

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS

**Estudo de variações dos genes do receptor para produtos
de glicação avançada (*RAGE*), preprorelina e
glucoquinase no diabetes gestacional**

**CURITIBA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS

**Estudo de variações dos genes do receptor para produtos
de glicação avançada (*RAGE*), preprogrelina e
glucoquinase no diabetes gestacional**

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

Orientador:
Prof. Dr. Geraldo Picheth
Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Cyntia Maria Teles Fadel-Picheth

**CURITIBA
2010**

Dedicado a

Eli Izabel

Alceu

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual sou nada. Ele é a minha força, é quem me dá sabedoria, é graças a Ele que cheguei até aqui.

Ao meu orientador Professor Dr. Geraldo Picheth, que com o convívio diário, se tornou uma pessoa muito importante na minha caminhada. Sou muito grata pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelos almoços, pelas pizzas, pelos momentos de descontração e finalmente, por toda a orientação neste trabalho. Agradeço pela confiança depositada em mim e pela presença sempre constante, o que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha co-orientadora Professora Dra. Cyntia Maria Teles Fadel-Picheth que me abriu as portas e que com a sua doçura, sempre esteve pronta a ajudar, a incentivar e a encontrar soluções.

Acredito que os orientadores são peças fundamentais para o bom desenvolvimento de um trabalho, e agradeço a Deus por ter colocado na minha vida pessoas tão queridas e especiais, por quem tenho enorme gratidão e a quem considero como “pais científicos”.

Ao Professor Dr. Emanuel Maltempo de Souza por toda ajuda e disponibilidade nas correções dos trabalhos.

À Dra. Rosângela R. Réa e Dra. Ana Ravazzani de Almeida que propiciaram a obtenção das amostras e estiveram sempre dispostas a colaborar.

À Dra. Tomoko Sasazawa Ito e a Cristiane Maria Chemin que da mesma forma me auxiliaram na obtenção das amostras.

Às Farmacêuticas-Bioquímicas Mônica Evelize Silveira, Katia Boritza e toda sua equipe, a quem agradeço pelo auxílio na obtenção das amostras e em especial, à Sandra Fabricio de Melo, que colaborou muito nas dosagens das amostras de forma voluntária e prestativa, com um capricho enorme.

Agradeço também à Roseli e ao Valter do centro politécnico, que ajudaram com materiais, reagentes e no sequenciamento de DNA, sempre com muita boa vontade.

Agradeço ao Fábio Brasil, pela disposição em colaborar na obtenção dos dados das pacientes.

Aos meus colegas de mestrado, Debora Regina Daga, Bruno Vizzotto, Simone Déo, Letícia Rocha, Stella Siu Ló, Ana Paula Tíbola, João Gasparetto, Mário Piantavini, agradeço pela amizade, pela força nos momentos difíceis, pelo incentivo, pelos momentos de descontração.

Agradeço ao Henrique R. Frigeri, que mesmo chegando depois, foi como um irmão, obrigada pelas conversas, pelo bom humor e pela companhia, ainda mais nos momentos finais.

Não posso deixar de agradecer também aos meus demais amigos, que têm lugar especial no meu coração e que sempre estiveram de alguma forma me dando apoio e incentivo.

Agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida, que contribuíram com o meu crescimento e que fizeram a diferença.

A minha família que sempre esteve me dando apoio em todo e qualquer momento, que sempre esteve orando por mim, a quem tenho grande amor.

E às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Alceu e Eli Izabel. Graças a vocês sou o que sou hoje. Vocês são meu porto-seguro, meu alicerce, meu chão. Agradeço por me compreenderem em todos os momentos, por me apoiarem nas decisões tomadas, por me incentivarem a sempre buscar o melhor e pelo amor sem limites. Não tenho como agradecer a tudo o que fazem por mim...

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas
se quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O *Diabetes mellitus* compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina, ou em ambos. O *Diabetes mellitus* gestacional (diabetes gestacional, DMG) é definido como a intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. A patologia promove severas complicações à gestante e ao feto. A frequência do DMG na população brasileira é de aproximadamente 7% das gestações. O objetivo do trabalho foi associar a variabilidade genética de sítios polimórficos -429T>C (rs1800625), -374T>A (rs1800624) e 63Del (-407 a -345bp) da região promotora e G82S (rs2070600) do exon 3 do gene do receptor para produtos de glicação avançada (*RAGE*), R51Q (rs34911341) e L72M (rs696217) do gene da preprogrelina e -30G>A (rs1799884) do promotor pancreático do gene da glucoquinase com o diabetes gestacional. As concentrações séricas de parâmetros bioquímicos também foram estudadas. A amostra foi composta por 750 gestantes, classificadas em saudáveis (grupo controle, n=600) e portadoras de diabetes gestacional (grupo DMG, n=150) pelo critério da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HC-UFPR (CEP/SD: 565.102.08.06 e CAAE: 0135.0.208.091-08). As gestantes do grupo DMG apresentaram média de idade superior em relação às controles (31,8±6,1 vs 24,8±6,2 anos), foram predominantemente de origem euro-brasileira (95%) e apresentaram IMC superior ao grupo controle (33,2±6,1 vs 24,8±4,5 kg/m²). A glicemia em jejum foi significativamente diferente entre os grupos DMG e controle (99,2±16,7 vs 82,0±6,8 mg/dL) e a concentração média de HbA1C no grupo DMG (5,7%) sugere um grupo com bom controle glicêmico. Quando os grupos foram pareados por idade, apenas a determinação dos triglicérides foi significativamente maior no grupo DMG em relação aos controles (231,6±74,8 vs 186,4±73,3 mg/dL), entre os componentes do perfil lipídico (colesterol total, HDL-C e LDL-C). Os polimorfismos estudados se encontraram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del da região promotora e G82S do exon 3 do gene *RAGE* não estão associados ao diabetes gestacional. O polimorfismo R51Q do exon 2 do gene da preprogrelina está associado ao diabetes gestacional, e portadoras do alelo 51Q apresentam um risco 5 vezes menor (odds ratio 5,65 e 95%IC:2,1 a 15,5) para desenvolver DMG. O polimorfismo L72M do exon 2 do gene da preprogrelina e o polimorfismo -30G>A da região promotora do promotor pancreático da glucoquinase também não estão associados ao diabetes gestacional. O alelo -30A do gene da glucoquinase esta associado a um aumento discreto, mas significativo da glicemia em jejum em gestantes saudáveis.

Palavras chave: diabetes gestacional, *RAGE*, *AGER*, preprogrelina, *GHRL*, glucoquinase, *GCK*, PCR-RFLP, perfil lipídico, variações genéticas, SNP.

ABSTRACT

Diabetes mellitus comprises a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The gestational *diabetes mellitus* (gestational diabetes, GDM) is defined as glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy. This pathology promotes severe complications to mother and fetus. The frequency of GDM in the Brazilian population is approximately 7% of pregnancies. The aim of this study, was to associate the genetic variability of polymorphic sites -429T>C (rs1800625), -374T>A (rs1800624) and 63Del (-407 a -345bp) of the promoter region and G82S (rs2070600) of exon 3 of the receptor for advanced glycation end products (*RAGE*), R51Q (rs34911341) and L72M (rs696217) of the preproghrelin gene and -30G>A (rs1799884) of the promoter of pancreatic glucokinase gene in gestational diabetes. Serum levels of biochemical parameters were also studied. The sample consisted of 750 pregnant women classified as healthy (control group, n = 600) and patients with gestational diabetes (GDM group, n = 150) according to the Brazilian Diabetes Society criteria, 2009. The project was approved by the Ethics Committee in Human Research of the HC-UFPR (CEP / SD: 565.102.08.06 and CAAE: 0135.0.208.091-08). Women in the GDM group had a higher mean age than controls (31.8±6.1 vs 24.8±6.2 years), were predominantly Euro-Brazilian (95%) and had BMI higher than the control group (33.2±6.1 vs 24.8± 4.5 kg/m²). The serum levels of glucose were significantly different between GDM and control groups (99.2±16.7 vs. 82.0±6.8 mg/dL) and the mean concentration of HbA1C in GDM group (5.7%) suggests a group with good glycemic control. When the groups were matched for age, triglycerides levels were the only parameter significantly higher in GDM compared to controls (231.6±74.8 vs 186.4±73.3 mg/dL). The other components of the lipid profile (total cholesterol, HDL-C and LDL-C) did not show differences among the groups. The studied polymorphisms were in the Hardy-Weinberg equilibrium. The polymorphisms -429T>C, -374T>A, 63Del of the promoter region and G82S of the exon 3 of the *RAGE* gene were not associated with gestational diabetes. The R51Q polymorphism of exon 2 preproghrelin gene was associated with gestational diabetes. Pregnant women carriers of 51Q allele have a 5-fold lower risk (odds ratio 5.65, 95% CI: 2.1 to 15.5) to develop GDM. The L72M polymorphism of exon 2 of the preproghrelin gene and the -30G>A polymorphism of the promoter region of the pancreatic promoter of glucokinase also were not associated with gestational diabetes. The -30A allele of the glucokinase gene was associated with a significant increase in fasting plasma glucose levels in healthy pregnant women.

Key words: gestational diabetes, *RAGE*, *AGER*, preproghrelin, *GHRL*, glucokinase, *GCK*, PCR-RFLP, lipid profile, genetic variations, SNP.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fluxograma para o diagnóstico do diabetes gestacional, segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.	30
FIGURA 2	Estrutura da proteína <i>RAGE</i> .	34
FIGURA 3	Mapa do gene <i>RAGE</i> e principais variantes genéticas.	35
FIGURA 4	Sequência de resíduos de aminoácidos da grelina com destaque para o sítio de acetilação no resíduo de serina.	37
FIGURA 5	Localização das regiões codificantes da grelina e da obestatina no gene da preprogrelina humana.	38
FIGURA 6	Estrutura e polimorfismos do gene da glucoquinase.	40
FIGURA 7	Hipóteses para associar os genes em estudo com o diabetes gestacional.	43
FIGURA 8	Fluxograma para caracterização dos grupos em estudo.	45
FIGURA 9	Eletroforese de produto de PCR do promotor do gene <i>RAGE</i> .	51
FIGURA 10	Clivagem do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene <i>RAGE</i> com a enzima de restrição <i>Tsp509I</i> .	53
FIGURA 11	Clivagem do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene <i>RAGE</i> com a enzima de restrição <i>AluI</i> .	54
FIGURA 12	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (344pb) do promotor do gene <i>RAGE</i> com a enzima <i>Tsp509I</i> .	55
FIGURA 13	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (344pb) do promotor do gene <i>RAGE</i> com a enzima <i>AluI</i> .	56
FIGURA 14	Perfil eletroforético dos produtos de PCR e de PCR-RFLP (344pb) do promotor do gene <i>RAGE</i> com destaque para a deleção de 63pb.	57
FIGURA 15	Eletroforese de produto de PCR do exon 3 do gene <i>RAGE</i> .	58
FIGURA 16	Clivagem do produto de PCR do exon 3 (397pb) do gene <i>RAGE</i> com a enzima de restrição <i>AluI</i> .	60
FIGURA 17	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (397pb) do exon 3 do gene <i>RAGE</i> com a enzima <i>AluI</i> .	61
FIGURA 18	Eletroforese de produto de PCR do gene da preprogrelina.	63
FIGURA 19	Clivagem do produto de PCR do polimorfismo L72M (618pb)	64

	do gene da preprorelina com a enzima de restrição <i>BseNI</i> .	
FIGURA 20	Clivagem do produto de PCR do polimorfismo R51Q (618pb) do gene da preprorelina com a enzima de restrição <i>SacI</i> .	65
FIGURA 21	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (618pb) do gene da preprorelina com a enzima <i>SacI</i> .	66
FIGURA 22	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (618pb) do gene da preprorelina com a enzima <i>BseNI</i> .	67
FIGURA 23	Eletroforese de produto de PCR do promotor do gene da Glucoquinase.	69
FIGURA 24	Clivagem do produto de PCR do polimorfismo -30G>A (251pb) do promotor do gene da glucoquinase com a enzima de restrição <i>MwoI</i> .	71
FIGURA 25	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (251pb) do promotor do gene da glucoquinase com a enzima <i>MwoI</i> .	72
FIGURA 26	Variação do perfil lipídico durante a gestação.	79
FIGURA 27	Alinhamento e cromatogramas típicos observados para as variações GG, GA e AA do promotor pancreático do gene da glucoquinase.	84
FIGURA 28	Relação entre a glicemia de jejum e os genótipos do polimorfismo -30G>A da região do promotor pancreático do gene da glucoquinase.	87
FIGURA 29	Hipótese sobre o efeito protetor do alelo 51Q do gene da grelina sobre o diabetes gestacional.	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PREVALÊNCIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.	26
TABELA 2	CATEGORIAS DE RISCO PARA O <i>DIABETES</i> GESTACIONAL.	27
TABELA 3	FATORES DE RISCO PARA O <i>DIABETES</i> GESTACIONAL.	28
TABELA 4	CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES</i> GESTACIONAL ATRAVÉS DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE COM 75g DE GLICOSE ANIDRA VIA ORAL.	29
TABELA 5	PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.	47
TABELA 6	GENES E VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESTUDO.	48
TABELA 7	PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE PCR-RFLP.	50
TABELA 8	CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> .	51
TABELA 9	PROTOCOLOS PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> POR PCR-RFLP.	52
TABELA 10	CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO EXON 3 DO GENE <i>RAGE</i> .	58
TABELA 11	PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO G82S DO EXON 3 DO GENE <i>RAGE</i> POR PCR-RFLP.	59
TABELA 12	CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE DA PREPROGRELINA.	62
TABELA 13	PROTOCOLO PARA A DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA PREPROGRELINA POR PCR-RFLP.	64

TABELA 14	CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO PROMOTOR DO GENE DA GLUCOQUINASE.	68
TABELA 15	PROTOCOLO PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE POR PCR-RFLP.	70
TABELA 16	PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.	73
TABELA 17	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO.	76
TABELA 18	COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.	77
TABELA 19	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO E INDICADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR PARA OS GRUPOS EM ESTUDO PAREADOS POR IDADE.	78
TABELA 20	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -429T>C, -374T>A E 63DeI DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.	80
TABELA 21	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO G82S DO EXON 3 DO GENE <i>RAGE</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.	81
TABELA 22	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS L72M E R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA, NA AMOSTRA EM ESTUDO.	82
TABELA 23	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -30G>A DA REGIÃO DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE, NA AMOSTRA EM ESTUDO.	83
TABELA 24	VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA (P<0,05) PARA O POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA.	85

TABELA 25	COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DO PERFIL LIPÍDICO E GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA NO GRUPO CONTROLE.	86
TABELA 26	CONCENTRAÇÕES DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE GLICÊMICO EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE.	86
TABELA 27	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -429T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> COM DADOS DA LITERATURA.	99
TABELA 28	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> COM DADOS DA LITERATURA.	101
TABELA 29	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA DELEÇÃO DE 63 pb DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>RAGE</i> COM DADOS DA LITERATURA.	102
TABELA 30	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA COM DADOS DA LITERATURA.	105
TABELA 31	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO L72M DO GENE DA PREPROGRELINA COM DADOS DA LITERATURA.	110
TABELA 32	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE COM DADOS DA LITERATURA.	112

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.	135
ANEXO 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).	136
ANEXO 3	Planilha para coleta de dados das pacientes diabéticas do Hospital de Clínicas da UFPR.	138
ANEXO 4	Método de extração de DNA genômico <i>salting out</i> com modificações.	139

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	Associação Canadense de Diabetes
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGEs	Produtos de glicação avançada, <i>advanced glycation end products</i>
Água ultra-pura	Água obtida em sistema de ultra purificação Milli-Q (Millipore) ou similar apresentando resistividade >18MΩ-cm
AV	Amplitude de variação
DP	Desvio padrão
HbA1C	Hemoglobina glicada fração A1C
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young-</i> Diabetes da maturidade de início precoce
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição; <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RAGE	Receptor para produtos de glicação avançada (AGEs); <i>receptor for advanced glycation end-products</i>
RS	Reference SNP, identificação dos polimorfismos de único nucleotídeo
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo, <i>single nucleotide polymorphism</i>
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES	21
3.2 SINTOMAS DO DIABETES	22
3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES	23
3.4 DIABETES GESTACIONAL	25
3.4.1 Diagnóstico do diabetes gestacional	29
3.4.2 Tratamento do diabetes gestacional	31
3.5 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES	33
3.5.1 O gene <i>RAGE</i> (receptor for advanced glycation end products)	33
3.5.2 O gene da preprorelina	36
3.5.3 O gene da glucoquinase	40
3.6 HIPÓTESES A SEREM PESQUISADAS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 AMOSTRA	44
4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra	44
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	46
4.2.1 Amostra para as análises bioquímicas	46
4.2.2 Amostra para análise do perfil lipídico	46
4.2.3 Quantificação dos parâmetros bioquímicos	47
4.3 ANÁLISES MOLECULARES	47
4.3.1 Variabilidade genética em estudo	47
4.3.2 Extração do DNA genômico	48
4.3.3 Quantificação do DNA genômico	48
4.3.4 Métodos moleculares	49
4.3.5 Variabilidade do gene <i>RAGE</i>	50
4.3.5.1 Reação de PCR para a região promotora do gene <i>RAGE</i>	50
4.3.5.2 Reação de PCR-RFLP para os polimorfismos -374T>A, -429T>C e 63Del do promotor do gene <i>RAGE</i>	52
4.3.5.3 Reação de PCR para o exon 3 do gene <i>RAGE</i>	57
4.3.5.4 Reação de PCR-RFLP para exon 3 do gene <i>RAGE</i>	59
4.3.6 Variabilidade do gene da preprorelina	62
4.3.6.1 Reação de PCR para a região do gene da preprorelina	62
4.3.6.2 Detecção molecular dos polimorfismos 346G>A (R51Q) e 408C>A (L72M) do gene da preprorelina por PCR-RFLP	63
4.3.7 Variabilidade do gene da glucoquinase	67
4.3.7.1 Reação de PCR para o promotor pancreático do gene da glucoquinase	67
4.3.7.2 Detecção do polimorfismo -30G>A do promotor pancreático do gene da glucoquinase por PCR-RFLP	69
4.3.8 Identificação das variações genéticas por reações de sequenciamento de DNA	72
4.3.9 Análise das sequências de DNA	74

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74
5 RESULTADOS	76
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	76
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	77
5.2.1 Análise do perfil lipídico	78
5.3 ANÁLISES MOLECULARES	80
5.3.1 Detecção dos polimorfismos -374T>A, -429T>C e 63Del do promotor do gene <i>RAGE</i> por PCR-RFLP	80
5.3.2 Detecção do polimorfismo G82S do gene <i>RAGE</i> por PCR-RFLP	81
5.3.3 Detecção dos polimorfismos L72M e R51Q do gene da preprogrelina por PCR-RFLP	81
5.3.4 Detecção do polimorfismo -30G>A do promotor do gene da glucoquinase por PCR-RFLP	83
5.3.5 Validação dos ensaios de PCR-RFLP para as variantes em estudo	83
5.3.5.1 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para os polimorfismos do gene <i>RAGE</i> analisados	83
5.3.5.2 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para os polimorfismos do gene da preprogrelina analisados	84
5.3.5.3 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para o polimorfismo do promotor pancreático do gene da glucoquinase analisado	84
5.3.6 Análise de correlação linear (Pearson)	85
6 DISCUSSÃO	88
6.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	89
6.1.1 Amostras	89
6.1.2 Parâmetros bioquímicos	92
6.1.2.1 Análise do perfil lipídico	95
6.2 ANÁLISES MOLECULARES	97
6.2.1 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP	97
6.2.2 O polimorfismo -429T>C da região promotora do gene <i>RAGE</i>	98
6.2.3 O polimorfismo -374T>A da região promotora do gene <i>RAGE</i>	100
6.2.4 A deleção de 63 pb da região promotora do gene <i>RAGE</i>	102
6.2.5 O polimorfismo G82S do exon 3 do gene <i>RAGE</i>	103
6.2.6 O polimorfismo 346G>A (R51Q) do gene da preprogrelina	104
6.2.7 O polimorfismo 408C>A (L72M) do gene da preprogrelina	108
6.2.8 O polimorfismo -30G>A do promotor pancreático do gene da glucoquinase	111
6.2.9 Validação do procedimento de PCR-RFLP	113
6.2.10 Comparações entre as variabilidades genéticas e outros parâmetros	113
6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
7 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	135
FICHA CATALOGRÁFICA	140

1 INTRODUÇÃO

O diabetes é uma patologia que afeta todas as classes sociais e idades, com elevado custo econômico e humano. Trata-se de uma epidemia que exige estudo e atenção dos agentes de saúde caso contrário, resultará inevitavelmente em aumento nas mortes por doenças cardiovasculares e também no aumento das consequências das complicações do diabetes (NATHAN, 2002).

A identificação de variantes genéticas associadas ao *Diabetes mellitus* é tema relevante na pesquisa clínica atual. Acredita-se que a maioria dos casos de diabetes são poligênicos, ou seja, impactados por vários genes. O risco para o desenvolvimento da doença resulta da interação de múltiplos genes e de suas variantes, seus produtos ou funções e o ambiente (NEWELL, 2004). Os estudos das formas monogênicas de diabetes têm fornecido correlações genótipo-fenótipo e maior compreensão dos fatores envolvidos na homeostase da glucose.

Os ensaios de biologia molecular têm se mostrado ferramentas indispensáveis e de uso crescente nos processos de pesquisa e diagnóstico clínico. Através dos testes moleculares podem-se identificar variações genéticas comuns em uma população (polimorfismos), e variáveis raras que são usualmente associadas a processos patológicos (BRYAN, 2007).

O diabetes gestacional fornece um campo fértil para o estudo e a compreensão dos fatores genéticos associados a esta patologia. O estresse produzido pelo processo fisiológico da gestação, mediado primariamente por alteração hormonal, induz indivíduos geneticamente susceptíveis a manifestar uma alteração na metabolização da glucose, com o aparecimento de hiperglicemia e o consequente diabetes gestacional. Não existe um consenso para o seu diagnóstico, existindo vários critérios e diversos estudos comparando os métodos de detecção utilizados (SETJI *et al.*, 2005; SANTOS-AYARZAGOITIA *et al.*, 2006; MOSES e CHEUNG, 2009). Suas causas não estão esclarecidas, sendo preponderantes para o desenvolvimento da patologia fatores como a obesidade e a constituição genética do indivíduo.

Existem poucos estudos de fatores genéticos associados ao diabetes gestacional. A presença de um parente consanguíneo de primeiro grau com *Diabetes mellitus* tipo 2 é um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes

gestacional, e o próprio diabetes gestacional é um fator de risco para o desenvolvimento do *Diabetes mellitus* tipo 2 após o parto (BAPTISTE-ROBERTS *et al.*, 2009). Esta situação sugere que os genes que predisõem ao *Diabetes mellitus* tipo 2 também estão envolvidos na genética do diabetes gestacional (NEWELL, 2004).

Neste trabalho propomos estudar variações de genes possivelmente associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 1 e tipo 2 ou às suas complicações como a processos inflamatórios, obesidade e regulação glicêmica, com o objetivo de identificar marcadores genéticos para o diabetes gestacional ou suas complicações. Este estudo também permitirá conhecer o perfil da população brasileira quanto aos fatores genéticos associados ao diabetes gestacional, possibilitando futuras políticas de prevenção em pacientes de risco e mesmo o aconselhamento genético quando pertinente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Associar a variabilidade genética de sítios polimórficos selecionados dos genes do receptor para produtos de glicação avançada (*RAGE*), preprogrelina e glucoquinase em gestantes saudáveis e com diabetes gestacional.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) e caracterizar as frequências genotípicas e alélicas para os seguintes genes e variações através de PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição): região promotora do gene *RAGE* para as variantes -429T>C, -374T>A, 63Del e exon 3 para a variante G82S (Gly82Ser); exon 2 do gene da preprogrelina para as variantes R51Q (Arg51Gln) e L72M (Leu72Met), e promotor pancreático do gene da glucoquinase, variante -30G>A.
- Confirmar as variantes genéticas em estudo através de sequenciamento do DNA;
- Correlacionar as frequências dos polimorfismos em estudo nos grupos em estudo;
- Correlacionar as variações genéticas em estudo com as concentrações séricas de parâmetros bioquímicos;
- Propor se pertinente, o uso diagnóstico das variações genéticas e biomoléculas em estudo como indicadores de risco ou proteção para o diabetes gestacional na população em estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O *Diabetes mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina, ou em ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes leva, a longo prazo, à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, sistema nervoso e vasos sanguíneos (ADA, 2009).

Muitos processos patológicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes. Estes vão desde a destruição auto-imune das células β do pâncreas com consequente deficiência de insulina, até anomalias que resultam na resistência a ação da insulina (ADA, 2009). A base das anormalidades no metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas nos diabéticos é a ação deficiente da insulina nos tecidos alvos. A ação deficiente da insulina resulta da secreção inadequada da mesma e/ou da diminuição da resposta à insulina pelo tecido (WILD *et al.*, 2004).

As complicações do diabetes a longo prazo incluem: retinopatia com potencial perda da visão; nefropatia podendo chegar à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; amputações; doença de Charcot e neuropatia autônoma causando sintomas gastrintestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunção sexual (WHO, 2006). Pacientes com diabetes têm uma incidência maior de aterosclerose cardiovascular e de doença cerebrovascular. Hipertensão e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas são frequentemente encontradas em pessoas com diabetes (ADA, 2009).

3.1 Classificação do diabetes

A Associação Americana de Diabetes (ADA, 2009) propõe uma classificação baseada na etiologia das várias formas do diabetes amplamente aceita na comunidade científica. As quatro grandes categorias do diabetes são:

- Diabetes tipo 1: resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição auto-imune das células β do pâncreas. Essa

condição é comumente designada como “insulinodependente” ou “diabetes juvenil”.

- Diabetes tipo 2: causado pela combinação da resistência à insulina e a deficiência de produção deste hormônio, com o aumento da produção hepática de glucose. Muitos pacientes com esta forma de diabetes são obesos, e sabe-se que a obesidade causa uma alteração na resistência à insulina. É usualmente designada como “diabetes da maturidade” ou “diabetes não-insulino dependente”.
- *Diabetes mellitus* gestacional (DMG): definido como qualquer grau de intolerância à glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez.
- Outras formas específicas de diabetes: são reconhecidos mais de 56 tipos específicos de diabetes. Como principais grupos destacam-se: os defeitos genéticos na função das células β pancreáticas (diabetes tipo MODY, *maturity-onset diabetes of the young*); defeitos genéticos na ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediadas pelo sistema imune e síndromes genéticas associadas ao diabetes, em alguns casos.

As diferenciações entre os tipos de diabetes 1 e 2 podem ser difíceis em alguns pacientes. A apresentação clínica e a progressão da doença variam consideravelmente em ambos os tipos de diabetes. As dificuldades no diagnóstico podem ocorrer em crianças, adolescentes e adultos, sendo que o diagnóstico correto pode tornar-se mais óbvio com a evolução da doença (ADA, 2009).

3.2 Sintomas do diabetes

Os sintomas clássicos que caracterizam o diabetes incluem a hiperglicemia, ou seja, o aumento dos níveis de glucose no sangue acima de 126mg/dL em jejum (SBD, 2009), poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva

persistente), perda de peso e, em alguns casos, polifagia (fome excessiva) e visão embaçada (FOWLER, 2007). É importante destacar que a maioria dos pacientes com diabetes, principalmente aqueles com diabetes tipo 2, grupo que representa cerca de 90% do total de diabéticos, não apresenta manifestações clássicas (DIB, 2008). Nestes, o diabetes é caracterizado por determinações de glicemia associadas à prevenção ou, esporadicamente, devido a manifestações como redução rápida da acuidade visual, infecções repetidas, dificuldade na cicatrização de feridas entre outras manifestações comuns a múltiplos processos patológicos (BEN-HAROUSH *et al.*, 2004). Estima-se que no Brasil cerca de 50% dos pacientes com diabetes não estão diagnosticados (SBD, 2004).

A maior incidência do diabetes tipo 1 é em crianças, adolescentes e adultos jovens. O início dos sintomas ocorre de forma abrupta, os pacientes são magros, apresentam facilidade para cetose (catabolismo excessivo de gordura em lugar dos carboidratos, como fonte energética) e grandes flutuações nos valores da glicemia. Há pouca influência hereditária.

O diabetes tipo 2 é de início insidioso, com sintomas inespecíficos, o que muitas vezes, retarda o diagnóstico. A obesidade está presente em cerca de 80% dos pacientes (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). Há forte componente hereditário, a prevalência aumenta com a idade e o indivíduo pode não apresentar os sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento).

3.3 Epidemiologia do diabetes

O diabetes tem se tornado a maior causa de morbidade e mortalidade nos Estados Unidos e vem aumentando sua importância pela crescente prevalência. Os Centros para Controle e Prevenção de Doenças estimam que a prevalência do diabetes tenha crescido 104% de 1980 até 2004 (FOWLER, 2007). O número de pessoas com diabetes está aumentando devido a diversos fatores como o crescimento da população, a maior expectativa de vida, a urbanização, a obesidade e a falta de atividade física (WILD *et al.*, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, calcula-se que em 2025 possam existir cerca de 11 milhões de diabéticos no país, o que representa um aumento de mais de 100% em relação aos 5 milhões de diabéticos no ano 2000 (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). Em projeções realizadas sobre a expansão do diabetes, acredita-se que o número de pessoas com diabetes no mundo irá dobrar entre os anos 2000 e 2030, passando de 171 milhões em 2000 para 366 milhões em 2030 (WILD *et al.*, 2004).

O *Diabetes mellitus* é uma patologia que está em primeiro plano no planejamento de políticas de saúde pública, quer pelo número de doentes, quanto pela possibilidade de melhora na expectativa e qualidade de vida dos afetados quando têm suporte no diagnóstico precoce, indicadores da evolução da doença e tratamento. Os custos relacionados ao diabetes foram estimados em 98 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos, com valores similares para o Reino Unido, quando se consideram fatores que envolvem a perda de produtividade, internações prolongadas, cirurgias e tratamentos complexos (SACKS *et al.*, 2002). O sistema de saúde norte americano prevê que os custos para um indivíduo com diabetes são quatro vezes maiores quando comparado ao não diabético e o Reino Unido gasta cerca de 10% do seu orçamento nacional para saúde com o diabetes (SACKS *et al.*, 2002). Dados para comparação com a situação brasileira não foram encontrados. A primeira campanha nacional de triagem para diabetes realizada em 2001 e patrocinada pelo governo brasileiro identificou 2,9 milhões de casos suspeitos de *Diabetes mellitus*. Cerca de 39 milhões de reais no ano de 2000 foram gastos pelo Sistema Único de Saúde com a hospitalização por *Diabetes mellitus*, sendo justificados os elevados valores pela alta permanência hospitalar e a severidade das complicações destes pacientes, o que demanda procedimentos de elevada complexidade (dados disponíveis em <http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/cnhd/publicacoes/home.html>).

A identificação precoce do diabetes e o tratamento com controle adequado trazem benefícios ao indivíduo e podem propiciar substancial redução nos custos do sistema de saúde, através da redução na gravidade e frequência das complicações geradas pela patologia. Indicadores para detecção da doença, bem como marcadores de tratamento e prognóstico confiáveis são elementos importantes na

construção de políticas para o atendimento e melhoria na qualidade de vida dos afetados pelo diabetes.

3.4 Diabetes Gestacional

O *Diabetes mellitus* gestacional (diabetes gestacional, DMG) é definido como a intolerância a glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (BUCHANAN *et al.*; 2007; ADA, 2009). A severidade da doença é variável e ela é considerada uma das mais importantes complicações associadas à gravidez. Como todas as formas de hiperglicemia, o diabetes gestacional resulta de uma inadequada oferta de insulina endógena para a demanda tecidual (MEYER *et al.*, 1996).

No Brasil a frequência do diabetes gestacional é de aproximadamente 7% nas gestações, variando de 1 a 14%, dependendo da população e dos testes usados para o diagnóstico (ADA, 2009). Os estudos apontam a detecção de aproximadamente 135.000 casos anualmente nos Estados Unidos (ADA, 2009). A Tabela 1 apresenta a frequência do diabetes gestacional em diferentes populações.

