

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

REJANE BAGGENSTOSS

ESTUDO DO POLIMORFISMO G54D DO GENE *MBL2* NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL

JOINVILLE

2013

REJANE BAGGENSTOSS

ESTUDO DO POLIMORFISMO G54D DO GENE *MBL2* NO DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE. Orientador: Prof. Dr. Jean Carl Silva. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE

2013


Termo de Aprovação

“Estudo do Polimorfismo G54D do Gene *MBL2* no Diabetes Mellitus Gestacional”

por

Rejane Baggenstoss

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Jean Carl Silva
Orientador (UNIVILLE)

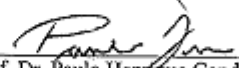


Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

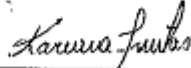
Banca Examinadora:




Prof. Dr. Jean Carl Silva
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Co-orientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Karina Cocco Monteiro Freitas
(USP)



Prof. Dr. Marco Antonio Moura Reis
(UNIVILLE)

Joinville, 07 de junho de 2013

À minha filha Gabriela pela infinita paciência. Filha te amo muito.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Renato e Romilda pelo eterno incentivo, que me estimularam em todos os momentos difíceis, nunca me deixando desistir desta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carl Silva e ao coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pela orientação oferecida, pela dedicação e pela paciência que tiveram comigo todo esse tempo. Obrigada, obrigada e obrigada!

Aos meus queridos irmãos que fizeram brilhantes recomendações.

As minhas amigas e sócias Suely Keiko Kohara, Bárbara Vicente de Souza e Goretti Silveira Rodrigues que me apoiaram, incentivaram e sempre ajudaram.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular pelo grande apoio, carinho e dedicação. Em especial a Silvia Vanderléia Petzhold e a Leslie Ecker Ferreira.

A todos os professores, funcionários e colegas deste Curso de Mestrado, pelo companheirismo e amizade em todas as fases do curso.

Aos alunos que ajudaram muito na coleta de dados Izabela K. Michels Willemann e Francisco Simões Pabis.

Aos funcionários da maternidade em especial a Jociane F. B. Colon.

Ao Laboratório Gimenes e ao Laboratório Municipal de Joinville pela ajuda na coleta dos exames laboratoriais.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de algum modo, ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Foi um privilégio enorme ter ao meu lado pessoas tão maravilhosas como vocês.

RESUMO

OBJETIVO: Analisar a influência da associação do polimorfismo G54D do gene *MBL2* na necessidade de tratamento complementar e ocorrência de recém-nascidos grandes para a idade gestacional na diabetes mellitus gestacional. **SUJEITOS E MÉTODOS:** Cento e cinco pacientes recrutadas em Joinville - Brasil foram avaliadas no período de novembro de 2010 a outubro de 2012. As gestantes foram divididas em dois grupos correspondentes a presença (n=37) ou ausência (n=68) do alelo mutado. As variantes do polimorfismo G54D do gene *MBL2* foram identificadas por meio da análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição, a partir de segmentos gênicos obtidos via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os desfechos primários avaliados foram parâmetros antropométricos (massa corporal, a estatura e o índice de massa corporal), bioquímicos da mãe (curva glicêmica com 75 gramas de glicose entre a 24^a e 28^a semanas de gravidez, a glicemia de jejum no diagnóstico e glicemia jejum após o tratamento, hemoglobina glicada após tratamento e glicemia pós prandial) e parâmetros do recém-nascido (peso ao nascer, glicemia capilar e APGAR de primeiro e quinto minuto). Também foi avaliado a necessidade de terapia complementar à dietoterapia quando comparado entre os dois grupos. **RESULTADOS:** 35,2 % das pacientes analisadas carregavam pelo menos um alelo mutado do polimorfismo G54D. Os dois grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao ganho de peso, paridade, idade, índice de massa corporal e idade gestacional de chegada à maternidade. Os grupos não diferiram quanto à necessidade de tratamento complementar à dietoterapia (16,2% vs 26, 7%) e à presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional (24,3% vs 13, 2%) nas pacientes portadoras ou não do alelo mutado, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Nossos dados demonstraram que o polimorfismo G54D do gene *MBL2* não tem associação sobre a necessidade de tratamento complementar à dietoterapia e à ocorrência de recém-nascidos grandes para a idade gestacional na amostra estudada.

Palavras-Chaves: *MBL2*; polimorfismo de nucleotídeo único; diabetes mellitus gestacional.

ABSTRACT

AIM: To assess the association of the G54D *MBL2* polymorphism with the need for additional treatment and the presence of large for gestational age newborns in gestational diabetes mellitus. **SUBJECTS AND METHODS:** One hundred and five patients recruited in Joinville - Brazil were evaluated between November 2010 until October 2012. Pregnant woman were divided into two groups correspondents to the presence (n = 37) or absence (n = 68) of the mutant allele. The variants polymorphisms of the G54D *MBL2* were identified by restriction fragment lengths polymorphic (RFLP) analysis, from gene segments obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR). Assessed outcomes were anthropometric and biochemical parameters of the mother and newborn, and the necessity of additional therapy associated with diet when compared to the two groups. **RESULTS:** 35.2% of the evaluated group carried at least one mutated allele of G54D *MBL2* polymorphism. There were no statistically significant differences in weight gain, parity, age, body mass index and gestational age of arrival maternity between the two groups. The groups did not differ in the need for additional treatment with diet therapy (16.2% vs 26, 7%) and presence of large for gestational age neonates (24.3 vs 13%, 2%) in the patients with the mutated allele or did not respectively. **CONCLUSION:** Our data showed that G54D *MBL2* polymorphism had no effect on the need for additional treatment added to the diet therapy and the occurrence of large for gestational age newborns in the studied population.

Keywords: *MBL2*, single nucleotide polymorphism; gestational diabetes mellitus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rastreamento e diagnóstico do DMG após estudo HAPO.....	22
Figura 2. Estrutura esquemática da proteína MBL.....	25
Figura 3. MBL e a ativação do sistema de complemento.....	28
Figura 4. Esquema da estrutura genética do gene <i>MBL2</i>	28
Figura 5. Perfis eletroforéticos de um subgrupo de amostras submetidas à genotipagem do polimorfismo G54D do gene <i>MBL2</i> via RFLP. Amostras 1, 6 e 10: genótipo A/B; 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9: genótipo A/A; e 11: <i>amplicon</i> não submetido à digestão.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diagnóstico de DMG – segundo IADPSG	22
Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação parcial do gene <i>MBL2</i>	38
Tabela 3. Ciclagem Térmica.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – American Diabetes Association

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

B – Linfócito B

Banl – New England Biolabs

CA – Caucasianos Americanos

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DHEG – Doença hipertensiva específica da gravidez

DMG – Diabetes Mellitus Gestacional

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*/Ácido Desoxirribonucleico

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

dNTPs – *Deoxynucleoside Triphosphate*/Deoxinucleosídeos Trifosfatados

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*/Ácido Etilenodiaminotetracético

EPIs – Equipamentos de Proteção Individual

FDA – Food and Drug Administration

GIG – Grande para idade gestacional

HbA1c – Hemoglobina glicosilada A1c

HAPO – Hypertension and Adverse Pregnancy Outcomes

IADPSG – International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups

IC – Intervalo de Confiança

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-12 – Interleucina 12

IDF – International Diabetes Federation

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

LPS – Lipopolissacarídeo

kg/m² – Quilogramas/metro²

MAC – Complexo de Ataque à Membrana

MASP-1 – Manose Associada à Serina Proteases 1

MASP-2 – Manose Associada à Serina Proteases 2

MASP-3 – Manose Associada à Serina Proteases 3

MBL – *Mannan-binding lectin* / Lectina de Ligação a Manose

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mM – Milimoles

NEB4 – New England Biolabs

NF-κB – Nuclear kappa de cadeia leve de intensificador de células B ativadas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*/Medida de Associação

