97	2,9	0,070**
Parto, Cesária (%)	38	53	0,004**
Aborto (%)	11,8	25,0	0,019**
Glicemia em jejum (mg/dL)	73 (70-78)	87 (79-95)	<0,001*
Glicose 1-h, 75g (mg/dL)	114 (92-134)	180 (158-198)	<0,001*
Glicose 2-h, 75g (mg/dL)	92 (77-110)	154 (126-167)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,7 (0,6-0,7)	0,6 (0,6-0,7)	0,287
Albumina (g/dL)	3,4 (3,2-3,6)	3,3 (3,1-3,5)	0,081

Controle, Grupo controle (sem diabetes); DMG, Grupo de gestantes com diabetes gestacional. Os valores são média ± DP (Desvio Padrão), mediana (intervalo interquartil) ou %. P, probabilidade, teste t-Student, *Mann-Whitney U test ou **Chi-quadrado. Em negrito probabilidade significativa (P<0,05).

- Idade:

Conforme apresentado na tabela 2, as gestantes com diabetes gestacional (DMG) são 3,7 anos mais velhas na mediana, quando comparadas ao grupo controle. Como se sabe, o aumento da idade é proporcional ao risco de desenvolvimento de DMG (COUSTAN *et al.*, 1989). Na amostra analisada a mediana para o grupo DMG foi de 31 anos, dado em conformidade com achados na literatura, onde há relatos de que a prevalência de diabetes *mellitus* gestacional aumenta com a idade, tornando-se mais frequente em mulheres a partir dos 30 anos de idade (MURGIA *et al.*, 2008).

- Peso e IMC:

Em relação ao peso, o grupo DMG apresenta cerca de 10 kg a mais que os controles, e como a altura não diferiu entre os grupos, o IMC reflete que estas gestantes apresentam, em média, sobrepeso (30,5 kg/m²). Considerando que o sobrepeso e a obesidade (IMC >30 kg/m²) são fatores que contribuem para o desenvolvimento do DMG e do diabetes tipo 2, esta diferença já era esperada (MURGIA *et al.*, 2008; TAKHSHID; ZARE, 2015).

- Semanas de gestação:

Para os grupos em estudo, os controles apresentam em média, cerca de 1 semana de gestação a mais (26,1 semanas) comparado com o DMG (25,4 semanas). Quanto ao aspecto clínico e hormonal, a diferença observada entre os grupos não apresenta relevância. Importante ressaltar que que ambos os grupos em estudo estão no período de 24-28 semanas de gestação, indicado para realização da curva

glicêmica e conseqüentemente do diagnóstico do DMG (SBD 2019-2020). Neste período gestacional, a elevação da concentração de hormônios que promovem resistência à ação da insulina, como o hormônio lactogênio placentário, se intensifica (BAEYENS *et al.*, 2016). Gestantes com DMG são mais facilmente identificadas neste período gestacional (KIM *et al.*, 2019).

- Hipertensão arterial:

Em relação a hipertensão arterial, nosso estudo não encontrou diferença estatística significativa entre os dois grupos (CTRL = 0,97% vs. DMG = 2,9%; P=0,070). Dados similares foram obtidos no estudo de Oppermann e colaboradores (2006) onde 4,3% das gestantes eram hipertensas. Tanto a hipertensão gestacional quanto o DMG parecem estar associados à resistência à insulina e uma resposta imune inata super expressa que, por sua vez, está associado à inflamação, disfunção vascular e estresse oxidativo. Há evidências de que a hipertensão gestacional em pacientes com DMG é resultado de disfunção vascular causada por desregulação inflamatória (SIBAI e ROSS, 2010).

Os distúrbios hipertensivos da gravidez complicam até 10% das gestações e representam uma causa significativa de morbimortalidade materna e perinatal (BRAUNTHAL e BRATEANU 2019). A hipertensão gestacional afeta o fluxo sanguíneo para órgãos como a placenta, rins, cérebro e fígado, e os efeitos sobre esses órgãos variam, dependendo da gravidade dos sintomas, aumentando as chances de parto cesáreo (SIBAI e ROSS 2010).

- Parto Cesária e Aborto:

O parto Cesária foi cerca de 1,4 vezes maior no grupo DMG (53% vs 38%, DMG e controles; P=0,004). O relato de aborto prévio foi cerca de 2 vezes maior no grupo DMG. A hiperglicemia promove aumento da insulina no feto, sendo este hormônio anabolizante (METZGER *et al.*, 2008). A presença de macrossomia (fetos grandes) é frequentemente associado às gestantes com DMG. Também o aumento de aborto espontâneo é bem documentado associado ao DMG. Ambos, macrossomia e aborto espontâneo são complicações frequentes associadas ao DMG em todas as populações estudadas (GUIAHI e DAVIS, 2012).

O DMG está associado a vários desfechos indesejáveis da gravidez, incluindo um risco aumentado de ruptura prematura de membranas, parto prematuro, macrossomia fetal e pré-eclâmpsia. O diabetes na gestação por si só não é uma indicação para cesariana, mas a via de parto em pacientes com essa condição é

baseada em uma decisão obstétrica, que normalmente culmina nesta decisão, devido à presença de certos fatores como desproporção cefalopélvica, colo uterino desfavorável à indução, macrosomia fetal e risco de morte intra-uterina (VIEIRA NETA *et al.*, 2014).

Além dos fatores mencionados, vários outros estão associados a uma maior incidência de partos cesáreos, incluindo: idade acima de 30 anos; ocorrência de cesariana prévia; primeira gestação; dilatação cervical de 3 cm ou menos; idade gestacional abaixo de 37 semanas ou acima 40 semanas; patologia materna prévia e sobrepeso ou obesidade materna (MARTINO *et al.*, 2016). Assim, nossos resultados estão de acordo com dados da literatura.

Identificamos que o maior número de partos cesáreos foi encontrado no grupo DMG (grupo controle = 38% vs grupo DMG = 53%), grupo este que também obteve a maior média no parâmetro idade (grupo controle = 26 vs grupo DMG = 31 anos) e ainda obteve a maior média de IMC (índice de massa corporal), Grupo controle = 26,8 kg/m² vs grupo DMG = 30,5 Kg/m². Deve ser ressaltado que a obesidade, isoladamente, é fator relevante associado ao aborto (FELISBINO-MENDES *et al.*, 2014).

Sabe-se que o tratamento para mulheres com DMG reduz a frequência dos fetos macrossômicos (LANDON *et al.*, 2009). O que pode ter contribuído para a taxa de cesarianas menos exacerbada no grupo de estudo.

A importância do bom controle glicêmico durante a gestação em diabéticas está bem determinada há várias décadas. Em relação ao efeito tóxico sobre o feto, foi demonstrado que a hiperglicemia nesse período está associada a uma mortalidade aumentada (MONTENEGRO JR *et al.*, 2001).