TABELA 1- PREVALÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

País	Critério de diagnóstico	Prevalência
Nova Zelândia	Local	19,3%
Itália	Carpen-Coustan	13,3%
Estados Unidos	NDDG	13,0%
Canadá	NDDG	12,8%
Tailândia	NDDG	10,2%
Austrália	OMS	9,5%
Brasil	OMS	7,6%
Sri Lanka	OMS	5,5%
Irã	Carpen-Coustan	4,8%
Índia	OMS	3,8%
Etiópia	OMS	3,7%
Paquistão	Carpen-Coustan	3,5%
Dinamarca	OMS	3,2%
Japão	Local	2,9%
China	OMS	2,3%
Coréia	NDDG	2,2%
Reino Unido	EASD	1,2%
Suíça	EASD	1,2%
Turquia	NDDG	1,2%
Taiwan	OMS	0,6%

EASD: Associação Européia para o estudo do diabetes, NDDG: National Diabetes Data Group, OGTT: Teste oral de tolerância a glucose, OMS: Organização Mundial de Saúde.
Adaptado de Shaat *et al.*, 2007.

A gravidez é usualmente acompanhada de resistência à insulina progressiva que inicia na metade da gestação e progride até o terceiro trimestre para níveis que se aproximam aos observados em indivíduos com diabetes tipo 2 (BUCHANAN *et al.*, 2005). As causas potenciais da inadequação da célula β pancreática na produção de insulina são múltiplas e não completamente descritas. Três categorias gerais têm sido identificadas:

- Disfunção autoimune das células β ;
- Anormalidades genéticas que prejudicam a secreção de insulina;
- Disfunção das células β que está associada com resistência crônica à insulina (METZGER *et al.*, 2007).

Duas formas de resistência à insulina existem em mulheres que desenvolvem diabetes gestacional. A primeira é identificada como a resistência fisiológica à insulina, normal da gestação; e a segunda é caracterizada por uma forma crônica que está presente antes da gestação e que se exacerba na gestação devido às mudanças fisiológicas (METZGER *et al.*, 2007).

Vários fatores de risco associados ao diabetes gestacional estão estabelecidos. A Tabela 2 mostra as categorias de risco do diabetes gestacional.

TABELA 2- CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL.

Categoria do risco	Características clínicas
Risco Alto (a presença de qualquer um dos fatores é suficiente para o enquadramento nesta categoria)	<ul style="list-style-type: none"> • Obesidade marcante • Diabetes em parentes consanguíneos de primeiro grau • História pessoal de intolerância à glucose • Gestação anterior com neonato macrossômico • Presença de glicosúria
Risco Médio	<ul style="list-style-type: none"> • Não se enquadra como risco alto ou baixo
Risco Baixo (necessário apresentar todas as características)	<ul style="list-style-type: none"> • Idade < 25 anos • Etnia associada a baixo risco • Ausência de diabetes em parentes consanguíneos de primeiro grau • Ganho normal de peso antes e durante a gravidez • Ausência de história de concentrações de glucose séricas anormais • Ausência de intercorrências obstétricas prévias

Adaptado de BUCHANAN e XIANG, 2005 com modificações

A Tabela 3 detalha os fatores de risco associados ao diabetes gestacional para justificar a elevada frequência deste na população brasileira.

TABELA 3- FATORES DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL.

<i>Fatores maternos</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Idade avançada • Múltiparas • Sobrepeso na gestação • Ganho de peso excessivo durante a gestação • $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$ • Baixa estatura (<1,50m) • Baixo peso do recém nato • Traço talassêmico • Síndrome do ovário policístico • Alto consumo de gordura saturada
<i>História familiar</i>
<ul style="list-style-type: none"> • História familiar de diabetes • Mãe com histórico de diabetes gestacional
<i>Achados prévios</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Malformação congênita • Natimorto • Macrossomia • Cesárea • Diabetes gestacional prévio
<i>Fatores gestacionais</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensão • Gravidez múltipla • Aumento da reserva de ferro
<i>Fatores de proteção</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Jovens (< 25 anos) • Uso moderado de álcool

Adaptado de BEN-HAROUSH *et al.*, 2004, com modificações.

A gestação é um estado hiperinsulinêmico caracterizado por uma diminuição da sensibilidade à insulina, parcialmente explicada pela presença de hormônios diabetogênicos (bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina), tais como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário. Os níveis glicêmicos de jejum tendem a ser mais baixos na gestante, contudo, os valores pós-prandiais são mais altos, sobretudo naquelas em que não há um aumento adequado da liberação de insulina (MAGANHA *et al.*, 2003).

3.4.1 Diagnóstico do diabetes gestacional

É relevante a precocidade na detecção e tratamento do diabetes gestacional para beneficiar a gestante e o feto, evitando as complicações decorrentes da doença. O defeito crônico nas células β pode estar presente antes e depois da gestação e, está acompanhado por aumento na glicemia. Esta hipótese sugere que quando o diabetes gestacional é diagnosticado, incluem-se algumas mulheres com intolerância a glucose prévia, descobertas apenas durante a rotina de tolerância a glucose realizada na gravidez (METZGER *et al.*, 2007).

A Associação Canadense de Diabetes recomenda que todas as mulheres entre a 24^a e 28^a semanas de gestação sejam submetidas ao teste oral de tolerância à glucose. Para mulheres com múltiplos fatores de risco, este teste deve ser feito durante o primeiro trimestre de gestação e, depois, novamente durante os segundo e o terceiro trimestres, mesmo que o primeiro teste tenha sido negativo para o diagnóstico do diabetes (CDA, 2005-2008).

Critérios alternativos para o diagnóstico do diabetes gestacional, baseados em recomendações internacionais e nacionais, estão disponíveis, como apresenta a Tabela 4.

TABELA 4- CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES GESTACIONAL ATRAVÉS DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLUCOSE COM 75g DE GLUCOSE ANIDRA VIA ORAL.

Glicemia	SBD	OMS	ADA
Jejum	≥110 mg/dL	≥126 mg/dL	>95 mg/dL
1-h pós 75g	-	-	>180 mg/dL
2-h pós 75g	≥140 mg/dL	≥140 mg/dL	>155 mg/dL

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes
 OMS: Organização Mundial da Saúde
 ADA: Associação Americana de Diabetes

A Sociedade Brasileira de Diabetes, com base no Estudo Brasileiro de Diabetes Gestacional (Ministério da Saúde do Brasil, 2001), indica como triagem inicial a glicemia de jejum na primeira consulta, considerando positiva a glicemia

igual ou superior a 85mg/dL. Glicemia de jejum entre 85 e 109mg/dL indica necessidade de encaminhamento para o teste oral de tolerância à glucose (TOTG). Glicemia de jejum igual ou superior a 110mg/dL deverá ser repetida antes do início da dieta alimentar; um segundo valor igual ou superior a 110mg/dL caracteriza o diagnóstico do diabetes gestacional. A figura 1 apresenta o procedimento para o diagnóstico do diabetes gestacional. Valores de glicemia de jejum menor que 85mg/dL, associados à presença de fatores de risco para diabetes gestacional indicam necessidade de repetição da glicemia de jejum a partir da 24ª semana.

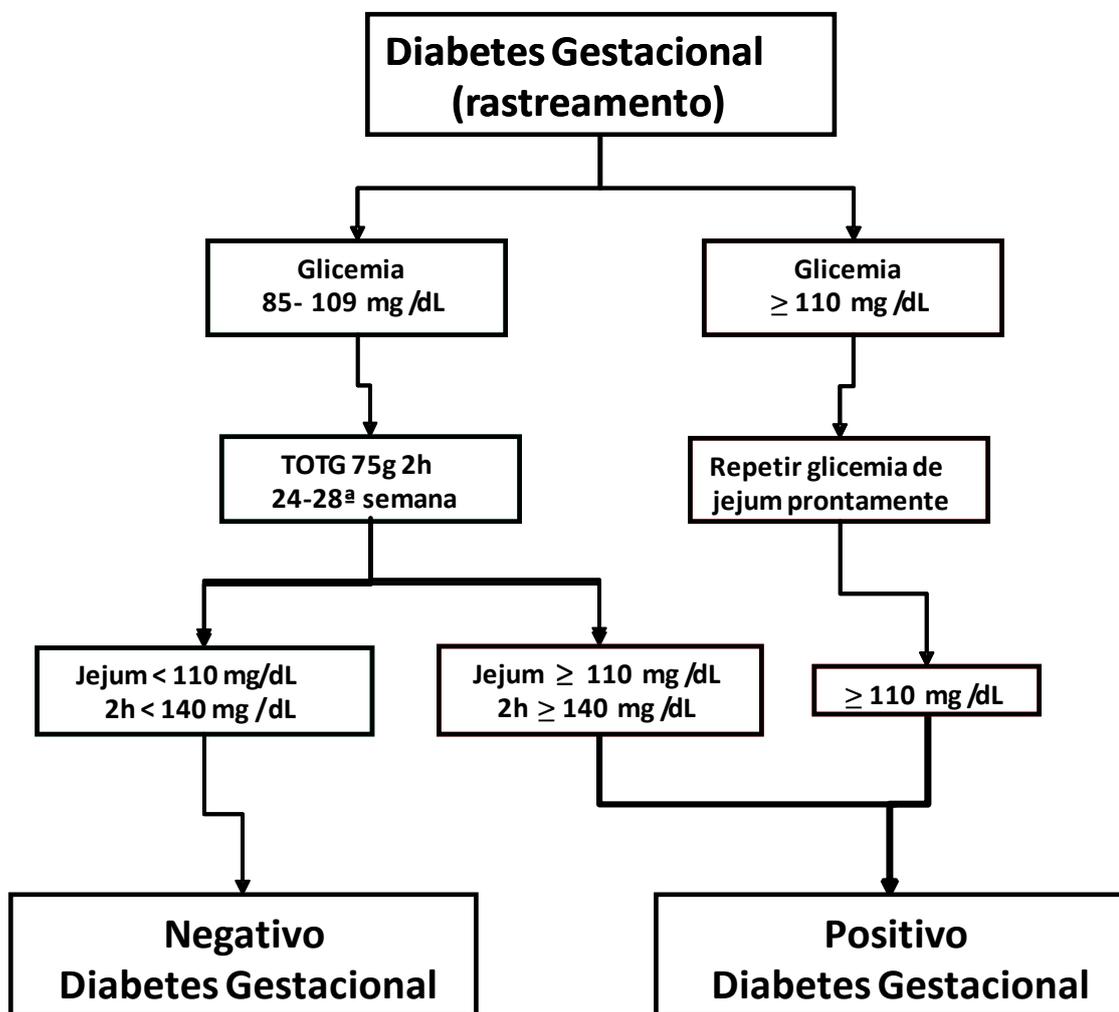


FIGURA 1- Fluxograma para o diagnóstico do diabetes gestacional segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.

Retirado das informações do Ministério da Saúde do Brasil, 2001 e SBD, 2009.

TOTG: Teste oral de tolerância à glucose.

O diabetes gestacional tem impacto importante para o feto e o neonato (METZGER *et al.*, 2007). Aumenta o risco de macrossomia, feto com mais de 4 kg (ZHANG *et al.*, 2008) e de outras morbidades fetais, tais como: hipoglicemia, hipocalcemia, tóco traumatismos, policitemia, distúrbios respiratórios, malformações congênitas, hipertrofia cardíaca, hipomagnesemia, crescimento intra-uterino retardado e icterícia prolongada (FUKS, 2000). Crianças nascidas de mães diabéticas possuem uma maior chance de ser obesas, ter intolerância à glucose ou diabetes na adolescência (KIM *et al.*, 2002).

3.4.2 Tratamento do diabetes gestacional

O tratamento inicial do diabetes gestacional consiste em dieta para diabetes, ou seja, planejamento alimentar (SBD, 2009).

A recomendação do American College of Obstetrics/ Gynecology (ACOG) é introduzir a insulina quando, depois de realizada dieta adequada a glicemia de jejum estiver superior a 105 mg/dL e/ou pós-prandial (duas horas após a refeição) superior a 120 mg/dL.

Historicamente, a introdução da insulina na terapêutica da gestante diabética foi um marco na qualidade da assistência a essas mulheres. Os dados sobre diabetes e gestação anteriores à utilização clínica da insulina são sombrios, com relato de cerca de 30% de mortalidade materna durante a gestação e 50% de óbitos fetais no período perinatal (MAGANHA *et al.*, 2003). O uso da insulina pode incluir uma mistura de insulinas de ação curta e intermediária. É comum haver a necessidade de aumento das doses de insulina devido ao aumento da resistência à insulina que ocorre durante a evolução da gestação (HADDEN, 2001).

Os hipoglicemiantes orais são contra-indicados na gestação já que alguns estudos demonstraram que estes medicamentos atravessam a placenta (HELLMUTH, *et al.*, 2000). Dentre os hipoglicemiantes orais da família da sulfoniluréia, somente a glibenclamida tem demonstrado ter transferência mínima através da placenta. A metformina atravessa a placenta e até o presente não existem evidências para indicar o seu uso no tratamento do diabetes gestacional,

exceto em pesquisas clínicas (METZGER *et al.*, 2007). Este fato é bastante discutido no meio científico, já que estudos recentes têm demonstrado que o uso de hipoglicemiantes orais pode sim ser indicado em casos específicos, não tendo maiores consequências ao feto (HAGUE, *et al.*, 2003; ROWAN, *et al.*, 2008).

A atividade física moderada é indicada desde que não haja contra-indicações como sangramentos ou outras restrições.

O controle do tratamento do diabetes gestacional é feito com a monitorização da glucose, feita em laboratório de análises clínicas com a retirada de sangue e/ou em casa, com as tiras reagentes e glicosímetro (METZGER, *et al.*, 2007). As medidas integradas de glucose, como a hemoglobina glicada, em geral são de pouca utilidade no diabetes gestacional, pois frequentemente estão normais. O seu uso está em discussão no meio científico (BALAJI, *et al.* 2007; ADA, 2010).

Mulheres com diabetes gestacional são mais propensas a desenvolver diabetes tipo 2, hipertensão e doença cardiovascular do que aquelas que mantiveram os níveis normais de glicemia durante a gestação (ENGLANDM *et al.*, 2009). Recentemente tem-se sugerido que o risco aumentado para o desenvolvimento dessas doenças pode estar ligado ao perfil lipídico das gestantes (RIZZO *et al.*, 2008). O risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 após o diabetes gestacional tem aumentado quase que de forma linear durante os primeiros dez anos após o parto. O risco é similar entre todos os grupos étnicos com diabetes gestacional (METZGER *et al.*, 2007).

Geralmente os níveis de glucose nas mulheres com diabetes gestacional retornam ao normal após o parto. Entretanto, devido ao risco aumentado de desenvolverem diabetes tipo 2 mais tarde, a reclassificação pode ser feita após o parto, utilizando critérios padronizados para a população não-gestante. Para reduzir o risco de desenvolver diabetes no futuro, as mulheres devem ter um estilo de vida saudável, devem regularmente ser submetidas a exame de glicemia para avaliar o possível desenvolvimento de diabetes tipo 2 ou intolerância à glucose (pré-diabetes), devem consultar o médico quando estiverem planejando a próxima gestação para checar os níveis de glucose e devem fazer acompanhamento durante toda a gestação (ADA, 2009).

O diabetes gestacional não é uma indicação para parto cesáreo ou parto antes de 38 semanas completas de gestação. Entretanto, após este período, o risco de macrossomia é maior. Desta forma, se o feto for viável, deve-se programar o parto para a 38ª semana (ADA, 2009).

3.5 Variações genéticas associadas ao diabetes

As formas monogênicas de diabetes como o MODY e o diabetes mitocondrial (de herança materna com frequentes manifestações clínicas), parecem contribuir em menor escala, cerca de < 5% dos casos, para o diabetes gestacional. Os genes envolvidos nesses subtipos de diabetes e de diabetes gestacional parecem ter importante efeito na função das células β e os pacientes frequentemente não têm evidência de resistência à insulina crônica (METZGER *et al.*, 2007).

Vários genes têm sido associados ao diabetes e excluindo o diabetes monogênico (MODY), até o presente não foi encontrado um *locus* gênico responsável pela patologia (METZGER *et al.*, 2007). As associações do diabetes com variações genéticas têm sido reportadas primariamente entre as complicações do diabetes e polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs, *single nucleotide polymorphism*).

3.5.1 O gene *RAGE* (*receptor for advanced glycation end products*)

Entre os receptores para produtos de glicação avançada (AGE, *advanced glycation end products*) mais estudados está o receptor para produtos de glicação avançada (*RAGE* ou *AGER*), que pertence à família das imunoglobulinas. Está complexado com o polipeptídeo lactoferrina, o que permite a internalização e transcitose dos AGE para o sub-endotélio (HUDSON *et al.*, 1998). Segundo Schmidt e Stern, 2000, o receptor é uma proteína de aproximadamente 45kDa. Sua estrutura está representada na figura 2.

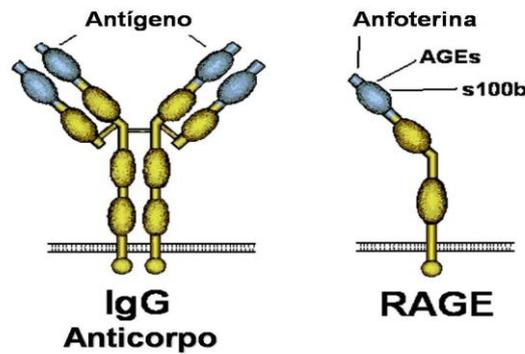


FIGURA 2- Estrutura da proteína RAGE.

Comparação entre as estruturas da proteína RAGE com anticorpos do tipo IgG, ambos da família das imunoglobulinas. Os possíveis sítios de ligação são apontados em RAGE. Adaptado de SCHMIDT e STERN, 2000.

Os AGE são um grupo heterogêneo de compostos que causam diversos efeitos adversos, incluindo: redução da atividade enzimática, dano aos ácidos nucléicos, degradação parcial de proteínas, ligação cruzada entre proteínas e indução de vias citotóxicas (HUDSON *et al.*, 1998).

A interação AGE-RAGE desencadeia uma transdução de sinal, com ativação da transcrição de vários genes, resultando em disfunção celular, formação de espécies reativas de oxigênio e ativação celular do fator NK- κ B (HUDSON *et al.*, 1998). A resultante da estimulação do RAGE favorece o processo aterogênico e trombogênico. Outras moléculas também podem interagir com o RAGE (proteínas fibrilas β -amilóides, S100/calgranulinas e anfoterina), caracterizando-o como um receptor multiligante (SCHMIDT e STERN, 2000).

O RAGE é expresso em uma variedade de tipos celulares, como células endoteliais, fagócitos mononucleares, músculo liso vascular e neurônios (KISLINGER *et al.*, 1999). Em situações de aumento da ativação celular ou estresse, como no envelhecimento, no diabetes, na inflamação e na doença de Alzheimer, a expressão do RAGE é extraordinariamente aumentada nas células afetadas (SCHMIDT e STERN, 2000).

O RAGE está localizado no cromossomo 6p21.3, é composto por 11 exons e 10 introns. Já foram identificados cerca de 50 polimorfismos do RAGE, com destaque para aqueles localizados na região promotora e no exon 3. Esta última

região codifica o possível sítio de ligação para os AGE (HUDSON *et al.*, 2008). A Figura 3 mostra as principais variantes descritas para o gene *RAGE*.

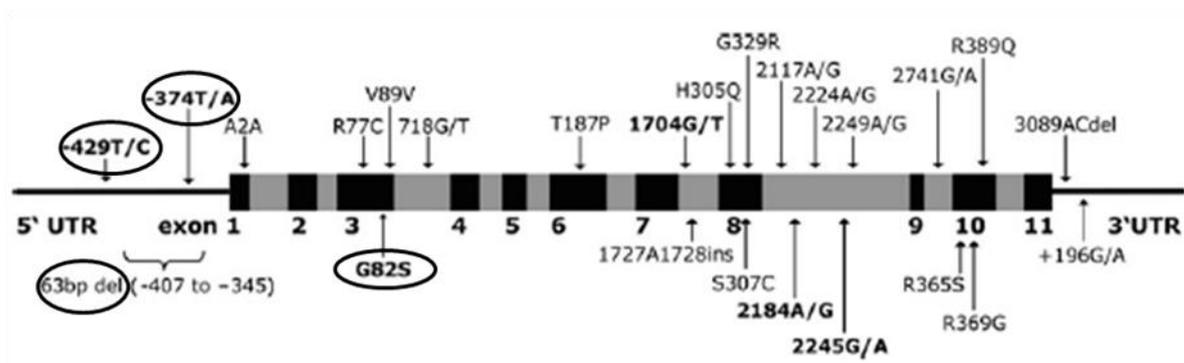


FIGURA 3- Mapa do gene *RAGE* e principais variantes genéticas.

Os quadrados escuros representam os exons. Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do gene *RAGE* mais frequentes e a deleção de 63pb estão representados em negrito com destaque (círculo) para as regiões promotora e exon 3 estudados neste trabalho.

FONTE: KANKOVÁ *et al.*, 2005.

A região promotora do gene *RAGE*, sítio dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e da deleção de 63pb (-407 a -345pb), tem sido associada com complicações do *Diabetes mellitus*. O genótipo AA do polimorfismo -374T>A do gene *RAGE* está associado com um controle metabólico inadequado em pacientes diabéticos do tipo 1 com doença cardiovascular e com excreção urinária aumentada de albumina, sugerindo uma interação gene - ambiente no desenvolvimento da nefropatia diabética e complicações cardiovasculares (PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003). Achados semelhantes foram descritos por SANTOS *et al.*, 2005 que mostraram que o alelo -374A está associado à redução do risco de isquemia em Afro-Brasileiros com diabetes tipo 2. FALCONE *et al.*, 2004 e 2005 também sugeriram que o alelo -374 A em homozigose está associado com menor risco para a doença arterial coronariana e com a gravidade da doença coronariana. Em estudos desenvolvidos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, PICHETH *et al.*, 2007, relataram que a presença do alelo -374A (em homozigose) é fator de proteção contra a severidade da doença cardiovascular em pacientes com diabetes tipo 2, e uma associação do alelo -429C com o diabetes tipo 1.

A deleção de 63 pares de bases na região promotora do gene *RAGE* (-407 a -354) tem sido associada com nefropatia diabética na população alemã (KANKOVA *et al.*, 2005).

O polimorfismo G82S é resultante da substituição de uma guanina por uma adenina (G>A) na posição 555 do exon 3 do gene *RAGE*. Essa substituição leva a mudança de glicina (G, Gly) por serina (S, Ser) uma alteração não-sinônima do resíduo de aminoácido no códon 82. O polimorfismo G82S tem sido associado a processos patológicos como a retinopatia em asiáticos com diabetes tipo 2 (KUMARAMANICKAVEL *et al.*, 2002), ao aumento da resposta inflamatória e artrite (HOFMANN *et al.*, 2002) e em complicações de pele em diabéticos tipo 2 (KANKOVA *et al.*, 1999). Na população asiática caucasóide não foi encontrada diferença na frequência genotípica ou alélica do polimorfismo G82S entre indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2 com ou sem doença macrovascular (HUDSON *et al.*, 2001). Yoshioka *et al.*, 2005, não encontraram relação entre o polimorfismo G82S e microalbuminúria (estágio inicial da nefropatia) em diabéticos tipo 2 japoneses.

Estes dados substanciam a relevância deste gene e suas variações genéticas para o *Diabetes mellitus*. Nenhum estudo de SNP do *RAGE* foi conduzido com pacientes com diabetes gestacional.

3.5.2 O gene da Preprogrelina

A grelina é um polipeptídeo de 28 aminoácidos produzido principalmente pelas células do estômago e associado ao processo de sinalização do estímulo de fome. Estimula a liberação de hormônio do crescimento e do hormônio adenocorticotrófico (ACTH), entre outros (ARVAT *et al.*, 2000). Recentemente, o número de potenciais funções para a grelina aumentou e incluem o controle metabólico, imunológico, reprodutivo e participação em processos comportamentais, incluindo a motilidade gastrointestinal, além de haver crescente evidência de uma função cardiovascular (BERTHOLD *et al.*, 2009). A grelina foi introduzida no mapa de genes da obesidade humana em 2004, e o papel das suas variantes genéticas na composição corporal e no perfil lipídico ainda não é claro (RANKINEN *et al.*, 2006).

O gene da grelina humana está localizado no cromossomo três (3p25-26), apresenta cinco exons (SEIM *et al.*, 2007). O gene do receptor da grelina (GHS-R) também está localizado no cromossomo três, na posição q26-27, e é uma proteína

G associada a um receptor, acoplada a sete domínios transmembrana (7-TM). Este receptor é bem conservado entre todas as espécies vertebradas, sugerindo que tanto a grelina quanto seu receptor apresentam importantes funções fisiológicas (KOJIMA *et al.*, 2008).

A grelina apresenta como característica, a acilação (n-octanoilação) do resíduo de serina três (figura 4), indispensável para sua atividade biológica e foi descrita como um ligante endógeno do receptor do hormônio do crescimento (LARSEN *et al.*, 2005).

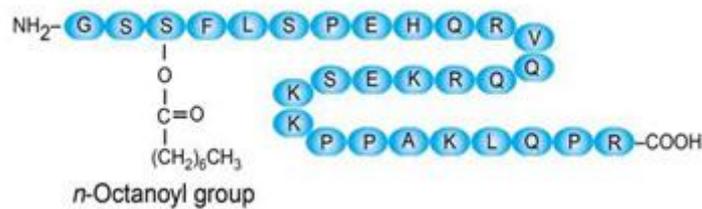


FIGURA 4- Sequência de resíduos de aminoácidos da grelina com destaque para o sítio de acetilação no resíduo de serina.

Sequência dos 28 resíduos de aminoácidos que formam a grelina madura, com destaque para a ligação de um grupo n-octanoil (acilação) no resíduo de Serina-3.

Estrutura obtida em: www.alz-pharma.com/anglais/azp01.php

O gene da grelina é designado também de gene da preprorelina. O transcrito do gene da preprorelina origina, por clivagem, além da grelina, outro polipeptídeo de ação oposta, a obestatina (UKKOLA *et al.*, 2001), como observado na figura 5. A obestatina atua na redução da ingestão de alimentos e na diminuição da motilidade intestinal, sem apresentar efeito sobre a liberação do hormônio do crescimento (ZAVARELLA *et al.*, 2008).

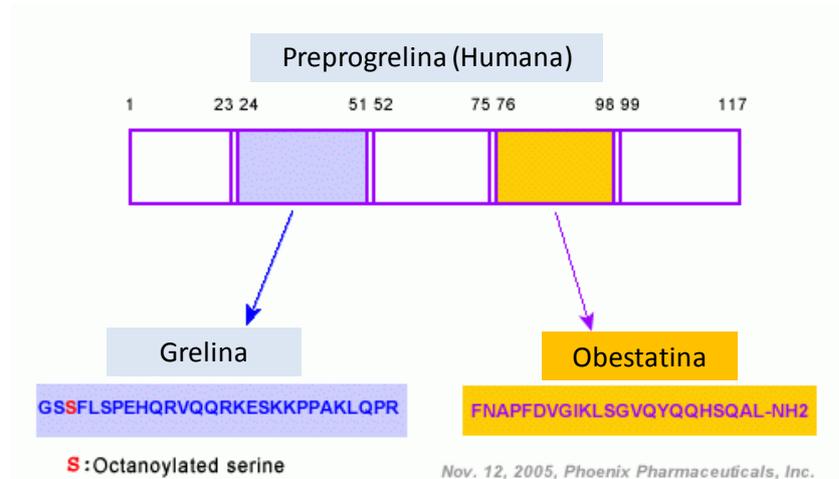


FIGURA 5- Localização das regiões codificantes da grelina e da obestatina no gene da preprorelina humana.

Produção da grelina e da obestatina pelo processamento primário do gene da preprorelina. A figura destaca os exons do gene, os sítios de clivagem e a sequência de aminoácidos dos dois hormônios. FONTE: www.alz-pharma.com/anglais/azp01.php.

A grelina circula no sangue e apresenta secreção pulsátil, com níveis elevados em jejum e baixos depois da alimentação. Estudos em humanos mostraram um aumento agudo nos níveis de glucose e uma diminuição nos níveis de insulina, após injeção intravenosa de grelina (KORBONITS *et al.*, 2002). A concentração plasmática da grelina é baixa em pessoas obesas e alta em pessoas magras, indicando que a concentração plasmática da grelina é inversamente proporcional ao índice de massa corpórea (KOJIMA *et al.*, 2008).

Vários polimorfismos do gene da preprorelina foram identificados (UKKOLA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2006). Estes podem atuar influenciando a função da grelina e podem alterar o balanço energético. Estudos anteriores sugeriram que os polimorfismos, localizados na região codificadora da preprorelina, estavam envolvidos na etiologia da obesidade e que poderiam modular secreção de insulina mediada pela glucose (ZAVARELLA *et al.*, 2008).

Os polimorfismos L72M e R51Q do exon 2 são os mais estudados em razão de alguns trabalhos terem mostrado associação destes polimorfismos com a obesidade (POYKKO, *et al.*, 2003), embora outros estudos tenham falhado em encontrar associações (LARSEN *et al.*, 2005).

O polimorfismo L72M (Leu72Met) está localizado entre as regiões codificantes da grelina madura e do peptídeo obestatina. Ocorre uma transição na base 408 (+408C>A) resultando na substituição de uma leucina por uma metionina na posição 72 da preprogrelina, região C-terminal (UKKOLA *et al.*, 2002). Suas consequências funcionais ainda não são conhecidas, mas sabe-se que este polimorfismo não altera a sequência da grelina madura. O polimorfismo L72M foi associado como preditor de disfunção renal no diabetes tipo 2 (LEE *et al.*, 2006) e portadores do alelo menos frequente (M72) parecem estar protegidos do acúmulo de gordura e de distúrbios metabólicos viscerais (ZAVARELLA *et al.*, 2008). Em uma população de Finlandeses com intolerância à glucose, este polimorfismo está associado a um risco aumentado de diabetes tipo 2 (BERTHOLD *et al.*, 2009). A variante L72M foi associada com um aumento da prevalência da síndrome metabólica, bem como com maiores concentrações de glicemia de jejum, menores concentrações de LDL-c (lipoproteína de alta densidade) e níveis mais elevados de triglicérides (STEINLE *et al.*, 2005).

No polimorfismo R51Q (Arg51Gln) ocorre uma transição na posição 152 (+152G>A), com a consequente substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 51 da grelina madura (UKKOLA *et al.*, 2002). Este polimorfismo foi associado com diabetes tipo 2 e com pressão alta em Finlandeses de meia idade (POYKKO *et al.*, 2003), entretanto esta variante não foi associada a fenótipos de obesidade em outros estudos (UKKOLA *et al.*, 2002).

O polimorfismo R51Q promove a modificação da sequência de aminoácidos do peptídeo da grelina madura e pode afetar sua função. O polimorfismo L72M, ao contrário, encontra-se fora da região onde a grelina madura é codificada, dessa forma poderia ser neutro e sem efeitos funcionais. Entretanto, considerando que a leucina na posição 72 é altamente conservada entre as diferentes espécies de mamíferos, o polimorfismo L72M pode ter um significado funcional, alterando o processamento de proteínas e, desta forma, afetando a secreção de grelina e / ou da sua atividade (MONTELEONE *et al.*, 2006).

3.5.3 O gene da Glucoquinase

A glucoquinase (GK, GGK, hexoquinase IV ou hexoquinase D) é uma enzima citoplasmática, pertencente ao grupo das hexoquinases. Fosforila a glucose no interior celular, catalisando a conversão da glucose em glucose-6-fosfato (G-6-P), primeira etapa do metabolismo da glucose, e atua como sensor de glucose na célula pancreática, regulando a secreção de insulina estimulada por glucose (CUESTA-MUNOZ *et al.*, 2004).

A glucoquinase é encontrada nas células β pancreáticas e nos hepatócitos diferem na porção N-terminal devido aos diferentes sítios de início de transcrição que são utilizados durante a transcrição do gene (WINTER, 2003).