PCR – Polimerase Chain Reaction/Reação em Cadeia da Polimerase

pb – Pares de bases

RN – Recém-nascido

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*/Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmento de Restrição

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*/Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUS – Sistema Único de Saúde

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

TBE – Tris/Borato/EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR-r – *Toll-Like Receptor*/ Receptores Semelhantes à Toll

TNF α – *Tumor Necrosis Factor α* / Fator de Necrose Tumoral α

U – Unidade

UI – Unidade Internacional

UNIVILLE – Universidade da Região de Joinville

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

μ g – Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Diabetes Mellitus Gestacional	17
3.1.1 Fisiopatologia do Diabetes Mellitus gestacional	17
3.1.2 Aspectos epidemiológicos	18
3.1.2.1 Impacto para os bebês	19
3.1.2.2 Impacto para a gestante	20
3.1.3 Diagnóstico	20
3.1.4 Tratamento	22
3.2 Lectina de ligação a manose (Mannose-binding lectin); MBL	23
3.2.1 MBL na imunidade inata	25
3.2.2 O gene MBL2	27
3.2.3 A Importância do polimorfismo da MBL na susceptibilidade a doenças	28
3.2.4 Relação do polimorfismo MBL com o diabetes mellitus	29
3.2.5 Relação do polimorfismo MBL e diabetes mellitus gestacional	30
3.2.6 Associação do DMG com outros polimorfismos	32
4 MÉTODOS	32
4.1 Caracterização da pesquisa	32
4.2 Aspectos éticos	33
4.3 Critérios de inclusão e exclusão	34
4.4 Desfechos primários avaliados	34
4.5 Dados maternos avaliados	34
4.6 Dados dos recém-nascidos avaliados	35
4.7 Tamanho da amostra	35
4.8 Análise estatística	35

4.9 Procedimentos laboratoriais	36
4.9.1 Coleta da amostra de sangue	36
4.9.2 Armazenamento das amostras.....	36
4.9.3 Extração de DNA genômico humano	37
4.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase.....	38
4.9.5 Digestão enzimática dos produtos de amplificação.....	39
4.9.6 Eletroforese e interpretação	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8 APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é definida como aparecimento de um grau variável de intolerância à glicose, diagnosticada pela primeira vez durante a gestação (ADA, 2011). Outra característica marcante da DMG é a resistência insulínica e a hiperinsulinemia. Existe a hipótese que a deficiência de MBL (manose-binding-lectina) poderia estar envolvida no aparecimento de alguns estados de resistência à insulina e contribuir para o risco poligênico do DMG (PETRY, 2010).

A MBL é uma proteína sintetizada no fígado, é um componente importante do sistema imune inato, sendo seu nível sérico determinado geneticamente. Três principais alelos mutantes no exon 1 do gene da MBL afetam a quantidade desta proteína dentro do soro estando associada à deficiência de MBL (KILPATRICK, 2002a; KILPATRICK, 2002b). A deficiência da MBL está presente em aproximadamente 10% da população (MEGIA *et al.*, 2004).

Vemos como primordial identificar as mulheres com DMG com maior risco para complicações materno-fetais. Nos recém-nascidos (RNs) destas mães ocorre maior probabilidade de hiperbilirrubinemia, alterações do metabolismo do cálcio, hipoglicemia e crianças grandes para a idade gestacional (BUCHANAN *et al.*, 2007). Na gestante, ocorre maior risco para pré-eclâmpsia, cesarianas, diabetes mellitus tipo 2 e aparecimento de doença cardiovascular. Nessas gestantes, as complicações estão relacionadas à resistência insulínica. A deficiência de MBL ativa a cascata do complemento e faz à liberação de TNF-alfa, interleucina 1 e 6 e outras citocinas pró-inflamatórias, que levam a um estado de resistência insulínica, e sua relação com desfecho desfavorável merece atenção (MEGIA *et al.*, 2004; PETRY, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a da associação do polimorfismo G54D do gene *MBL2* com a necessidade de tratamento complementar e presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a frequência alélica e genotípica da variante G54D do gene *MBL2*.
- Avaliar a associação entre a presença da variante e a necessidade de tratamento complementar da DMG.
- Avaliar a associação entre a presença da variante e o nascimento de recém-nascidos grandes para a idade gestacional.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diabetes Mellitus gestacional

O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) se caracteriza por uma intolerância à glicose que se inicia ou é detectada, pela primeira vez, durante a gestação (ADA, 2011). O DMG representa cerca de 90% de todas as formas de manifestação do diabetes na gestação, ocorrendo o agravamento da intolerância à glicose com maior frequência no terceiro trimestre de gestação (SBD, 2011).

O diabetes gestacional tem sido uma morbidade muito frequente, sobretudo diante da elevada prevalência de obesidade e sobrepeso anteriores à gestação e também porque as mulheres estão engravidando em idade cada vez mais avançada (SBD, 2011).

3.1.1 Fisiopatologia do Diabetes Mellitus gestacional

A gravidez é caracterizada por resistência insulínica e hiperinsulinemia, que pode predispor as gestantes a desenvolverem diabetes. A fisiopatologia do DMG é explicada pela elevação de hormônios contra reguladores da insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez, bem como pelo aumento de peso, diminuição de exercícios físicos, aumento da ingestão calórica e de fatores predeterminantes associados à genética individual (ADA; CASTORINO e JOVANOVIC, 2011).

O principal hormônio relacionado com a resistência à insulina durante o período de gravidez é o hormônio lactogênico placentário. Contudo, sabe-se que outros hormônios hiperglicemiantes como cortisol, estrógeno, progesterona, hormônio de crescimento e prolactina, também estão envolvidos (CASTORINO e JOVANOVIC, 2011). Na gestante não diabética, os hormônios placentários e ovarianos estimulam maior secreção de insulina, porém ocorre alteração na sensibilidade celular devido às alterações nos receptores de insulina (SAUDERS e PADILHA, 2009).

No início da gestação, os níveis elevados de estrogênio e progesterona determinam hiperplasia das células pancreáticas, aumentando a resposta da insulina a uma carga de glicose, compensando as alterações hormonais posteriores. O objetivo deste aumento é facilitar a lipogênese e a gliconeogênese (SAUDERS e PADILHA, 2009).

3.1.2 Aspectos epidemiológicos

Nos Estados Unidos da América, a prevalência do DMG é de 7%, podendo variar de 1% a 14% dependendo da população, o que resulta em 200 mil novos casos por ano (IADPSG, 2010).

Em estudo no Brasil, a prevalência de DMG entre as mulheres com mais de 20 anos de idade, atendidas em serviços de pré-natal, seguindo a recomendação para rastreamento da Organização Mundial da Saúde de 1980 é de 7,6%. Sendo que em 94% desses casos elas apresentaram apenas tolerância diminuída à glicose, em 6% apresentaram hiperglicemia, semelhantemente ao nível de diabetes na ausência de gravidez (PADILHA *et al.*, 2010).

Em 2008, foi publicado o estudo “Hiperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes” (HAPO), que objetivou definir o valor de glicemia materna, relacionado com eventos perinatais adversos (METZGER *et al.* 2008). Devido à consistência dos resultados, em 2010, o “International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups” (IADPSG) definiu novos critérios diagnósticos para DMG baseados nos resultados apresentados pelo HAPO, que foram seguidos pela “American Diabetes Association” (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), no ano de 2011. Com a adoção desses novos critérios diagnósticos, a prevalência de DMG poderá chegar a 18%, dependendo, entretanto, da população estudada, da etnia, da área geográfica e da frequência do rastreamento (IADPSG, 2011; SIMMONS, *et al.* 2010).