Quando a hiperglicemia está presente no início da gestação, durante a fase de organogênese, há um risco aumentado de malformações e abortos espontâneos. As repercussões do mau controle metabólico sobre a gestante são também extremamente negativas (KITZMILLER *et al.*, 1978; HEALY *et al.*, 1995). Em nosso estudo, o grupo DMG apresentou maior número de casos de aborto quando comparado ao grupo de gestantes saudáveis (grupo controle = 11,8% vs grupo DMG = 25%).

- Glicemia e curva glicêmica:

O diagnóstico do DMG está centrado nas alterações das concentrações de glicose no sangue, em jejum e após sobrecarga padronizada de glicose (dextrose) oral (teste oral de tolerância à glicose - TOTG) (ADA, 2019; ADA, 2020).

As determinações da curva glicêmica para gestantes, com as combinações da glicemia de jejum e, glicemias 1h- e 2 horas após a tomada oral de 75 g de glicose, permitiu diferenciar de forma inequívoca os grupos em estudo, utilizando o fluxograma da Tabela 1.

- Albumina:

As concentrações séricas da albumina não diferiram entre os grupos ($P=0,081$). As concentrações médias de albumina (3,4 e 3,3 g/dL) representam cerca de 1 g/dL menos quando comparado a uma mulher não-grávida (AGBECHA *et al.*, 2018). A redução observada na albumina é decorrente principalmente da hemodiluição fisiológica associada ao período gestacional em estudo (SOMA-PILLAY *et al.*, 2016). As concentrações observadas em nosso estudo são similares as descritas por Sufrin e colaboradores (2015) para gestantes.

Também relevante ressaltar que as concentrações observadas da albumina sérica, não parecem estar associadas à processos patológicos. (WEISS, 2014; FRIGERI, 2015).

- Creatinina:

Os grupos em estudo não diferiram quanto a concentração da creatinina sérica ($P=0,081$). A creatinina é um marcador de filtração glomerular e consequentemente da função renal. Wiles e colaboradores (2019) em estudo de meta-análise sugerem que concentrações superiores a 0,87 mg/dL de creatinina sérica devem ser consideradas fora da “normalidade” durante a gestação. As concentrações observadas no estudo (médias 0,6 – 0,7 mg/dL), indicam que as gestantes estudadas não apresentam lesão renal importante, identificada por este biomarcador.

Entre as complicação associadas ao diabetes, a nefropatia diabética é caracterizada pela presença de albuminúria, funcionalmente há hiperfiltração glomerular e aumento da excreção de albumina; e com o avanço da nefropatia, aumento da proteinúria (LIM, 2014). Não foram identificadas gestantes com este padrão na amostra em estudo, possivelmente, devido à ausência de tempo suficiente para viabilizar o desenvolvimento da patologia.

6.2 Análises Moleculares

As genotipagens realizadas através do sistema TaqMan, empregados, foram inequívocos e com elevada qualidade, verificada pelo programa do equipamento (qPCT 7500 fast; Applied Biosystems), como demonstrado nas Figuras 7 e 8.

As Tabelas 3 e 4 apresentam as frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg das variantes rs2167270 e rs266729 dos genes LEP e ADIPOQ, respectivamente.

TABELA 3 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2167290 DO GENE DA LEPTINA

Gene/Polimorfismo		Controle n=401	DMG N=188	P
<i>LEP</i> , rs2167270				0.532
	G/G	153 (38,2%)	65 (34,6%)	
	G/A	194 (48,4%)	92 (49,2%)	
	A/A	54 (13,4%)	31 (16,2%)	
FAM	A-alelo	37,7%	41,0%	0.278*
	[95%IC]	[34-41%]	[36-46%]	
Modelos				
Dominante	GG/GA+AA	153/248	65/123	0,401
Recessivo	AA/GG+GA	54/347	31/157	0,330

Controle, gestantes sem diabetes; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; FAM: frequência do alelo menor. Ambos os grupos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Controle, P= 0,543; DMG, P= 0,861). P: probabilidade, teste do Chi-quadrado para o genótipo e *frequências alélicas*. 95% IC- intervalo de confiança de 95%.

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs266729 DO GENE DA ADIPONECTINA

Gene/Polimorfismo		Controle n=401	DMG n=188	P
<i>ADIPOQ</i> , rs266729				0,399
	C/C	223 (55,5%)	114 (60,6%)	
	C/G	151 (37,7%)	60 (32,0%)	
	G/G	27 (6,8%)	14 (7,4%)	
FAM	G-alelo	25,7%	23,4%	0,434*
	[95%IC]	[23-29%]	[19-28%]	
Modelos				
Dominante	CC/CG+GG	223/178	114/74	0,250
Recessivo	GG/CC+CG	27/374	14/174	0,751

Controle, gestantes sem diabetes; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; FAM: frequência do alelo menor. Ambos os grupos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Controle, P= 0,834; DMG, P= 0,132). P, probabilidade, teste do Chi-quadrado para o genótipo e *frequências alélicas*. 95% IC- intervalo de confiança de 95%.

Tanto o SNP do gene LEP quanto o SNP do gene ADIPOQ apresentaram um valor de $P > 0,05$, o que mostra que não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos estudados.

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

A frequência do alelo menos comum (A) do polimorfismo rs2167270 do gene LEP (37% - grupo controle e 40% - grupo DMG) foi semelhante à população global (34%), população caucasiana em geral (35%) e semelhante à população africana, onde a frequência do alelo menos frequente (A) é cerca de 46%, porém diferente da população japonesa, onde a frequência do alelo menos comum é de 19% e na população chinesa é de 22%, de acordo com o HapMap (<http://www.hapmap.org/>).

A frequência do alelo menos comum (G) do polimorfismo rs266729 do gene ADIPOQ (25,7% - grupo controle e 23,4% - grupo DMG) foi semelhante à população global (23%), semelhante às populações caucasiana e japonesa, porém diferente da população africana (31, 29% e 9%, respectivamente), de acordo com o HapMap (<http://www.hapmap.org/>).

Em estudo realizado por Pawlik e colaboradores (2017) foi verificada a associação entre polimorfismos nos genes adiponectina e leptina e o desenvolvimento de DMG. Estudos anteriores indicaram que esse alelo está associado a níveis mais baixos de adiponectina no plasma e é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Além disso, a necessidade de insulina foi mais frequente e maior em mulheres com DMG portadoras do alelo LEP rs2167270 A, associado ao aumento do nível sérico de leptina.

Em nosso estudo, não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs2167270 do gene LEP e o DMG. Entre as mulheres estudadas, observou-se menor prevalência do alelo A, e um estudo feito por PAWLIK e colaboradores (2017) também encontrou prevalência menor do alelo A, além de também não ter encontrado associação do polimorfismo em mulheres com DMG.