O gene da glucoquinase está localizado no cromossomo 7p15.3-p15.1 e contém 10 exons (NCBI NG_008847.1), com aproximadamente 45.000 pares de bases, que codificam uma proteína de 465 aminoácidos (TINTO *et al.*, 2008). Possui dois promotores tecido-específicos que permitem sua regulação de forma diferenciada no fígado e no pâncreas (figura 6). A glucoquinase pancreática atua como sensor de glucose para a regulação da secreção de insulina (MARZ *et al.*, 2004).

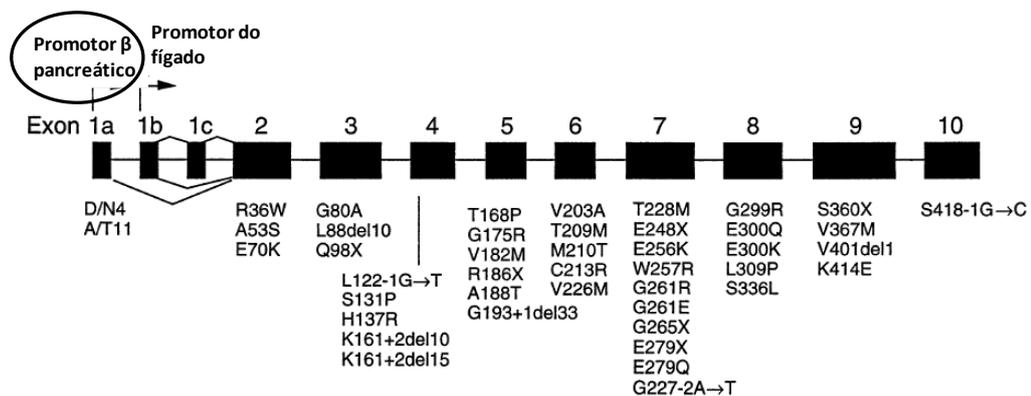


FIGURA 6- Estrutura e polimorfismos do gene da glucoquinase. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do gene da glucoquinase. Em destaque, circulado, está indicada a localização do promotor pancreático da glucoquinase. Retirado de VELHO *et al.*, Diabetologia, 1997.

As mutações no gene da glucoquinase causam diminuição da afinidade da enzima pela glucose e conduzem à hiperglicemia. Indivíduos com mutações na glucoquinase apresentam hiperglicemia leve de jejum que não progride necessariamente com a idade (SAKER *et al.*, 1996). Devido à natureza discreta da hiperglicemia, os indivíduos são raramente sintomáticos, sendo a maioria diagnosticada durante exames de rotina. Estes indivíduos podem não satisfazer os critérios para diagnóstico de diabetes ou podem ser classificados com diabetes gestacional, intolerância a glucose, diabetes tipo 2 ou MODY de acordo com as circunstâncias que os levaram aos testes (OWEN *et al.*, 2001).

Vários polimorfismos do gene da glucoquinase estão associados ao diabetes tipo 2 e, principalmente, envolvidos no diabetes monogênico MODY-2, com uma prevalência de mutações de 20% na população inglesa (BARROSO, 2005). As frequências e os polimorfismos do gene da glucoquinase associados ao diabetes variam conforme a população estudada, não sendo relatado na literatura um estudo para a população brasileira.

Pacientes com diabetes gestacional apresentam alta prevalência de mutações no gene da glucoquinase (ELLARD *et al.*, 2000). Uma possível explicação para este achado consiste na susceptibilidade genética ao diabetes relativo à mutação no gene da glucoquinase em heterozigose encontrar um ambiente propício para a manifestação da doença na gestante, quando uma resistência à insulina ocorre fisiologicamente associada ao processo da gestação (ELLARD *et al.*, 2000).

Em cerca de 6% das gestantes são encontradas mutações no gene da glucoquinase (SAKER *et al.*, 1996). A identificação dessas mutações é importante porque, quando estão presentes, determinam um curso clínico diferente, tanto na gestação quanto fora dela, além de aumentar em 50% o risco do feto ser afetado (OWEN *et al.*, 2001) e de influenciar a conduta clínica durante a gestação (THOMSON *et al.*, 2003).

Em gestantes com mutações no gene da glucoquinase, o efeito da glicemia materna sobre o feto dependerá se este herdou ou não a mutação (OWEN *et al.*, 2001). Se o feto apresentar um genótipo normal, o efeito será semelhante ao de uma gestação em que a mãe desenvolveu diabetes gestacional, podendo o feto apresentar macrossomia (crescimento excessivo); se a mutação for herdada, a

concentração de glucose materna estará em um nível adequado para estimular a glucoquinase fetal, produzindo um crescimento normal. Neste caso, o tratamento da mãe com insulina a fim de diminuir a concentração sérica de glucose, produzirá um efeito negativo sobre o crescimento fetal, resultando em um feto pequeno para a idade gestacional. Este efeito também estará presente se a mutação for herdada do pai (OWEN *et al.*, 2001).

Uma variação de único nucleotídeo na região promotora (-30G>A) foi descrita para o gene da glucoquinase expresso no pâncreas. Essa variação pode levar a um menor nível de glucoquinase e aumentar em contrapartida a secreção de insulina estimulada por glucose (RISSANEN *et al.*, 1998), além de afetar o peso do feto ao nascimento (HATTERSLEY *et al.*, 1998). Esse polimorfismo está associado com uma redução da função da célula β em japoneses com intolerância a glucose. Por outro lado, em outras populações, como em holandeses e finlandeses, não foi encontrada nenhuma associação (MARZ *et al.*, 2004). Yamada *et al.*, 2006 encontraram uma associação inversa do polimorfismo -30G>A com o risco para a obesidade, ou seja, o alelo A atua como fator protetor contra a obesidade. O polimorfismo -30G>A do gene da glucoquinase foi associado ao aumento da glicemia em jejum e pós-sobrecarga (75 g de glucose) em uma população européia (ROSE *et al.*, 2005).

3.6 Hipóteses a serem pesquisadas

Com base nas características dos genes e variabilidades genéticas conhecidas neste estudo, temos como premissa a expectativa de que algumas variantes possam influenciar o desenvolvimento do *Diabetes mellitus* gestacional ou suas complicações. A figura 7 resume as hipóteses presentes neste projeto.

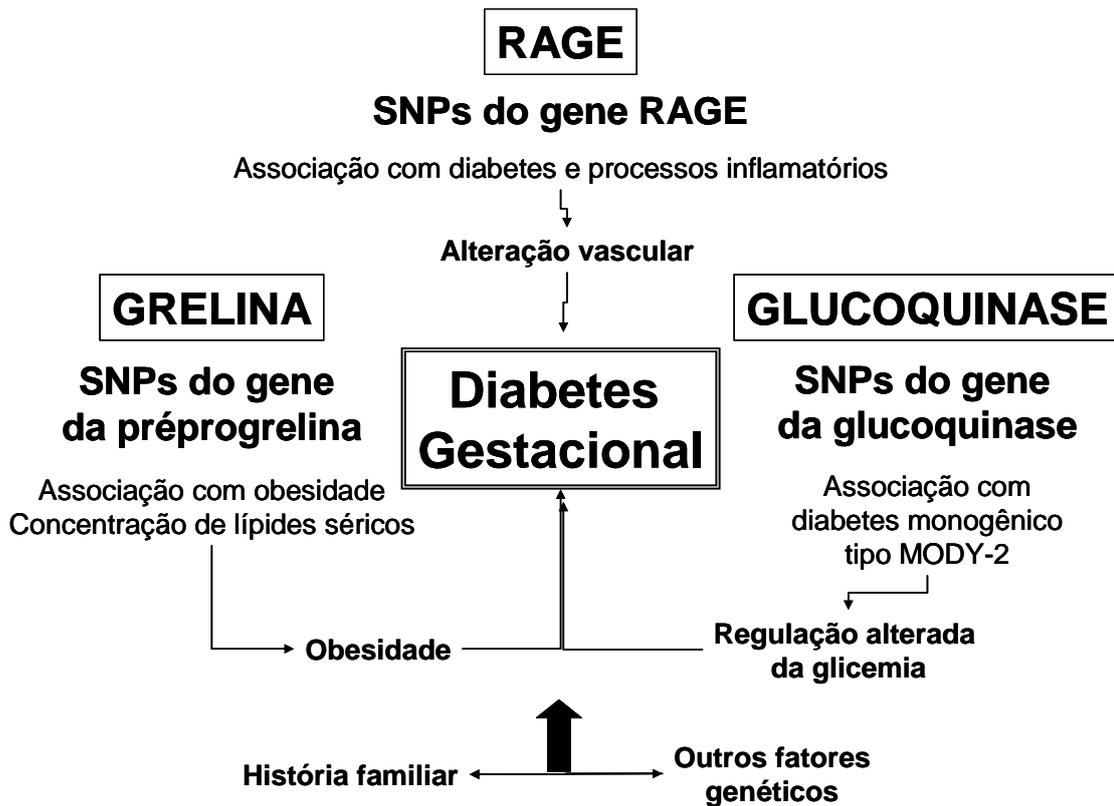


FIGURA 7- Hipóteses para associar os genes em estudo com o diabetes gestacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 565.102.08.06 e CAAE: 0135.0.208.091-08 (Anexo 1), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o Registro 97/2008.

4.1 Amostra

Foram obtidas 750 amostras de sangue periférico, coletado com EDTAK₃ (Vacutainer, BD). Destas, 150 amostras provieram de pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional e 600 amostras de gestantes saudáveis e sem diabetes, utilizadas como grupo controle. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) coordenado pelas Doutoradas Rosângela R. Réa e Ana Cristina Ravazzani. As pacientes concordaram em participar do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, anexo 2). O anexo 3 mostra a planilha utilizada na coleta de dados antropométricos, clínicos e laboratoriais. As amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba.

4.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

A amostra em estudo foi subdividida em dois grupos designados como: grupo controle e grupo de diabetes gestacional (DMG). Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos estão descritos abaixo e estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009). O fluxograma apresentado na Figura 1 (Item 3.4.1) resume os critérios utilizados.

- Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): Gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glucose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas à dose de glucose.
- Grupo Controle para Diabetes Gestacional: Gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL.

As amostras de sangue e soro das pacientes foram coletadas, durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante, não tendo sido necessária coleta específica para este projeto. O sistema informatizado do Laboratório Municipal de Curitiba não contempla informações de etnia dos pacientes, por esse motivo esta informação não pode ser analisada para o grupo controle.

A Figura 8 sumariza a classificação da amostra.

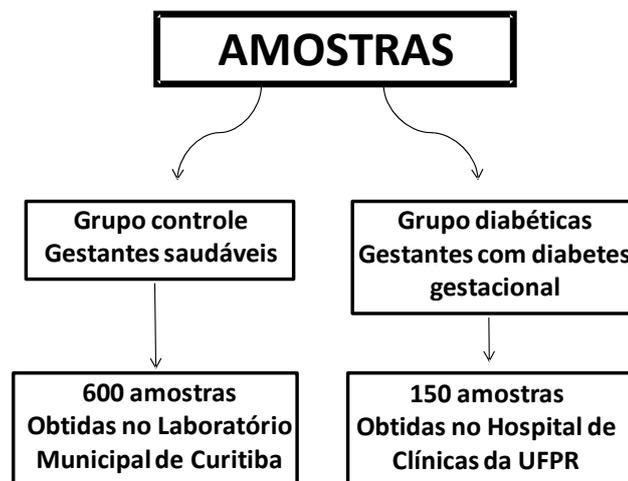


Figura 8 – Fluxograma para caracterização dos grupos em estudo.

Os critérios adotados para caracterizar hipertensão, tabagismo, uso de insulina e macrosomia no recém-nato estão descritos a seguir. Os critérios adotados para caracterizar a hipertensão são aqueles contemplados na V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009; que caracteriza hipertensão arterial quando a pressão arterial sistólica é $> 130\text{mmHg}$ e a pressão arterial diastólica é $> 80\text{mmHg}$ ou há uso de agentes hipertensivos. Foram

utilizados os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998), para definição de fumante. Fumante é aquele que fumou mais de 100 cigarros na vida e fuma atualmente; ex-fumante quem fumou mais de 100 cigarros na vida e deixou de fumar há pelo menos um dia e não fumantes são os que nunca fumaram, os que só experimentaram e os que fumaram menos de 100 cigarros na vida (WHO, 2009). Pacientes em uso de insulina foram àquelas em que o controle da dieta não foi suficiente para reduzir os níveis glicêmicos, a glicemia de jejum permaneceu superior a 95 mg/dL e a pós prandial superior a 130 mg/dL (SBD, 2009). Os recém-natos macrossômicos foram aqueles que ao nascer apresentaram peso superior a 4,00kg (ZHANG *et al.*, 2008).

Pacientes que apresentaram insuficiência renal e doença cardiovascular não foram incluídas na amostra.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Amostra para as análises bioquímicas

As amostras de sangue coletadas sem anticoagulante, em tubo seco com gel separador, foram centrifugadas por 10 minutos a 3200 x g (centrífuga 1420 Eppendorf). Após centrifugação o soro foi separado em alíquotas e mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas (0,82% do total) foram excluídas de todos os ensaios.

4.2.2 Amostra para análise do perfil lipídico

Uma sub-amostra (item 4.2.1), compreendendo 628 gestantes, foi utilizada para as análises do perfil lipídico. Esta sub-amostra foi resultante do pareamento entre os grupos controle e DMG por idade, fator que afeta o perfil lipídico nas comparações.

4.2.3 Quantificação dos parâmetros bioquímicos

As quantificações em soro dos analitos em estudo foram realizadas em sistema automatizado Architect (Abbott), com calibradores e controles Trulab. Os princípios dos métodos e reagentes utilizados estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5- PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Dosagem	Princípio metodológico	Reagente utilizado
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico (TBHB).	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.
Albumina	Reação com verde de bromocresol	
Colesterol total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	
Creatinina	Picrato alcalino cinético	Biosys Ltda.
HDL - colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	Labtest Diagnóstica S/A.
LDL - colesterol*	Calculado pela equação de Friedewald	IV Diretrizes Brasileiras
Colesterol não – HDL	Cálculo: Colesterol – HDL-C	
Proteínas Totais	Reação do Biureto	
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase com reação de Trinder.	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Uréia	Ensaio cinético com urease, glutamato desidrogenase (GLD), nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH).	Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.

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

Os índices de risco para doença cardiovascular, razão colesterol total/HDL-C, razão LDL-C/HDL-C e log(TG/HDL-C) também foram calculados e avaliados (DOBIASOVA *et al.*, 1998).

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

4.3.1 Variabilidade genética em estudo

A Tabela 6 sumariza os genes e a variabilidade genética estudada.

TABELA 6- GENES E VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESTUDO.

Cromossomo	Genes (abreviatura)	OMIM*	Variações genéticas	Localização no gene	dbrs**
6p21.3	<i>RAGE</i> (AGER)	600214	-429T>C -374T>A 63Del(-407 a -345bp) g.555G>A (G82S)	Promotor Promotor Promotor Exon 3	rs1800625 rs1800624 ----- rs 2070600
3q25-26	Preprorelina (GHRL)	605353	g.346G>A (R51Q) g.408C>A (L72M)	Exon 2 Exon 2	rs34911341 rs696217
7p15.3-15.1	Glucocinase (GCK)	138079	-30G>A	Promotor	rs1799884

*OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&cmd=search&term>

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

4.3.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico, das amostras de sangue periférico foi extraído a partir de leucócitos pelo método de *salting out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991), com modificações (Anexo 4), ou com o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art 28-9042-65).

4.3.3 Quantificação do DNA genômico

Após extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Witter e Kusukawa (WITTEWER e KUSUKAWA, 2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra- pura e quantificadas por espectrofotometria em 260 nm (Bio Photometer, Eppendorf). O cálculo da concentração foi realizado pela equação:

$$\text{Concentração em ng/}\mu\text{L de DNA (fita dupla)} = A_{260} \times 50 \times \text{diluição}$$

As amostras com concentração de DNA superiores a 100 ng/ μ L foram consideradas adequadas.

A pureza da amostra do DNA foi estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,8 e 2,0 foram considerados adequados (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Amostras que não apresentaram resultados satisfatórios, com a relação A_{260}/A_{280} , sendo inferior a 1,8 ou superior a 2,0, e concentrações de DNA abaixo de 100 ng/ μ L, foram submetidas a uma nova extração.

Todas as amostras de DNA foram normalizadas para a concentração de 100 ng/ μ L por diluição com água-ultra pura estéril e mantidas em freezer a -20°C até o momento da análise.

4.3.4 Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Eppendorf Gradient (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados em relação à quantidade e qualidade por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-hidroxi-metil-aminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2 μ L do produto de PCR acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens foram capturadas e foto documentadas com câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP).

Os fragmentos de DNA oriundos das reações de PCR-RFLP foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1 ou 19:1) em cuba miniProtean 3, BioRad (100x75x0,75mm). Na tabela 7 estão descritos o preparo dos géis empregados nas reações e as condições de ensaio.

TABELA 7- PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE PCR-RFLP.

	Gene <i>RAGE</i>	Gene da preprogrelina	Gene da glucoquinase
Reagentes	<i>Gel a 10%</i>	<i>Gel a 8%</i>	<i>Gel a 10%*</i>
Solução a 40% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 (GE, HealthCare)	1,66 mL	1,0 mL	1,66 mL
TBE 5X	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Água ultra-pura	<i>qsp</i> 5 mL (2,34 mL)	<i>qsp</i> 5 mL (3,0 mL)	<i>qsp</i> 5 mL (2,34 mL)
Persulfato de amônio 10% p/v	0,040 mL	0,040 mL	0,040 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL	0,005 mL
Condições de ensaio	<i>variáveis</i>	<i>variáveis</i>	<i>variáveis</i>
<i>Pré-corrída</i>	30 min, 150V	30 min, 150V	30 min, 150V
<i>Tampão de corrida</i>	TBE 1,0X	TBE 1,0X	TBE 1,0X
<i>Corrente</i>	150V (16mA/gel)	150V (15mA/gel)	150V (16mA/gel)
<i>Temperatura</i>	Geladeira (4-8 °C)	Geladeira (4-8 °C)	Geladeira (4-8 °C)
<i>Tempo</i>	~1h30min	~1hora	~1h30min

Géis (5mL) para a cuba miniProtean 3, BioRad (100x75x0,75mm).

*Para o ensaio de PCR-RFLP do gene da glucoquinase, foi utilizada a acrilamida/bisacrilamida 19:1.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

4.3.5 Variabilidade do gene *RAGE*

4.3.5.1 Reação de PCR para a região promotora do gene *RAGE*

Para a identificação das regiões polimórficas do promotor do gene *RAGE*, foi otimizada a amplificação da região -590 à -246 pb do promotor do gene *RAGE* utilizando oligonucleotídeos iniciadores (Alpha-DNA LTDA) descritos por HUDSON *et al.*, 2001 que geram um amplicon de 344 bp. A Tabela 8 mostra as condições otimizadas de ensaio para esta amplificação.

TABELA 8- CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*.

Reagentes	Região Promotora	
Oligonucleotídeos iniciadores	Prom F: 5'- GGG GGC AGT TCT CTC CTC -3' Prom R: 5'- TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT -3'	
	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	10pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	100ng/20µL	1,0µL
Tampão Taq 10X*	1X	2,0µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6µL
Água reagente estéril	----	12,8µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	4U	0,8µL
Ciclos térmicos	1 ciclo 94°C → 2min 34 ciclos: 94°C → 1min 60°C → 1min 72°C → 1min 1 ciclo: 72°C → 10min	

*Tampão Taq 10X concentrado: 200mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl.

A figura 9 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para a região promotora do gene *RAGE*.

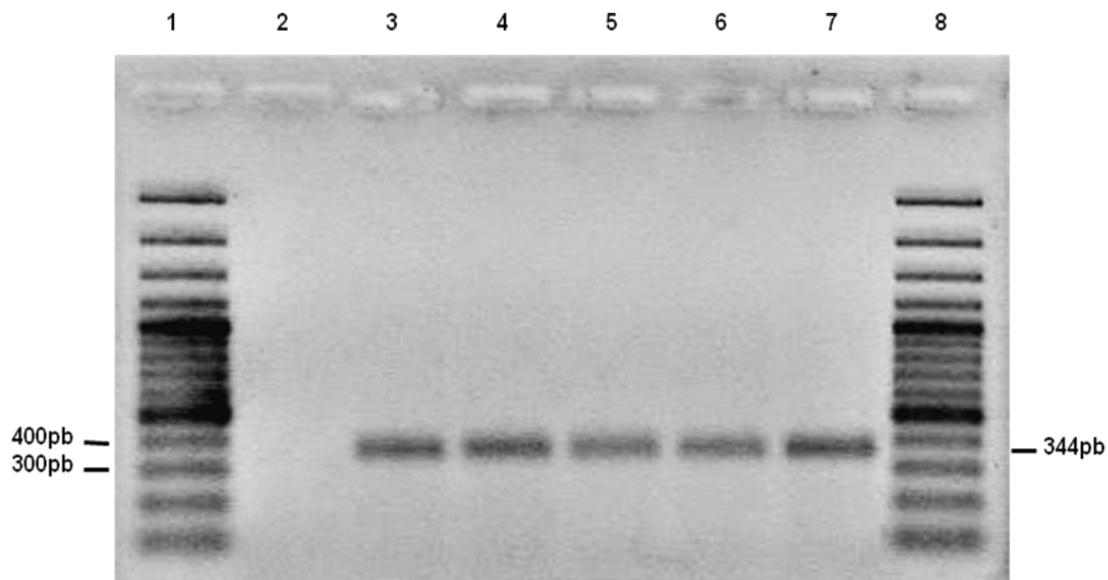


FIGURA 9- Eletroforese de produto de PCR do promotor do gene *RAGE*. Nas linhas 1 e 8 estão os marcadores de massa de 100pb; na linha 2 está o controle (branco da reação) e nas linhas 3 a 7 estão amostras amplificadas. À direita e à esquerda do gel está indicada a massa molecular do fragmento (344pb) e do marcador de massa, respectivamente.

4.3.5.2 Reação de PCR-RFLP para os polimorfismos -374T>A, -429T>C e 63Del do promotor do gene *RAGE*

A presença dos polimorfismos da região promotora do gene *RAGE* foi caracterizada através da reação de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) utilizando as enzimas de restrição *Tsp509 I* (New England BioLabs) para o polimorfismo -374T>A e *Alu I* (New England BioLabs) para o polimorfismo -429T>C. Os protocolos de ensaio estão descritos na Tabela 9.

TABELA 9- PROTOCOLOS PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE* POR PCR-RFLP.

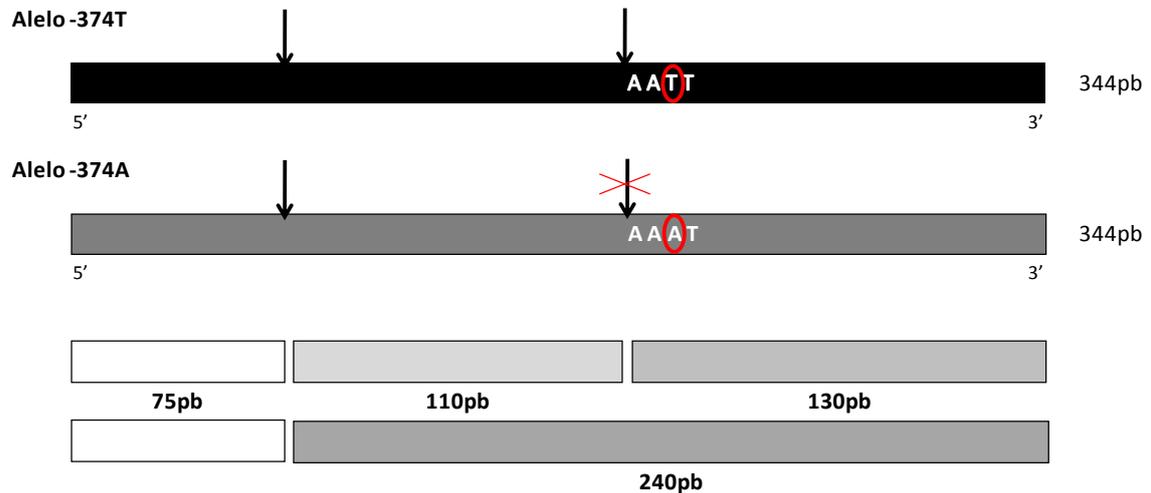
Reagentes	Polimorfismos	
	-374T>A	-429T>C
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,25μL	1,0μL
Tampão (10X concentrado)	0,5μL (1X)*	0,5μL (1X)**
Água ultra-pura estéril	3,13μL	3,4μL
Enzima de restrição (10U/μL)	0,125μL (1,25U) <i>Tsp509I</i>	0,1μL (1U) <i>AluI</i>
Volume final de reação	5,0μL	5,0μL
Temperatura de incubação	65°C	37°C
Tempo de incubação	16h	16h

*Tampão 10X NEBuffer (New England BioLabs): 100mM Bis Tris Propano-HCl; 100mM MgCl₂; 10mM ditiotretitol; pH 7,0 a 25°C.

**Tampão 10X REact 1 (Invitrogen): 500mM Tris-HCl; 100mM MgCl₂; pH 8,0 a 37°C.

As Figuras 10 e 11 mostram os mapas de restrição dos amplicons e o perfil eletroforético esperado dos polimorfismos da região promotora do gene *RAGE* com as respectivas enzimas de restrição.

a. Mapa de restrição do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene *RAGE*



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene *RAGE*

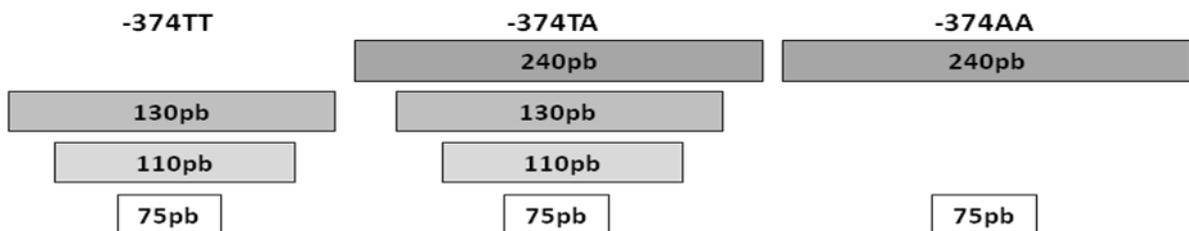
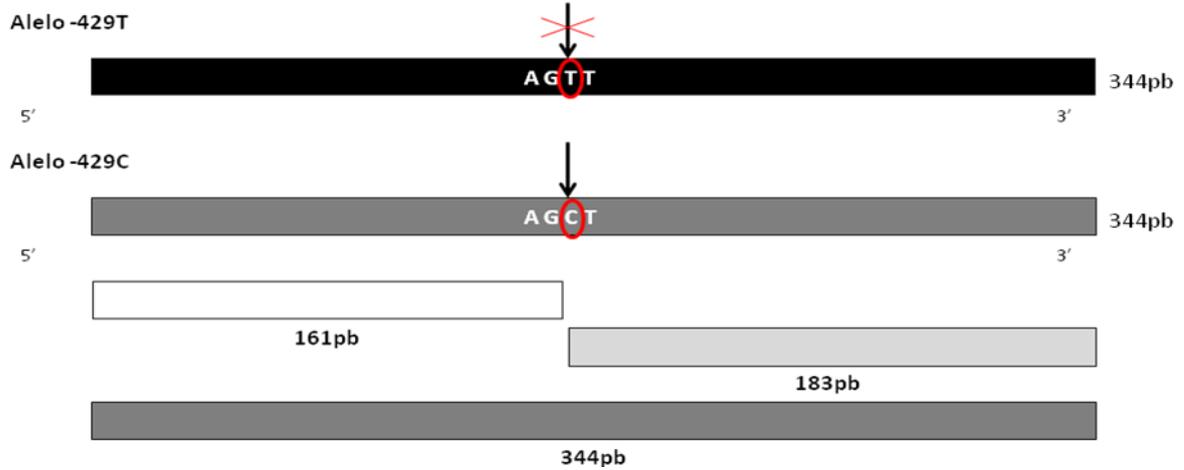


FIGURA 10- Clivagem do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene *RAGE* com a enzima de restrição *Tsp509I*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Tsp509I*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo mutado -374A. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene *RAGE*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene *RAGE*



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE*

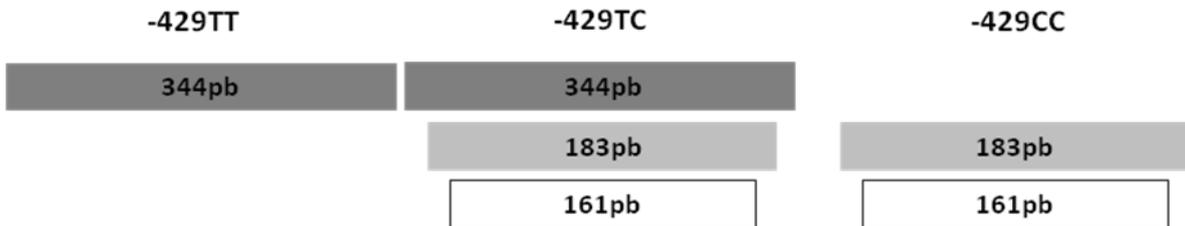


FIGURA 11- Clivagem do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene *RAGE* com a enzima de restrição *AluI*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *AluI*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo selvagem -429T. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE*.

As Figuras 12 e 13 mostram os perfis eletroforéticos típicos obtidos da PCR-RFLP para os polimorfismos do promotor do gene *RAGE*.

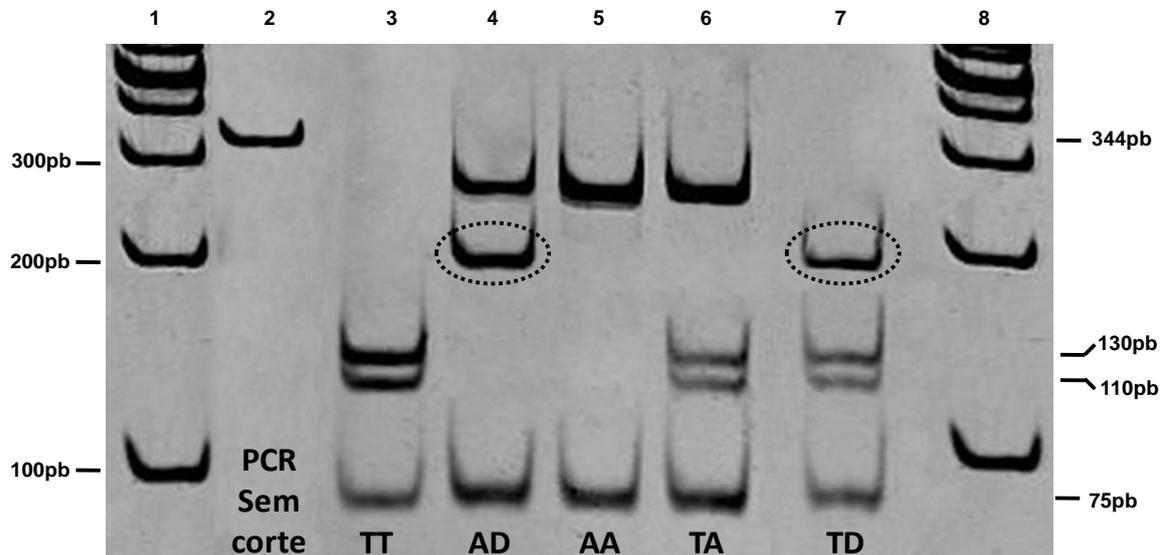


FIGURA 12- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (344pb) do promotor do gene *RAGE* com a enzima *Tsp509I*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poli-acrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). Nas linhas 1 e 8 estão o marcador de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram respectivamente um produto de PCR sem corte (antes da digestão), os perfis de restrição para os genótipos -374TT, -374AD com a deleção de 63 pares de bases, -374AA, -374TA e -374TD com a deleção de 63 pares de bases. À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos. Em destaque, circulado no gel, fragmento de DNA associado com a presença da deleção em heterozigose.