3.1.2.1 Impacto para os bebês

A hiperglicemia materna pode desencadear um aumento na produção de insulina pelo feto, o que resulta em um aumento da lipogênese fetal, resultando num depósito excessivo de gordura causando um bebê obeso (ACCIOLY, 2005).

Essas complicações são ocasionadas na maioria das vezes pela presença de macrossomia fetal. A macrossomia fetal é definida como recém-nascido com peso superior a 4.000g. O alto peso ao nascer, por sua vez, é um fator predisponente para a resistência insulínica, obesidade e diabetes tipo 2, na infância e na fase adulta. (SILVA et al., 2009; DABELEA, 2007).

As complicações imediatas para os recém-nascidos são hemorragia intracraniana, distócia de ombro, fratura de clavícula, lesões do plexo braquial, paralisia diafragmática, hemorragias oculares, subdurais, céfalo-hematomas, hepatomegalia e cardiomegalia (JOLLY *et al.*, 2003; LANDON *et al.*, 2011).

As alterações clínicas mais comuns estão associadas à hipoglicemia, a hiperbilirrubinemia, a hipocalcemia e a imaturidade pulmonar (SBD, 2011). A hipoglicemia ocorre após o parto, o bebê não receberá mais alto nível de glicose da mãe, mas ainda terá um alto nível de insulina, o que provocará a queda do nível glicêmico (SBD, 2011).

A hipocalcemia decorre de uma resposta mais lenta do paratormônio ao nascimento. Além de outros fatores como a hipercalcitonemia e a hipomagnesemia que estão envolvidos na fisiopatologia (SBD, 2011).

O aumento da glicemia materna associa-se à maior concentração de hemoglobina glicada, que tem maior afinidade por oxigênio e favorece a hipóxia de vários graus. A resposta fetal à hipóxia é o aumento na produção de glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, a poliglobulia. A pletora fetal é responsável pela maior ocorrência de icterícia neonatal (ACCIOLY, 2005; LANDON *et al.*, 2011).

A imaturidade pulmonar aparece devido à hiperinsulinemia fetal, que causa atraso na formação do surfactante pulmonar, levando a um risco aumentado de síndrome de membrana hialina pulmonar em gestações com interrupção antes da 38ª semana, comparada com fetos de mulheres não diabéticas (HOLLANDER *et al.* 2007).

Por tudo isso, esses recém-nascidos estão expostos a um alto risco de morbimortalidade, onde devemos atuar.

3.1.2.2 Impacto para gestante

Como ocorre com todas as outras formas de diabetes, o DMG é resultado da secreção inadequada de insulina e/ou devido à resistência insulínica. As principais complicações das mães com DMG são infecção do trato urinário, bacteriúria assintomática, piora de hipertensão preexistente, pré-eclâmpsia, obesidade e desenvolvimento de diabetes tipo 2 (BASSO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Em razão da macrosomia fetal ocorre um aumento no risco de lacerações perineais e complicações no parto (parto distócico) sendo necessária, muitas vezes, a realização de cesariana (BAPTISTE-ROBERTS *et al.*, 2009).

Para estas mães, há um risco de 10% ao ano de desenvolver Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) no futuro, variando a incidência conforme as características populacionais da paciente, localização geográfica, etnia e índice de massa corporal (KAAJA e AKIRA 2005; MESTMAN, 2004). Sendo que o DM2 está associado a altos índices de morbidade, gerando custos diretos e indiretos significativos para o sistema de saúde, sendo caracterizada atualmente como uma epidemia global (ADA, 2011; BAPTISTE-ROBERTS *et al.*, 2009). Atualmente torna-se indispensável o planejamento da assistência através de uma abordagem interdisciplinar. Faz se necessário um acompanhamento durante a gestação e após o parto, com a finalidade de estabelecer ações para vigilância do estado de saúde, controle glicêmico e mudanças nos hábitos de vida para esta população.

3.1.3 Diagnóstico

A triagem universal parece ser a melhor abordagem, porque 90% das mulheres grávidas têm fatores de risco para DMG durante a gravidez (DANILENKO-DIXION *et al.*, 1999).

Em 2010, IADPSG, um grupo multicêntrico com representantes de várias organizações obstétricas e endocrinológicas, incluindo a ADA, recomendou alteração na terminologia. Na atualidade, o diabetes diagnosticado durante a gravidez pode ser classificado como pré-gestacional ou gestacional. O diagnóstico de diabetes prévio pode ser feito em mulheres que satisfaçam qualquer um dos seguintes critérios na sua primeira visita pré-natal: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL; hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ a partir de um ensaio padronizado; glicemia casual ≥ 200 mg/dL, que é posteriormente confirmada pela glicemia de jejum ou hemoglobina glicada. Já o diagnóstico do diabetes gestacional é confirmado durante a visita de pré-natal, nas grávidas com 24 semanas de gestação, quando a glicemia de jejum for acima de 92 mg/dL e menor de 126 mg/dL (figura 1). Se a gestante apresentar uma glicemia de jejum acima de 126 mg/dL na primeira consulta de pré-natal ela é considerada portadora de diabetes. Quando não houver a detecção de diabetes ou diabetes gestacional, no teste inicial da primeira consulta de pré-natal, 75 gramas de glicose devem ser administradas nas grávidas, entre 24 e 28 semanas de gestação para pesquisa de diabetes, segundo os parâmetros apresentados na tabela 1 (IADPSG, 2010; ADA e SBD, 2011).

A IADPSG e a ADA têm recomendado que, na primeira consulta pré-natal seja realizado o teste da hemoglobina glicosilada A1c, nas pacientes de risco para DMG, já que normalmente essas mulheres não estão em jejum nessa visita.

Figura 1. Rastreamento e diagnóstico do DMG após estudo HAPO.

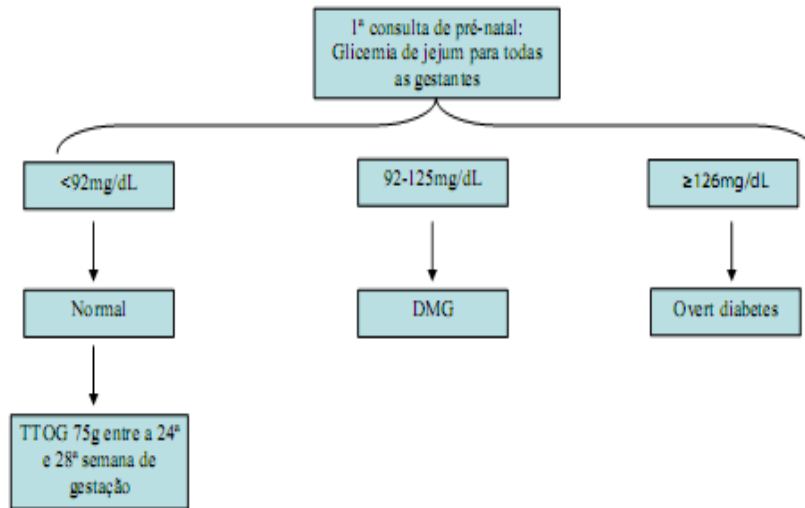


Tabela 1. Diagnóstico de DMG- segundo IADPSG-2010

	IADPSG-2010
JEJUM	92 mg/dL
1 HORA	180 mg/dL
2 HORAS	153 mg/dL

* Um valor alterado confirma o diagnóstico

3.1.4 Tratamento

Acredita-se que se tenha grande importância identificar as mulheres com Diabetes Mellitus Gestacional, visto que a terapêutica adequada e precoce pode reduzir a morbidade materna e fetal, especialmente a macrossomia (O'SULLIVAN *et al.*, 1966).