Polimorfismos nos genes adiponectina e leptina são fatores associados a um risco aumentado de desenvolver diabetes *mellitus* após transplante renal (ROMANOWSKI *et al.*, 2015). No estudo de Vaskú e colaboradores (2006), o alelo A do polimorfismo rs2167270 foi o fator de risco para diabetes gestacional, diferentemente do observado em nosso estudo.

As adipocinas são os hormônios do tecido adiposo envolvidos na resistência à insulina na gestação e no DMG (PAWLIK *et al.*, 2017). A presença de adiponectina e seus receptores foi detectada na placenta humana (CAMINOS *et al.*, 2005; DESOYE *et al.*, 2007). Estudos anteriores indicaram níveis mais baixos de adiponectina plasmática em mulheres com DMG (DORUK *et al.*, 2014). Os níveis séricos de adiponectina na gestação são correlacionados com sensibilidade à insulina, níveis de insulina e metabolismo da glicose. Os estudos mostraram que a adiponectina tem propriedades de sensibilização à insulina e exerce efeito significativo sobre o metabolismo da glicose e lipídios em mulheres grávidas. Este hormônio reduz a produção de glicose hepática e aumenta a captação de glicose no músculo esquelético. Além disso, a adiponectina reduz a gliconeogênese, bem como diminui a síntese de triglicerídeos e a oxidação de ácidos graxos no fígado. Níveis plasmáticos de adiponectina foram positivamente correlacionados à concentração plasmática de HDL e inversamente correlacionadas com as concentrações de triglicerídeos (HARA *et al.*, 2005; CATALANO *et al.*, 2006). A partir dos dados relatados, a adiponectina parece melhorar o metabolismo da glicose e prevenir o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes.

Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs266729 do gene ADIPOQ e o DMG. Entre as mulheres estudadas, observou-se maior prevalência do alelo C (genótipos CC e CG), já no estudo realizado por Pawlik e colaboradores, 2017 observou-se maior prevalência do alelo G e associação deste polimorfismo com o DMG, o que sugere que o alelo G do polimorfismo rs266729 do gene ADIPOQ está associado a um risco aumentado de DMG nesta população. Os dados apresentados mostram ainda que a presença do alelo G está associada, independentemente de idade, IMC prévio à gestação e gestações anteriores, a um risco aumentado de DMG.

Os dados disponíveis na literatura para os polimorfismos analisados são contraditórios, o que pode ser explicado pelas características das populações estudadas. Não dispomos de dados para efeito de comparação para a população Brasileira. Novos estudos com maior tamanho amostral podem ser relevantes para confirmar os achados aqui relatados.

A Tabela 5 apresenta comparações entre as frequências alélicas dos polimorfismos em estudo com outras populações, estudadas no projeto 1000 genomas em sua fase 3.

TABELA 5 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM OUTRAS POPULAÇÕES, ESTUDADAS NO PROJETO 1000 GENOMAS EM SUA FASE 3

Populações	Designações	LEP, rs2167270	ADIPOQ, rs266729
		A-alelo	G-alelo
Brasileira (presente estudo)	Euro-Brasileira	37,7 (34-41)	25,7 (23-29)
Todas as populações	ALL	34	23
Africana	AFR	44	10
Americana	AMR	41	24
Leste Asiático	EAS	20	28
Europeia	EUR	37	28
Sul asiática	SAS	28	28

Em destaque (negrito) frequências alélicas que extrapolam o intervalo de confiança de 95% apresentado para o grupo controle da população Euro-Brasileira em estudo. Frequências obtidas no sítio Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), compiladas do projeto 1000 genomas em sua fase 3. LEP, rs2167270; https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:128240796-128241796;v=rs2167270;vdb=variation;vf=17177282 ADIPOQ, rs266729; https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=3:186841185-186842185;v=rs266729;vdb=variation;vf=60028

Para o gene LEP, a frequência do alelo de menor (MAF, A-alelo) do polimorfismo rs2167270, foi similar as populações Americanas e Europeias, sendo maior quando comparado as populações Asiáticas (Leste e Sul), e pouco menor quando comparada a população Africana.

Para o gene ADIPOQ, a frequência do alelo de menor (MAF, G-alelo) do polimorfismo rs266729, foi similar as populações Americanas, Europeias e Asiáticas (Leste e Sul), sendo expressivamente maior (~2 vezes) quando comparada a população Africana.

No geral, a população majoritariamente Euro-Brasileira estudada, como esperado foi similar a populações Europeias e Americanas.

6.3 Comparações entre genótipos e concentrações de biomarcadores

A análise de variância, comparação entre médias, foi utilizada como teste de triagem na busca de associação entre os parâmetros estudados e os genótipos dos polimorfismos em análise. Os genótipos foram codificados como 1 (homozigoto comum ou frequente), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro ou menos frequente). As variáveis

contínuas utilizadas na comparação foram submetidas a análise de variância (ANOVA, one-way). Os resultados estão na tabela 6.

TABELA 6 - COMPARAÇÕES COM ANOVA ENTRE PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS COM GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

	Probabilidade – ANOVA				
	LEP, rs2167270			ADIPOQ, rs266729	
Parametros	Controle	DMG		Controle	DMG
Peso	0,567	0,384		0,998	0,375
IMC	0,290	0,674		0,962	0,595
Glicemia jejum	0,096	0,327		0,587	0,805
Glicemia 2-h	0,335	0,984		0,752	0,651
Albumina	0,468	0,358		0,911	0,420
Creatinina	0,530	0,979		0,111	0,530

Os valores não probabilidade para o teste de ANOVA (*one-way*).

Como demonstrado na tabela 6 acima, não foram identificadas associações relevantes entre os parâmetros testados e os genótipos em estudo.

Como considerações finais, é importante ressaltar que o tamanho amostral utilizado no presente estudo, é suficiente para a prospecção de associação dos polimorfismos com o diabetes gestacional. Os resultados observados, necessitam de confirmação com maior tamanho amostral, em especial para os estudos de associação com biomarcadores.

7. Conclusões

- Os polimorfismos rs2167270 do gene LEP e rs266729 do gene ADIPOQ não foram associados ao diabetes *mellitus* gestacional na população em estudo.
- As frequências genotípicas e alélicas (A-alelo, ~38%) do polimorfismo rs2167270 do gene LEP e rs266729 (G-alelo, ~26%) do gene ADIPOQ das amostras deste estudo foram similares às outras populações caucasianas, descritas;
- A frequência do alelo menos frequente (MAF; A-alelo) do polimorfismo rs2167270 do gene LEP da população deste estudo (A) foi maior quando comparado as populações Asiáticas (Leste e Sul), e pouco menor quando comparada a população Africana.
- A frequência do alelo menos frequente (MAF; G-alelo) do polimorfismo rs266729 do gene ADIPOQ foi expressivamente maior (~2 vezes) quando comparada a população Africana.
- As frequências dos alelos menos frequentes (MAF) dos dois polimorfismos em estudo (rs2167270, gene LEP e rs266729, gene ADIPOQ) foram muito semelhantes à média da população global.
- Os genótipos dos polimorfismos rs2167270, gene LEP e rs266729, gene ADIPOQ, não apresentaram associação com parâmetros antropométricos ou biomarcadores laboratoriais testados.