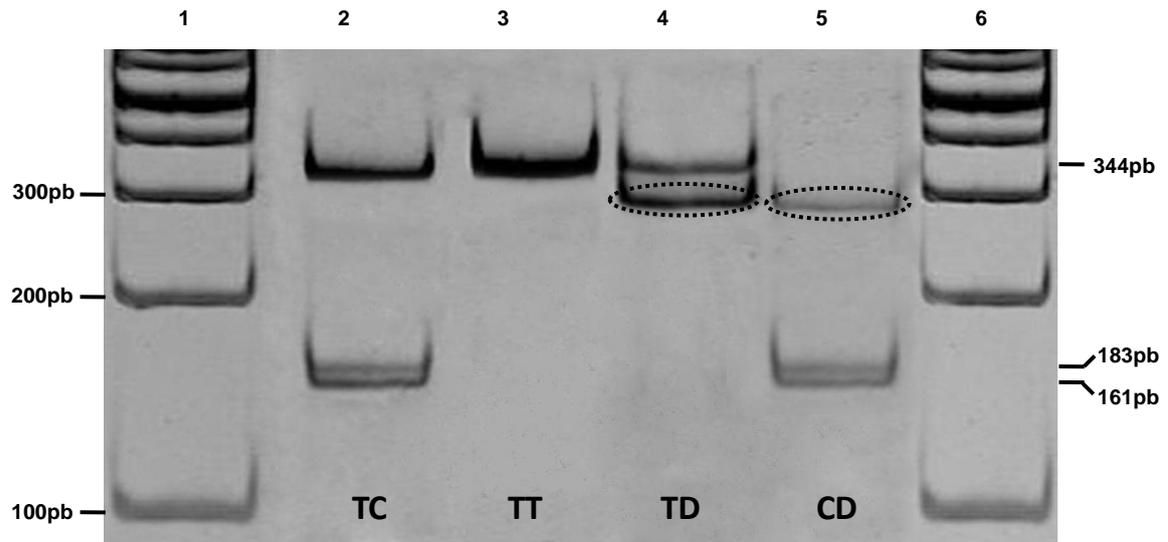


FIGURA 13- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (344pb) do promotor do gene *RAGE* com a enzima *AluI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP).

Nas linhas 1 e 6 estão os marcadores de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3, 4 e 5 mostram respectivamente os perfis de restrição para os genótipos -429TC, -429TT, -429TD com a deleção de 63 pares de bases, -429CD com a deleção de 63 pares de bases. À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos. Em destaque, circulado no gel, fragmento de DNA associado à presença da deleção em heterozigose.

A Figura 14 mostra os padrões eletroforéticos típicos encontrados para a deleção de 63pb da região promotora do gene *RAGE*, na PCR e na PCR-RFLP.

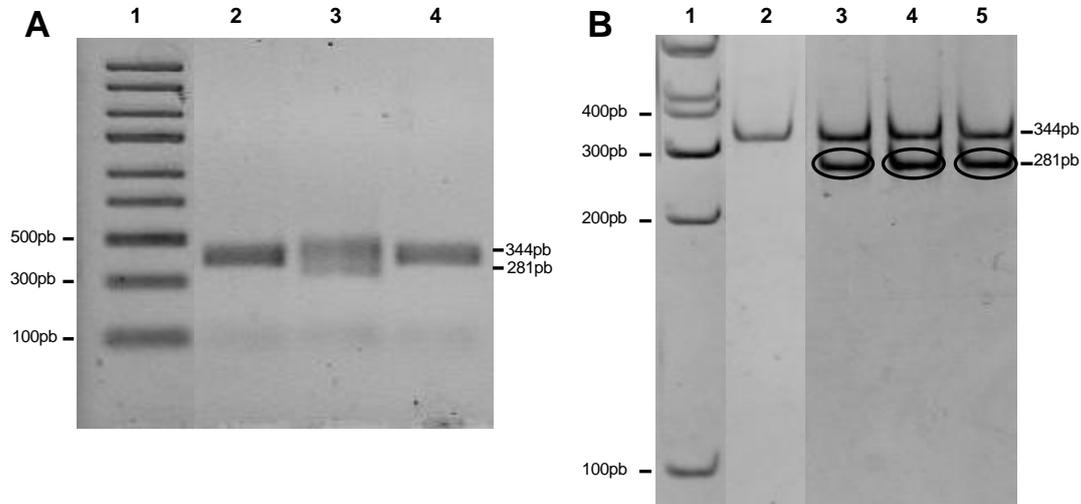


FIGURA 14- Perfil eletroforético dos produtos de PCR (344pb) do promotor do gene *RAGE* para a deleção de 63pb. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% (A) ou gel de poliacrilamida 10% (B) em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP).

A: encontra-se o perfil eletroforético típico da reação de PCR. Na linha 1 está o marcador de massa molecular de 100pb. As linhas 2 e 4 mostram produtos de PCR sem deleção. A linha 3 mostra o perfil eletroforético de uma amostra com 63Del em heterozigose. A direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos.

B (gel montado): encontra-se o perfil eletroforético típico da reação de PCR-RFLP. Na linha 1 está o marcador de massa molecular de 100pb. Na linha 2 está um produto de PCR sem corte (antes da digestão). As linhas 3, 4 e 5 mostram o perfil eletroforético de uma amostra com 63Del em heterozigose, circulada no gel. À direita do gel está a massa molecular dos fragmentos obtidos.

4.3.5.3 Reação de PCR para o exon 3 do gene *RAGE*

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Kanková *et al.*, 2001 e sintetizados pela Invitrogen. Estes permitem a amplificação da região compreendida entre os nucleotídeos 7007 e 7402, (Sugaya *et al.*, 1994) e correspondente ao íntron 2, exon 3 e parte do íntron 3, gerando um produto de PCR

de 397pb. A Tabela 10 mostra as condições otimizadas de ensaio para esta amplificação.

TABELA 10- CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO EXON 3 DO GENE *RAGE*.

Reagentes	Exon 3	
Oligonucleotídeos iniciadores	Prom F: 5'- GTA AGC GGG GCT CCT GTT GCA -3' Prom R: 5'- GGC CAA GGC TGG GGT TGA AGG -3'	
	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	10pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	100ng/20µL	1,0µL
Tampão Taq 10X*	1X	2,0µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6µL
Água reagente estéril	----	12,8µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	4U	0,8µL
Ciclos térmicos	1 ciclo 94°C → 3min 34 ciclos: 94°C → 40s 68°C → 40s 72°C → 45s 1 ciclo: 72°C → 10min	

*Tampão Taq 10X concentrado: 200mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl.

A figura 15 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para o exon 3 do gene *RAGE*.

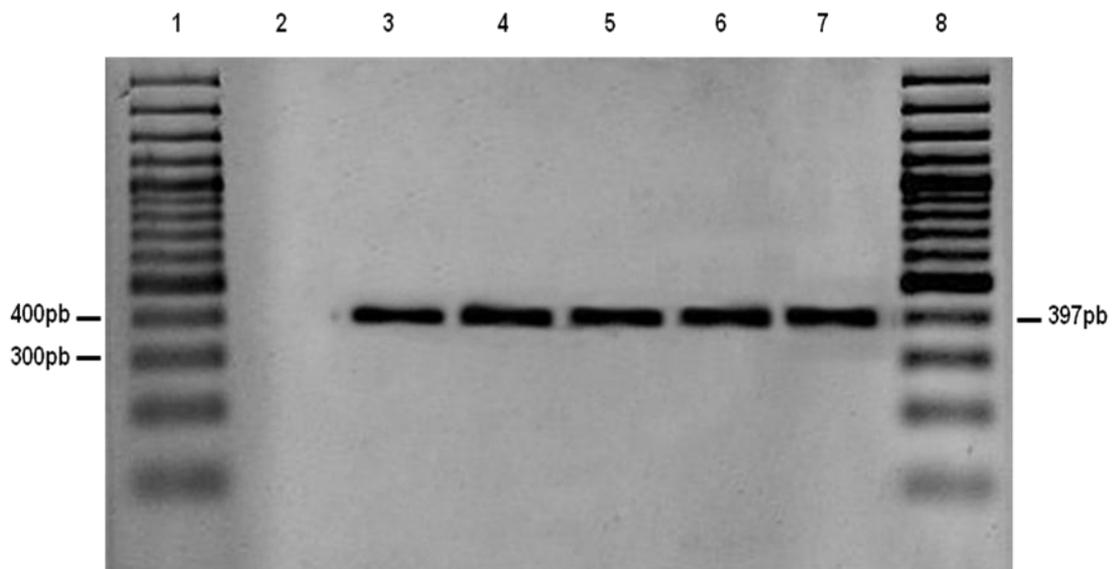


FIGURA 15- Eletroforese de produto de PCR do exon 3 do gene *RAGE*.

Nas linhas 1 e 8 estão o marcador de massa de 100pb; na linha 2 está o controle (branco da reação) e nas linhas 3 a 7 estão amostras amplificadas. À direita do gel está a massa molecular do fragmento (397pb).

4.3.5.4 Reação de PCR-RFLP para exon 3 do gene *RAGE*

A presença do polimorfismo no exon 3 do gene *RAGE* foi caracterizada através da reação de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) utilizando a enzima de restrição *Alu* I (New England BioLabs). O protocolo de restrição está na Tabela 11.

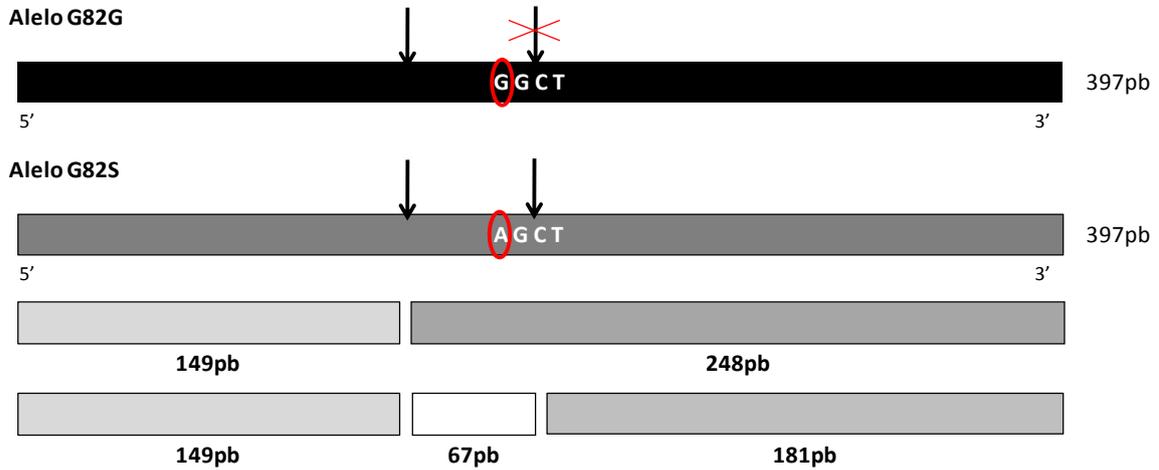
TABELA 11- PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO G82S DO EXON 3 DO GENE *RAGE* POR PCR-RFLP.

	Polimorfismo
Reagentes	G82S
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,25μL
Tampão (10X concentrado)	0,5μL (1X)*
Água ultra-pura estéril	3,4μL
Enzima de restrição (10U/μL)	0,1μL (1U) <i>Alu</i> I
Temperatura de incubação	37°C
Tempo de incubação	16h

*Tampão 10X REact 1 (Invitrogen): 500mM Tris-HCl; 100mM MgCl₂; pH 8,0 a 37°C

A Figura 16 mostra o mapa de restrição e o perfil eletroforético esperado do polimorfismo G82S do exon 3 do gene *RAGE* com a enzima de restrição.

a. Mapa de restrição do produto de PCR do exon 3 (397pb) do gene *RAGE*



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo G82S do exon 3 do gene *RAGE*

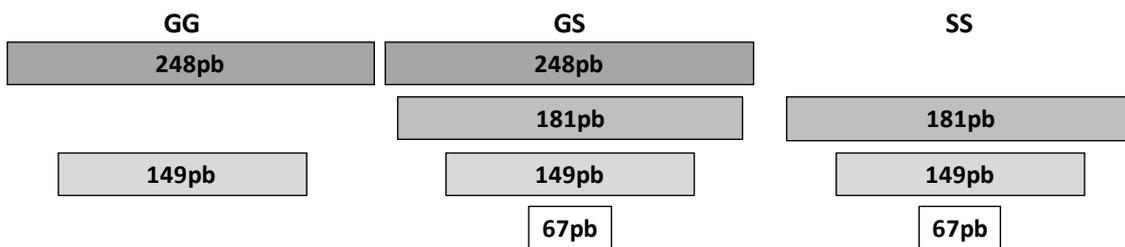


FIGURA 16- Clivagem do produto de PCR do exon 3 (397pb) do gene *RAGE* com a enzima de restrição *AluI*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *AluI*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) na região do alelo selvagem G82G. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo G82S do exon 3 do gene *RAGE*.

A Figura 17 mostra um gel típico de PCR-RFLP do exon 3 do gene *RAGE* com a enzima *AluI* para o polimorfismo G82S.

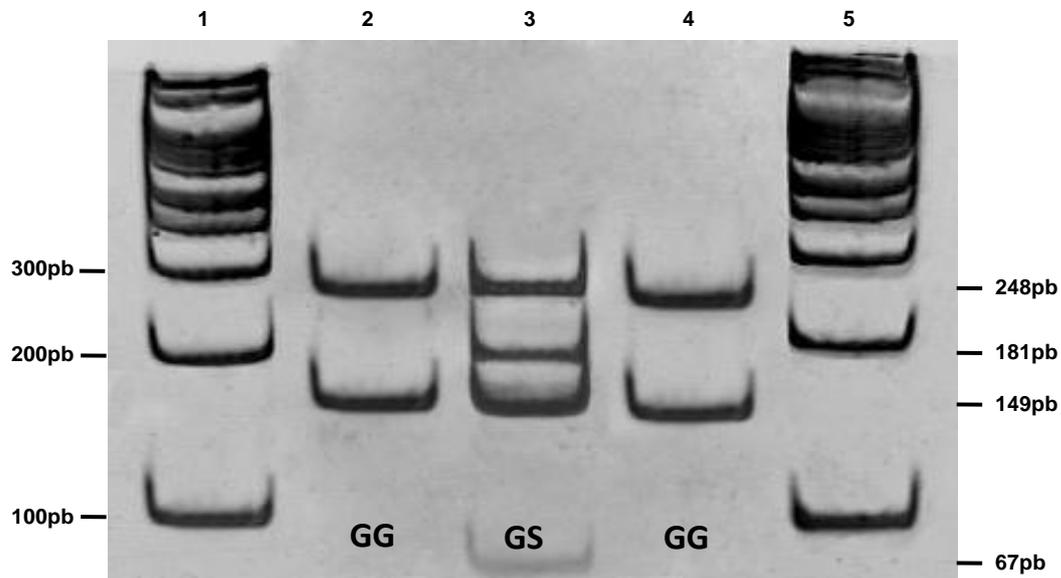


FIGURA 17- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (397pb) do exon 3 do gene *RAGE* com a enzima *AluI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP).

Nas linhas 1 e 5 estão o marcador de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3 e 4 mostram respectivamente os perfis de restrição para os genótipos G82G (GG), G82S (GA) e G82G (GG). À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos.

4.3.6 Variabilidade do gene da preprorelina

4.3.6.1 Reação de PCR para a região do gene da preprorelina

Foi otimizada a amplificação do gene da preprorelina compreendendo os exons 1 e 2, que condicionam o polipeptídeo da grelina na íntegra. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados foram descritos por UKKOLA *et al.*, 2002 e produzem um amplicon de 618 pb. A Tabela 12 mostra as condições otimizadas para produção deste amplicon.

TABELA 12- CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE DA PREPROGRELINA.

Reagentes	Região Promotora	
Oligonucleotídeos iniciadores	GHRL F: 5'- GCT GGG CTC CTA CCT GAG C -3' GHRL R: 5'- GGA CCC TGT TCA CTG CCA C -3'	
	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	10pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	100ng/20µL	1,0µL
Tampão Taq 10X*	1X	2,0µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6µL
Água reagente estéril	----	13,4µL
Taq DNA polimerase (5U/µL) (Taq <i>Platinum</i>)	1U	0,2µL
Ciclos térmicos	1 ciclo 94°C → 3min 34 ciclos: 94°C → 1min 69°C → 1min 72°C → 1:30 min 1 ciclo: 72°C → 10min	

*Tampão Taq 10X concentrado: 200mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl

A figura 18 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para o gene da preprorelina.

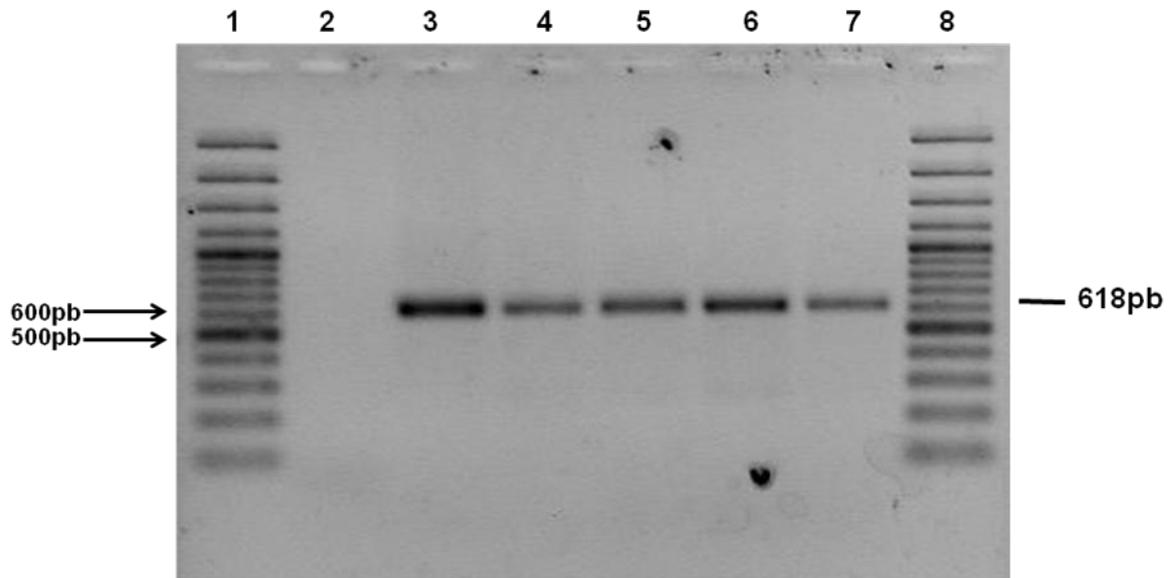


FIGURA 18- Eletroforese de produto de PCR do gene da preprorelina. Nas linhas 1 e 8 estão os marcadores de massa de 100pb; na linha 2 está o controle (branco da reação) e nas linhas 3 a 7 estão amostras amplificadas. Ao lado do gel está a massa molecular dos fragmentos (618pb) e do marcador de massa.

4.3.6.2 Detecção molecular dos polimorfismos 346G>A (R51Q) e 408C>A (L72M) do gene da preprorelina por PCR-RFLP

Os polimorfismos do exon 2 do gene da preprorelina foram analisados por PCR-RFLP utilizando a enzima *Sac* I (Fermentas) para a detecção do polimorfismo R51Q e a enzima *Bse*NI (Fermentas) para a detecção do polimorfismo L72M. Na tabela 13 está descrito o protocolo utilizado para a PCR-RFLP do gene da preprorelina.

TABELA 13- PROTOCOLO PARA A DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA PREPROGRELINA POR PCR-RFLP.

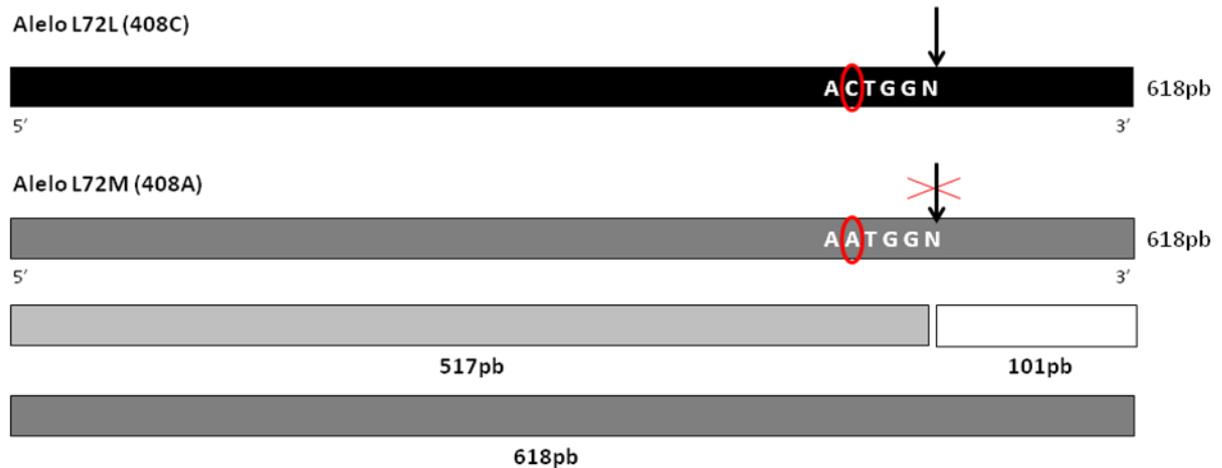
Reagentes	Polimorfismos	
	R51Q	L72M
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,25μL	1,25μL
Tampão (10X concentrado)	0,5μL (1X)*	0,5μL (1X)**
Água ultra-pura estéril	3,13μL	3,4μL
Enzima de restrição (10U/μL)	0,125μL (1,25U) <i>SacI</i>	0,125μL (1,25U) <i>BseNI</i>
Volume final de reação	5,0μL	5,0μL
Temperatura de incubação	37°C	65°C
Tempo de incubação	16h	16h

*Tampão Buffer *SacI* (Fermentas): 10mM Tris-HCl (pH 7.4 a 25°C), 100mM KCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,2mg/mL BSA e 50% glicerol.

**Tampão Buffer B (Fermentas): 10mM Tris -HCl (pH 7,5); 10mM MgCl₂; 0,1mg/mL BSA.

As Figuras 19 e 20 mostram os mapas de restrição e o perfil eletroforético esperado dos polimorfismos em estudo com as respectivas enzimas de restrição.

a. Mapa de restrição do produto de PCR do gene da preprogrelina (618pb)



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo L72M do gene da preprogrelina

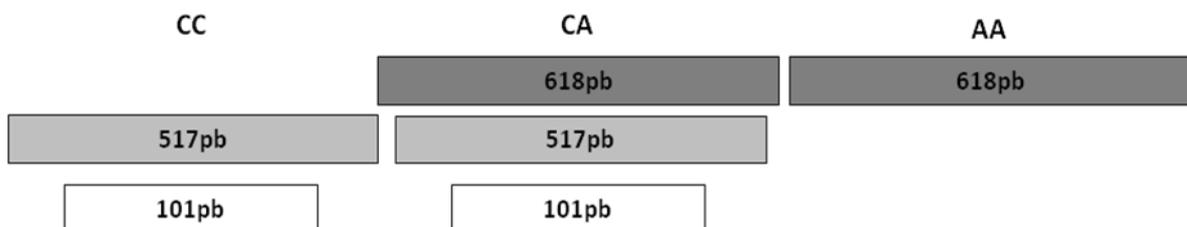
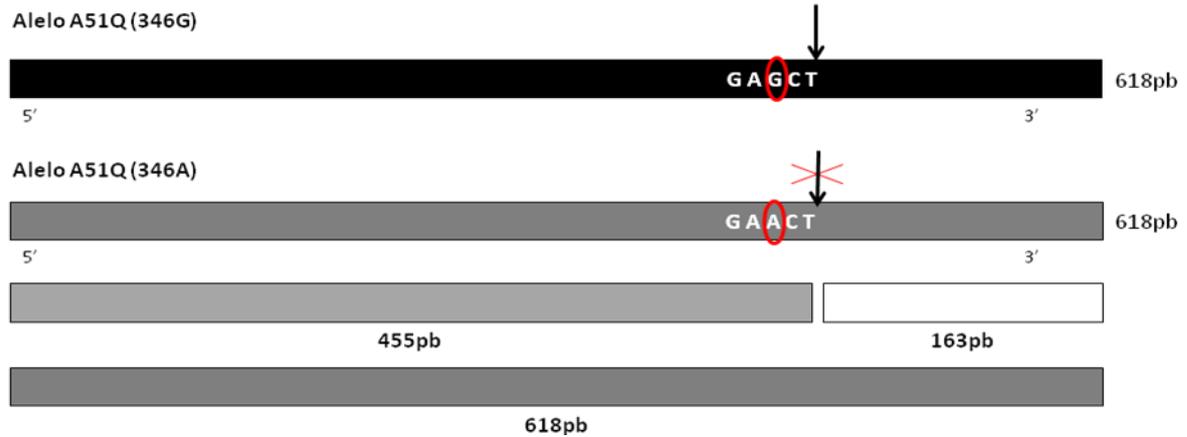


FIGURA 19- Clivagem do produto de PCR do polimorfismo L72M (618pb) do gene da preprogrelina com a enzima de restrição *BseNI*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *BseNI*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo mutado L72M. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo L72M do gene da preprogrelina.

a. Mapa de restrição do produto de PCR do gene da preprorelina (618pb)



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo R51Q do gene da preprorelina

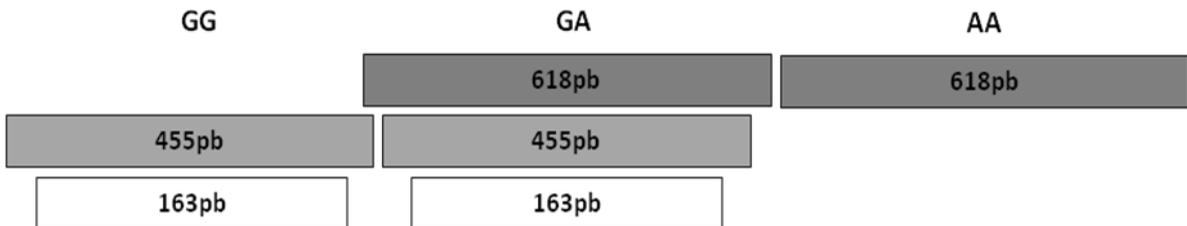


FIGURA 20- Clivagem do produto de PCR do polimorfismo R51Q (618pb) do gene da preprorelina com a enzima de restrição *SacI*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *SacI*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) na região do alelo mutado R51Q. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo R51Q do gene da preprorelina.

A Figura 21 mostra um gel típico de PCR-RFLP do gene da preprorelina com a enzima *SacI* para o polimorfismo R51Q.

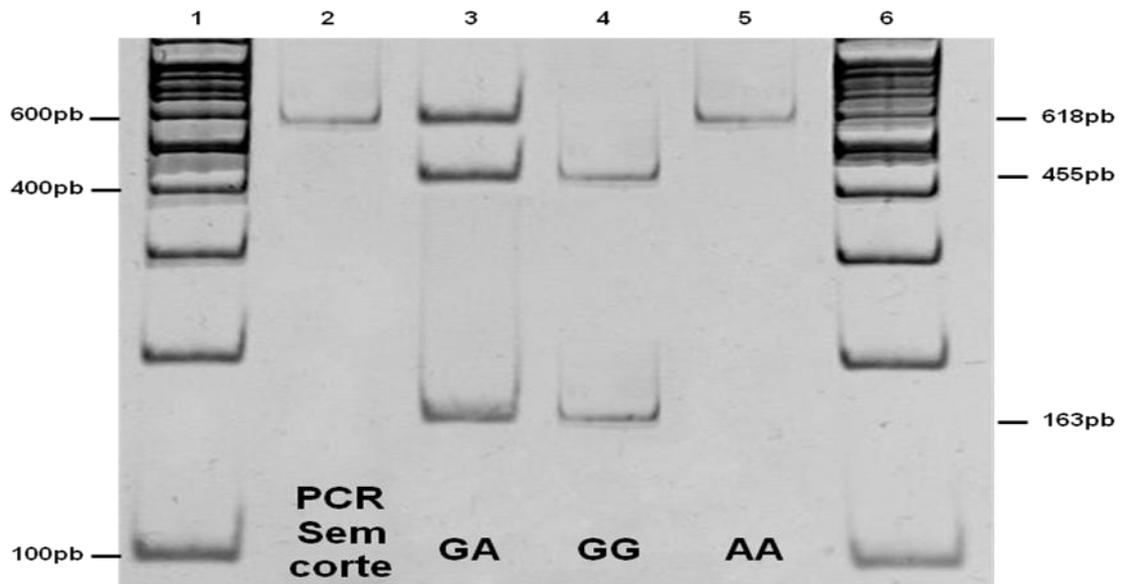


FIGURA 21- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (618pb) do gene da preprorelina com a enzima *SacI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 8% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). Nas linhas 1 e 6 estão o marcador de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3, 4 e 5 mostram respectivamente um produto de PCR sem corte, os perfis de restrição para os genótipos GA, GG e AA. A direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos.

A Figura 22 mostra um gel típico de PCR-RFLP do gene da preprogrelina com a enzima *BseNI* para o polimorfismo L72M.

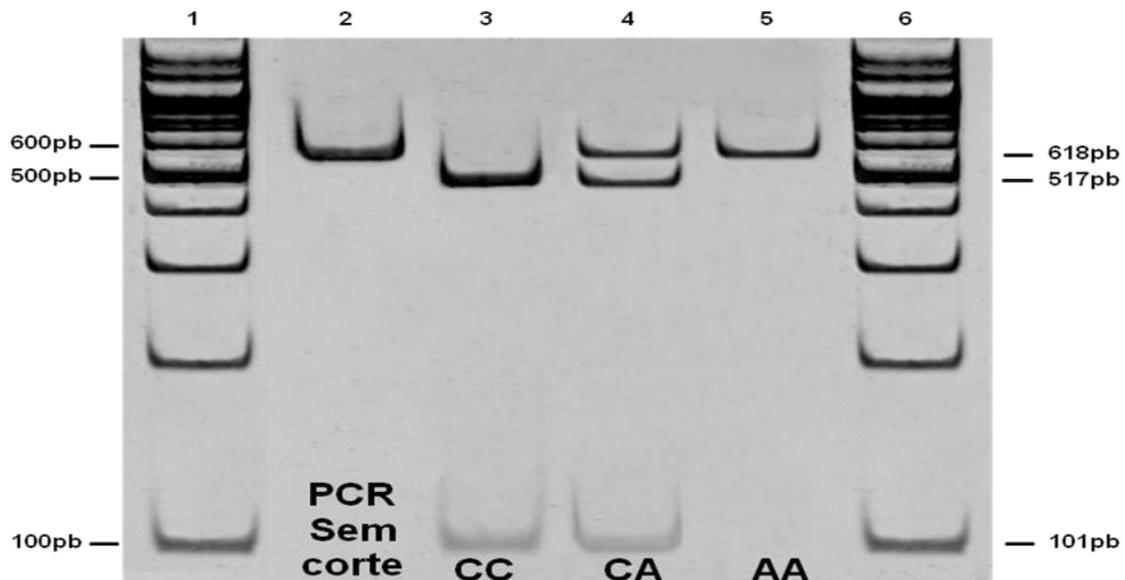


FIGURA 22- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (618pb) do gene da preprogrelina com a enzima *BseNI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 8% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). Nas linhas 1 e 6 estão os marcadores de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3, 4 e 5 mostram respectivamente um produto de PCR sem corte, os perfis de restrição para os genótipos CC, CA e AA. À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos.

4.3.7 Variabilidade do gene da glucoquinase

4.3.7.1 Reação de PCR para o promotor pancreático do gene da glucoquinase

Para a amplificação da região do promotor do gene da glucoquinase, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados empregando o programa Primer 3 ([Primer3: www.primer tool](http://www.primer3.org/)) resultando em um amplicon de 251 pares de base (251 pb).

A análise *in silico* dos oligonucleotídeos foi realizada com o programa [NetPrimer](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/), disponível na Internet (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) sendo realizadas as análises de temperatura de anelamento (T_m), propriedades

termodinâmicas e a formação de grampos e dímeros de iniciadores. Os resultados obtidos indicaram temperatura de anelamento de aproximadamente 65°C para o ensaio de PCR e baixa possibilidade do aparecimento de grampos e dímeros de iniciadores. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram alinhadas com as sequências do genoma humano depositadas no banco de genes, utilizando-se o programa Blast N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). As análises mostraram que os oligonucleotídeos iniciadores propostos alinham com as regiões do promotor pancreático da glucoquinase, sugerindo especificidade. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo foram sintetizados pela IDT.