O tratamento eficaz para as mulheres com diabetes gestacional consiste em orientação nutricional adequada, monitoramento intensivo da glicose, atividade física e administração de insulina, caso a glicemia não seja controlada adequadamente apenas com a dieta (LANDON *et al.*, 2009). Os principais objetivos da terapia médica são alcançar normoglicemia, evitar a cetose e contribuir para bem-estar fetal proporcionando ganho de peso adequado (ADA, 2011). A restrição calórica pode ser útil no tratamento de mulheres com sobrepeso e obesidade com o GDM (ACOG, 2001). Também há recomendações de várias escolas para a criação de uma equipe multidisciplinar, composta por médicos, enfermeiros, nutricionistas, educadores especializados em diabetes, farmacêuticos, entre outros, para o melhor controle da doença (METZGER *et al.* 2008; ADA, 2011).

Existem vários estudos clínicos randomizados e observacionais que demonstraram não haver qualquer efeito adverso, materno ou fetal, com a utilização dos hipoglicemiantes orais quando comparado com a insulina (SILVA *et al.*, 2007; ACOG, 2001). Sendo que a IDF (International Diabetes Federation), desde 2009 coloca a insulina como tratamento de escolha após a falência da dieta, entretanto a glibenclamida e a metformina podem ser consideradas em algumas situações. Contudo, ADA, Food and Drug Administration (FDA) e o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas não endossam o uso oral de hipoglicemiantes durante a gravidez (ADA, 2011; ACOG, 2001).

Atualmente, sabe-se que, quanto mais cedo o tratamento for iniciado, melhor será o resultado. Portanto, faz-se necessário identificar pacientes de risco para DMG para o início precoce do tratamento complementar. Alguns marcadores clínicos que indicam a maior probabilidade de necessidade de tratamento complementar são: idade acima de 25 anos, presença de glicosúria, polidrâmio, feto macrossômico ou GIG (grande para idade gestacional), antecedentes familiares de diabetes, história pregressa de pré-diabetes, síndrome de ovários policísticos, abortamento habitual ou óbito fetal intra-útero inexplicado, síndromes hipertensivas, gemelaridades e más formações fetais, obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual, entre outros fatores de risco (HEDDERSON *et al.*, 2008).

3.2 Lectina de ligação a manose (Mannose-binding lectin); MBL

A proteína “mannose-binding lectin”, também denominada “mannan-binding lectin”, é um membro da família das “colectinas”, que, por seu termo, são moléculas compostas de uma região com sequência semelhante a colágeno e um domínio semelhante à lectina (Figura 2) (KILPATRICK, 2003). Sendo constituída por um polipeptídeo dividido em quatro domínios distintos: um domínio rico em cisteína, seguido por um domínio de colágeno, uma porção alfa-hélice chamada de pescoço e um domínio reconhecedor de carboidratos (WALLIS, 2002).

A síntese da MBL ocorre no fígado, sendo um componente do sistema imune inato cujos níveis séricos são determinados geneticamente (KILPATRICK, 2002a; KILPATRICK, 2002b). A MBL é uma proteína solúvel colágeno-like, que se liga aos carboidratos ou a compostos acetilados presentes na superfície de microrganismos e de células do hospedeiro.

A concentração da MBL no plasma de um indivíduo é determinada pelos dois haplótipos herdados de seus pais. Os níveis de MBL podem variar em decorrência de fatores como interação com o meio ambiente, devido à exposição às infecções, trauma e, principalmente, em resposta a fase aguda das infecções, quando os níveis de MBL na circulação sanguínea podem estar aumentados em até três vezes quando comparados a valores fisiológicos normais (HANSEN *et al.*, 2001).

Em resumo, a MBL é uma proteína de fase aguda do sistema imune, secretada pelos hepatócitos e participa da resposta imune inata, liga-se a superfície dos patógenos ricos em manose, agindo como opsonina e induzindo a fagocitose. Essa proteína também pode eliminar microrganismos ativando a cascata de complemento e induzindo a lise do patógeno (KILPATRICK, 2003; TURNER, 1996).

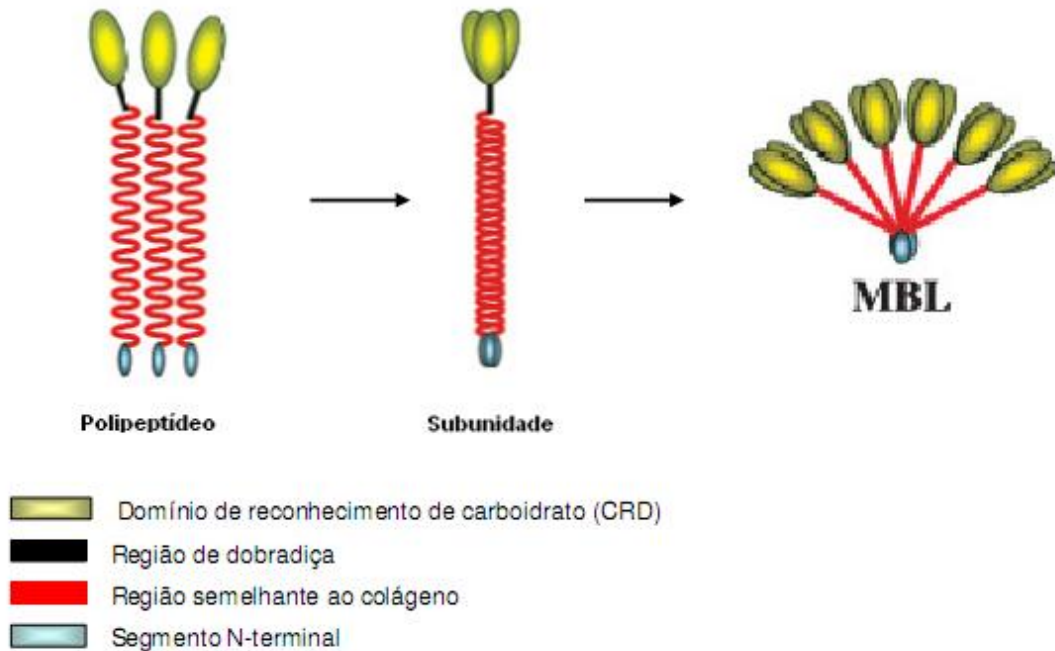


Figura 2. Estrutura esquemática da proteína MBL
 Fonte: Adaptado de Fujita *et al.*, 2004.

3.2.1 MBL na imunidade inata

A imunidade inata é constituída por um conglomerado de mecanismos moleculares altamente sofisticados, sendo responsável pela primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores (MEDZHITV e JANEWAY, 2000). O sistema de complemento representa um dos mecanismos ativadores e amplificadores do sistema imune humoral e inato, promovendo proteção contra microorganismos através de mecanismos dependentes e independentes de anticorpos (PETERSEN, THIEL e JENSENIUS, 2001).

A ativação do sistema complemento mediada pela MBL representa a terceira via de ativação do complemento, que é distinta das outras duas vias, a clássica - em condições fisiológicas é ativada por complexos antígeno e anticorpo e alternativa- não requer anticorpo para sua ativação (TURNER, 2003) (figura 3).