REFERÊNCIAS

- ABI-ABIB *et al.* Diabetes na gestação. **Revista HUPE**. v. 13, n.3, p. 40-47. 2014b.
- ACOG Practice Bulletin nº. 190: Gestational Diabetes. **Obstet Gynecol**, v. 131, p. e49–e64, 2018.
- ADA. American Diabetes Association – Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes – 2020. **Diabetes Care**, v. 43, p. S183-S192, 2020.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes care**. v.43, p:S1-S2, 2020.
- AGBECHA, A.; GALI, R. M.; YISA, E. N. *et al.* Association of Metabolic Markers of Insulin Resistance with Blood Pressure in Prehypertensive Adults in Makurdi, Nigeria. **Cardiol Angiol: na Int J**. v.7, p: 1-11, 2018.
- ALHARBI, K. K. *et al.* Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) Gly927Arg: correlation with gestational diabetes mellitus in saudi women. **Biomed Res Int**. v. 2014, p. 146495. 2014.
- ANGUEIRA *et al.*, New Insights into Gestational Glucose Metabolism: Lessons Learned From 21st Century Approaches. **Diabetes**; 64(2): 327-334. 2015. <https://doi.org/10.2337/db14-0877>.
- ANAND, M.; ANAND, M.; MAHAJAN, D. S. To study the incidence of gestational diabetes *mellitus* and risk factors associated with GDM. **Int J Adv Med**, 4(1):112-116; 2017.
- ASHWORTH, C. J.; HOGGARD, N.; THOMAS, L., *et al.* Placental leptina. **Reviews of Reproduction**. V. 5, p.18-24, 2000.
- BAEYENS, N.; BANDYOPADHYAY, C.; COON, B. G.; YUN, S.; and SCHWARTZ, M. A. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. **J. Clin. Invest**. 126, 821–828. 2016. doi: 10.1172/JCI83083.
- BAHRAMI, A.; HASSANIAN, S. M.; KHAZAEI, M.; GHARIB, M.; RAHMANI, M.; FIUJI, H.; JAZAYERI, M. H.; MOETAMANI-AHMADI; M.; FERNS, G. A.; AVAN, A. The 9p21 locus as a potential therapeutic target and prognostic marker in colorectal cancer. **Pharmacogenomics**, 19(5):463-474; 2018.

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

BAYENS, L.; HINDI, S.; SORENSON, R. L.; GERMAN, M. S. **Diabetes Obes Metab.** v.18, p: 63–70, 2016.

BELTCHEVA, O.; BOYADZHIEVA, M.; ANGELOVA, O.; MITEV, V.; KANEVA, R. *et al.* The rs266729 single-nucleotide polymorphism in the adiponectin gene shows association with gestational diabetes. **Arch Gynecol Obstet** 289: 743-748, 2014.

BOUTARI, C.; MANTZOROS, C. S. Adiponectin and leptin in the diagnosis and therapy of NAFLD. *Metabol. Clin. Experim.*, v. 103, p: 154028, 2020.

BOUTIN, P.; FROGUEL, P. Genetics of human obesity. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, v. 15(3), p:391-404, 2001.

BOUZID, T.; HAMEL, F. G.; LIM, J. Y. Role of adipokines in controlling insulin signaling pathways in type-2 diabetes and obesity. Current and future perspectives. **Int J Diabetes Res** 5, 75–85, 2016.

BRAUNTHAL, S.; BRATEANU, A. Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment. **SAGE open medicine**, 7:2050312119843700; 2019.

CAMINOS, J. E.; NOGUEIRAS, R.; GALLEGO, R.; BRAVO, S.; TOVAR, S.; GARCÍA-CABALLERO T. *et al.* Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 90, p: 4276–86, 2005.

CARDOSO, A. L.; FERNANDES, A.; AGUILAR-PIMENTEL, J. A.; ANGELIS, M. H.; GUEDES, J. R.; BRITO, M. A.; ORTOLANO, S.; PANI, G.; ATHANASOPOULOU, S.; GONOS, E. S.; SCHOSSERER, M.; GRILLARI, J.; PETERSON, P.; TUNA, B. G.; DOGAN, S.; MEYER, A.; VAN O. S, R.; TRENDELENBURG, A. U. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 47, p: 214-277, 2018.

CATALANO, P. M.; HOEGH, M.; MINIUM, J.; HUSTON-PRESLEY, L.; BERNARD, S.; KALHAN, S. *et al.* Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, v. 49, p: 1677–85, 2006.

CHO, 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** 52:253–261. 2009.

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

DABELEA, D.; HANSON, R. L; LINDSAY, R. S. *et al.* Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. **Diabetes**, v. 49, p.2208– 2211, 2000.

DAVIS, S. K., GEBREAB, S. Y.; XU, R.; Riestra, P.; KHAN, R. J.; SUMNER, A. E.; HICKSON, D.; BIDULESCU, A. Association of adiponectin with type 2 diabetes and hypertension in African American men and women: the Jackson Heart Study. **BMC Cardiovasc Disord** 15, 13, 2015.

DESOYE, G.; HAUGUEL-DE, M. S. The human placenta in gestational diabetes *mellitus*. The insulin and cytokine network. **Diabetes Care**. 2007;30:120–6.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020: **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2019.

DIVELLA, R.; DANIELE, A.; MAZZOCCA, A. *et al.* ADIPOQ rs266729 G/C gene polymorphism and plasmatic adipocytokines connect metabolic syndrome to colorectal cancer. **J Cancer**. v.8, n.6, p: 1000-1008, 2017.

DORUK, M.; UĞUR, M.; ORUÇ, A. S.; DEMIREL, N.; YILDIZ, Y. Serum adiponectin in gestational diabetes and its relation to pregnancy outcome. **J Obstet Gynaecol.** 2014;34:471–5.

EGAN, A. M.; VELLINGA, A.; HARREITER, J.; SIMMONS, D.; DESOYE, G.; CORCOY, R.; ADELANTADO, J. M.; DEVLIEGER, R.; VAN ASSCHE, A.; GALJAARD, S. *et al.*: Epidemiology of gestational diabetes mellitus according to IADPSG/WHO 2013 criteria among obese pregnant women in Europe. **Diabetologia**, 60(10):1913-1921; 2017.

EISSA, A. Investigate the relation between Adiponectin gene variants and cardiovascular comorbidities and diabetes. **Int J Health Sci** (Qassim), v. 10, p: 183–189, 2016.