A tabela 14 mostra as condições de otimização deste ensaio.

TABELA 14- CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO PROMOTOR DO GENE DA GLUCOQUINASE.

Reagentes	Região Promotora	
Oligonucleotídeos iniciadores	GK_PROM F: 5'- GTGACAAGGCGATTGAGTGG -3' GK_PROM R: 5'- TCACATCCTAGCCTGCTTCC -3'	
	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	10pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	100ng/20µL	1,0µL
Tampão Taq 10X*	1X	2,0µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6µL
Água reagente estéril	----	12,8µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	4U	0,8µL
Ciclos térmicos	1 ciclo 94°C → 3min 34 ciclos: 94°C → 1min 65°C → 1min 72°C → 1min 1 ciclo: 72°C → 10min	

*Tampão Taq 10X concentrado: 200mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl

A figura 23 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para o gene da glucoquinase.

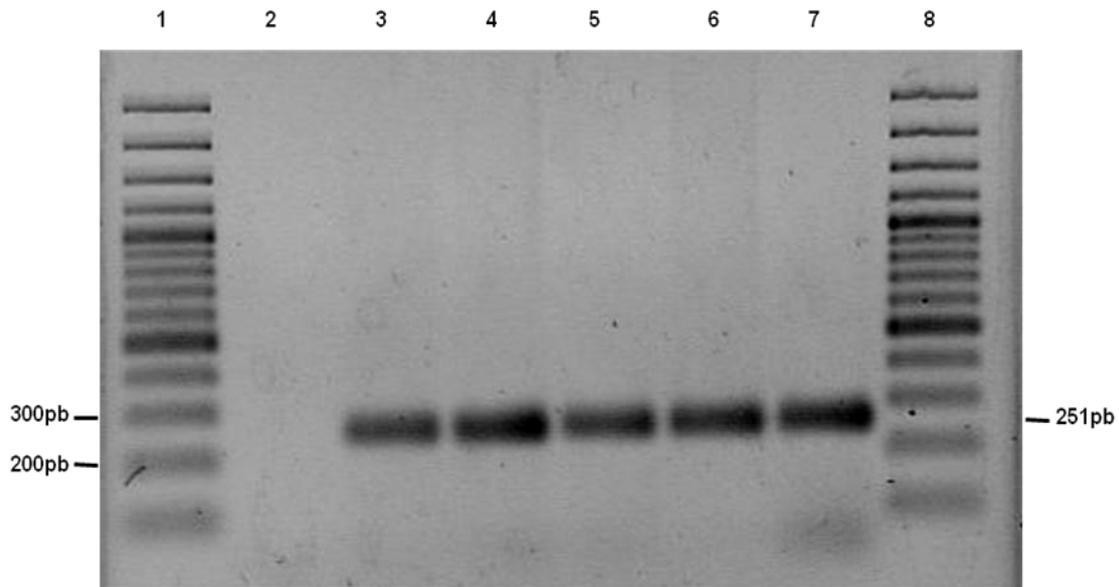


FIGURA 23- Eletroforese de produto de PCR do promotor do gene da Glucoquinase.

Nas linhas 1 e 8 estão os marcadores de massa de 100pb; na linha 2 está o controle (branco da reação) e nas linhas 3 a 7 estão amostras amplificadas. À direita do gel está a massa molecular do fragmento (251pb).

4.3.7.2 Detecção do polimorfismo -30G>A do promotor pancreático do gene da glucoquinase por PCR-RFLP

O polimorfismo -30G>A da região do promotor pancreático do gene da glucoquinase foi analisado através de PCR-RFLP utilizando a enzima *Mwo* I (New England BioLabs). Na tabela 15 está descrito o protocolo utilizado para a análise.

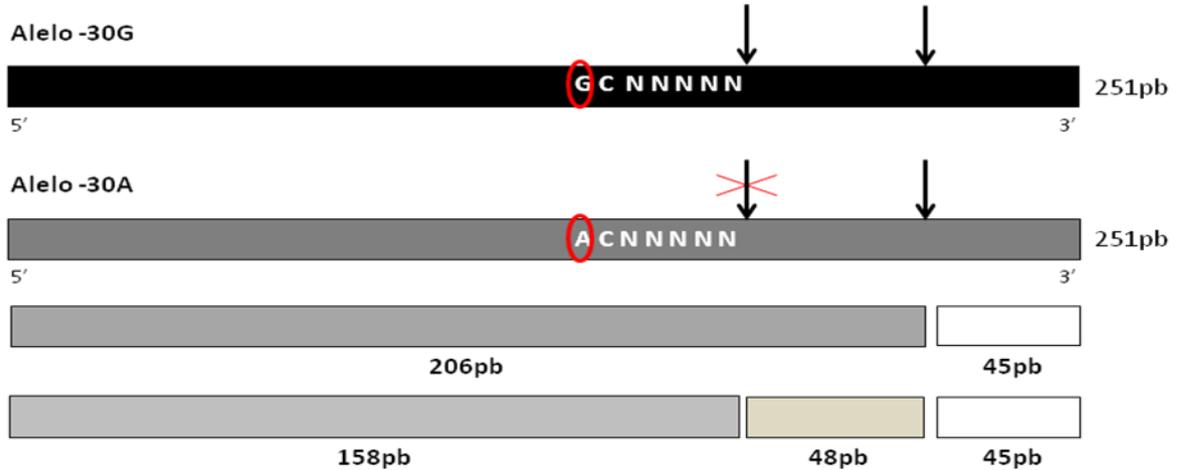
TABELA 15- PROTOCOLO PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE POR PCR-RFLP.

	Polimorfismo
Reagentes	-30G>A
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,25μL
Tampão (10X concentrado)	0,5μL (1X)*
Água ultra-pura estéril	3,13μL
Enzima de restrição (10U/μL)	0,125μL (1,25U) <i>Tsp509I</i>
Volume final de reação	5,0μL
Temperatura de incubação	65°C
Tempo de incubação	16h

*Tampão 10X NEBuffer 3 (NewEngland BioLabs): 100mM NaCl; 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂; 1mM ditrioseitol; pH 7,9 a 25°C.

A Figura 24 mostra o mapa de restrição e o perfil eletroforético esperado do polimorfismo em estudo com a respectiva enzima de restrição.

a. Mapa de restrição do produto de PCR do promotor do gene da glucoquinase (251pb)



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -30G>A do promotor do gene da glucoquinase

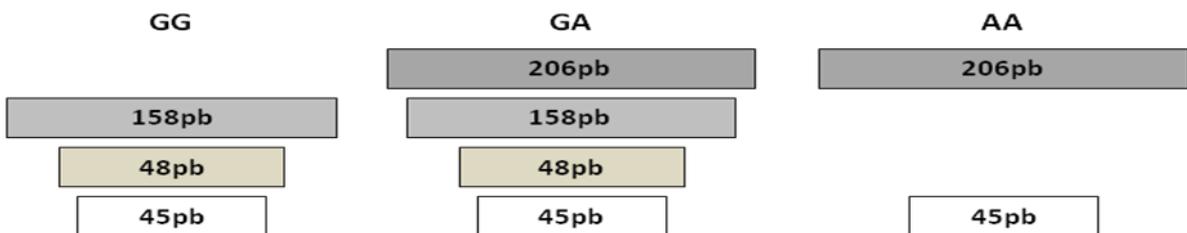


FIGURA 24- Clivagem do produto de PCR do polimorfismo -30G>A (251pb) do promotor do gene da glucoquinase com a enzima de restrição *MwoI*.

a. Mapa de restrição do produto de PCR, as setas indicam os sítios de restrição para a enzima *MwoI*. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) na região do alelo mutado -30G>A. b. Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -30G>A do promotor do gene da glucoquinase.

A Figura 25 mostra um gel típico de PCR-RFLP do amplicon contendo o promotor do gene da glucoquinase com a enzima *MwoI* para o polimorfismo -30G>A.

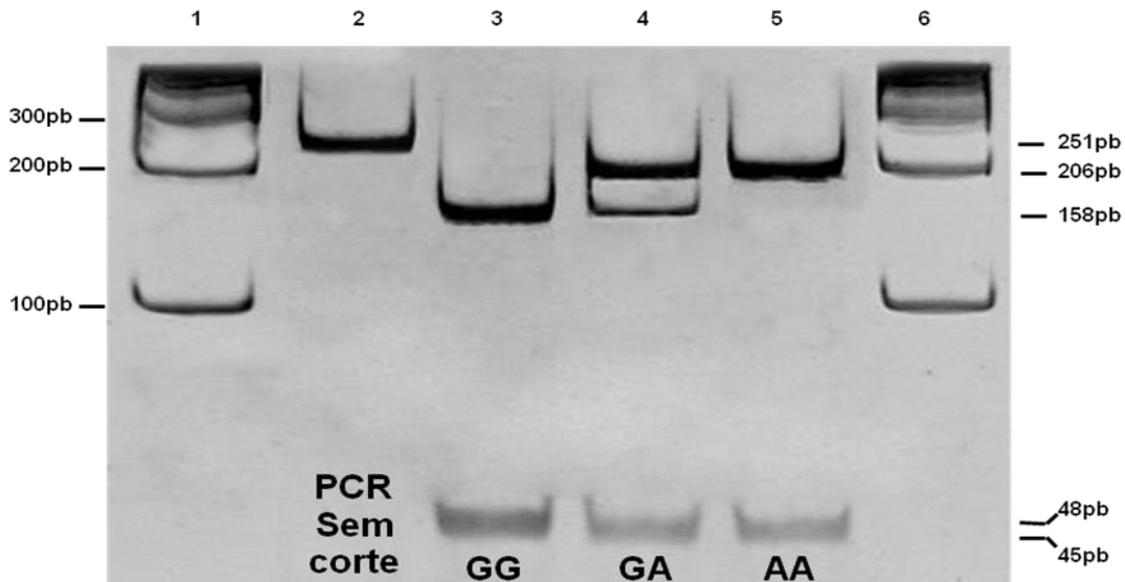


FIGURA 25- Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (251pb) do promotor do pâncreas do gene da glucoquinase com a enzima *MwoI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliácridamida (19:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). Nas linhas 1 e 6 estão o marcador de massa molecular de 100pb. As linhas 2, 3, 4 e 5 mostram, respectivamente, um produto de PCR sem corte, os perfis de restrição para os genótipos GG, GA e AA. À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos.

4.3.8 Identificação das variações genéticas por reações de sequenciamento de DNA

A caracterização dos polimorfismos detectados por PCR-RFLP foi realizada também por reação de sequenciamento dos fragmentos de DNA (amplicon) após remoção dos oligonucleotídeos iniciadores e dNTP. A reação de sequenciamento de DNA foi realizada com o kit ET terminator (GE Healthcare), que utiliza didesoxirribonucleotídeos acoplados a fluoróforos. Foram sequenciadas 40 diferentes amostras de DNA sendo 20 no sentido direto e 20 no reverso. Do total de amostras sequenciadas, aproximadamente 30% puderam ser analisadas por apresentarem boa qualidade nas sequências. Os produtos das reações foram

analisados em sequenciador automático modelo 377 (Applied Biosystems) ou MegaBACE 1000 (GE Healthcare). A Tabela 16 detalha o protocolo para a reação de sequenciamento.

TABELA 16 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.

Remoção dos oligonucleotídeos iniciadores dos produtos de PCR	
Produto de PCR (10-20 ng/μL)	5 mL
Exonuclease I*	0,33 μL
Fosfatase Alcalina de camarão**	0,66 μL
Incubação	45 min a 37°C
Inativação	20 min a 80°C
Reação de sequenciamento	
Produto de PCR livre de oligonucleotídeos (10 - 15 ng)	2 mL
Oligonucleotídeos iniciadores “F” ou “R” (10 pmol/μL)	1 mL
Água ultra-pura estéril	1,5 mL
Reagente ET***	3 mL
Ciclos/temperaturas	35 ciclos: 30 s a 94°C e 120 s a 60°C
Purificação dos produtos da reação de sequenciamento	
Reação de sequenciamento	Utilizar o volume total da reação
Água ultra-pura estéril	12 mL
Acetato de amônio 7,5M	2 mL
Etanol absoluto	65 mL
Homogeneizar e Centrifugar	20 min a 8000 x g
Retirar o excesso do etanol	
Etanol 70%	150 mL
Homogeneizar e Centrifugar	10 min a 8000 x g
Secar	
Reconstituir com água ultra pura estéril ou formamida	10 mL

*EXO I, USB, 10U/μL; **SAP, USB, 1U/μL; ***GE HealthCare

4.3.9 Análise das sequências de DNA

As sequências de DNA foram analisadas através da montagem das sequências contíguas a partir das sequências direta (F) e reversa (R) obtidas e a detecção dos polimorfismos foi realizada utilizando os programas CodonCode Aligner 3.5.4 para Windows (<http://www.codoncode.com>), BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.8.0 e Clone Manager Professional Suite 7.11. Os arquivos utilizados nas análises, em extensão “scf”, foram gerados pelo programa Phred/Phrap (EWING *et al.*, 1998) e CONSED (GORDON; *et al.*, 1998).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre variáveis com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras não-pareadas e pela análise de variância (ANOVA). A variável triglicérides foi analisada após sua normalização por transformação logarítmica, por não apresentar distribuição normal (JEKEL *et al.*, 1999).

Para as variáveis descontínuas foram utilizados os Testes de Qui-quadrado (χ^2) ou o Teste Exato de Fischer bidirecional (RxC) (Miller, 1999). Para as análises de correlação foi utilizado o modelo de correlação linear descrito por Pearson.

O programa Statistica para Windows 8.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para as análises estatísticas.

Para o alinhamento das sequências de DNA foram utilizados os programas BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), CodonCode Aligner 3.5.4 para Windows (<http://www.codoncode.com>) e Clone Manager (http://www.scied.com/pr_cmbas.htm). Para o desenho e análise dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado o programa Primer3 ([Primer3: www.primer3.com](http://www.primer3.com)).

Na análise das frequências alélicas foram considerados valores similares, aqueles dentro do intervalo de confiança (95% IC). Àqueles abaixo ou acima deste, foram considerados diferentes.

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

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra

A análise estatística descritiva dos grupos em estudo, incluindo média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação está na Tabela 17. Com relação à etnia, entre as pacientes com diabetes gestacional, foi observada apenas uma paciente de origem oriental que não foi incluída nas análises.

TABELA 17- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=600) Média ± DP M [AV]	DMG (n=150) Média ± DP M [AV]	P
Idade (anos)	24,8±6,25 24 [14-42]	31,83±6,12 31 [18-46]	<0,001
Etnia (%)			
Euro-Brasileiras	-	94,7	
Afro-Brasileiras	-	5,3	
Semana de gestação ao diagnóstico	17,62±9,9 15 [4-38]	30,08±5,17 31 [13-38]	<0,001
Peso (kg)	64,49±12,84 63,0 [39,7-143]	84,45±16,88 82,5 [54,4- 125,5]	<0,001
Altura (m)	1,61±0,06 1,61 [1,40-1,82]	1,60±0,07 1,60 [1,32- 1,80]	0,036
IMC (kg/m ²)	24,85±4,51 24,02 [16-58]	33,24±6,12 32,23 [21-49]	<0,001
PAS (mmHg)	106,36±12,13 110 [40-190]	118,78±12,11 120 [100-160]	<0,001
PAD (mmHg)	66,02±8,83 60 [40-110]	75,00±10,37 80 [50-100]	<0,001
Hipertensão arterial* (%)	1,2	32	
Tabagismo* (%)			
Não fumante	-	68,5	
Ex-fumante	-	26,2	
Fumante	-	5,3	
Uso de insulina* (%)	-	33,8	
Macrossomia* (%)	-	5,9	

DP: Desvio padrão; M: Mediana; AV: Amplitude de variação

PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica

IMC: Índice de massa corporal

*Critérios descritos no item 4.1.1 do Material e Métodos.

P: Teste t para variáveis independentes.

5.2 Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos para a amostra em estudo são mostrados na Tabela 18. As determinações de HbA1C e glicemia 2 horas após ingestão oral de 75g de glucose (2-h 75g de glucose) foram realizadas apenas no grupo DMG.

TABELA 18- COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=600) Média ± DP M [AV]	DMG (n=150) Média ± DP M [AV]	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	82,04±6,8 82 [57-99]	99,24±16,72 96 [74-168]	<0,001
2-h 75g de glucose (mg/dL)	-	165,52±32,85 156 [140-320]	
HbA1C (%)	-	5,73±0,87 5,8 [4-10]	
Colesterol (mg/dL)	197,32±50,21 189 [107-483]	226,5±47,46 222 [125-335]	<0,001
HDL-C (mg/dL)	55,20±14,41 54 [25-119]	56,82±15,07 54 [27-109]	0,238
LDL-C (mg/dL)	117,85±41,21 111 [29,4-370,8]	125,76±42,70 123 [34-234]	0,061
Triglicérides (mg/dL)	122,87±56,55 108 [47-449]	225,34±73,10 218 [88- 524]	<0,001*
Proteína Total (g/dL)	6,89±0,72 6,9 [3,3-8,9]	6,18±0,40 6,2 [5,0-7,4]	<0,001
Albumina (g/dL)	4,25±0,48 4,3 [2,2-5,3]	3,65±0,23 3,6 [3,1-4,3]	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,81±0,09 0,8 [0,5-1,3]	0,74±0,10 0,7 [0,3-1,0]	<0,001
Uréia (mg/dL)	20,32±5,30 20 [8-38]	15,39±3,98 15 [6-32]	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,59±0,87 3,5 [1,3-8,7]	4,52±0,95 4,5 [1,8-7,8]	<0,001

Os resultados são: Média ±1-DP e Mediana [amplitude de variação (AV)].

P teste t para variáveis independentes

*Triglicérides calculado com transformação logarítmica.

LDL-C: Obtido pela equação de Friedewald.

5.2.1 Análise do perfil lipídico

A tabela 19 e a figura 26 mostram a evolução dos componentes do perfil lipídico durante a gestação na presença e ausência de diabetes gestacional.

TABELA 19- CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO E INDICADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR PARA OS GRUPOS EM ESTUDO PAREADOS POR IDADE.

Parâmetros	CONTROLE n= 478	DMG n= 150	P
Idade (anos)	32,9±3,6	34,4±4,3	0,057
IMC (kg/m ²)	27,6±4,4	33,5±5,9	<0,001
Colesterol (mg/dL)	237,1±48,5	231,1±49,6	0,567
HDL-C (mg/dL)	62,1±15,7	58,3±14,8	0,169
Triglicérides (mg/dL)	186,4±73,3	231,6±74,8	<0,001*
LDL-C (mg/dL)	137,4±41,7	128,4±44,7	0,325
Log TG/HDL-C	0,46±0,24	0,60±0,20	0,0017
Colesterol/HDL-C	4,11±1,64	4,29±1,33	0,568
LDL-C /HDL-C	2,44±1,34	2,40±1,09	0,868

Os valores são média ±1DP

P teste t para amostras independentes

*P calculado para triglicérides log- transformados

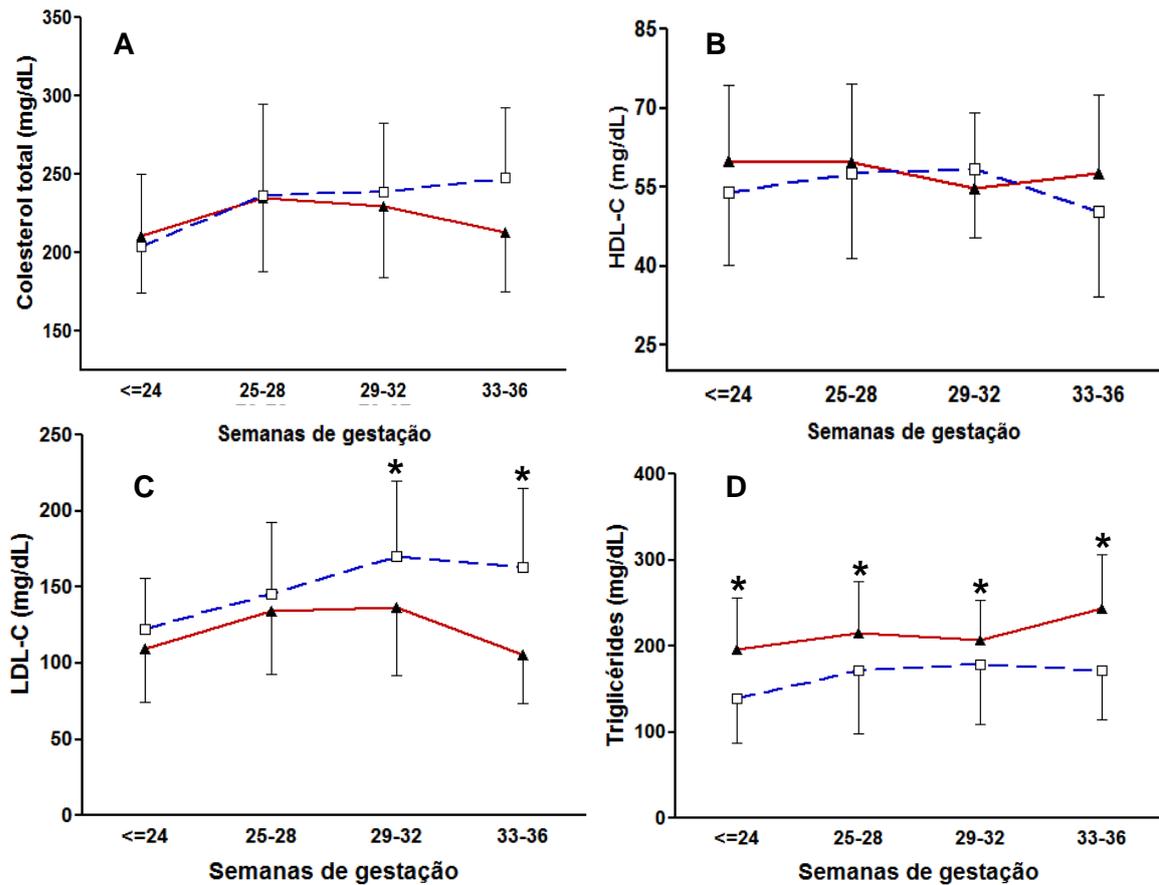


Figura 26- Variação do perfil lipídico durante a gestação.

As linhas tracejadas com quadrados abertos representam o grupo controle (n=478) e as linhas cheias com triângulos fechados, o grupo com diabetes gestacional (n=150).

A figura A representa o colesterol total, a figura B o HDL-Colesterol, a figura C o LDL-Colesterol e a figura D, os triglicérides.

Os símbolos representam a média e as barras verticais 1DP.

Os asteriscos (*) representam uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

O tamanho amostral para os períodos de gestação em estudo foram, respectivamente, para os grupos controle/DMG, <=24 (282/26), 25-28 (88/35), 29-32 (66/38) e 33-36 (42/51).

As determinações de colesterol total e HDL-C não foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 25 A e B). A concentração de LDL-C (Figura 25 C) aumenta com o decorrer da gestação no grupo controle, com diferenças significativas entre os grupos ocorrendo a partir da 32^a semana de gestação. Os triglicérides (Figura 25 D) se mostraram significativamente aumentados em todos os períodos estudados da gestação nas diabéticas em relação ao grupo controle.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

5.3.1 Detecção dos polimorfismos -374T>A, -429T>C e 63 Del do promotor do gene *RAGE* por PCR-RFLP

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 20.

TABELA 20- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -429T>C, -374T>A E 63Del DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 600)	DMG (n= 150)	P
-429T>C (rs1800625)	T/T	486 (81,0)	131 (87,3)	0,100
	T/C	109 (18,2)	19 (12,7)	
	C/C	5 (0,8)	0 (0)	
frequência alélica de C	H- W (P) [95% IC]	0,681 9 [8-12]	0,407 6 [4-9]	(χ^2) 0,054
-374T>A (rs1800624)	T/T	289 (48,2)	85 (56,7)	0,161
	T/A	258 (43,0)	52 (34,7)	
	A/A	53 (8,8)	13 (8,6)	
frequência alélica de A	H- W (P) [95% IC]	0,669 30 [28-33]	0,225 26 [21-31]	(χ^2) 0,141
63Del (-407_-345bp)	I/I	562 (93,7)	143 (95,3)	0,442
	I/D	38 (6,3)	7 (4,7)	
	D/D	0 (0)	0 (0)	
frequência alélica de D	H- W (P) [95% IC]	0,423 3 [2-4]	0,771 2 [1-4]	(χ^2) 0,449

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

A deleção de 63pb foi detectada duplamente. Inicialmente através da eletroforese em gel de agarose do produto de PCR, e posteriormente confirmada através da PCR-RFLP para os polimorfismos -429T>C e -374T>A.

5.3.2 Detecção do polimorfismo G82S do gene *RAGE* por PCR-RFLP

Uma sub-amostra foi utilizada para a análise do polimorfismo G82S (g.555G>A), com o objetivo de prospectar uma possível associação com o DMG, por tratar-se de um polimorfismo já estudado por nosso grupo de pesquisa. As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 21.

TABELA 21- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO G82S DO EXON 3 DO GENE *RAGE*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle (n= 77)	DMG (n= 109)	P
G82S (rs 2070600) g.555G>A	G/G	77 (100)	107 (98,2)	0,512
	G/S	0 (0)	2 (1,8)	
	S/S	0 (0)	0 (0)	
frequência alélica de S	H- W (P) [95% IC]	0,951 0 [0-0]	0,922 0,9 [0-2]	(χ^2) 0,232

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2 .

5.3.3 Detecção dos polimorfismos L72M e R51Q do gene da preprorelina por PCR-RFLP

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 22.

TABELA 22- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS L72M E R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 600)	DMG (n= 150)	P
R51Q (rs34911341) Arg51Gln	G/G	528 (88,0)	146 (97,2)	0,0002*
	G/A	71 (11,8)	4 (2,8)	
	A/A	1 (0,2)	0 (0)	
frequência alélica de A	H- W (P) [95% IC]	0,381 6 [5-7]	0,863 1,3 [0-3]	(χ^2) 0,0001*
L72M (rs696217) Leu72Met	C/C	508 (84,7)	132 (88,1)	0,321
	C/A	90 (15,0)	17 (11,2)	
	A/A	2 (0,3)	1 (0,7)	
frequência alélica de A	H- W (P) [95% IC]	0,342 8 [6-9]	0,461 6 [4-9]	(χ^2) 0,383

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

Genótipos G/G (A51A), G/A (R51Q) e A/A (Q51Q).

Genótipos C/C (L72L), C/A (L72M) e A/A (M72M).

Os valores de probabilidade destacados em negrito foram significativos.

*Valores de P corrigidos (Bonferroni) para genótipos 0,0022 e alelo 0,0011.

Cálculo da razão de chance (*Odds Ratio*) para o polimorfismo R51Q.

	Contagem do alelo de risco 51Q	
	Presente	Ausente
DMG	4	146
Controle	72	528
TOTAL	76	674
OD	0,20*	
IC 95%**	0,07-0,56	

*OD: Odds ratio=0,20 equivale a um risco de 5,65 vezes

**IC: Intervalo de confiança de 95%

5.3.4 Detecção do polimorfismo -30G>A do promotor do gene da glucoquinase por PCR-RFLP

As frequências genóticas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 23.

TABELA 23- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO - 30G>A DA REGIÃO DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle (n= 600)	DMG (n= 150)	P
-30G>A (rs1799884)	G/G	387 (64,5)	86 (57,3)	0,240
	G/A	186 (31,0)	57 (38,0)	
	A/A	27 (4,5)	7 (4,8)	
frequência alélica de A	H- W (P) [95% IC]	0,441 20 [18-22]	0,532 24 [19-28]	(χ^2) 0,161

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

5.3.5 Validação dos ensaios de PCR-RFLP para as variantes em estudo

5.3.5.1 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para os polimorfismos do gene *RAGE* analisados

O laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná dispunha de várias amostras genotipadas por PCR-RFLP com a confirmação dos genótipos através de reação de sequenciamento de DNA. Estas amostras foram utilizadas como controle para validar o procedimento empregado neste projeto.

5.3.5.2 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para os polimorfismos do gene da preprogrelina analisados

A comparação dos ensaios de PCR-RFLP para a determinação dos polimorfismos do gene da preprogrelina está em revisão uma vez que a reação de sequenciamento não apresentou boa qualidade na discriminação das bases.

5.3.5.3 Confirmação dos ensaios de PCR-RFLP para o polimorfismo do promotor pancreático do gene da glucoquinase analisado

Os resultados obtidos na PCR-RFLP foram confirmados pela reação de sequenciamento do amplicon de 251 pb contendo o polimorfismo -30G>A. A Figura 27 mostra um exemplo da análise de sequenciamento.

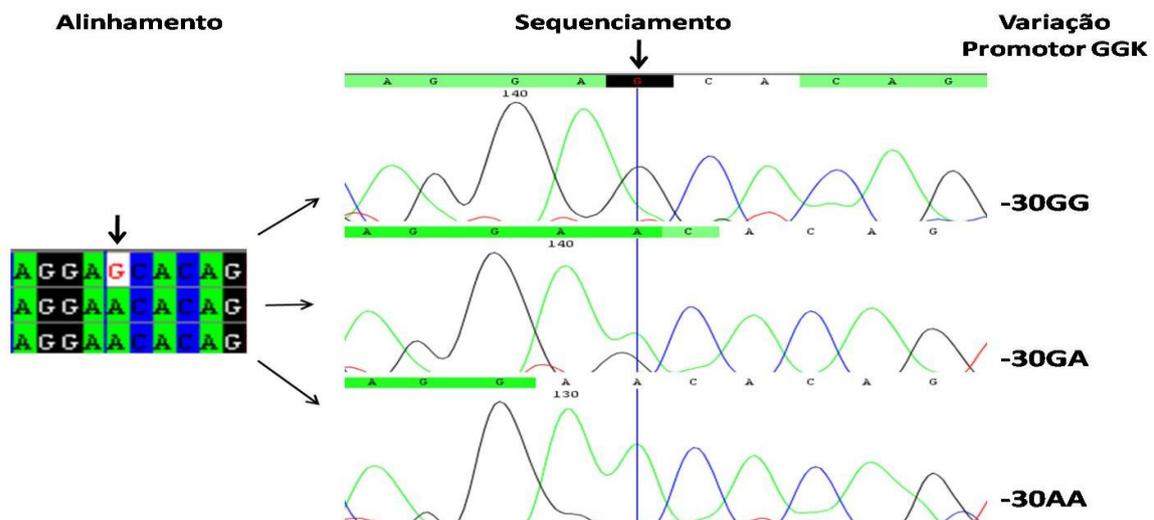


Figura 27 – Alinhamento e cromatogramas típicos observados para as variações GG, GA e AA do promotor pancreático do gene da glucoquinase. A seta indica o sítio de mutação. Análises obtidas com o programa CodonCode e seleção de bases de alta qualidade.

5.3.6 Análise de correlação linear (Pearson)

A análise de correlação linear de Pearson foi realizada com as variáveis indicadas na legenda da tabela, separadamente para os grupos controle e DMG.

A Tabela 24 mostra as correlações significativas para o polimorfismo R51Q do gene da preprorelina nos grupos em estudo.

TABELA 24- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
GHRL	Controle	529	Semana gestação	0,118	0,010
			HDL-C	-0,232	<0,0001
			Log(TG/HDL-C)	-0,128	0,005
			Relação colesterol/HDL-C	0,195	<0,0001
			Relação LDL-C/HDL-C	0,205	$P < 0,000$
	DMG	150	Sem correlação significativa	---	----

Polimorfismos (R51Q) códigos: 1=R51R e 2 R51Q+Q51Q

r, coeficiente de correlação

Variáveis analisadas: idade, semana de gestação do diagnóstico (normal ou diabética), peso (kg), altura (cm), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (-429T>C, -374T>A, 63bp Del, L72M, R51Q, -30G>A).

Códigos para os polimorfismos: 1= homocigoto comum, 2= heterocigoto + homocigoto menos freqüente.

A Tabela 25 compara as concentrações séricas do perfil lipídico e marcadores de risco cardiovascular de acordo com os genótipos do polimorfismo R51Q.