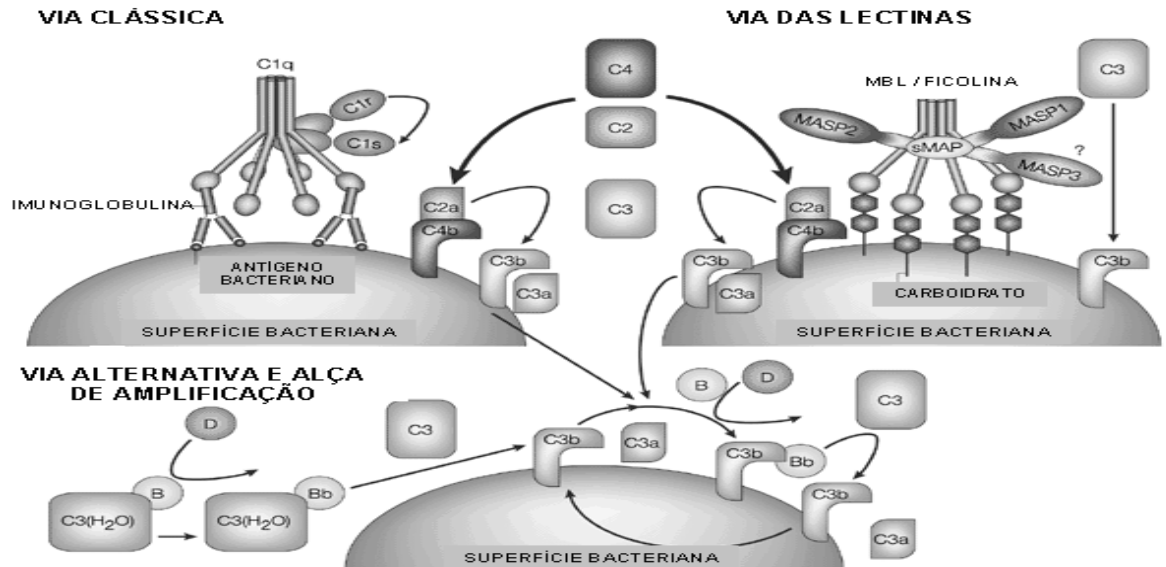


Figura 3. MBL e a ativação do sistema de complemento

Fonte: Adaptado de www.plab.ku.dk/tcbh/complementpathways.gif

A via da MBL ou via das lectinas (IKEDA *et al.*, 1987) ativa a lectina ativadora de manose, um membro das colectinas que reconhece carboidratos das cápsulas de bactérias, fungos e protozoários. A via da lectina é composta por cinco proteínas séricas, a MBL, as Proteases séricas associadas à MBL que são: manose associada à serina protease 1(MASP-1), manose associada à serina protease 2 (MASP-2) e manose associada à serina protease 3 (MASP-3) e pequena proteína associada à MBL (GARRED *et al.* 2006). A ativação do Sistema Complemento pela MBL plasmática ocorre quando a lectina se liga a resíduos de oligossacarídeos (Manose e N-acetilglicosamina) presentes na superfície de vários microorganismos (PETERSEN, THIEL e JENSENIUS, 2001).

Uma vez iniciada essa reação em cascata, em detrimento de sua ligação aos carboidratos, é desencadeada a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que ocasiona a morte do microorganismo (MATSUSHITA *et al.* 1998).

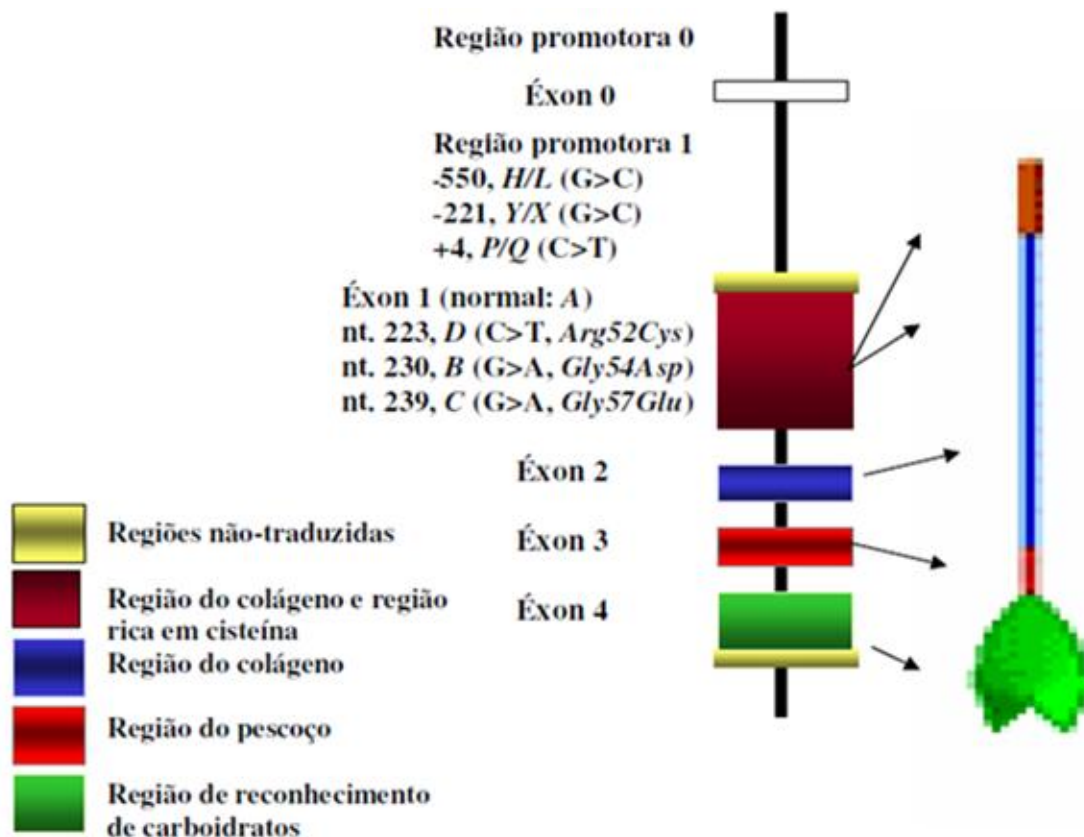
As pessoas deficientes em MBL têm maior suscetibilidade a várias doenças infecciosas o que demonstra a importância da via da lectina na defesa do hospedeiro. (JACK, KLEIN e TURNER 2001; JANEWAY *et al.*, 2007).

3.2.2 O gene *MBL2*

Em muitos animais existem dois genes MBL, o *MBL1* e o *MBL2*, que codificam um produto funcional. No entanto, nos seres humanos o gene *MBL1* (ou *MBL1P1*) é um pseudogene, não codificando uma proteína funcional (GUO *et al.*, 1998; PETERSEN, THIEL e JENSENIUS, 2001). A codificação da MBL funcional nos seres humanos é atribuída ao gene *MBL2*, que está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11. 2-q21) (SASTRY *et al.*, 1989).

Existem polimorfismos reconhecidos do gene *MBL2* localizados na região promotora 5' não traduzida (-550G>C, -221G>C e +4C>T) que afetam a expressão da proteína MBL. E existem alterações no éxon 1 (R52C, G54D e G57E) que afetam a funcionalidade da proteína MBL. As variantes conhecidas são D (troca de arginina por cisteína, rs5030737- R52C), B (troca de uma glicina por ácido aspártico rs1800450-G54D) e C (troca da glicina por ácido glutâmico rs1800451- G57E), denominando-se A o tipo selvagem. Essas mutações ocorrem no nucleotídeo 223 (C para T), 230(G para A) e 239(G para A) do éxon 1, denominando-se D, B e C respectivamente. Qualquer uma destas mutações (B, C ou D) é referida como O, enquanto que o tipo selvagem é designado por A (STEFFENSEN *et al.*, 2000; MADSEN *et al.*, 1995). Conjectura-se que as três mutações estruturais no éxon 1 (Figura 4) causariam ruptura da região semelhante a colágeno da molécula, desta forma impediria a montagem correta dos oligômeros. Todas as variantes (B, C e D) estão associadas a baixos níveis séricos de MBL (MADSEN *et al.*, 1995; SUPER *et al.*, 1989). Estes três alelos variantes apresentam um efeito dominante nos níveis séricos de MBL, diminuindo os níveis funcionais de MBL em 90%. Em recém-nascidos, a concentração da MBL corresponde a 60% da encontrada em adultos (THIEL *et al.*, 1995). A mutação da variante B ocorre em de 7 a 25% nas populações da europa e da ásia, mas é praticamente inexistente na África (TURNER *et al.*, 2000). A variante C está ausente entre os asiáticos e índios americanos é raro entre os caucasianos, mas é comumente visto em populações da África com uma frequência de 50% (LIPSCOMBE *et al.*, 1992). O alelo D ocorre com menor freqüência do que os alelos B ou C e parece estar confinado a população do leste africano(GARRED,2008).