EVARISTO-NETO, A. D.; FOSS-FREITAS, M. C.; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in a rural community of Angola. **Diabetol Metab Syndr**. 2010 Nov 1;2:63.

FASSHAUER, M., PASCHKE, R.; STUMVOLL, M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. **Biochimie**. 2004;86(11):779-84.

FELISBINO-MENDES, M. S.; MATOZINHOS, F. P.; MIRANDA, J. J. *et al.* **BMC Pregnancy and Childbirth**. v. 14, p:5, 2014.

FISCHER, A. W., CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Leptin: Is It Thermogenic? **Endocrine Reviews**. v.41, n.2, p: 232-260, 2020.

FLORES-LE, R. *et al.*, Seven-year mortality in heart failure patients with undiagnosed diabetes: an observational study. **Cardiovasc Diabetol**, 10, 39. 2011.

FOUCAN, L.; MAIMAITIMING, S.; LARIFLA, L.; HEDREVILLE, S.; DELOUMEAUX, J.; JOANNES, M. O. *et al.* Adiponectin gene variants, adiponectin isoforms and cardiometabolic risk in type 2 diabetic patients. **J Diabetes Investig**. V.5;P.192–198. 2014.

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

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

GUIAHI, M.; DAVIS, A. First-trimester abortion in women with medical conditions. **Contraception**. v. 86, p: 622–630, 2012.

HARA, K.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Adiponectin: an adipokine linking adipocytes and type 2 diabetes in humans. **Curr Diab Rep**. v. 5, p:136–40, 2005.

HEALY, K.; JOVANOVIC-PETERSON, L.; PETERSON, C. M. Pancreatic disorders of pregnancy. **Pregestational diabetes. Endocrinol Metabol Clin North America**. v.24, n.1, p: 73-101, 1995.

HEBERT, M. F.; MA, X.; NARAHARISSETTI, S. B. *et al.* Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network. Are we optimizing gestational diabetes treatment with glyburide? The pharmacologic basis for better clinical practice. **Clin Pharmacol Ther**, v. 85, p. 607–614, 2009.

HIVERT, M. F.; MANNING, A. K.; MCATEER, J. B.; FLOREZ, J. C.; DUPUIS, J. *et al.* Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. **Diabetes**. v.57, p: 3353-3359, 2008.

HOFFSTEDT, J.; ERIKSSON, P.; MOTTAGUI-TABAR, S.; ARNER, P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. **Horm Metab Res**. v.34 p: 355–9, 2002.

HOLMES, V. A.; YOUNG, I. S.; PATTERSON, C. C. *et al.* Diabetes and Pre-eclampsia Intervention Trial Study Group. Optimal glycemic control, preeclampsia, and gestational hypertension in women with type 1 diabetes in the Diabetes and Pre-eclampsia Intervention Trial. **Diabetes Care**, v. 34, p.1683–1688, 2011.

HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; ARITA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUDA, M.; OKAMOTO, Y.; IWAHASHI, H.; KURIYAMA, H.; OUCHI, N.; MAEDA, K.; NISHIDA, M.; KIHARA, S.; SAKAI, N.; NAKAJIMA, T.; HASEGAWA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v.20, p: 1595–1599, 2000.

HSIAO, T. J.; LIN, E. A. Validation Study of Adiponectin rs266729 Gene Variant with Type 2 Diabetes, Obesity, and Metabolic Phenotypes in a Taiwanese Population. **Biochem Genet**. 2016.

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

IDF. International Diabetes Federation. **IDF Atlas**. 8. ed. Bruxelles: International Diabetes Federation; 2020.

IMPERATORE, G.; HANSON, R. L.; PETTITT, D. J.; KOBES, S.; BENNETT, P. H., *et al.* Sib- pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. **Pima Diabetes Genes Group. Diabetes** 47: 821–830. 1998.

International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. METZGER, B. E.; GABBE, S. G.; PERSSON, B.; BUCHANAN, T. A. *et al.* 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.

ISSE, N.; OGAWA, Y.; TAMURA, N.; MASUZAKI, H. *et al.* Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. **J Biol Chem**. Nov 17; 270(46):27728-33. 1995.

JANG, H. C.; MIN, H. K.; LEE, H. K.; CHO, N. H.; METZGER, B. E. Short stature in Korean women: a contribution to the multifactorial predisposition to gestational diabetes mellitus. **Diabetologia** 1998;41:778-83.

JANH *et al.*, Short stature in Korean women: a contribution to the multifactorial predisposition to gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**. v.41, p: 778-783, 1998.

JIANG, B.; LIU, Y.; LIU, Y.; FANG, F.; WANG, X.; LI, B. Association of four insulin resistance genes with type 2 diabetes mellitus and hypertension in the Chinese Han Population. **Mol, Biol. Rep.** v. 41, p: 925-933, 2014.

JUNG, C. H.; KIM, B. Y.; MOK, J. O.; KANG, S. K.; KIM, C. H. Association between serum adipocytokine levels and microangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**. v. 5; p. 333–339, 2014.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; OKADA-IWABU, M.; IWABU, M. Adiponectin and its receptors: implications for obesity-associated diseases and longevity. **Lancet Diabetes Endocrinol**. v.2, p: 8–9. 2014.

KARIMI, H.; NEZHADALI, M.; HEDAYATI, M. Association between adiponectin rs17300539 and rs266729 gene polymorphisms with serum adiponectin level in an Iranian diabetic/pre-diabetic population. **Endocrine Regulations**, v. 52, p: 176-184, 2018.

KASUGA, Y.; HATA, K.; TAJIMA, A.; OCHIAI, D.; SAISHO, Y.; MATSUMOTO, T.; ARATA, N.; MIYAKOSHI, K.; TANAKA, M. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study. **Endocrine Journal**, v. 64, n. 4, p: 463-475, 2017.

KHAN, M. M.; SONKAR, G. K.; ALAM, R. *et al.* Association of ADIPOQ Gene Variant rs266729 with Circulatory Adiponectin Levels in Patients with Type 2 Diabetes in North Indian Population: A Case-Control Study. **Biom Pharmacol J**. v.10, n.1, p: 407-417, 2017.

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

KIEFFER, T. J.; HABENER, J. F. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic b-cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.** v.278, p: E1-E14, 2000.

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

KIM, W., Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, PARK S.K. *et al.* Gestational diabetes *mellitus* diagnosed at 24 to 28 weeks of gestation in older and obese Women: Is it too late? **PLoS ONE.** v. 14, n. 12, p: e0225955, 2019.

KITZMILLER, J. L.; CLOHERTY, J. P.; YOUNGER, M. D.; TABATABAII, A.; ROTHCHILD, S. B.; SOSENKO, I.; EPSTEIN, M. F.; SINGH, S.; NEFF, R. K. Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. **American journal of obstetrics and gynecology.** v. 131, n. 5, p:560-580, 1978.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care,** v. 25, p.1862–1868, 2002.