TABELA 25- COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DO PERFIL LIPÍDICO E GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA NO GRUPO CONTROLE

Variáveis	Genótipos (R51Q)		P
	RR n=528	RQ+QQ n=72	
Colesterol, mg/dL	197,50±27±	194,9±50,8	0,667
HDL-C, mg/dL	56,3±14,0	46,8±14,4	<0,0001
LDL-C, mg/dL	116,6±40,8	124,6±42,7	0,130
Triglicérides, mg/dL	123,7±58,1	118,0±47,1	0,613*
Colesterol não-HDL	141,4±48,5	148,3±48,6	0,271
Log(TG/HDL-C)	0,31±0,21	0,39±0,20	0,005
Colesterol/HDL-C	3,70±1,3	4,42±1,3	<0,0001
LDL-C/HDL-C	2,23±1,1	2,88±1,2	<0,0001

Os valores são média+1 Desvio Padrão (DP)

P, teste t para variáveis independentes

* valor de P calculado após transformação logarítmica

A Tabela 26 mostra a concentração de variáveis bioquímicas envolvidas no controle glicêmico em relação aos genótipos do polimorfismo -30G>A do gene da glucoquinase.

TABELA 26- CONCENTRAÇÕES DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE GLICÊMICO EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE.

Variáveis	Grupo Controle				Grupo DMG			
	GG n=387	GA n=186	AA n=27	P	GG n=86	GA n=57	AA n=7	P
Glicemia, mg/dL	81,4±6,6	82,7±6,7	86,1±6,8	<0,001	96,9±20,3	91,9±27,2	78,7±8,9	0,089
2-h pós 75g, mg/dL	--	--	--	--	99,9±16,1	98,4±17,8	93,8±15,2	0,623
HbA1C, %	--	--	--	--	5,7±0,7	5,7±1,0	6,1±0,7	0,449

Os valores representam a média ± 1 Desvio Padrão (DP)

P comparação entre os três grupos pela análise de variância (ANOVA)

Variáveis: Glicemia em jejum, 2h pós 75g: glicemia após 75 g de glucose oral e HbA1C: hemoglobina glicada fração A1C.

O grupo controle só dispõe de dados para glicemia de jejum

A figura 28 mostra o comportamento da concentração da glicemia de jejum nos grupos controle de DMG conforme os genótipos do polimorfismo -30G>A da região promotora do gene da glucoquinase expresso no pâncreas.

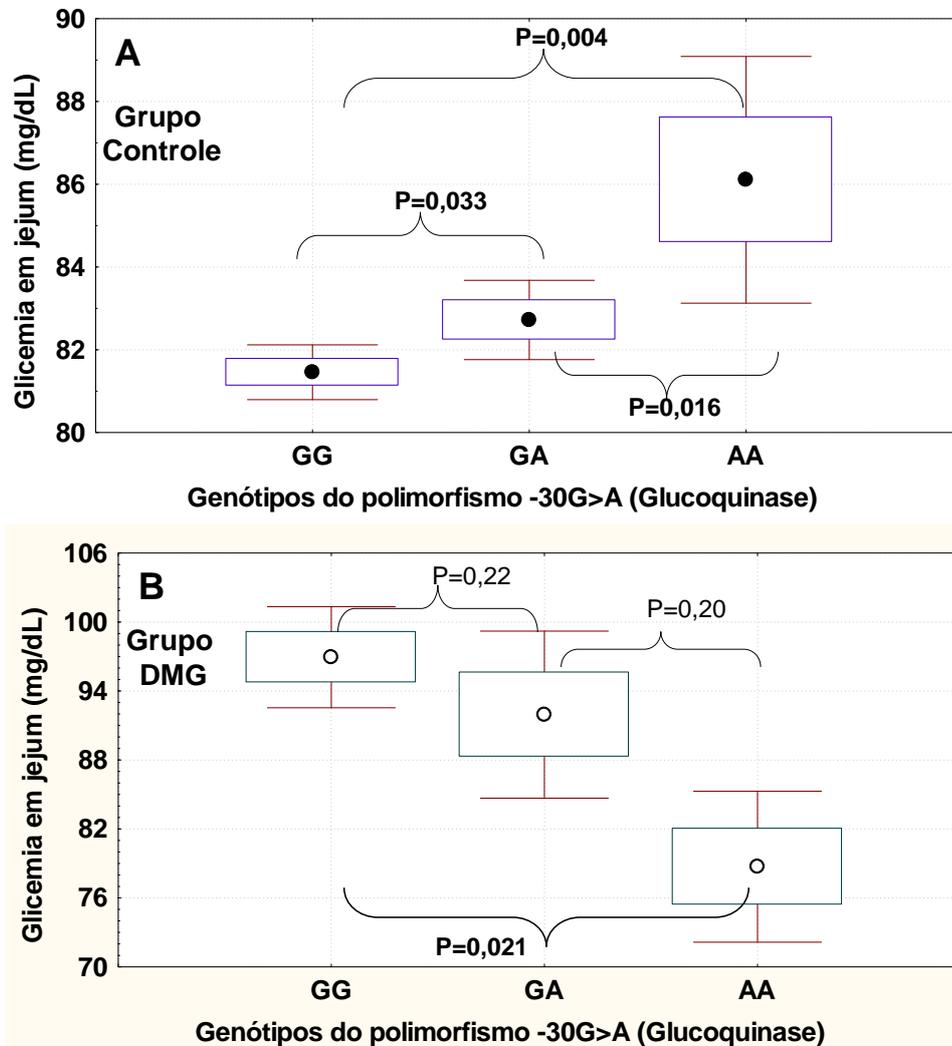


Figura 28. Relação entre a glicemia de jejum e os genótipos do polimorfismo -30G>A da região do promotor pancreático do gene da glucoquinase.

Em ambas as figuras o símbolo central representa a média, o quadrado 1 erro padrão e as barras verticais 2 erros padrão. Os valores de P são comparações através do teste t para amostras não pareadas.

Figura 28 A. Relação entre a glicemia de jejum e os genótipos para o grupo controle. Tamanho da amostra, GG=387, GA=186 e AA=27.

Figura 28 B. Relação entre a glicemia de jejum e os genótipos para o grupo DMG. Tamanho da amostra, GG=86, GA=57 e AA=7.

6. Discussão

Desde a sua primeira descrição em 1950, o *Diabetes mellitus* gestacional tem sido uma das síndromes mais controversas (SANTOS-AYARZAGOITIA *et al.*, 2006). Contribui para isto o fato de que existem diferentes critérios para o diagnóstico do diabetes gestacional, tais como os preconizados pela Associação Americana de Diabetes (ADA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Sociedade Australiana de Diabetes na Gestação (ADIPS) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009). Todos estes critérios são baseados nas determinações da glicemia em jejum e após sobrecarga oral de glucose.

A dificuldade da padronização nos procedimentos diagnósticos para o diabetes gestacional reflete a ausência de marcadores de diagnóstico definitivos ou um padrão ouro, para esta patologia. O diagnóstico precoce e o acompanhamento adequado das gestantes continuam sendo as principais ferramentas para prevenir complicações para a gestante diabética e para o feto (REECE *et al.*, 2009).

Comparativamente aos tipos 1 e 2 de diabetes, o DMG tem poucos estudos de associação com fatores genéticos (SHAAT *et al.*, 2007). Uma relação estreita entre o diabetes tipo 2 e o diabetes gestacional é sugerida em diversos estudos (DAMM *et al.*, 1996; LAUENBORG *et al.*, 2009). Genes que predispõem ao diabetes tipo 2 estão também envolvidos no diabetes gestacional (KAUTZKY-WILLER *et al.*, 1997). Outra hipótese intrigante é a possibilidade da transmissão materna (via DNA mitocondrial) associada ao DGM, pois mulheres com mães ou avós diabéticas (tipo 2) apresentam um risco maior de desenvolver esta condição durante a gestação (NEWELL, 2004).

Os produtos dos genes estudados neste projeto, *RAGE*, preprogrelina e glucoquinase, têm associação com o diabetes demonstrada em vários trabalhos publicados, embora alguns sejam conflitantes. Portanto, nosso estudo deve contribuir para o conhecimento do efeito destes genes e suas variações genéticas no DMG.

6.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.1.1 Amostras

Idade

A média superior de idade apresentada pelo grupo DMG em relação aos controles (Tabela 17) é uma característica das pacientes atendidas em hospitais especializados no acompanhamento de gestações de risco. A faixa etária marcadamente superior apresentada pelas pacientes do grupo DMG em relação aos controles (médias 31,8 vs 24,6 anos) reflete que o risco para DMG aumenta com a idade da gestante (COUSTAN *et al.*, 1989). Este achado foi mostrado em múltiplos estudos, e está em concordância com nossos achados. A idade da gestante inferior a 25 anos está associada a baixo risco para DMG (METZGER *et al.*, 2007) o que está também de acordo com a idade observada para o grupo controle em nosso estudo.

Etnia

Quanto à etnia, o predomínio de Euro-Brasileiras (94,7%) no grupo DMG foi amplo, caracterizando que nosso estudo reflete primariamente este segmento da população (Tabela 17). Comparações ou mesmo pareamento com o grupo controle neste aspecto não foram possíveis, pois as amostras coletadas no Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba, não registram esta informação. Embora o fator étnico seja relevante nos estudos genéticos, não temos razões ou informações para suspeitar de que o grupo controle não reflita uma proporção étnica similar ao grupo DMG.

Mulheres afro-descendentes têm risco para DMG significativamente superior a euro- descendentes (DOOLEY *et al.*, 1991).

A população obtida para o estudo é do Paraná, mais especificamente de Curitiba e região metropolitana, onde a maioria da população é euro-brasileira (77,4%) com cerca de 3% de afro-descendentes (Dados do Censo, 2000).

Para minimizar possíveis efeitos relacionados à etnia, o tamanho amostral utilizado para o grupo controle foi expressivamente maior (cerca de 4 vezes) em relação ao grupo com DMG.

Semana de gestação no diagnóstico

As amostras do grupo controle foram coletadas em período significativamente precoce da gestação (~4 meses) quando comparadas ao grupo DMG (Tabela 17). A precocidade da triagem das gestantes no programa implantado na cidade de Curitiba – “mãe Curitibana” - é desejável. No entanto, as pacientes triadas neste programa têm o diagnóstico confirmatório de DMG e atendimento especializado, realizado no Hospital de Clínicas ou em outros centros, em período médio de 30 semanas. Considerando que o período para triagem e detecção do DMG preconizado em vários consensos é entre 24-28 semanas (ADA, 2009), seria relevante prover esforços para tornar o atendimento especializado à gestante diabética com maior precocidade.

Peso, Altura e Índice de massa corporal (IMC)

Os grupos em estudo diferenciam-se de modo muito significativo quanto ao peso e o reflexo deste o IMC (Tabela 17). O grupo DMG apresenta na média cerca de 30% mais IMC quando comparado ao controle. Dois elementos podem explicar este achado. Primeiro, como mencionado anteriormente, o grupo controle teve seus dados obtidos em período significativamente precoce da gestação em relação ao grupo DMG. É esperado o ganho de peso e aumento do IMC com a evolução da gravidez.

A concentração de insulina aumenta no início da gravidez normal, o que promove um aumento de peso fisiológico na gestante. Na paciente com DMG, o estabelecimento de uma severa resistência à insulina, induz a liberação compensatória de quantidades maiores de insulina pelo pâncreas, aumentando o ganho ponderal neste grupo. Portanto, como esperado, o grupo DMG em estudo apresenta um IMC maior que gestantes saudáveis do grupo controle.

Outro fator relevante a ser mencionado, que poderia contribuir para explicar esta diferença está relacionado ao risco aumentado para DMG associado ao sobrepeso. Diversos estudos apontam um risco aumentado de desenvolvimento do diabetes gestacional em mulheres com alto IMC quando comparadas àquelas com índice normal. Na ausência de gravidez, mulheres com $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ apresentam risco relativo cerca de três vezes superior para DMG quando comparadas aquelas com $\text{IMC} < 20 \text{ kg/m}^2$ (SOLOMON *et al.*, 1997, TORLONI *et al.*, 2009). Um $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ foi sugerido como um dos principais preditores para DMG em estudo de Turhan *et al.*, 2003.

Pressão arterial

A hipertensão arterial afeta entre 5 a 10% das gestantes e pode propiciar complicações para a mãe e feto, sendo a insuficiência renal aguda, pré-eclampsia, a patologia mais conhecida associada ao processo (WALKER, 2000).

O processo de hiperinsulinemia e dislipidemia, associados ao DMG, induzem ao aparecimento de hipertensão (CASEY *et al.*, 1997). Ainda não estão esclarecidos os processos patofisiológicos que envolvem a hipertensão durante a gravidez (KIM *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que mulheres com hipertensão prévia (5 anos) ou de aparecimento no primeiro trimestre de gestação têm risco duas vezes aumentado de desenvolver diabetes gestacional durante a gestação. Há ainda uma forte relação entre pressão arterial e diabetes gestacional quando a mulher está com sobrepeso ($\text{IMC} > 25 \text{ Kg/m}^2$), o que aumenta suas chances de desenvolver a doença durante a gestação (HEDDERSON *et al.*, 2008).

O grupo controle em estudo apresentou hipertensão em cerca de 1% das gestantes, significativamente menor que os cerca de 30% observados nas pacientes com DMG (Tabela 17).

Em estudos realizados com gestantes brasileiras, Gaio *et al.*, 2001 reportaram uma frequência de hipertensão de 7,5%, valor expressivamente superior ao observado em nosso grupo controle. A discrepância pode ser atribuída às diferentes características das populações estudadas e aos diferentes critérios na seleção dos pacientes.

6.1.2 Parâmetros bioquímicos

Marcadores glicêmicos

A determinação da glicemia foi significativamente diferente entre os grupos (Tabela 18). Este efeito era esperado pelo critério de classificação da amostra (Figura 8, Material e Métodos).

A determinação da glicemia pós-prandial para o grupo DMG confirma o critério de seleção destas pacientes, com valor mínimo 2 horas após a ingestão de 75 g de glucose como igual ou superior a 140 mg/dL.

A concentração da hemoglobina glicada (HbA1C), um marcador do controle glicêmico, sugere que o grupo com DMG, com valores médios de HbA1C de 5,7%, seja de diabéticas com bom controle glicêmico. Valores de HbA1C superiores a 6,5% sugerem controle glicêmico inadequado e necessidade de intervenção nutricional ou medicamentosa nas pacientes (BALAJI *et al.*, 2007; ADA, 2010).

Perfil lipídico

O comportamento do perfil lipídico (Tabela 18) entre os grupos em estudo apresentou uma elevação nas concentrações séricas de colesterol e triglicérides no

grupo DMG em comparação ao controle. Por outro lado as concentrações de HDL-C e LDL-C não mostraram diferenças significativas.

Sendo a fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) o principal meio de transporte do colesterol sérico, pode parecer paradoxal a elevação do colesterol sem a reciprocidade de alteração da fração LDL-C. É possível que tanto a falta de pareamento dos grupos quanto a idade sejam fatores determinantes para esta disparidade. O pareamento dos grupos por idade para a análise do perfil lipídico está discutido em detalhes no item 6.1.2.1.

A elevação de triglicérides é frequente e bem caracterizada nas pacientes com DMG (BUTTE, 2000; TOESCU *et al.*, 2004).

Proteína total e albumina

Os resultados das concentrações séricas de proteína total e albumina foram significativamente menores no grupo com DMG em relação ao controle (Tabela 18). Analisados em conjunto, estes biomarcadores refletem o estado nutricional das pacientes e a retenção de líquidos.

A gravidez é um processo associado a um aumento de 50% no sangue circulante, resultante de vasodilatação induzida por vários elementos (CARPENTER, 2007). Postulamos para a amostra em estudo que o efeito primário para a redução da proteína total e albumina no grupo DMG seja devido ao aumento de volume de sangue circulante, com maior quantidade de água. O grupo com DMG, por representar um estágio mais avançado da gestação (~30 semanas), terá um efeito maior da retenção de líquidos, quando comparado ao grupo controle. Como não temos elementos para descartar um efeito sócio-econômico diferencial entre os grupos, o menor aporte e qualidade de alimentos no grupo DMG não pode ser desprezado. Entretanto, como todas as pacientes em estudo provêm de estrato social similar, a última hipótese parece ser mais frágil.

Uréia e Creatinina

As determinações de uréia e creatinina são biomarcadores clássicos de função renal (ROSNER, 2009). Aumentos nas determinações destes marcadores estão associados a processos de insuficiência renal como a pré-eclâmpsia (WIZNITZER *et al.*, 2009).

A amostra em estudo apresentou concentrações séricas significativamente menores para uréia e creatinina no grupo DMG em relação ao controle (Tabela 18).

Dois elementos são responsáveis por este achado. Primeiro, como discutido para as determinações de proteína e albumina, o grupo DMG teve sua amostra coletada em período de gestação mais avançado, sofrendo maior efeito do aumento do volume sanguíneo e hemodiluição associada. O outro elemento relevante, que postulamos para explicar esta diferença se encontra no expressivo número de gestantes com DMG apresentando hipertensão (~30%). O processo hipertensivo associado ao aumento do volume sanguíneo aumenta a filtração glomerular aumentando o “clearance” de uréia e creatinina (LINDHEIMER *et al.*, 2009).

Os valores máximos observados para uréia e creatinina em ambos os grupos, dentro da referência, reforçam que não foram selecionados pacientes com alteração relevante da função renal, como proposto em Material e Métodos, na caracterização da amostra (item 4.1.1).

Ácido Úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente superior no grupo DMG em relação ao controle (Tabela 18).

Este aumento médio do ácido úrico em cerca de 1 mg é expressivo, em especial se consideramos o que foi discutido para uréia e creatinina.

Postulamos que a elevação do ácido úrico no grupo DMG esta associada à resistência à insulina e à hipertensão, que predominam neste grupo, como sugerem Yoo *et al.*, 2005.

6.1.2.1 Análise do perfil lipídico

A transferência de componentes lipídicos pela placenta é limitada. O sincitiotrofoblasto, principal componente da placenta, atua como uma barreira física entre a circulação da mãe e do feto (MARSEILLE-TREMBLAY *et al.*, 2008). O metabolismo lipídico materno tem uma função importante no crescimento fetal e nas consequências tardias da gestação (MARSEILLE-TREMBLAY *et al.*, 2008), apesar das dificuldades dos lipídios em atravessar a placenta (HERRERA, 2002). Os lipídios atravessam a placenta por difusão ou combinados com proteínas a fim de suprir o feto (WOOLLETT, 2005).

Durante a gestação normal, as variações nas concentrações do perfil lipídico (colesterol total, LDL-C, HDL-C e triglicérides) não estão bem definidas (WIZNITZER *et al.*, 2009). Um aumento moderado no colesterol total, LDL-C e triglicérides, principalmente devido ao aumento do estrogênio têm sido descrito (BRIZZI *et al.*, 1999). Entretanto, um aumento no HDL-C tem sido observado em algumas populações, mas não em outras (BRIZZI *et al.*, 1999). As alterações no metabolismo lipídico são progressivas e podem ser marcantes em mulheres com DMG (BUTTE, 2000).

O DMG induz um estado de dislipidemia consistente com a resistência à insulina e à concentração de estrogênio. Durante a gestação, mulheres com DMG, apresentam concentrações elevadas de triglicérides e reduzidas de LDL-C quando comparadas àquelas com gestações normais (KOUKKOU *et al.*, 1996). As concentrações de colesterol total, HDL-C e apolipoproteínas não são significativamente diferentes entre gestantes normais e aquelas complicadas pelo DMG (BUTTE, 2000).

Nossos resultados para o perfil lipídico com os grupos em estudo, pareados por idade, mostraram apenas os triglicérides significativamente aumentados (aproximadamente 25%; 231/186) no grupo DMG em relação ao controle (Tabela 19). Para os índices de risco, representados pelas razões entre colesterol total/HDL-C (Castelli I), LDL-C/HDL-C (Castelli II) e log (TG/HDL-C), apenas o último foi significativamente diferente entre os grupos, refletindo a expressiva variação dos triglicérides.

Portanto, para o perfil lipídico associado ao DMG, os principais discriminadores entre os grupos foram as concentrações de triglicérides e a razão log (TG/HDL-C), que devem ser recomendadas como marcadores preferenciais.

Outro fator associado ao perfil lipídico estudado foi a variação na concentração destes elementos, associados a períodos da gestação (Figura 25).

A concentração de colesterol total, após discreta elevação, estatisticamente não significativa, no período anterior ou até 24 semanas, se manteve estável durante a gestação (Figura 25 A).

O HDL-C não mostrou variações significativas durante todo o período da gestação em estudo, sendo o componente de menor variação do perfil lipídico (Fig. 25 B). Corroboram com este achado, os dados das Tabelas 18 e 19, que também não mostraram variações nas concentrações séricas do HDL-C, respectivamente, na amostra total e naquela pareada por idade.

A concentração sérica do LDL-C apresentou perfil similar ao do colesterol total em relação à evolução da gestação (Fig. 25 C). No entanto, as determinações realizadas no período final da gestação, 29-32 e 33-36 semanas de gestação, mostraram significativo aumento do LDL-C nas pacientes com DMG em relação ao grupo controle. Postulamos que a disparidade observada entre colesterol total e LDL-C possa refletir a forma de cálculo do LDL-C pela equação de Friedewald, empregada neste estudo. Esta equação utiliza a relação triglicérides/5 para estimar o conteúdo de colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C). Quando a concentração de triglicérides ultrapassa 200 mg/dL, podem ocorrer distorções no cálculo de Friedewald (FRIEDWALD *et al.*, 1972). Propomos, em estudos futuros, determinar a concentração de LDL-C por método direto homogêneo para elucidar este tópico.

A concentração sérica dos triglicérides foi significativamente maior em todos os períodos da gravidez estudados para o grupo DMG em relação ao controle (Fig. 25 D). O efeito da resistência à insulina, preponderante no grupo DMG, sobre o metabolismo dos triglicérides é conhecido (SOLOMON *et al.*, 1999).

A hiperinsulinemia exerce um efeito inibitório sobre a degradação das lipoproteínas ricas em triglicérides (primariamente VLDL) favorecendo a hiperlipidemia (KOUKKOU *et al.*, 1996).

Em síntese, a distribuição observada para o perfil lipídico durante a gestação em nossa população é similar àquela reportada por Koukkou *et al.*, 1996 que avaliou gestantes.

Quantificar o perfil lipídico durante a gestação pode ser útil, em particular nas pacientes com histórico familiar positivo para a doença arterial coronariana (KOUKKOU *et al.*, 1996; TOESCU *et al.*, 2004). Poucos estudos estão disponíveis, comparando o efeito do diabetes gestacional sobre as concentrações dos lípidos séricos e os dados apresentados neste projeto contribuem para ampliar este conhecimento, com ênfase na população brasileira.

6.2 ANÁLISES MOLECULARES

6.2.1 Detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP

A otimização da reação em cadeia da polimerase (PCR) proposta neste estudo permitiu a obtenção de produtos de PCR com boa quantidade e com ausência de bandas inespecíficas (Figuras 9, 15, 17 e 22 Material e Métodos).

A Taq DNA polimerase nativa da Invitrogen foi utilizada para a amplificação do gene da preprogrelina. Após a mudança do fornecedor da síntese dos oligonucleotídeos iniciadores para a empresa Sinapse Biotecnologia, houve a necessidade de re-adaptar a técnica, que passou a apresentar bandas inespecíficas. Só foi possível a obtenção de produtos de PCR com boa qualidade, sem bandas inespecíficas, com a utilização da Taq DNA polimerase *Platinum* da Invitrogen com os novos iniciadores.

A reação de restrição foi otimizada para um volume final de 5 μ L (Tabelas 7, 9 e 11, Material e Métodos) o que propiciou uma redução nos custos do ensaio sem perda da eficiência do processo. A opção por trabalhar com gel de poliacrilamida na separação dos fragmentos de restrição, embora mais trabalhosa quando comparada ao gel de agarose, ofereceu melhor identificação dos fragmentos em relação aos resultados de géis de agarose observados na literatura (HUDSON *et al.*, 2001, MIRAGLIA DEL GIUDICE *et al.*, 2004).

A genotipagem através da técnica de PCR-RFLP foi eficaz na identificação dos genótipos de todos os polimorfismos estudados. Nenhuma das amostras testadas apresentou problemas de genotipagem. Como desvantagem para esta técnica deve-se ressaltar que é um processo trabalhoso com múltiplas etapas.

As comparações das frequências alélicas obtidas com as de outras populações estudadas e descritas na literatura, foram feitas com base no intervalo de confiança (95%IC), como descrito no item Material e Método (4.4).

6.2.2 O polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE*

A Tabela 20 (Item 5.3.1, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em tela.

As frequências genotípicas do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,100$) ou alélica ($P=0,054$) entre os grupos estudados.

A tabela 27 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo -429T>C em outros estudos.

A frequência para o alelo -429C encontrada (9% para o grupo controle e 6% para o grupo DMG) foi menor quando comparada a outras populações Europeias como Eslovenos (~14%, Globocnik-Petrovic *et al.*, 2003), Afro-Americanas e Africanas (16% e 12%, respectivamente; Goulart *et al.*, 2008). As frequências observadas neste estudo foram similares apenas a uma população de Asiáticos (4%) (NCBI Single nucleotide polymorphism, 2009).

TABELA 27- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -429T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			TT	TC	CC	C
Euro-Brasileiros	DMG	150	87,3	12,7	0	6
	Saudáveis	600	81,0	18,2	0,8	9
Euro-Brasileiros	DM2	520	77,3	20,6	2,1	12
Afro-Brasileiros	DM2	183	77,0	21,9	1,1	12
SANTOS <i>et al.</i> , 2005						
Euro-Brasileiros	DM1	102	64,7	33,3	2,0	19
	Saudáveis	225	80,4	19,6	0	10
PICHETH <i>et al.</i> , 2007						
Eslovenos	DM2+Retinopatia	116	73,2	25,9	0,9	13
	DM2	70	74,3	25,7	0	14
Globocnik Petrovic <i>et al.</i> , 2003						
Euro-Americanos	DM2	481	71,8	26,1	2,1	15
	Saudáveis	496	69,6	28,1	2,3	16
Afro-Americanos	DM2	156	82,7	11,8	5,3	11
	Saudáveis	100	75,5	22,4	1,0	12
Goulart <i>et al.</i> , 2008						
Tchecos	DM2+ND	198	63,1	29,8	7,1	22
	DM2	179	72,1	25,7	2,2	15
	Saudáveis	228	69,3	26,3	3,9	17
KANKOVÁ <i>et al.</i> , 2005						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; ND: nefropatia diabética.

Santos *et al.*, 2005 estudando pacientes diabéticos tipo 2, classificados em Euro- e Afro-brasileiros, reportaram uma frequência para o alelo -429C de 12%, para ambos os grupos étnicos, significativamente maior que o observado neste estudo. Picheth *et al.*, 2007 estudando pacientes diabéticos tipo 1 Euro- Brasileiros reportaram uma frequência para o alelo menos frequente -429C de 19%, significativamente maior que o observado neste estudo. Entretanto, entre os indivíduos saudáveis de ambos os estudos anteriormente descritos, as frequências alélicas foram similares às observadas em nosso estudo (~10%).

A associação do gene *RAGE* com diabetes tipo 1 e 2 é controversa. Picheth *et al.*, 2007 reportaram uma associação do polimorfismo -429T>C com diabetes tipo1; e Hudson *et al.*, 2001 reportaram associação com retinopatia diabética.

Entretanto, outros estudos não encontraram associação deste polimorfismo com diabetes (KANKOVA *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2005).

Neste estudo, não foi observada associação entre o polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE* com o diabetes gestacional.

6.2.3 O polimorfismo -374T>A da região promotora do gene *RAGE*

A Tabela 20 (Item 5.3.1, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em questão.

A tabela 28 sumariza as frequências alélicas e genóticas encontradas para o polimorfismo -374T>A em outros estudos.

A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,161$) ou alélica ($P=0,141$) entre os grupos estudados.

A frequência alélica encontrada (30% para o grupo controle e 26% para o grupo de diabéticas) se apresentou similar a outras populações de brancos como Europeus e Asiáticos e a uma população de Afro-Americanos (NCBI Single nucleotide polymorphism, 2009). Os dados encontrados são similares ainda à população de Euro-Brasileiros com diabetes tipo 1 ou 2 (PICHETH *et al.*, 2007, SANTOS *et al.*, 2005). Lindholm *et al.*, 2006 reportaram uma frequência do alelo menos frequente -374A em pacientes diabéticos tipo 1 e 2, respectivamente, de 29 e 26%, similares às encontradas para o grupo de gestantes diabéticas em estudo. Goulart *et al.*, 2008 reportaram uma frequência de 26% do alelo -374A em diabéticos tipo 2 de origem Euro-Americana, similar ao encontrado neste estudo. Eslovenos (GLOBOCNIK PETROVIC *et al.*, 2003) e Tchecos (KANKOVA *et al.*, 2005), reportaram uma frequência do alelo -374A maior (33-37%), em diabéticos.

TABELA 28- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			TT	TA	AA	A
Euro-Brasileiros	DMG	150	56,7	34,7	8,6	26
	Saudáveis	600	48,2	43,0	8,8	30
Euro-Brasileiros	DM2	520	46,5	40,7	9,3	31
Afro-Brasileiros	DM2	183	52,5	31,7	7,1	24
SANTOS <i>et al.</i> , 2005						
Euro-Brasileiros	DM1	102	44,1	47,1	8,8	32
	Saudáveis	225	42,7	49,3	8,0	33
PICHETH <i>et al.</i> , 2007						
Suecos	DM1	867	49,0	43,7	7,3	29
	DM2	2453	55,1	38,4	6,5	26
Escandinavos	Saudáveis	205	62,4	32,7	4,9	21
LINDHOLM <i>et al.</i> , 2006						
Eslovenos	DM2+Retinopatia	116	43,1	47,4	9,5	37
	DM2	70	41,4	42,9	15,7	33
GLOBOCNIK PETROVIC <i>et al.</i> , 2003						
Euro- Americanos	DM2	481	56,7	35,1	8,2	26
	Saudáveis	496	55,1	34,9	9,6	27
Afro- Americanos	DM2	156	88,1	9,3	2,6	07
	Saudáveis	100	82,0	13,0	5,0	11
GOULART <i>et al.</i> , 2008						
Tchecos	DM2+ND	198	41,4	46,5	10,6	34
	DM2	179	36,3	50,3	11,7	37
	Saudáveis	228	39,5	49,6	9,6	35
KANKOVÁ <i>et al.</i> , 2005						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; ND: nefropatia diabética.

Estudos deste polimorfismo com o diabetes gestacional não foram observados na literatura, o que não permite uma comparação com outros estudos similares. Falcone *et al.*, 2004 reportaram que o alelo -374A tem um efeito protetor na doença cardiovascular. Entretanto, estudos conduzidos por Kanková *et al.*, 2005, Kirbis *et al.*, 2004, Globocnick *et al.*, 2003, Hudson *et al.*, 2001 e JiXiong *et al.*, 2003, não evidenciaram associação deste polimorfismo com diabetes tipo 2 e suas complicações.

Neste estudo, não foi observada associação do polimorfismo -374T>A do promotor do gene *RAGE* com o *Diabetes mellitus* gestacional e/ou suas complicações.

6.2.4 A deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE*

A Tabela 20 (Item 5.3.1, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e a deleção em questão.

A tabela 29, na sequência, sumariza as frequências alélicas e genótípicas encontradas para a deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE* em outros estudos.

A frequência genotípica da deleção analisada está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,442$) ou alélica ($P=0,449$) entre os grupos estudados.

TABELA 29- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA DELEÇÃO DE 63 pb DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipos (%)			Alelo (%)
			II	ID	DD	D
Euro-Brasileiros	DMG	150	95,3	4,7	0	2
	Saudáveis	600	93,7	6,3	0	3
Euro-Brasileiros	DM2	520	96,5	3,5	0	2
Afro-Brasileiros	DM2	183	91,3	8,7	0	4
SANTOS <i>et al.</i> , 2005						
Brancos (Alemães)	DM1	559	97,8	2,2	0	1
	DM2	528	97,7	2,3	0	1
	Saudáveis	475	98,5	1,5	0	0,7
RUDOFKY JR <i>et al.</i> , 2004						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1.