Acredita-se que a deficiência da MBL na população geral seja de 7 a 10%, tratando-se de uma imunodeficiência muito comum (JACK, KLEIN e TURNER, 2001; MEGIA, *et al.*, 2004).



Fonte: Adaptado de DOMMETT, KLEIN e TURNER; 2006.

3.2.3 A Importância do polimorfismo da MBL na susceptibilidade a doenças

Na literatura, existem estudos que buscam esclarecer a associação da proteína MBL e sua deficiência a suscetibilidade à infecção de diversos patógenos, à severidade das doenças infecciosas ou aparecimento de doenças autoimunes (KILPATRICK, 2003; GARRED *et al.*, 2006).

O sistema imune inato utiliza uma diversidade de receptores que reconhecem e induzem resposta imune contra os patógenos.

Um exemplo típico é o vírus da hepatite, em que a molécula de MBL possui sítios de reconhecimento para açúcares como a manose e N-acetil-D-glucosamina presentes na superfície dos vírus. Sendo que ele pode levar a destruição do patógeno por meio do complexo de ataque à membrana (KILPATRICK, 2003). Pacientes com alelos mutantes homozigotos para MBL foram identificados como sendo mais suscetível a doença pneumocócica invasiva (ROY *et al.* 2002). Doença bacteriana grave e sepse também foram mais frequentes em adultos deficientes de MBL internados em unidade de terapia intensiva (GARRED *et al.*, 2006).

A concentração sérica de MBL varia significativamente, podendo ocorrer de 0 a 5.000 ng/mL em indivíduos saudáveis (THIEL *et al.* 1995). Contudo a deficiência sérica da MBL esta associada à susceptibilidade a vários tipos de infecção e doenças autoimunes (GARRED *et al.*, 2006; ROY *et al.*, 2002). Podemos citar exemplos como: aborto de repetição, lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide juvenil, reto colite ulcerativa inespecífica, aumento risco de trombogênese, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), doença Celíaca, aterosclerose mais precoce e talvez, diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e diabetes gestacional têm sido relacionadas com a o polimorfismo da MBL (BONIOTTO *et al.*,2005; GERGELY *et al.*, 2009; DAVIES *et al.*, 1997).

3.2.4 Relação do polimorfismo MBL com o diabetes mellitus

No diabetes ocorre um estado de inflamação crônica subclínica do tecido adiposo, muscular e do fígado caracterizada pela produção anormal de citocinas e mediadores inflamatórios. Sendo que os polimorfismos genéticos podem influenciar na produção desses mediadores inflamatórios, predispondo a diferentes desordens incluindo o diabetes (DAHER *et al.*, 2011).

Há dados conflitantes sobre diabetes tipo 1 e a deficiência de MBL. No estudo de Araujo e colaboradores (2007), demonstrou-se que a deficiência de MBL está associada a um aumento do risco de desenvolver diabetes na infância e adolescência, resistência à insulina e à obesidade. Já no estudo de Bouwman e

colaboradores (2005) verificou-se o aumento sérico de MBL nos pacientes diabéticos tipo 1. A conclusão desse estudo foi de que os pacientes, que apresentaram aumento de MBL tiveram um risco aumentado para o desenvolvimento do diabetes tipo 1.

Estudos como de Hovind e colaboradores (2005) e Hansen e colaboradores (2004) demonstram que níveis mais elevados de MBL estão associados com complicações diabéticas microvasculares. Esses estudos indicaram uma associação entre um aumento do risco de desenvolver insuficiência renal e os altos níveis de MBL em pacientes com diabetes. Os processos imunológicos exatos envolvendo o papel da MBL na patogênese da nefropatia diabética ainda não são claros.

A MBL desempenha o papel chave na via da lectina de ativação do complemento e pode influenciar a expressão de citocinas (WANG *et al.*, 2011). Existem estudos demonstrando que a deficiência de MBL está associada com o estímulo de citocinas e a expressão dos receptores Toll-Like (TLRs). Os receptores do tipo Toll-Like são uma família de proteínas transmembrânicas que desempenham o papel principal no sistema imune inato, bem como na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (KAWAI e AKIRA, 2010). Estudos com vários TLRs demonstram que eles ativam a via de NF-Kb (fator nuclear kappa de cadeia leve de intensificador de células B ativadas) que são necessários para a ativação de células T, que regulam a expressão de várias citocinas inflamatórias tais como a interleucina 1(IL-1), interleucina 8(IL-8), interleucina 12(IL-12) e o TNF- α que são diversas vias moleculares de resistência à insulina (KAWAI e AKIRA, 2010). Observou-se também que a MBL pode ligar-se diretamente ao domínio extracelular de um subtipo de TLRs o TLR4, de maneira dose dependente e esta interação pode atenuar a ligação do Lipopolissacarídeo (LPS) à superfície das células (WANG *et al.* 2011). O LPS elevado aumenta absorção de energia que se acumula em forma de gordura, aumentando a resistência insulínica (CARICILLI e SAAD, 2013).

3.2.5 Relação do polimorfismo MBL e Diabetes Mellitus Gestacional

Embora os mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos associando os níveis de MBL com DMG sejam parcialmente conhecidos, sabe-se que a MBL desempenha um duplo papel na modificação da resposta inflamatória (FRUEBIS *et al.*, 2001). Tanto fatores genéticos como fatores inflamatórios são responsáveis pela patogênese da diabetes gestacional. A gravidez é considerada um grande fenômeno imunológico porque a grávida precisa acomodar o feto como um enxerto. Com isso, ocorrem mudanças profundas no sistema imunológico materno. (ALUVIHARE, KALLIKOURDIS e BETZ 2005; TROWSDALE e BETZ, 2006).

A fisiopatologia do DMG é muito semelhante à diabetes mellitus tipo 2. Na gravidez e no período pós-parto pode ocorrer um aumento, significativo da concentração de MBL e na atividade da via de complemento da MBL (VAN DE GEIJIN *et al.* 2007).

Na gestação ocorre resistência insulínica classicamente atribuída ao cortisol e aos hormônios da gravidez, porém alguns estudos recentes demonstram que várias citocinas inflamatórias também estão envolvidas no processo (PETRY, 2010).

A deficiência de MBL ativa a cascata do complemento e faz a liberação de TNF- α , interleucina 1 e 6 e outras citocinas pró-inflamatórias que podem levar a um estado de resistência insulínica e um processo acelerado de aterogênese (MEGIA, *et al.*, 2004; PETRY 2010).

No entanto, alguns estudos indicam que a diminuição da MBL pode influenciar no aparecimento do diabetes tipo 2 e no DMG através de um efeito sobre a secreção de insulina, sugerindo processo inflamatório das células β -pancreáticas (MEGIA, *et al.*, 2004).