KIM, J. S.; IHM, C. G.; LEE, T. W.; KIM, Y. G.; MOON, J. Y.; LEE, S. H. *et al.* Association of leptin receptor gene polymorphisms with post-transplant diabetes mellitus: short report and literature review. **Trends Transplant.,** v. 10, p: 1-6, 2017.

KOHAN, L.; NASIRI, M.; HABIB, A.; BOLHASANI, A. Association of G-2548A polymorphism in the promoter of leptin gene with plasma leptin level and risk of type 2 diabetes. **J. Shahid Sadoughi Univ. Med. Sci.,** v. 21, p: 70-77, 2013.

KRUDE, H.; BIEBERMANN, H.; SCHNABEL, D.; TANSEK, M. Z. *et al.* Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. **J. Clin. Endocrinol. Metab.;** 88:4633–4640. 2003.

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.

KWAK, S. H.; CHOI, S. H.; JUNG, H. S.; CHO, Y. M.; LIM, S. *et al.* Clinical and genetic risk factors for type 2 diabetes at early or late post partum after gestational diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 98, p: E744-752.a, 2013.

KWAK, S. H.; CHOI, S. H.; KIM, K.; JUNG, H. S.; CHO, Y. M. *et al.* Prediction of type 2 diabetes in women with a history of gestational diabetes using a genetic risk score. **Diabetologia** 56: 2556-2563.b, 2013.

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

LANDON, M. B.; SPONG, C. Y.; THOM, E.; CARPENTER, M. W.; RAMIN, S. M.; CASEY, B.; WAPNER, R. J.; VARNER, M. W.; ROUSE, D. J.; THORP, J. M. Jr. *et al.* A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. **The New England journal of medicine**. v.36, n. 14, p:1339-1348, 2009.

LANG, H. F., CHOU, C. Y.; SHEU, W. H.; LIN, J. Y. Weight loss increased serum diponectin but decreased lipid levels in obese subjects whose body mass index was lower than 30 kg/m². **Nutr Res**. v.31, n.5, p:378–386, 2011.

LAUENBORG *et al.*, Common Type 2 Diabetes Risk Gene Variants Associate with Gestational Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 94, n. 1, p:145–150, 2009.

LEKVA, T.; ROLAND, M. C. P.; MICHELSEN, A. E.; FRIIS, C. M.; AUKRUST, P.; BOLLERSLEV, J. *et al.* Large reduction in adiponectin during pregnancy is associated with large for- gestational-age newborns. **J Clin Endocrinol Metab**. v.102, p:2552–2559, 2017.

LI, Y. Y.; YANG, Z. J.; ZHOU, C. W.; WANG, X. M.; QIAN, Y.; XU, J.; WANG, B.; WU, J. Adiponectin-11377CG gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese population: A meta-analysis of 6425 subjects. **PLoS ONE**. v. 8, p: e61153, 2013.

LI, Y.; WU, Q. H.; JIAO, M. L. *et al.* Gene-environment interaction between adiponectin gene polymorphisms and environmental factors on the risk of diabetic retinopathy. **J Diabetes Invest**. v.6, n.1, p:56-66, 2015.

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

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

- LING, H.; WATERWORTH, D. M.; STIRNADEL, H. A.; POLLIN; T. I.; BARTER, P. J. *et al.* Genome-wide linkage and association analyses to identify genes influencing adiponectin levels: the GEMS Study. **Obesity (Silver Spring)**. v. 17, p: 737–744, 2009.
- MALEK, R.; DAVIS, S. N. Pharmacokinetics, efficacy and safety of glyburide for treatment of gestational diabetes mellitus. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 12, p. 691–699, 2016.
- MALTA, D. C. *et al.* Tendência da prevalência do diabetes melito autorreferido em adultos nas capitais brasileiras, 2006 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 23, n.4, p. 2014.
- MAMMÈS, O.; BETOULLE, D.; AUBERT, R.; HERBETH, B.; SIEST, G.; FUMERON, F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. **Ann Hum Genet**. v.64, p:391–394, 2000.
- MAO, H.; LI, Q.; GAO, S. Meta-Analysis of the Relationship between Common Type 2 Diabetes Risk Gene Variants with gestational diabetes *mellitus*. **Plos One**. v.7, n.9, p: e45882, 2012.
- MARTIN, A. O; SIMPSON, J. L; OBER, C.; FREINKEL, N. *et al.* Frequency of diabetes *mellitus* in mothers of probands with gestational diabetes: Possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**. v. 151, n. 4. 1985.
- MARTIN, S. S.; BLAHA, M. J.; MUSE, E. D.; QASIM; A. N.; REILLY, M. P.; BLUMENTHAL, R. S. *et al.* Leptin and incident cardiovascular disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) **Atherosclerosis**. v. 239, p:67–72, 2015.
- MARTINEZ-USEROS, J.; LI, W.; CABEZA-MORALES M., GARCIA-FONCILLAS J. Oxidative stress: a new target for pPancreatic cancer prognosis and treatment. **J Clin Med**. v. 6, n.3, pii:E29, 2017.
- MARTINO, J.; SEBERT, S.; SEGURA, M. T.; GARCIA-VALDES, L.; FLORIDO, J.; PADILLA, M. C.; MARCOS, A.; RUEDA, R.; MCARDLE, H. J.; BUDGE, H. *et al.* Maternal Body Weight and Gestational Diabetes Differentially Influence Placental and Pregnancy Outcomes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v. 101, n.1, p:59-68, 2016.
- METZGER, B. E. *et al.* Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on gestational diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S251-60. 2007.

METZGER, B. E.; LOWE, L. P.; DYER, A. R.; TRIMBLE, E. R.; CHAOVARINDR, U.; COUSTAN, D. R. *et al.* Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med.** v. 8, p: 358: 1991-2002, 2008.

MIEHLE, K.; STEPAN, H.; FASSHAUER, M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. **Clin Endocrinol.** v.76, p:2–11, 2012.

MITANCHEZ, D.; JACQUEMINET, S.; NIZARD, J.; TANGUY, M. L.; CIANGURA, C.; LACORTE, J. M. *et al.* Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: a prospective clinical trial. **PLoS One.** v.12, 2017.

MONTENEGRO JR, R. M.; PACCOLA, G.; FARIA, C. M.; SALES, A. P. M.; MONTENEGRO, A. P. D. R.; SALIM, M. J.; DUARTE, G.; FOSS, M. C. Evolução Materno-Fetal de Gestantes Diabéticas Seguidas no HC- FMRP-USP no Período de 1992-1999. **Arq Bras Endocrinol Meta.** v. 45, n.5, 2001.