A frequência do alelo menos frequente para a deleção de 63pb mostrou-se similar àquela descrita para Euro-Brasileiros com diabetes tipo 2 (2%) (SANTOS *et al.*, 2005). Quando analisada a frequência alélica obtida comparada a uma população de alemães, esta foi maior no grupo de gestantes diabéticas estudado (3% vs 1%). Ao comparar indivíduos saudáveis, as gestante Euro-Brasileiras apresentaram frequência alélica bastante superior ao grupo de alemães saudáveis (3% vs 0,7%).

A baixa frequência de um dos alelos não permitiu análises com maior poder discriminatório devido ao tamanho amostral utilizado.

Rudofsky Jr *et al.*, 2004 relataram que a deleção de 63 pb não esta relacionada às manifestações do diabetes, e como neste estudo, não identificaram indivíduos homozigotos (D/D) entre a população estudada.

Neste estudo, não foi observada associação entre a deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE* com o diabetes gestacional.

Os polimorfismos da região do gene *RAGE* em estudo, -429T>C, -374T>A e a deleção de 63pb (-345_-407pb) são funcionais e os alelos menos frequentes determinaram um aumento na expressão da proteína *RAGE* de 2-, 3- e 4 vezes, respectivamente, em ensaios *in vitro* (HUDSON *et al.*, 2001). Estes autores propõem que os sítios mutados dos referidos polimorfismos (-429C, -374A e 63Del) com base em estudos de EMSA (*E*lectrophoretic *M*obility *S*hift *A*ssay) diminuem a afinidade de um repressor transcricional, o que promove maior expressão da proteína *RAGE* e consequentemente de seus efeitos fisiológicos.

Podemos inferir do estudo dos polimorfismos da região promotora de *RAGE* que o aumento da expressão de *RAGE* não afeta de modo significativo indivíduos com diabetes gestacional. Esta hipótese apresenta como limitação não dispormos de nenhuma quantificação da proteína *RAGE*.

6.2.5 O polimorfismo G82S do exon 3 do gene *RAGE*

A Tabela 21 (Item 5.3.2, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em questão.

A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,512$) ou alélica ($P=0,232$) entre os grupos estudados.

O alelo menos freqüente (82S) não foi encontrado no grupo controle e a sua frequência foi inferior a 1% no grupo DMG. Entretanto, os dados são similares aos descritos por NAKA *et al.*, 2006 quando compararam as frequências deste polimorfismo com diabetes tipos 1 e 2 em Euro-Brasileiros (0,9%). Em contraste, o alelo S82 apresenta elevada frequência em populações de orientais, como Chineses (23%, Liu *et al.*, 1999) e Japoneses (~12%; Yohioka *et al.*, 2005).

Para esta análise o tamanho amostral foi um limitador para a obtenção de comparações com maior confiabilidade estatística. Este estudo foi desenvolvido como um ensaio prospectivo e demonstrou que o polimorfismo G82S não está associado ao diabetes gestacional. Pela baixa frequência do alelo 82S em nossa população Euro-Brasileira (<1%), os possíveis efeitos desta variação devem ser pouco expressivos em termos populacionais.

6.2.6 O polimorfismo 346G>A (R51Q) do gene da preprorelina

A Tabela 22 (Item 5.3.3, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em questão.

O polimorfismo R51Q foi associado com concentrações plasmáticas menores de grelina e com a obesidade. Ainda, este polimorfismo é um sítio para a clivagem proteolítica do polipeptídeo preprorelina, cuja clivagem produz a grelina madura (UKKOLA *et al.*, 2002).

O polimorfismo R51Q foi genotipado através da amplificação de um fragmento do exon 2 do gene da preprorelina pelo ensaio de PCR (item 4.1.5.3, Material e Métodos). As frequências genotípicas obtidas para esta posição se mostraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 22). Os grupos em estudo apresentaram diferenças significativas quanto às frequências genotípicas ($P=0,0002$) e alélicas ($p= 0,0001$).

A tabela 30, na sequência, sumariza a comparação dos resultados deste estudo e outros trabalhos publicados.

Quando comparada a frequência alélica obtida neste trabalho com outras populações, observa-se que esta é similar à Euro-Brasileiros obesos, aos Finlandeses hipertensos e saudáveis (POYKKO *et al.*, 2003) e a crianças alemãs extremamente obesas (HINNEY *et al.*, 2002). Com relação às demais populações, a frequência alélica encontrada é superior em ambos os grupos estudados.

TABELA 30- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO R51Q DO GENE DA PREPROGRELINA COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipos (%)			Alelo (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-Brasileiros	DMG	150	97,2	2,8	0	1,3
	Saudáveis	600	88,0	11,8	0,2	6
Euro-Brasileiros	Obesos	142	141	1	0	0,4
	Saudáveis	153	151	2	0	0,7
DANTAS, 2008						
Finlandeses- OPERA	Hipertensos	507	93,7	6,3	0	1,2
(Projeto Oulu)	Saudáveis	521	97,5	2,5	0	3
POYKKO <i>et al.</i> , 2003						
Crianças alemãs	Extremamente obesas	215	96,7	3,3	0	1,6
	Peso normal	93	96,8	3,2	0	1,6
HINNEY <i>et al.</i> , 2002						
Dinamarqueses	Obesos	234	99,0	1,0	0	0,4
	Não-obesos	323	98,0	2,0	0	1,2
	DM2	541	98,0	2,0	0	0,9
	Saudáveis	229	99,0	1,0	0	0,7
LARSEN <i>et al.</i> , 2005						
Italianos (mulheres)	AN	59	100	0	0	0
	BN	114	99,2	0,8	0	0,4
	Saudáveis	119	98,4	1,6	0	0,8
MONTELEONE <i>et al.</i> , 2006						
Amish (Pensilvânia)	SM	823	91,8	8,2	0	3
STEINLE <i>et al.</i> , 2005						
SOS (Sujeitos obesos suecos)	Obesos	96	93,7	6,3	0	3
	Saudáveis	96	100	0	0	0
UKKOLA <i>et al.</i> , 2001						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; SM: Síndrome metabólica.

Estudos prévios de associação do polimorfismo R51Q com diabetes e obesidade apresentam resultados conflitantes. O alelo menos frequente 51Q não foi associado com diabetes tipo 2 e obesidade, segundo Larsen *et al.*, 2005.

Neste estudo, o alelo 51Q foi caracterizado como um fator protetor para o desenvolvimento do diabetes gestacional. Gestantes que apresentem o alelo 51Q apresentam cerca de 5 vezes menos chance de desenvolver DMG (*Odds ratio* 5,64, 95%IC 2,1-15,5).

Dezaki *et al.*, 2006 mostraram que a liberação da grelina das ilhotas pancreáticas contra-regula a liberação de insulina induzida pela glucose. Eles mostraram também que ratos nocauteados para o gene da grelina apresentavam resposta diminuída à sobrecarga de glucose e aumentada liberação de insulina.

Steinle *et al.*, 2005 mostraram que o alelo 51Q é um fator protetor contra a síndrome metabólica, um achado comumente associado ao diabetes e à obesidade. A resistência à insulina, característica primordial da síndrome metabólica é comum à gestação e está exacerbada nas gestantes diabéticas.

Com base no descrito anteriormente, nossa hipótese para justificar o efeito protetor do 51Q em relação ao diabetes gestacional esta sumarizado na Figura 29.

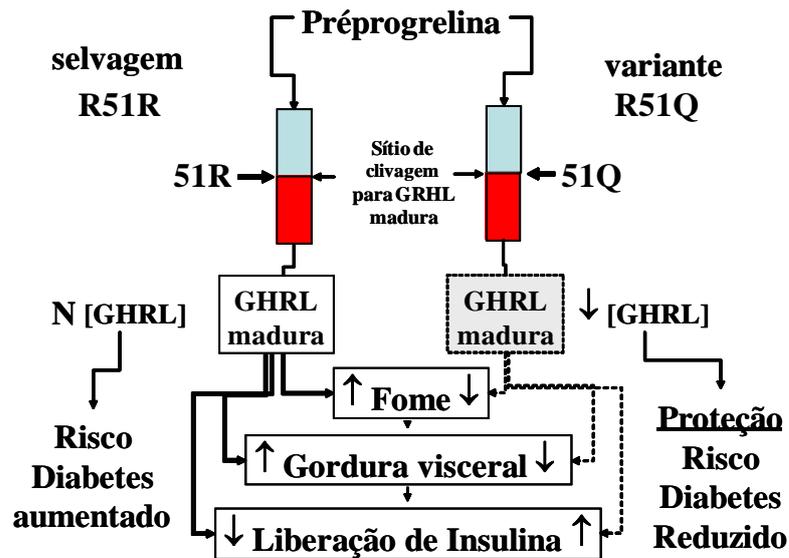


Figura 29. Hipótese sobre o efeito protetor do alelo 51Q do gene da grelina sobre o diabetes gestacional.

O alelo 51Q condiciona para menor produção de grelina madura, quando comparado ao alelo 51R. A menor concentração de grelina reduz fatores de predisposição ao diabetes gestacional como o aumento ponderal (fome), e gordura visceral (resistência à insulina) e favorece a maior liberação de insulina.

Propomos como hipótese, que o efeito protetor do alelo 51Q sobre o diabetes gestacional está relacionado ao efeito da grelina sobre a liberação de insulina pelo pâncreas. Indivíduos que apresentem o alelo 51Q podem apresentar uma clivagem menos efetiva da preprogrelina, gerando como consequência menor concentração sérica de grelina madura (UKKOLA *et al.*, 2002). Como a grelina inibe a liberação de insulina, indivíduos com o alelo 51Q terão maior disponibilidade de insulina, decorrente de menor inibição da liberação desta. Desta forma, o alelo 51Q protege contra efeitos da resistência à insulina durante a gravidez, corroborando com os achados protetores da síndrome metabólica.

De modo adicional, a grelina é um hormônio orexígeno (induz o apetite) e aumenta a gordura visceral (ARVAT *et al.*, 2000). Menor concentração de grelina, associada ao alelo 51Q, pode minimizar os efeitos desta sobre o excesso ponderal, reduzindo os riscos para o diabetes gestacional.

Certamente outros efeitos ou interações da grelina e o polimorfismos R51Q frente às complexas alterações metabólicas associadas ao diabetes gestacional podem estar presentes. Não é possível descartar que o efeito observado reflita o

envolvimento de outros genes que apresentem um desequilíbrio de ligação com o polimorfismo do gene da preprorelina em tela.

Por outro lado, Poykko *et al.*, 2003 reportaram que o alelo 51Q é um marcador de risco para diabetes tipo 2 e hipertensão, em oposição a nossa observação com o DMG. A divergência poderia ser explicada pela população Finlandesa de hipertensos, com doença cardiovascular estudada por Poykko *et al.*, 2003, ser muito diferente da estudada neste trabalho.

Como fatores limitantes da hipótese proposta para o efeito protetor do alelo 51Q, ressaltamos que não dispomos de quantificação da grelina ou quaisquer outros estudos funcionais para a proteína mutada. Estas observações permanecem como sugestões para futuros trabalhos.

6.2.7 O polimorfismo 408C>A (L72M) do gene da preprorelina

A Tabela 22 (Item 5.3.3, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em tela.

O polimorfismo L72M foi determinado através da amplificação de um fragmento do exon 2 do gene da preprorelina pelo ensaio de PCR-RFLP (item 4.1.5.3, Material e Métodos). As frequências obtidas para esta posição se mostraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 22). As frequências genotípicas ($P=0,321$) e alélicas ($P=0,383$) não diferiram significativamente entre os grupos em estudo.

A tabela 31, em sequência, sumariza os dados obtidos neste estudo e compara com outros trabalhos da literatura.

A frequência do alelo 72M observada em Euro-Brasileiras, neste trabalho, foi similar a uma população de brancos com síndrome metabólica e saudáveis (8-9%), de acordo com Bing *et al.*, 2005 e a uma população de alemães com *Diabetes mellitus* tipo 2 (5%) e saudáveis (8%), segundo Berthold *et al.*, 2009. Dados de Dantas, 2008 para uma população de euro-brasileiros obesos e saudáveis, foram similares aos encontrados para a população de gestantes em estudo no projeto em tela. Quando comparada a frequência alélica do grupo de gestantes controle

utilizado neste estudo, com uma população de crianças alemãs extremamente obesas e de peso normal (HINNEY *et al.*, 2002); em Dinamarqueses obesos, não obesos, diabéticos tipo 2 e saudáveis (LARSEN *et al.*, 2005); em Italianas com anorexia e bulimia nervosa (MONTELEONE *et al.*, 2006); em sujeitos obesos suecos (UKKOLA *et al.*, 2001); em judeus da Pensilvânia (STEINLE *et al.*, 2005) e italianos saudáveis (ZAVARELLA *et al.*, 2008) constatamos que esta foi bastante similar (4-9%).

Coreanos (LEE *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006) e chineses (WANG *et al.*, 2009) apresentaram frequência alélica de 3 a 4 vezes superior (21-23%) à população de gestantes estudada. Este fato nos permite inferir que populações asiáticas apresentam frequência elevada do alelo menos frequente quando comparada às demais populações e, em especial, à população Euro-Brasileira.

TABELA 31- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO L72M DO GENE DA PREPROGRELINA COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CA	AA	A
Euro-Brasileiros	DMG	150	88,1	11,2	0,7	6
	Saudáveis	600	84,7	15,0	0,3	8
Euro-Brasileiros	Obesos	143	126	16	1	6,3
	Saudáveis	153	134	18	1	6,5
DANTAS, 2008						
Coreanos	DM2	69	59,4	37,7	2,9	22
	Função renal normal	69	58,0	37,7	4,3	23
	Disfunção renal	69	84,1	14,5	1,4	9
LEE et al, 2006						
Crianças alemãs	Extremamente obesas	215	81,9	18,1	0	9
	Peso normal	93	82,8	17,2	0	9
HINNEY et al, 2002						
Chineses	SOP	271	61,6	34,7	3,7	22
	Saudáveis	296	60,7	35,1	4,2	21
WANG et al, 2009						
Americanos	LNH	308	84,0	16,0	0	16
	Saudáveis	684	84,0	15,0	1,0	16
SKIBOLA et al, 2005						
DanMONICA (brancos)	SM	558	83,9	15,1	1,0	9
	Saudáveis	4268	85,1	14,2	0,7	8
BING et al, 2005						
Coreanos	DM2	206	64,6	31,5	3,9	20
	Saudáveis	80	67,5	28,8	3,8	18
KIM et al, 2006						
Dinamarqueses	Obesos	229	87,0	13,0	0	7
	Não-obesos	316	86,0	14,0	0	7
	DM2	528	86,0	13,0	0	7
	Saudáveis	229	85,0	14,0	1,0	8
LARSEN et al, 2005						
Italianas	AN	59	88,2	11,8	0	6
	BN	114	90,4	9,6	0	5
	Saudáveis	119	91,6	8,4	0	4
MONTELEONE et al, 2006						
Amish (Pensilvânia)	SM	800	93,2	6,8	0	4
STEINLE et al, 2005						
SOS (Sujeitos obesos suecos)	Obesos	96	84,4	12,5	3,1	9
	Saudáveis	96	87,5	12,5	0	6
UKKOLA et al, 2001						
Alemãs	DM2	420	89,8	9,5	0,7	5
	Saudáveis	430	84,6	15,2	0,2	8
BERTHOLD et al, 2009						
Italianos	Saudáveis	1420	82,8	15,8	1,4	9
ZAVARELLA et al 2008						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; SOP: Síndrome do ovário policístico; LNH: Linfoma não-Hodgkin; SM: Síndrome metabólica; AN: Anorexia nervosa; BN: Bulimia nervosa.

Americanos com linfoma não Hodgkin também apresentaram frequência alélica superior (16%) às descritas para Euro-Brasileiras, entretanto menor quando comparada a asiáticos.

O polimorfismo L72M foi associado como preditor de disfunção renal no diabetes tipo 2 (LEE *et al.*, 2006) e foi associado à obesidade por Ukkola *et al.*, 2001. O polimorfismo L72M e sua associação com a obesidade, fator predisponente para o diabetes, tornou relevante a investigação do seu efeito no DMG.

Nossos resultados nos permitem concluir que o polimorfismo L72M não está associado ao diabetes gestacional.

Não há relatos de outros estudos desta variabilidade genética em populações com diabetes gestacional, reforçando a originalidade deste estudo.

6.2.8 O polimorfismo -30G>A do promotor pancreático do gene da glucoquinase

A Tabela 23 (Item 5.3.4, Resultados) sumariza os dados obtidos para os grupos e o polimorfismo em tela.

A tabela 32, em sequência, sumariza os dados obtidos neste estudo e compara com outros trabalhos da literatura.

Mulheres com mutações no gene da glucoquinase têm frequência aumentada de diabetes gestacional (SAKER *et al.*, 1996; ELLARD *et al.*, 2000). Variantes comuns na GCK, incluindo a variante -30G>A têm sido associadas com disfunção das células β pancreáticas e com diabetes (SHAAT *et al.*, 2006).

Sendo a glucoquinase (hexoquinase IV) um importante sensor para a liberação de insulina pelo pâncreas, é esperado que variações genéticas que afetem a concentração da enzima ou sua conformação afetem a glicemia. Várias mutações do gene da glucoquinase estão relacionadas ao diabetes monogênico MODY-2 (*maturity onset diabetes of the young type 2*), mais recentemente designado de GCK-MODY (SHAAT *et al.*, 2006).

TABELA 32- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -30G>A DO PROMOTOR PANCREÁTICO DO GENE DA GLUCOQUINASE COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-Brasileiros	DMG	150	57,3	38,0	4,8	24
	Saudáveis	600	64,5	31,0	4,5	20
Afro- Americanas	DMG	94	57,1	37,8	4,1	23
	DMG e DM2 pós	77	64,9	33,8	1,3	18
	Saudáveis	99	63,6	34,3	2,0	19
CHIU <i>et al.</i> , 1994						
Escandinavas	DMG	648	67,8	28,2	4,0	18
	Saudáveis (gestantes)	1232	72,3	25,7	2,0	15
SHAAT <i>et al.</i> , 2006						
Dinamarqueses (Inter99)	Intolerantes à glucose	684	66,0	31,0	4,0	19
	DM2	1408	70,0	28,0	2,0	16
	Saudáveis	4773	72,0	26,0	2,0	15
ROSE <i>et al.</i> , 2005						
Alemãs (Estudo Luric)	DAC	1921	64,0	32,0	4,0	20
	Saudáveis	378	68,0	29,0	3,0	18
MÄRZ <i>et al.</i> , 2004						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: *Diabetes mellitus* gestacional; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM2 pós: *Diabetes mellitus* tipo 2 pós gestação; DAC: doença arterial coronariana.

O polimorfismo -30G>A da região promotora da glucoquinase pancreática, foi associado ao diabetes tipo 2 (HOLMKVIST *et al.*, 2008), diabetes gestacional (SHAAT *et al.*, 2006) e obesidade (GOMEZ-ZUMAQUERO *et al.*, 2008). Entretanto, alguns estudos não conseguiram confirmar estas associações (YAMADA *et al.*, 1997, HOLMKVIST *et al.*, 2008).

As frequências genotípicas obtidas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando comparadas as frequências genotípicas ($P=0,240$) e alélicas ($P=0,161$) obtidas entre os grupos, estas não foram significativamente diferentes.

As frequências do alelo -30A observadas neste estudo, comparadas com gestantes Afro-Americanas saudáveis (19%) e na presença do diabetes gestacional (23%) foram similares (CHIU *et al.*, 1994). O mesmo efeito foi observado para

gestantes saudáveis (15%) e diabéticas (18%) de origem escandinava (SHAAT *et al.*, 2006).

Ao analisar as frequências alélicas com populações apresentando diabetes tipo 2 (ROSE *et al.*, 2005) e doença arterial coronariana (MARZ *et al.*, 2004), observa-se que as frequências permanecem similares às reportadas neste trabalho (15-20%).

Nossos resultados mostram que o polimorfismo -30G>A do promotor pancreático do gene da glucoquinase não está associado ao diabetes gestacional em Euro-Brasileiras.

6.2.9 Validação do procedimento de PCR-RFLP

As genotipagens através de PCR-RFLP foram validadas por comparações com amostras previamente caracterizadas por PCR-RFLP e confirmadas por reação de sequenciamento de DNA para os ensaios envolvendo as variantes genéticas do gene *RAGE*, disponíveis no laboratório de Bioquímica Clínica e oriundas de projetos anteriores. Todas as comparações forneceram resultados esperados.

Para o gene da preprorelina foram sequenciadas cerca de 40 amostras (~5% do total). As sequências obtidas não permitiram discriminar as variantes em estudo com sequências de alta qualidade. Novos ensaios de sequenciamento serão realizados para este objetivo.

Foram sequenciadas cerca de 8% do total das amostras deste estudo para o gene da glucoquinase (-30G>A). Cerca de 50% destas renderam sequências de boa qualidade e que puderam ser analisadas (Figura 26), confirmando os resultados da PCR-RFLP. Não foram observados resultados discordantes.

6.2.10 Comparações entre as variabilidades genéticas e outros parâmetros

As variáveis e os polimorfismos foram associados inicialmente através da análise de correlação linear de Pearson (Tabela 24). Para todas as análises dos

polimorfismos foi utilizado o modelo dominante aonde o genótipo selvagem (mais frequente) em homozigose é comparado à soma dos demais genótipos para cada variação.

O grupo DMG não apresentou correlação entre as variáveis em estudo e os polimorfismos -374T>A, 63Del e G82S do gene *RAGE*. Certamente o tamanho da amostra, expressivamente menor do grupo DMG quando comparada ao grupo controle pode explicar parte deste resultado.

Outro elemento importante é a baixa frequência de algumas variantes como 82S, 63Del, -429C e 72M que inviabiliza a comparação ou mesmo podem produzir resultados falsos. Portanto, as comparações com os respectivos polimorfismos foram reportadas, mas não foram consideradas relevantes para discussões e análises subsequentes.

Polimorfismo R51Q da grelina e marcadores bioquímicos

Como o polimorfismo R51Q apresentou diferença significativa entre os grupos foi analisado separadamente (Tabela 25). O grupo DMG não apresentou nenhuma correlação significativa provavelmente devido à baixa frequência do alelo 51Q, neste grupo, com apenas quatro indivíduos com o genótipo R51Q.

Entre as correlações significativas, o principal destaque está na associação do alelo 51Q com a redução do HDL-C ($r = -0,232$; $P < 0,0001$). Esta associação também se reflete nos resultados de correlação significativa para os demais índices de risco $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$, Colesterol/HDL e LDL-C/HDL-C, em que a redução na fração HDL-C promove associação significativa positiva.

A análise da concentração sérica do perfil lipídico e marcadores de risco cardiovascular (Tabela 25) com o polimorfismo R51Q para o grupo controle confirma os resultados da análise de correlação e evidencia que os portadores do alelo 51Q têm concentração menor de HDL-C, sugerindo que estes indivíduos possam apresentar um fator de risco para a doença cardiovascular maior quando comparados aos portadores do alelo 51R em homozigose. Também, todos os indicadores de risco cardiovascular $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$, colesterol/HDL-C e LDL-C/HDL-

C foram expressivamente maiores ($P < 0,0001$) em gestantes saudáveis portadoras do alelo 51Q.

Martin *et al.*, 2008 estudando Canadenses saudáveis não observou associação de polimorfismos da preprorelina com o perfil lipídico, sendo que a variante R51Q não fazia parte deste estudo. Larsen *et al.*, 2005 não encontraram associação dos polimorfismos L72M e R51Q da grelina com o perfil lipídico e glicemia em pacientes diabéticos tipo 2 e obesos.

No presente não é possível explicar este achado com base nas ações fisiológicas da grelina. Novos estudos para confirmar este achado e elucidar o mecanismo pelo qual o alelo 51Q está associado a uma redução no HDL-C em gestantes saudáveis devem ser realizados.

Polimorfismo -30G>A da glucoquinase e glicemia

A análise de correlação evidenciou um efeito antagônico do alelo -30A do polimorfismo -30G>A da glucoquinase sobre a glicemia de jejum entre os grupos controle e DMG (Tabela 24).

Para gestantes saudáveis (grupo controle) a presença do alelo -30A condiciona para um aumento discreto, mas significativo da glicemia em jejum sendo que gestantes com os genótipos GA e AA apresentam uma aumento médio da glicemia de 1,3 mg/dL (~1%) e 4,7 mg/dL (~6%) como observado na Tabela 27. Este resultado esta em concordância com aquele descrito por Rose *et al.*, 2005, que descreveram para uma população Dinamarquesa, predominantemente normoglicêmica, incrementos de 1,8 mg/dL e 3,6 mg/dL para indivíduos com genótipos -30GA e -30AA, respectivamente, em relação aos -30GG. O mesmo efeito foi observado sobre a glicemia após sobrecarga de glucose. Estes autores não analisaram o efeito deste polimorfismo sobre a glicemia em diabéticos e intolerantes à glucose. Rose *et al.*, 2005 concluem que o alelo -30A confere um risco aumentado para intolerância à glucose e síndrome metabólica.

Para o grupo com DMG foi observado um efeito oposto, com o alelo -30A favorecendo a redução da glicemia, sem afetar a glicemia após sobrecarga ou o controle glicêmico avaliado pela concentração da hemoglobina glicada (Tabela 27).

A Figura 27 ilustra o comportamento da glicemia de jejum frente aos genótipos do polimorfismo -30G>A da região promotora do promotor do pâncreas do gene da glucoquinase. Enquanto no grupo controle a concentração de glucose é significativamente diferente entre todos os genótipos, o grupo DMG a diferença significativa ocorre apenas entre os dois homozigotos -30GG e -30AA. É importante ressaltar que o grupo DMG apresenta um tamanho amostral significativamente menor que o grupo controle e não é possível eliminar o efeito de um resultado espúrio decorrente deste fator.

Rose *et al.*, 2005 reconhecem não haver explicação no presente para o efeito do alelo -30A da glucoquinase sobre a glicemia. As hipóteses propostas pelos referidos autores são genéricas e sugerem que o alelo -30A ou outras variantes genéticas em desequilíbrio de ligação com esta alterem a expressão da glucoquinase favorecendo o incremento da glicemia. Esta hipótese é corroborada por Stone *et al.*, 1996 que descreveram que o alelo -30A está associado com uma redução da função da célula β pancreática em Americanos de origem Japonesa.

Em contraponto, Rissanen *et al.*, 1998 não observaram associação do polimorfismo -30G>A com a secreção de insulina em Finlandeses saudáveis, apresentando intolerância à glucose e diabetes tipo 2.

O controverso efeito do alelo -30A do polimorfismo -30G>A da glucoquinase observado neste trabalho sobre a glicemia, requer novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos no processo.

6.3 Considerações finais

O diabetes gestacional é uma patologia de elevada frequência na população Brasileira que afeta tanto a gestante quanto o feto.

Este projeto de pesquisa estudou o comportamento de marcadores tradicionais para o diabetes e suas associações com marcadores moleculares, caracterizados por polimorfismos de genes que têm envolvimento com o diabetes ou fatores de risco para seu desenvolvimento.

Reconhecidamente poucos estudos que associam variabilidade genética estão disponíveis para o diabetes gestacional. É neste contexto que se situa o presente trabalho. Contribuir para o conhecimento de novos marcadores para diagnóstico e fatores de risco ou proteção associados ao diabetes gestacional.

7. CONCLUSÕES

- A concentração sérica de triglicérides e o marcador de risco Log(TG/HDL-C) estão significativamente aumentados no grupo com DMG. Estes foram os marcadores que melhor discriminaram o grupo com diabetes gestacional do grupo controle saudável.
- Os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del da região promotora, e G82S do exon 3 do gene *RAGE* não estão associados ao diabetes gestacional.
- O polimorfismo L72M do exon 2 do gene da preprorelina não está associado ao diabetes gestacional.
- O polimorfismo R51Q do exon 2 do gene da preprorelina está associado ao diabetes gestacional, atuando o alelo 51Q como um fator protetor ao desenvolvimento da doença (*odds ratio* 0,20; 95IC% 0,07-0,56). Gestantes com o alelo 51Q apresentam risco 5 vezes menor de desenvolver diabetes gestacional.
- O alelo 51Q do gene da preprorelina está associado a uma menor concentração sérica de HDL-colesterol favorecendo, nas portadoras da variante, o risco para doença arterial coronariana.
- O polimorfismo -30G>A da região promotora do promotor pancreático da glucoquinase não está associado ao diabetes gestacional.
- O alelo -30A do promotor pancreático do gene da glucoquinase está associado ao incremento na glicemia de jejum em gestantes saudáveis. Este efeito não pode ser comprovado no grupo com diabetes gestacional.

REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 32 Suppl 1, p. S62-67, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v.33 Suppl 1, p. S62-S69, 2010.

ARVAT, E.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F.; DEGHENGI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 23, n. 8, p. 493-495, 2000.

BALAJI, V.; MADHURI, B. S.; ASHALATHA, S.; SHEELA, S.; SURESH, S.; SESHIAH, V. A1C in gestational *Diabetes mellitus* in Asian Indian women. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1865-1867, 2007.

BAPTISTE-ROBERTS, K.; BARONE, B. B.; GARY, T. L.; GOLDEN, S. H.; WILSON, L. M.; BASS, E. B.; NICHOLSON, W. K. Risk factors for type 2 diabetes among women with gestational diabetes: a systematic review. **Am J Med**, v. 122, n. 3, p. 207-214 e204, 2009.

BARROSO, I. Genetics of Type 2 diabetes. **Diabet. Med.**, v. 22, n. 5, p. 517-535, 2005.

BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestational *Diabetes mellitus* and its association with Type 2 diabetes. **Diabet. Med.**, v. 21, n. 2, p. 103-113, 2004.

BERTHOLD, H. K.; GIANNAKIDOU, E.; KRONE, W.; MANTZOROS, C. S.; GOUNI-BERTHOLD, I. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is associated with a decreased risk for type 2 diabetes. **Clin Chim Acta**, v. 399, n. 1-2, p. 112-116, 2009.

BING, C.; AMBYE, L.; FENGER, M.; JORGENSEN, T.; BORCH-JOHNSEN, K.; MADSBAD, S.; URHAMMER, S. A. Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits. **Diabet Med**, v. 22, n. 9, p. 1157-1160, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao *Diabetes mellitus*: hipertensão arterial e *Diabetes mellitus*. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas – Brasília. **Ministério da Saúde**, p. 102, 2001.

BRIZZI, P.; TONOLO, G.; ESPOSITO, F.; PUDDU, L.; DESSOLE, S.; MAIOLI, M.; MILIA, S. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 2, p. 430-434, 1999.

BRYAN, L. A. Genetics of *Diabetes mellitus* (Screening and sequencing for monogenic or inherited forms) **Arnold O. Beckman Conference**, 2007.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational *Diabetes mellitus*. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 3, p. 485-491, 2005.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S105-111, 2007.

BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational *Diabetes mellitus*. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1256S-1261S, 2000.

CARPENTER, M. W. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S246-250, 2007.

CASEY, B. M.; LUCAS, M. J.; MCINTIRE, D. D.; LEVENO, K. J. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. **Obstet Gynecol**, v. 90, n. 6, p. 869-873, 1997.

CDA. Gestational diabetes: Preventing complications in pregnancy. **Canadian Diabetes Association**, 2005-2008.

CHIU, K. C.; GO, R. C.; AOKI, M.; RIGGS, A. C.; TANIZAWA, Y.; ACTON, R. T.; BELL, D. S.; GOLDENBERG, R. L.; ROSEMAN, J. M.; PERMUTT, M. A. Glucokinase gene in gestational *Diabetes mellitus*: population association study and molecular scanning. **Diabetologia**, v. 37, n. 1, p. 104-110, 1994.

COUSTAN, D. R.; NELSON, C.; CARPENTER, M. W.; CARR, S. R.; ROTONDO, L.; WIDNESS, J. A. Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. **Obstet Gynecol**, v. 73, n. 4, p. 557-561, 1989.

CUESTA-MUNOZ, A. L.; HUOPIO, H.; OTONKOSKI, T.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; NANTO-SALONEN, K.; RAHIER, J.; LOPEZ-ENRIQUEZ, S.; GARCIA-GIMENO, M. A.; SANZ, P.; SORIGUER, F. C.; LAAKSO, M. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 2164-2168, 2004.