Desta maneira, identificando-se os fatores de risco genético para DMG ajudamos a encontrar os mecanismos subjacentes à sua fisiopatologia e, podendo revelar novas estratégias de prevenção e metas terapêuticas. Em última análise, o aumento do conhecimento sobre a genética do DMG irá ajudar a evitar complicações para a mãe e para a criança (PETRY, 2010).

3.2.6 Associação do Diabetes Mellitus Gestacional com outros polimorfismos

O DMG é uma doença heterogênea, apresenta características genéticas complexas e participa de múltiplos locos gênicos, sendo que eles podem influenciar a produção de vários mediadores inflamatórios e predispor ao diabetes gestacional (VOGEL e MOTULSKI, 2000).

Existem poucas pesquisas que procuram compreender as bases genéticas do diabetes mellitus gestacional. Recentemente Daher e colaboradores (2011), fizeram uma extensa revisão da literatura sobre polimorfismos do gene inflamatórios e DMG. Foram incluídos nos estudos pacientes de etnias diferentes, mas combinados com os controles. Avaliaram-se 13 polimorfismos diferentes, entre eles a leptina, lectina manose-binding, receptor de produtos finais da glicação avançada, adiponectina, interleucina 10 e fator de necrose tumoral dentre outros. Devido à heterogeneidade e número limitado de estudos sobre DMG e polimorfismos dos genes inflamatórios, não foi possível fazer nenhuma análise adicional dos dados existentes, segundo o autor.

Outro recente estudo foi realizado com um grupo de 136 gestantes coreanas, tendo sido avaliados os polimorfismos PPAR γ^2 e IGF2BP2, ficando demonstrada a correlação positiva com a ocorrência do DMG, enquanto que o polimorfismo KCNQ1 não teve correlação (CHON *et al.*, 2013).

Em mais um estudo, dessa vez com gestantes diabéticas mexicanas, sugeriu-se que a presença do polimorfismo do TNF- α aumenta os níveis de insulina e aumenta também a resistência insulínica em mulheres com DMG (GUZMÁN-FLORES *et al.* 2013).

Existem muitas lacunas que não permitem a compreensão da etiologia do DMG em suas diversas formas. Esta incompreensão estimula os cientistas a realizarem análises moleculares na procura dos genes candidatos a essa doença.

4 MÉTODOS

4.1 Caracterização da pesquisa

Estudo de coorte prospectivo com recrutamento consecutivo de participantes entre novembro de 2010 e outubro de 2012, na Maternidade Darcy Vargas, que é considerada o centro de referência pública ao atendimento da gestante diabética em Joinville – SC. Participaram do estudo 109 gestantes diagnosticadas com DMG durante o acompanhamento pré-natal rotineiro.

4.2 Aspectos éticos

O estudo foi desenvolvido seguindo os requisitos contidos nas Resoluções 196/96 e 340/04 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, em particular aquelas enquadradas na Área Temática Especial “Genética Humana”. As participantes mantiveram o direito de recusa à participação em todas as etapas da pesquisa, sem penalidades ou prejuízos de qualquer natureza às desistentes, e foi, sempre, garantida a privacidade de todas as informações obtidas. Após a confirmação do aceite por meio da aposição da assinatura da paciente no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), foi realizada a captação de dados por entrevista, resultados de exames laboratoriais (glicemia em jejum, hemoglobina glicada, curva glicêmica) e análise do prontuário (em ficha própria e individual para cada participante) (Apêndice B).

O banco de dados, contendo informações pertinentes à investigação, foi utilizado somente para a elaboração de produção científica e ficou sob-responsabilidade da instituição, Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, a cargo dos pesquisadores envolvidos. A publicação dos resultados e conclusões será realizada sem a identificação das participantes, mantendo-as em absoluto sigilo. As amostras foram enviadas à análise molecular identificada por codificação numérica e impessoal.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE – processo 203/2011, em nove de agosto de 2011.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

As pacientes foram selecionadas seguindo-se os critérios da Organização Mundial de Saúde (IADPSG, 2010) para o diagnóstico de DMG, apresentando idade mínima de 18 anos, idade gestacional entre 20 e 32 semanas, gestação única, circunferência abdominal fetal entre os percentis 10% e 97% e ausência de doenças como doença hipertensiva específica da gravidez, asma entre outras que pudessem interferir na interpretação dos resultados. Foram excluídas as gestantes que tiveram perda de seguimento ou que apresentaram condições clínicas, que pudessem interferir no tratamento ou no resultado perinatal. Também foram excluídas as gestantes que tiveram bebês com nascimento antes da 37^a semana.

4.4 Desfechos primários avaliados

Frequências alélica e genotípica do polimorfismo G54D do gene *MBL2*, necessidade de tratamento complementar e ocorrência de RNs grandes para a idade gestacional.

4.5 Dados maternos avaliados

Os dados maternos avaliados no estudo foram: idade, índice de massa corporal, ganho de peso durante a gestação, idade gestacional no momento da inclusão no estudo (calculada a partir da primeira ultrassonografia realizada pela paciente), necessidade de tratamento complementar, tipo de tratamento (hipoglicemiante oral ou insulina), nível glicêmico materno durante o pré-natal, hemoglobina glicosilada, idade gestacional ao término da gravidez, além de outras intercorrências.

4.6 Dados dos recém-nascidos avaliados

Os dados dos recém-nascidos avaliados no estudo foram: peso ao nascer, sendo considerados recém-nascidos grandes para a idade gestacional (peso acima do percentil 90 em curvas de crescimento) e ou macrosomia (peso > 4000 g) (MARCONDES, 1989). Suspeita de hipoglicemia (glicemia capilar < 40 mg/dL), ESCORE DE APGAR de primeiro e quinto minuto (método mais comumente empregado para avaliar o ajuste imediato do recém-nascido à vida extrauterina, avaliando suas condições de vitalidade).

4.7 Tamanho da amostra

São atendidas em média, 500 gestantes diagnosticadas com DMG por ano, na Maternidade Darcy Vargas. A presença da variante rara do polimorfismo G54D do gene *MBL2* na população geral é estimada em, aproximadamente, 10% (MEGIA, 2004). Os outros dois desfechos primários selecionados (ocorrência de recém-nascido grande para a idade gestacional e necessidade de terapia complementar) apresentam frequência estimada de 30% (JOLLY, *et al.* 2003). Uma vez que se estabeleceu comparar a diferença das frequências de necessidade de implementação de terapia complementar entre as gestantes portadoras e não portadoras do alelo mutado do polimorfismo G54D, então a frequência estimada calculada é de 3% (30% x 10%). Considerando o intervalo de confiança da prevalência estimada (IC) de 1,5 a 4,5%, chega-se a uma amostra de 109 (80% de nível de confiança).

4.8 Análise estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas (quantitativas), a análise foi realizada através do cálculo de médias e desvios padrão. Para as variáveis categóricas (qualitativas), calcularam-se frequências absolutas e relativas.

Para a análise da hipótese de igualdade entre as médias dos grupos foi utilizado o teste t. Se no caso a normalidade foi rejeitada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O teste de normalidade utilizado foi Kolmogorov-Smirnov.

Para se testar a homogeneidade dos grupos em relação às proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Ficou estabelecido nível de significância menor que 0,05.

4.9 Procedimentos laboratoriais

4.9.1 Coleta da amostra de sangue

A coleta da amostra única de sangue periférico das gestantes foi realizada na própria maternidade, em parceria com o Laboratório Gimenes (em anexo consta a Declaração de Coparticipante do Laboratório Gimenes na presente pesquisa; Apêndice A). Portanto, foi realizada no mesmo local e momento das coletas da rotina de acompanhamento pré-natal dessas pacientes. Tão somente foi necessário o acréscimo de 1 mL de sangue, sem necessidade de uma punção venosa específica, ou seja, sem imposição de risco adicional à gestante. O tubo contendo a amostra e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante foi encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, onde o sangue foi processado e analisado conforme descrito a seguir.