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

NG, Z. *et al.*, Association of leptin/receptor and TNF- α gene variants with adolescent obesity in Malaysia. **Pediatrics Internationa**, 2014. doi: 10.1111/ped.12336

NOGUES, P.; DOS SANTOS, E.; JAMMES, H.; BERVEILLER, P.; ARNOULD, L.; VIALARD, F.; DIEUDONNÉ, M. N. Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta. **Clinical Epigenetics.** v. 11, p:20, 2019.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. Revista Biotecnologia **Ciência & Desenvolvimento.** v. n.33, p. 10 - 13. 2004.

OKPECHI, I. G.; RAYNER, B. L.; DER MERWE, L. V. *et al.* Genetic Variation at Selected SNPs in the Leptin Gene and Association of Alleles with Markers of Kidney Disease in a Xhosa Population of South Africa. **Plos One.** v.5, n.2, p: e9086, 2010.

OLCKERS, A.; TOWERS, G. W.; VAN DER MERWE, A.; SCHWARZ, P. E.; RHEEDER, P.; SCHUTTE, A. E. Protective effect against type 2 diabetes mellitus identified within the ACDC gene in a black South African diabetic cohort. **Metabolism.** v. 56, p: 587–592, 2007.

OPPERMANN, R. M. L.; DUNCAN, B. B.; RAMOS, J. G. L.; SERRUYA, S. J.; SCHMIDT, M. I. Distribution of uterine height during pregnancy in a Brazilian cohort – comparison with the reference curve of the Centro Latino-Americano de Perinatologia. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 28, n.9, 2006.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; WALSH, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Curr. Opin. Lipidol.** v.14, p: 561–566, 2003.

PAGAN *et al.*, A gene variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.** v. 180, p: 77–82, 2014.

PAGANO, C.; MARIN, O.; CALCAGNO, A.; SCHIAPPELLI, P.; PILON, C.; MILAN, G. *et al.* Increased serum resistin in adults with Prader-Willi syndrome is related to obesity and not to insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab.** v.90, p:4335–4340, 2005.

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

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

PAWLIK, A. *et al.* Adiponectin and leptin gene polymorphisms in women with gestational diabetes *mellitus*. **J Assist Reprod Genet.** v. 34, n. 4, p: 511–516, 2017.

PEILA, C.; GAZZOLO, D.; BERTINO, E. *et al.* Influence of Diabetes during Pregnancy on Human Milk Composition. **Nutrients.** v.12, p: 185, 2020.

PÉREZ-PÉREZ, A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; VILARINO-GARCÍA, T.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. **Int J Mol Sci.** v.21, p: 5887, 2020.

PÉREZ-PÉREZ, A.; VILARINO-GARCÍA, T.; GUADIX, P.; DUENAS, J. L.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Leptin and Nutrition in Gestational Diabetes. **Nutrients.** v. 12, p: 1970, 2020.

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

PRAKASH, J.; MITTAL, B.; AWASTHI, S.; SRIVASTAVA, N. Association of adiponectin gene polymorphism with adiponectin levels and risk for insulin resistance syndrome. **Int J Prev Med.** v. 6, p:31, 2015.

PRIOR, S. L.; GABLE, D. R.; COOPER, J. A.; BAIN, S. C.; HUREL, S. J.; HUMPHRIES, S. E. *et al.* Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. **Eur Heart J.** v.30, n.10, p:1263-9, 2009.

QIAO, L.; MACLEAN, P. S.; SCHAACK, J. B.; SHAO, J. C/EBP Regulates Human Adiponectin Gene Transcription Through an Intronic Enhancer. **Diabetes**, v. 54(6), p: 1744-54, 2005.

REICHELT, A. J.; WEINERT, L. S.; MASTELLA, L. S.; GNIELKA, V.; CAMPOS, M. A.; HIRAKATA, V. N.; OPPERMAN, M. L. R.; SILVEIRO, S. P.; SCHMIDT, M. I. Clinical characteristics of women with gestational diabetes - comparison of two cohorts enrolled 20 years apart in southern Brazil. Sao Paulo medical journal = **Revista paulista de medicina.** v. 135, n.4, p:376-382, 2017.

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

ROMANOWSKI, M.; DZIEDZIEJKO, V.; MACIEJEWSKA-KARLOWSKA, A. *et al.* Adiponectin and leptin gene polymorphisms in patients with post-transplant diabetes mellitus. **Pharmacogenomics.** v. 16, n.11, p:1243–1251, 2015.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes** da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2020. SEABRA, A.L.R.

SACKS, D. A.; HADDEN, D. R.; MARESH, M.; DEEROCHANAWONG, C.; DYER, A. R.; METZGER, B. E.; LOWE, L. P.; COUSTAN D. R.; HOD, M.; OATS, J .J. *et al.* Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. **Diabetes care.** v. 35, n.3, p:526-528, 2012.

SAHIN, D. S.; TUMER, C.; DEMIR, C.; CELIK, M. M.; CELIK, M.; UCAR, E. *et al.* Association with leptin gene C.-2548 G > A polymorphism, serum leptin levels, and body mass index in Turkish obese patients. **Cell Biochem Biophys.** v.65, p:243–247, 2013.

SÁINZ, N.; BARRENETXE, J.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTÍNEZ, J. A. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. **Metabolism**. v. 64, p:35–46, 2015.

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

SAÚDE OP-AD, SAÚDE MD, OBSTETRÍCIA FBDADGE, DIABETES SBD. **Rastreamento e diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional no Brasil**. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34278/9788579671180-por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>: OPAS, 2016.

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

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

SHAAT, N.; GROOP, I. A. variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, 2007.

SHAFAEIZADEH, S.; HARVEY, L.; ABRAHAMSE-BERKEVELD, M.; MUHARDI, L.; VAN DER BEEK, E. M. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated with Age-Specific Alterations in Markers of Adiposity in Offspring: A Narrative Review. **Int J Environ Res Public Health**. v.17, p: 3187, 2020.

SHENG, T.; YANG, K. Adiponectin and its association with insulin resistance and type 2 diabetes. **J Genet Genomics**. v. 35, p: 321–326, 2008.

SIBAI, B. M.; ROSS, M. G. Hypertension in gestational diabetes mellitus: pathophysiology and long-term consequences. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet**. v. 23, n.3, p:229-233, 2010.

SMETNEV, S.; KLIMUSHINA, M.; KUTSENKO, V. *et al.* Associations of SNPs of the ADIPOQ Gene with Serum Adiponectin Levels, Unstable Angina, and Coronary Artery Disease. **Biomolecules**. v.9, p: 537, 2019.

SOMA-PILLAY, P.; CATHERINE, N. P.; TOLPPANEN, H. *et al.* Physiological changes in pregnancy. **Cardiovasc J Afr**. v.27, p: 89–94, 2016.