DAMM, P.; VESTERGAARD, H.; KUHL, C.; PEDERSEN, O. Impaired insulin-stimulated nonoxidative glucose metabolism in glucose-tolerant women with previous gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 174, n. 2, p. 722-729, 1996.

DANTAS, V.G.L. Estudo de associação de variações dos genes *BCHE* (butirilcolinesterase) e *GHRL* (grelina) com obesidade. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 2008.

DEZAKI, H.; SONE, H.; KOIZUMI, M.; NAKATA, M.; KAKEI, M.; NAGAI, H.; HOSODA, H.; KANGAWA, K.; YADA, T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. **Diabetes**, v. 55, p. 3486-3493, 2006.

DIB, S.A. Heterogeneity of type 1 *Diabetes mellitus*. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.52, n.2, p. 205-218, 2008.

DOBIASOVA M.; URBANOVA Z.; RAUCHOVA H.; SAMANEK M.; FROHLICH J.J. High density lipoprotein subclasses and esterification rate of cholesterol in children: effect of gender and age. **Acta Paediatr**, v.87, p. 918-923, 1998.

DOOLEY, S. L.; METZGER, B. E.; CHO, N. H. Gestational *Diabetes mellitus*. Influence of race on disease prevalence and perinatal outcome in a U.S. population. **Diabetes**, v. 40 Suppl 2, p. 25-29, 1991.

EDISON, R. J.; BERG, K.; REMALEY, A.; KELLEY, R.; ROTIMI, C.; STEVENSON, R. E.; MUENKE, M. Adverse birth outcome among mothers with low serum cholesterol. **Pediatrics**, v. 120, n. 4, p. 723-733, 2007.

ELLARD, S.; BEARDS, F.; ALLEN, L. I.; SHEPHERD, M.; BALLANTYNE, E.; HARVEY, R.; HATTERSLEY, A. T. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. **Diabetologia**, v. 43, n. 2, p. 250-253, 2000.

ENGLAND, L. J.; DIETZ, P. M.; NJOROGI, T.; CALLAGHAN, W. M.; BRUCE, C.; BUUS, R. M.; WILLIAMSON, D. F. Preventing type 2 diabetes: public health implications for women with a history of gestational *Diabetes mellitus*. **Am J Obstet Gynecol**, v. 200, n. 4, p. e361-368, 2009.

EWING, B. *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Gen. Res.**, v. 8, p. 75-185, 1998.

FALCONE, C.; CAMPO, I.; EMANUELE, E.; BUZZI, M. P.; ZORZETTO, M.; SBARSI, I.; CUCCIA, M. Relationship between the -374T/A *RAGE* gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. **Int. J. Mol. Med.**, v. 14, n. 6, p. 1061-1064, 2004.

FALCONE, C.; CAMPO, I.; EMANUELE, E.; BUZZI, M. P.; GEROLDI, D.; BELVITO, C.; ZORZETTO, M.; SBARSI, I.; CUCCIA, M. -374T/A polymorphism of the *RAGE* gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Clin. Chim. Acta**, v. 354, n. 1-2, p. 111-116, 2005.

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

FOWLER, M. J. Diabetes: magnitude and mechanisms. **Clin. Diabetes**, v. 25, p. 25-28, 2007.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-552, 1972.

FUKS, A. G. Insulinoterapia no *Diabetes mellitus* tipo 2: quando e como iniciar. **Int Clin Med**, v.1, n. A2, 2008.

GAIO, D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; NUCCI, L. B.; MATOS, M. C.; BRANCHTEIN, L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated

factors in a cohort of Brazilian women. **Hypertens Pregnancy**, v. 20, n. 3, p. 269-281, 2001.

GLOBOCNIK PETROVIC, M.; STEBLOVNIK, K.; PETERLIN, B.; PETROVIC, D. The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 220, n. 12, p. 873-876, 2003.

GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; ROJO-MARTINEZ, G.; GARCIA-ESCOBAR, E.; MARTIN-NUNEZ, G. M.; HARO, J.; ESTEVA, I.; RUIZ DE ADANA, M.; CUESTA, A. L.; OLVEIRA, G.; MORCILLO, S.; SORIGUER, F. The -30G>A polymorphism of the glucokinase gene promoter is associated with obesity in a population from southern Spain. **Obesity**, v. 16, n. 8, p. 1973-1975, 2008.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genet. Res.**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOULART, A. C.; GERMER, S.; REXRODE, K. M.; MARTIN, M.; ZEE, R. Y. Polymorphisms in advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) gene, insulin resistance, and type 2 *Diabetes mellitus*. **Clin Chim Acta**, v. 398, n. 1-2, p. 95-98, 2008.

HADDEN, D. R. When and how to start insulin treatment in gestational diabetes: a UK perspective. **Diabet Med**, v. 18, n. 12, p. 960-964, 2001.

HAGUE, W. M.; DAVOREN, P. M.; OLIVER, J.; ROWAN, J. Contraindications to use of metformin. Metformin may be useful in gestational diabetes. **BMJ**, v. 326, n. 7392, p. 762; author reply 762, 2003.

HATTERSLEY, A. T.; BEARDS, F.; BALLANTYNE, E.; APPLETON, M.; HARVEY, R.; ELLARD, S. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. **Nat Genet**, v. 19, n. 3, p. 268-270, 1998.

HEDDERSON, M. M.; FERRARA, A. High blood pressure before and during early pregnancy is associated with an increased risk of gestational *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2362-2367, 2008.

HELLMUTH, E.; DAMM, P.; MOLSTED-PEDERSEN, L. Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies. **Diabet Med**, v. 17, n. 7, p. 507-511, 2000.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2002.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHAFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 6, p. 2716, 2002.

HOFMANN, M. A.; DRURY, S.; HUDSON, B. I.; GLEASON, M. R.; QU, W.; LU, Y.; LALLA, E.; CHITNIS, S.; MONTEIRO, J.; STICKLAND, M. H.; BUCCIARELLI, L. G.; MOSER, B.; MOXLEY, G.; ITESCU, S.; GRANT, P. J.; GREGERSEN, P. K.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M. *RAGE* and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. **Genes Immun.**, v. 3, n. 3, p. 123-135, 2002.

HOLMKVIST, J.; ALMGREN, P.; LYSSSENKO, V.; LINDGREN, C. M.; ERIKSSON, K. F.; ISOMAA, B.; TUOMI, T.; NILSSON, P.; GROOP, L. Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes and future risk of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1738-1744, 2008.

HUDSON, B. I.; STICKLAND, M. H.; GRANT, P. J. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (*RAGE*) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1155-1157, 1998.

HUDSON, B. I.; STICKLAND, M. H.; FUTERS, T. S.; GRANT, P. J. Effects of novel polymorphisms in the *RAGE* gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1505-1511, 2001.

HUDSON, B. I.; STICKLAND, M. H.; FUTERS, T. S.; GRANT, P. J. Study of the -429 T/C and -374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease. **Diabetes Care**, v. 24, n. 11, p. 2004, 2001.

HUDSON, B. I.; CARTER, A. M.; HARJA, E.; KALEA, A. Z.; ARRIERO, M.; YANG, H.; GRANT, P. J.; SCHMIDT, A. M. Identification, classification, and expression of *RAGE* gene splice variants. **FASEB J.**, v. 22, n. 5, p. 1572-1580, 2008.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Limed, 1999.

JIXIONG, X.; BILIN, X.; MINGGONG, Y.; SHUQIN, L. -429T/C and -374T/A polymorphisms of *RAGE* gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 9, p. 2696-2697, 2003.

KANKOVA, K.; VASKU, A.; HAJEK, D.; ZAHEJSKY, J.; VASKU, V. Association of G82S polymorphism in the *RAGE* gene with skin complications in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 10, p. 1745, 1999.

KANKOVA, K.; ZAHEJSKY, J.; MAROVA, I.; MUZIK, J.; KUHROVA, V.; BLAZKOVA, M.; ZNOJIL, V.; BERANEK, M.; VACHA, J. Polymorphisms in the *RAGE* gene influence susceptibility to diabetes-associated microvascular dermatoses in NIDDM. **J. Diabetes Complications**, v. 15, n. 4, p. 185-192, 2001.

KANKOVA, K.; STEJSKALOVA, A.; HERTLOVA, M.; ZNOJIL, V. Haplotype analysis of the *RAGE* gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 *Diabetes mellitus*. **Nephrol Dial Transplant**, v. 20, n. 6, p. 1093-1102, 2005.

KAUTZKY-WILLER, A.; PRAGER, R.; WALDHAUSL, W.; PACINI, G.; THOMASETH, K.; WAGNER, O. F.; ULM, M.; STRELI, C.; LUDVIK, B. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. **Diabetes Care**, v. 20, n. 11, p. 1717-1723, 1997.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1862-1868, 2002.

KIM, D. J.; KIM, K. W.; CHO, N. H.; NOH, J. H.; LEE, M. S.; LEE, M. K. The cutoff value of fasting plasma glucose to differentiate frequencies of cardiovascular risk factors in a Korean population. **Diabetes Care**, v. 26, n. 12, p. 3354-3356, 2003.

KIM, S. Y.; JO, D. S.; HWANG, P. H.; PARK, J. H.; PARK, S. K.; YI, H. K.; LEE, D. Y. Preproghrelin Leu72Met polymorphism is not associated with type 2 *Diabetes mellitus*. **Metabolism**, v. 55, n. 3, p. 366-370, 2006.

KIRBIS, J.; MILUTINOVIC, A.; STEBLOVNIK, K.; TERAN, N.; TERZIC, R.; ZORC, M. The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (*RAGE*) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. **Coll Antropol**, v. 28, n. 2, p. 611-616, 2004.

KISLINGER, T.; FU, C.; HUBER, B.; QU, W.; TAGUCHI, A.; DU YAN, S.; HOFMANN, M.; YAN, S. F.; PISCHETSRIEDER, M.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 44, p. 31740-31749, 1999.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Structure and function of ghrelin. **Results Probl. Cell. Differ.**, v. 46, p. 89-115, 2008.

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D. C.; MEIN, C. A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A. B.; FROGUEL, P. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 8, p. 4005-4008, 2002.

KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational *Diabetes mellitus*: a cross-sectional and prospective study. **J Clin Pathol**, v. 49, n. 8, p. 634-637, 1996.

KUMARAMANICKAVEL, G.; RAMPRASAD, V. L.; SRIPRIYA, S.; UPADYAY, N. K.; PAUL, P. G.; SHARMA, T. Association of Gly82Ser polymorphism in the *RAGE* gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. **J. Diabetes Complications**, v. 16, n. 6, p. 391-394, 2002.

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

LARSEN, L. H.; GJESING, A. P.; SORENSEN, T. I.; HAMID, Y. H.; ECHWALD, S. M.; TOUBRO, S.; BLACK, E.; ASTRUP, A.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. Mutation analysis of the preproghrelin gene: no association with obesity and type 2 diabetes. **Clin. Biochem.**, v. 38, n. 5, p. 420-424, 2005.

LAUENBORG, J.; GRARUP, N.; DAMM, P.; BORCH-JOHNSEN, K.; JORGENSEN, T.; PEDERSEN, O.; HANSEN, T. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 1, p. 145-150, 2009.

LEE, D. Y.; KIM, S. Y.; JO, D. S.; HWANG, P. H.; KANG, K. P.; LEE, S.; KIM, W.; PARK, S. K. Preproghrelin Leu72Met polymorphism predicts a lower rate of

developing renal dysfunction in type 2 diabetic nephropathy. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 155, n. 1, p. 187-190, 2006.

LINDHEIMER, M. D.; TALER, S. J.; CUNNINGHAM, F. G. ASH position paper: hypertension in pregnancy. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 11, n. 4, p. 214-225, 2009.

LINDHOLM, E.; BAKHTADZE, E.; SJOGREN, M.; CILIO, C. M.; AGARDH, E.; GROOP, L.; AGARDH, C. D. The -374 T/A polymorphism in the gene encoding *RAGE* is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 49, n. 11, p. 2745-2755, 2006.

LIU, L.; XIANG, K. *RAGE* Gly82Ser polymorphism in diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, v. 22, p. 646, 1999.

MAGANHA, C. A.; VANNI, D. G.; BERNARDINI, M. A.; ZUGAIB, M. [Management of gestational diabetes]. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, n. 3, p. 330-334, 2003.

MARSEILLE-TREMBLAY, C.; ETHIER-CHIASSON, M.; FOREST, J. C.; GIGUERE, Y.; MASSE, A.; MOUNIER, C.; LAFOND, J. Impact of maternal circulating cholesterol and gestational *Diabetes mellitus* on lipid metabolism in human term placenta. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 6, p. 1054-1062, 2008.

MARTIN, G. R.; LOREDO, J. C.; SUN, G. Lack of association of ghrelin precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 4, p. 908-912, 2008.

MARZ, W.; NAUCK, M.; HOFFMANN, M. M.; NAGEL, D.; BOEHM, B. O.; KOENIG, W.; ROTHENBACHER, D.; WINKELMANN, B. R. G(-30)A polymorphism in the pancreatic promoter of the glucokinase gene associated with angiographic coronary artery disease and type 2 *Diabetes mellitus*. **Circulation**, v. 109, n. 23, p. 2844-2849, 2004.

METZGER, B. E.; BUCHANAN, T. A.; COUSTAN, D. R.; DE LEIVA, A.; DUNGER, D. B.; HADDEN, D. R.; HOD, M.; KITZMILLER, J. L.; KJOS, S. L.; OATS, J. N.; PETTITT, D. J.; SACKS, D. A.; ZROUPAS, C. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S251-260, 2007.

MEYER, W. J.; CARBONE, J.; GAUTHIER, D. W.; GOTTMANN, D. A. Early gestational glucose screening and gestational diabetes. **J. Reprod. Med.**, v. 41, n. 9, p. 675-679, 1996.

MIRAGLIA DEL GIUDICE, E.; SANTORO, N.; CIRILLO, G.; RAIMONDO, P.; GRANDONE, A.; D'ANIELLO, A.; DI NARDO, M.; PERRONE, L. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, n. 3, p. 447-450, 2004.

MONTELEONE, P.; TORTORELLA, A.; CASTALDO, E.; DI FILIPPO, C.; MAJ, M. No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene with anorexia nervosa or bulimia nervosa. **Neurosci. Lett.**, v. 398, n. 3, p. 325-327, 2006.

MOSES, R. G.; CHEUNG, N. W. Point: Universal screening for gestational *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1349-1351, 2009.

NAKA, C. L.; PICHETH, G.; ALCANTERA, V. M.; REA, R. R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PEDROSA FDE, O.; MARTINEZ, T. L.; SOUZA, E. M. The Gly82Ser polymorphism of the receptor of advanced glycation end product (*RAGE*) gene is not associated with type 1 or type 2 diabetes in a Brazilian population. **Diabetes Care**, v. 29, n. 3, p. 712-713, 2006.

NATHAN, D. M. Clinical review 146: The impact of clinical trials on the treatment of *Diabetes mellitus*. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 1929-1937, 2002.

NCBI Single nucleotide polymorphism. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (search rs1800624 and rs1800625).

NEWELL, A. M. Genetics for targeting disease prevention: diabetes. **Prim. Care**, v. 31, n. 3, p. 743-766, 2004.

OWEN, K.; HATTERSLEY, A. T. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 15, n. 3, p. 309-323, 2001.

PETTERSSON-FERNHOLM, K.; FORSBLOM, C.; HUDSON, B. I.; PEROLA, M.; GRANT, P. J.; GROOP, P. H. The functional -374 T/A *RAGE* gene polymorphism is

associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 891-894, 2003.

PICHETH, G.; HEIDEMANN, M.; PEDROSA, F. O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; COSTANTINI, C. O.; DA ROCHA MARTINEZ, T. L.; DE SOUZA, E. M. The -429 T>C polymorphism of the receptor for advanced glycation end products (*RAGE*) is associated with type 1 diabetes in a Brazilian population. **Clin. Chim. Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 163-164, 2007.

POYKKO, S.; UKKOLA, O.; KAUMA, H.; SAVOLAINEN, M. J.; KESANIEMI, Y. A. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 455-458, 2003.

RANKINEN, T.; ZUBERI, A.; CHAGNON, Y. C.; WEISNAGEL, S. J.; ARGYROPOULOS, G.; WALTZ, B.; PERUSSE, L.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 4, p. 529-644, 2006.

REECE, E. A.; LEGUIZAMON, G.; WIZNITZER, A. Gestational diabetes: the need for a common ground. **Lancet**, v. 373, n. 9677, p. 1789-1797, 2009.

RISSANEN, J.; SAARINEN, L.; HEIKKINEN, S.; KEKALAINEN, P.; MYKKANEN, L.; KUUSISTO, J.; DEEB, S. S.; LAAKSO, M. Glucokinase gene islet promoter region variant (G-->A) at nucleotide -30 is not associated with reduced insulin secretion in Finns. **Diabetes Care**, v. 21, n. 7, p. 1194-1197, 1998.

RIZZO, M.; BERNEIS, K.; ALTINOVA, A. E.; TORUNER, F. B.; AKTURK, M.; AYVAZ, G.; RINI, G. B.; SPINAS, G. A.; ARSLAN, M. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in women with gestational diabetes. **Diabet. Med.**, v. 25, n. 12, p. 1406-1411, 2008.

ROSE, C. S.; EK, J.; URHAMMER, S. A.; GLUMER, C.; BORCH-JOHNSEN, K.; JORGENSEN, T.; PEDERSEN, O.; HANSEN, T. A -30G>A polymorphism of the beta-cell-specific glucokinase promoter associates with hyperglycemia in the general population of whites. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3026-3031, 2005.

ROSNER, M. H. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. **Adv Clin Chem**, v. 49, p. 73-97, 2009.

ROWAN, J. A.; HAGUE, W. M.; GAO, W.; BATTIN, M. R.; MOORE, M. P. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. **N Engl J Med**, v. 358, n. 19, p. 2003-2015, 2008.

RUDOFISKY JR, G.; ISERMANN, B.; SCHILLING, T.; SCHIEKOFER, S.; ANDRASSY, M.; SCHNEIDER, J. G.; MORCOS, M.; HUMPERT, P. M.; SAYED, A. A. R.; WITTE, S.; RENN, W.; PFOHL, M.; HAMANN, A.; NOSIKOV, V.; SCHLEICHER, E.; HARING, H. U.; RUDOFISKY, G.; RITZ, E.; NAWROTH, P. P.; BIERHAUS, A. A 63bp deletion in the promoter of *RAGE* correlates with decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 112, p. 135-141, 2004.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDSTEIN, D. E.; MACLAREN, N. K.; MCDONALD, J. M.; PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of *Diabetes mellitus*. **Clin. Chem.**, v. 48, n. 3, p. 436-472, 2002.

SAKER, P. J.; HATTERSLEY, A. T.; BARROW, B.; HAMMERSLEY, M. S.; MCLELLAN, J. A.; LO, Y. M.; OLDS, R. J.; GILLMER, M. D.; HOLMAN, R. R.; TURNER, R. C. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1325-1328, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANTOS-AYARZAGOITIA, M.; SALINAS-MARTINEZ, A. M.; VILLARREAL-PEREZ, J. Z. Gestational diabetes: Validity of ADA and WHO diagnostic criteria using NDDG as the reference test. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 74, n. 3, p. 322-328, 2006.

SANTOS, K. G.; CANANI, L. H.; GROSS, J. L.; TSCHIEDEL, B.; PIRES SOUTO, K. E.; ROISENBERG, I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. **Mol. Genet. Metab.**, v. 85, n. 2, p. 149-156, 2005.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. *RAGE*: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 9, p. 368-375, 2000.

SEIM, I.; COLLET, C.; HERINGTON, A. C.; CHOPIN, L. K. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. **BMC Genomics**, v. 8, p. 298, 2007.

SETJI, T. L.; BROWN, A. J.; FEINGLOS, M. N. Gestational *Diabetes mellitus*. **Clin. Diabetes**, v. 23, n. 1, p. 17-22, 2005.

SHAAT, N.; KARLSSON, E.; LERNMARK, A.; IVARSSON, S.; LYNCH, K.; PARIKH, H.; ALMGREN, P.; BERNTORP, K.; GROOP, L. Common variants in MODY genes increase the risk of gestational *Diabetes mellitus*. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1545-1551, 2006.

SHAAT, N.; GROOP, L. Genetics of gestational *Diabetes mellitus*. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 569-583, 2007.

SKIBOLA, D. R.; SMITH, M. T.; BRACCI, P. M.; HUBBARD, A. E.; AGANA, L.; CHI, S.; HOLLY, E. A. Polymorphisms in ghrelin and neuropeptide Y genes are associated with non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 5, p. 1251-1256, 2005.

SOLOMON, C. G.; WILLETT, W. C.; CAREY, V. J.; RICH-EDWARDS, J.; HUNTER, D. J.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; SPEIZER, F. E.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J. E. A prospective study of pregravid determinants of gestational *Diabetes mellitus*. **JAMA**, v. 278, n. 13, p. 1078-1083, 1997.

SOLOMON, C. G.; CARROLL, J. S.; OKAMURA, K.; GRAVES, S. W.; SEELY, E. W. Higher cholesterol and insulin levels in pregnancy are associated with increased risk for pregnancy-induced hypertension. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 3, p. 276-282, 1999.

STEINLE, N. I.; POLLIN, T. I.; O'CONNELL, J. R.; MITCHELL, B. D.; SHULDINER, A. R. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 12, p. 6672-6677, 2005.

STONE, L. M.; KAHN, S. E.; FUJIMOTO, W. Y.; DEEB, S. S.; PORTE, D., JR. A variation at position -30 of the beta-cell glucokinase gene promoter is associated with reduced beta-cell function in middle-aged Japanese-American men. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 422-428, 1996.

SUGAYA, K.; FUKAGAWA, T.; MATSUMOTO, K.; MITA, K.; TAKAHASHI, E.; ANDO, A.; INOKO, H.; IKEMURA, T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics**, v. 23, n. 2, p. 408-419, 1994.

THOMSON, K. L.; GLOYN, A. L.; COLCLOUGH, K.; BATTEN, M.; ALLEN, L. I.; BEARDS, F.; HATTERSLEY, A. T.; ELLARD, S. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). **Hum Mutat**, v. 22, n. 5, p. 417, 2003.

TINTO, N.; ZAGARI, A.; CAPUANO, M.; DE SIMONE, A.; CAPOBIANCO, V.; DANIELE, G.; GIUGLIANO, M.; SPADARO, R.; FRANZESE, A.; SACCHETTI, L. Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e1870, 2008.

TOESCU, V.; NUTTALL, S. L.; MARTIN, U.; NIGHTINGALE, P.; KENDALL, M. J.; BRYDON, P.; DUNNE, F. Changes in plasma lipids and markers of oxidative estresse in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 1, p. 93-98, 2004.

TORLONI, M. R.; BETRÁN, A. P.; HORTA, B. L.; NAKAMURA, M. U.; ATALLAH, A. N.; MORON, A. F.; VALENTE, O. Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Obes. Rev.**, v. 10, p. 194-203, 2009.

TURHAN, N. O.; SECKIN, N. C.; AYBAR, F.; INEGOL, I. Assessment of glucose tolerance and pregnancy outcome of polycystic ovary patients. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 81, n. 2, p. 163-168, 2003.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E. E.; CHAGNON, M.; SJOSTROM, L.; BOUCHARD, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 8, p. 3996-3999, 2001.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; TSCHOP, M.; HEIMAN, M. L.; LEON, A. S.; RAO, D. C.; SKINNER, J. S.; WILMORE, J. H.; SJOSTROM, L.; BOUCHARD, C. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. **Obes. Res.**, v. 10, n. 8, p. 782-791, 2002.

VELHO, G.; BLANCHE, H.; VAXILLAIRE, M.; BELLANNE-CHANTELOT, C.; PARDINI, V. C.; TIMSIT, J.; PASSA, P.; DESCHAMPS, I.; ROBERT, J. J.; WEBER, I. T.; MAROTTA, D.; PILKIS, S. J.; LIPKIND, G. M.; BELL, G. I.; FROGUEL, P. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. **Diabetologia**, v. 40, n. 2, p. 217-224, 1997.

WALKER, J. J. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 356, n. 9237, p. 1260-1265, 2000.

WANG, K.; WANG, L.; ZHAO, Y.; SHI, Y.; CHEN, Z. J. No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene and polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 485-490, 2009.

WHO. Guidelines for the prevention, management and care of *Diabetes mellitus*. **Geneva: World Health Organization**, n. 32, p. 1-82, 2006.

WHO. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic. **Geneva World Health Organization**, 2009.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WINTER, W. E. Newly defined genetic diabetes syndromes: maturity onset diabetes of the young. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.

WITTEW, C. T.; KUSUKAWA, N. Nucleic acid techniques. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. 4 ed. Elsevier: St. Louis, 2006, p. 1407-1449.

WIZNITZER, A.; MAYER, A.; NOVACK, V.; SHEINER, E.; GILUTZ, H.; MALHOTRA, A.; NOVACK, L. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational *Diabetes mellitus*: a population-based study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 201, n. 5, p. e481-488, 2009.

WOOLLETT, L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 6, p. 1155-1161, 2005.

YAMADA, K.; YUAN, X.; ISHIYAMA, S.; ICHIKAWA, F.; KOYAMA, K. I.; KOYANAGI, A.; KOYAMA, W.; NONAKA, K. Clinical characteristics of Japanese men with glucokinase gene beta-cell promoter variant. **Diabetes Care**, v. 20, n. 7, p. 1159-1161, 1997.

YAMADA, Y.; KATO, K.; KAMEYAMA, T.; YOKOI, K.; MATSUO, H.; SEGAWA, T.; WATANABE, S.; ICHIHARA, S.; YOSHIDA, H.; SATOH, K.; NOZAWA, Y. Genetic factors for obesity. **Int. J. Mol. Med.**, v. 18, n. 5, p. 843-851, 2006.

YOO, T. W.; SUNG, K. C.; SHIN, H. S.; KIM, B. J.; KIM, B. S.; KANG, J. H.; LEE, M. H.; PARK, J. R.; KIM, H.; RHEE, E. J.; LEE, W. Y.; KIM, S. W.; RYU, S. H.; KEUM, D. G. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**, v. 69, n. 8, p. 928-933, 2005.

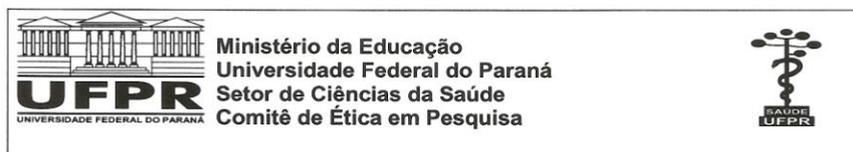
YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; TAKAKURA, Y.; UMEKAWA, T.; KOGURE, A.; TODA, H.; YOSHIKAWA, T. Association study of G1704T and G82S polymorphisms of *RAGE* gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients. **Metabolism**, v. 54, n. 4, p. 488-491, 2005.

ZAVARELLA, S.; PETRONE, A.; ZAMPETTI, S.; GUEORGUIEV, M.; SPOLETINI, M.; MEIN, C. A.; LETO, G.; KORBONITS, M.; BUZZETTI, R. A new variation in the promoter region, the -604 C>T, and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene are associated with protection to insulin resistance. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 4, p. 663-668, 2008.

ZHANG, X.; DECKER, A.; PLATT, R. W.; KRAMER, M. S. How big is too big? The perinatal consequences of fetal macrosomia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 198, n. 5, p. e511-516, 2008.

ANEXO 1

**Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de
Ciências da Saúde da UFPR**



Curitiba, 25 de junho de 2008.

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

Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Estudos fenotípicos e genotípicos de polimorfismos dos genes do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), Préprogrelina e Glucoquinase no diabetes gestacional**", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado com recomendação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 25 de junho de 2008.

Registro CEP/SD: 565.102.08.06

CAAE: 0135.0.208.091-08

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

Data para entrega do relatório final ou parcial: 26/12/2008.

Atenciosamente

Profa. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Profa. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

- a) Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “**Estudos fenotípicos e genotípicos de polimorfismos dos genes do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), Preprogrelina e Glucoquinase no diabetes gestacional**”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
- b) É importante que você leia e entenda toda a informação dada.
- c) O objetivo desta pesquisa é estudar variações genéticas no DNA e associá-las com o processo do diabetes gestacional.
- d) Caso você participe da pesquisa, não será necessário nenhum procedimento específico, pois será utilizado o sangue já coletado para outros exames de rotina não trazendo para você nenhum desconforto ou risco a mais, a não ser a coleta a qual você já irá realizar para outros exames.
- e) Não há riscos adicionais envolvidos na sua participação neste projeto.
- f) Contudo, os benefícios esperados são: conhecer as variações genéticas dos genes em estudo na população brasileira, procurar marcadores de risco ou proteção para o diabetes gestacional e fornecer elementos para a elaboração de futuras políticas públicas.
- g) Os pesquisadores Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos, Farmacêutica Bioquímica, mestranda do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná (contato: izabellacrs@hotmail.com fone (41) 3252-8328), Cyntia Maria Telles Fadel Picheth, professora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (fpicheth@ufpr.br , fone: (41) 3360-4086) e Geraldo Picheth, professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (gpicheth@ufpr.br, fone: 3360-4067) que poderão ser contatados (na Universidade Federal do Paraná, Curso de Farmácia, Rua Prof. Lothario Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP 80210-170 em horário comercial) são os responsáveis pelo projeto e poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.
- h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.
- i) A sua participação neste estudo é voluntária (sua escolha). Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não irá afetar de nenhuma maneira seu atendimento, que está garantido.

- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade (sigilo)** seja mantida.
- k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) **não** são da sua responsabilidade.
- l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- n) As amostras serão conservadas após a realização da pesquisa para posterior utilização em outras pesquisas científicas similares, mantendo-se a confidencialidade (sigilo) das mesmas como dito acima.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)
Local e data

Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos
Pesquisadora responsável

ANEXO 3

Planilha para coleta de dados das gestantes diabéticas

Caracterização do Paciente		Nº protocolo	Data
Nome:			___/___/___
Dados clínicos			
N	Dados	Obs.	
1	Semana de gestação	[] semanas	Número de gestações:
2	Idade	[] anos	
3	Peso	Antes= []kg	Depois= []kg
4	Altura	[] cm	
5	IMC		
6	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental	
7	Dieta	(1)= Sim (2)= Não	
8	Pressão Arterial (PA)	[]/[] mmHg	
9	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante	
10	Fatores de risco	Idade: (1)= Sim (2) = Não Obesidade: (1)= Sim (2)= Não Macrossomia: (1)= Sim (2)= Não _____ Aborto(s): (1)= Sim (2)= Não Se sim, quantos: ____ Gravidez prévia com DG: (1)= Sim (2)= Não Morte neonatal: (1)= Sim (2)= Não	
11	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não _____	
12	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não _____	
13	Medicamentos:	a) Hipoglicemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: b) Hipolipemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: c) Anti-hipertensivos: (1) = Sim (2) = Não Quais: d) Insulina: (1)= Sim (2)= Não Outros:	
14	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: TSH: Outros:	
15	Outras patologias:		

ANEXO 4

Método de extração de DNA genômico.

Modificações no método de Lahiri e Nurberger, 1991.

Etapas	Ações
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>)
2	Em tudo Eppendorf colocar 900 μ L de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 μ L do <i>buffy coat</i> Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 μ L
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 μ L de tampão de proteinase K 20 μ L de proteinase K 10 μ L de SDS 20% 120 μ L de água ultra pura Homogeneizar em vortex Colocar em banho-maria 65 °C por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 μ L de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 μ L de etanol absoluto Homogeneizar por inversão Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 μ L de etanol 70% Homogeneizar em vortex Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 μ L de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 °C

Santos, Izabella Castilhos Ribeiro dos

Estudo de variações dos genes do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), preprorelina e glucoquinase no diabetes gestacional / Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos – Curitiba, 2010.

140 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Professor Geraldo Picheth

Co-orientadora: Professora Cynthia Maria Telles Fadel-Picheth

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Análises Clínicas.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. RAGE. 3. AGER.
4. Preprorelina. 5. GHRL. 6. Glucoquinase. 7. GCK. 8. PCR-RFLP.
9. Perfil lipídico. 10. Variações genéticas. 11. SNP. I. Picheth, Geraldo. II. Fadel-Picheth, Cynthia Maria Telles. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 618.3

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)