SPIJKERMAN, A. M.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; ADRIAANSE, M. C.; KOSTENSE, P. J.; RUWAARD, D.; STEHOUWER, C. D.; BOUTER, L. M.; HEINE, R. J. Microvascular complications at time of diagnosis of type 2 diabetes are similar among diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: the hoorn screening study. **Diabetes Care**. 2003 Sep;26(9):2604-8. doi: 10.2337/diacare.26.9.2604. PMID: 12941726.

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

STUEBE *et al.*, Second Trimester Insulin Resistance, Early Pregnancy Body Mass Index and Gestational Weight Gain. **Matern Child Health J**. v. 14, p:254–260, 2010. doi 10.1007/s10995-009-0449-2.

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

SUFRIN, S.; NESSA, A.; ISLAM, M. T.; DAS, R. K.; RAHMAN, M. H. Study on Serum Albumin in Third Trimester of Pregnancy. **Mymensingh Medical Journal: MMJ**. v.24, n.3, p: 464-466, 2015.

TAKHSHID, M. A.; ZARE, Z. Resistin - 420 C/G polymorphism and serum resistin level in Iranian patients with gestational diabetes mellitus. **J Diabetes Metab Disord**. 2015 Apr 28;14:37. doi: 10.1186/s40200-015-0165-y. PMID: 25945322; PMCID: PMC4419403.

TENENBAUM-GAVISH, K.; SHARABI-NOV, A.; BINYAMIN, D. *et al.*, First trimester biomarkers for prediction of gestational diabetes *mellitus*. **Placenta**. v.101, p: 80-89, 2020.

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

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

TRUJILLO, J.; VIGO, A.; DUNCAN, B. B.; FALAVIGNA, M.; WENDLAND, E. M.; CAMPOS, M. A.; SCHMIDT, M. I. Impact of the International Association of Diabetes

and Pregnancy Study Groups criteria for gestational diabetes. **Diabetes research and clinical practice** v. 108, n. 2, p:288-295, 2015.

UKKOLA, O.; SANTANIEMI, M.; RANKINEN, T.; LEON, A. S.; SKINNER, J. S.; WILMORE, J. H.; RAO, D. C.; BERGMAN, R.; KESANIEMI, Y. A.; BOUCHARD, C. Adiponectin polymorphisms, adiposity and insulin metabolism: HERITAGE family study and Oulu diabetic study. **Ann Med.** v. 37, p: 141–150, 2005.

VASKÚ, J. A.; VASKÚ, A.; DOSTÁLOVÁ, Z.; BIENERT P. Association of leptin genetic polymorphism -2548 G/A with gestational diabetes mellitus. **Genes Nutr.** v.1, p:117–23, 2006.

VASSEUR, F.; HELBECQUE, N.; DINA, C.; LOBBENS, S.; DELANNOY, V.; GAGET, S.; BOUTIN, P.; VAXILLAIRE, M.; LEPRETRE, F.; DUPONT, S.; HARA, K.; CLEMENT, K.; BIHAIN, B.; KADOWAKI, T.; FROGUEL, P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. **Hum Mol Genet.** v. 11, p: 2607–2614, 2002.

VIEIRA NETA, F. A.; CRISÓSTOMO, V. L.; CASTRO, R. C. M. B.; PESSOA, S. M. F.; ARAGÃO, M. M. S.; CALOU, C. G. P. Avaliação do perfil e dos cuidados no pré-natal de mulheres com diabetes mellitus gestacional. **Rev Rene.** v. 15, n. 5, p:823–831, 2014.

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

WANG, X.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; LIU, H.; LAN, C.; CHEN, X. *et al.* APM1 gene variants -11377C/G and 4545G/C are associated respectively with obesity and with non-obesity in Chinese type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 84, n. 3, p:205-10, 2009.

WAUTERS, M. *et al.* Leptin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Insulin in Obese Women with Impaired Glucose Tolerance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** Vol. 86, No. 7. 2001.

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

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.

WILES, K.; BRAMHAM, K.; SEED, P. T. *et al.* Serum Creatinine in Pregnancy: A Systematic Review. **Kidney Int Rep**. v.4, n. 3, p: 408-419, 2019.

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

WHO. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. **Diabetes research and clinical practice**. v.103, n.3, p:341-63, 2014.

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, S.; JIANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Y.; TANG, W.; LIU, C.; LIU, L.; CHEN, Y. Investigation of LEP and LEPR polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: a case–control study in Eastern Chinese Han population. **OncoTargets and Therapy**. v. 11. p: 2083-2089, 2018.

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

ANEXO 01 – EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (MÉTODO *SALTING OUT*)
MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE LAHIRI E NURBERGER, 1991

Reagentes:	Equipamentos:
- TKM1 (Tris HCl 1M pH=7,6 , KCl 1M, MgCl ₂ 1M, EDTA 0,1M) -TKM1 + TRITON -ÁGUA ULTRA PURA (MILI-Q) -NaCl 6M -SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) -Etanol absoluto	-Banho-seco -vórtex -Centrífuga mini-spin -microondas (para solubilizar o SDS) -pipetas (20 µl, 100 - 200 µl, 1000 µl) e ponteiros equivalentes -tubos <i>ependorf</i> (1500 µl/ 1,5 mL)

ETAPAS	AÇÕES
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA; Centrifugar o tubo de sangue por 10 minutos a 4.000 rpm; Remover o plasma; Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>).
2	Em tubo <i>ependorf</i> , adicionar 500 µL do <i>buffy coat</i> ; Colocar 900 µL de TKM1 Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm; Desprezar quase todo o sobrenadante. Repetir este passo.
3	No mesmo tubo <i>ependorf</i> , colocar 900 µL de TKM1 + Triton Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm; Desprezar quase todo o sobrenadante. Repetir este passo.
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura; Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm; Desprezar todo o sobrenadante.
5	Adicionar ao sedimento: 20 µL de SDS 20%; 120 µL de água ultra pura; Homogeneizar em vórtex; Colocar em banho-maria a 65°C por 1 a 2 horas; Homogeneizar os tubos em vórtex sempre que achar necessário para solubilização dos <i>pellets</i> .
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente; Adicionar 100 µL de Cloreto de Sódio 6M; Homogeneizar; Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm.
7	TRANSFERIR o sobrenadante para um novo tubo <i>ependorf</i> ; Adicionar 700 µL de etanol absoluto; Homogeneizar por inversão; Centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm; Desprezar o sobrenadante.
8	Adicionar 700 µL de etanol 70%; Homogeneizar em vórtex; Centrifugar por 2 minutos a 13.00 rpm;

	Desprezar o sobrenadante; Deixar os tubos secarem em temperatura ambiente, estufa a 37 °C (aprox. 24h), ou em bloco de aquecimento a 65°C (aprox. 4h).
9	Depois de seco, reconstituir com 100 µL de água ultrapura; Homogeneizar em vórtex; Deixar por 1 hora a 65°C.