4.9.2 Armazenamento das amostras

As amostras de sangue foram mantidas em 4°C até realização da etapa de extração do Ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico. No TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) do estudo (Apêndice 1), foi solicitada autorização para armazenamento da amostra de DNA extraída por cinco anos, para possível utilização em futuras pesquisas no mesmo campo do conhecimento. Em atenção à Resolução CNS 441/2011, declara-se que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do CEP da Instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

4.9.3 Extração de DNA genômico humano

As amostras de sangue foram submetidas à extração do DNA total utilizando-se os procedimentos recomendados pelo fabricante do kit *Genomic DNA Extraction Kit* (Real Biotech Corporation, Taiwan), conforme, brevemente, descrito a seguir.

Após centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante (plasma) foi descartado em solução desinfetante e a fração celular foi utilizada para a obtenção do DNA. Em microtubo de 1,5 mL, 300 µL de sangue foram reunidos a 900 µL de *RBC Lysis Buffer*, homogeneizando-se a mistura por inversão. Incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após separação por centrifugação (3.000 rpm / 2 min), o sobrenadante foi desprezado. O precipitado celular recebeu novo volume (100 µL) de *RBC Lysis Buffer* e foi acrescido de 200 µL de *GB Buffer*, seguido de homogeneização vigorosa. Incubou-se a mistura até que a amostra lisada estivesse clara. Adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%), homogeneizando imediatamente. O volume completo da suspensão foi aplicado à coluna GD, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. *W1 buffer* (400 µL) foi adicionado à coluna GD, centrifugando-se em seguida a 13.000 rpm por 30 segundos. O filtrado foi descartado. À coluna GD adicionou-se 600 µL de *Wash Buffer*, centrifugando-se novamente por 13.000 rpm por 30 segundos. Descartou-se o filtrado e transferiu-se

a coluna GD para microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de *Elution Buffer* pré-aquecido a 70°C, mantendo em repouso durante 3 a 5 minutos, para completa absorção do tampão pela matriz da coluna. O DNA purificado foi coletado por centrifugação a 13.000 rpm durante 30 segundos. O DNA foi quantificado e seu grau de pureza foi avaliado via leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm em espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV. O DNA obtido foi alíquotado e mantido a -20°C, até subsequente genotipagem, e a -70°C (estoque de longo prazo).

4.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Um segmento do gene *MBL2*, correspondente ao éxon 1 e parte da região 5' não traduzida, foi amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction; PCR), com emprego dos seguintes iniciadores (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação parcial do gene *MBL2*

Iniciador	Sequência (5' → 3')
Senso	GAGGCTTAGACCTATGGGGCTAG
Anti-senso	CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG*

Fonte: MATSUSHITA *et al.* (1998).

Cada tubo, contendo amostra ou controle negativo, recebeu 50 µL de solução, preparada em cabine de segurança de uso específico, contendo 50 pmol dos iniciadores (Tabela 2), 200 µM dNTP's, 1,5 mM MgCl₂, 1U Platinum Taq[®] Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), tampão de reação (Invitrogen) e água grau PCR. A termociclagem foi realizada em aparelho XP Cycler (Bioer Technology Co., Tokyo, Japão), conforme detalhado na tabela 3.

Tabela 3. Ciclagem Térmica

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação inicial	94	2 min	
Desnaturação	94	30 seg	
Pareamento	60	45 seg	40vezes
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	

Fonte: Primária, (2013).

4.9.5 Digestão enzimática dos produtos de amplificação

Depois da obtenção do segmento de interesse via PCR, o polimorfismo foi analisado via utilização de endonuclease, ou seja, por meio da análise de Polimorfismos de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP). Os produtos de amplificação (amplicons) foram submetidos à digestão pela endonuclease *BanI* (New England Biolabs, Beverly, EUA), com sítio de reconhecimento específico correspondente a G▼GYRCC. Para até 15µL de “amplicons”, foi utilizado 1U da endonuclease e volume de tampão NEB4 (New England Biolabs) recomendado pelo fabricante. A incubação foi realizada a 37°C, durante 2 horas.

4.9.6 Eletroforese e interpretação

Os produtos da PCR e da RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Em frasco Erlenmeyer de 250 ml, 1 g de agarose (Invitrogen) foi dissolvida em 100 mL de tampão TBE (80 mM Tris-HCl; 113 mM Ácido Bórico; 2,5 mM EDTA), seguido de fervura rápida em forno de micro-ondas. Após resfriamento gradual até temperatura suportável ao toque (aproximadamente 65°C), 0,5 µg/mL de

Brometo de Etídeo foi adicionado, seguido de homogeneização e resfriamento adicional visando à polimerização. O gel foi posicionado em cuba de eletroforese e coberto com tampão TBE.

Dez microlitros de “amplicons” ou o volume completo (20 μ L) da digestão enzimática receberam, respectivamente, 3 ou 5 μ L de tampão de aplicação (0,05% Azul de Bromofenol 0,5% Xileno Cianol; 40% Glicerol). As amostras foram aplicadas no gel e expostas a 100 V por 1 ou 2-3 horas, respectivamente, seguido de exposição à luz ultravioleta e digitalização (MiniBis-Pro, DNR Bioimage SytemsLtd., Israel).

Três padrões de restrição são previstos. Para o genótipo heterozigoto (A/B) são esperados 3 fragmentos distintos (83, 1034 e 1117 pb); para o genótipo homozigoto selvagem (A/A) preveem-se 2 fragmentos (83 e 1034 pb); e para o genótipo homozigoto mutante (B/B) espera-se observar apenas o segmento de 1117 pb (pares de bases). A figura 5 exemplifica um subconjunto de resultados gerados por meio da separação eletroforética dos fragmentos obtidos com a digestão dos “amplicons” pela enzima *BanI*.

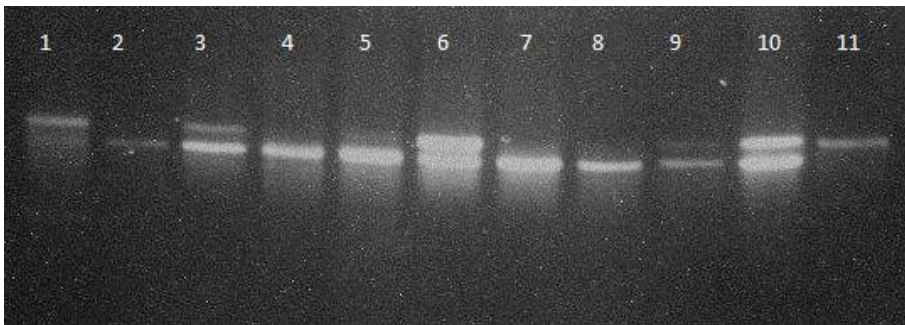


Figura 5. Perfis eletroforéticos de um subgrupo de amostras submetidas à genotipagem do polimorfismo G54D do gene *MBL2* via RFLP. Amostras 1, 6 e 10: genótipo A/B; 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9: genótipo A/A; e 11: *amplicon* não submetido à digestão.

Fonte: Primária, (2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico, que será encaminhado para publicação em periódicos.

Estudo do polimorfismo G54D do gene *MBL2* no diabetes mellitus gestacional

Study of polymorphism G54D of *MBL2* gene in gestational diabetes mellitus

Rejane Baggenstoss¹ *, Silvia Vanderléia Petzhold¹, Izabela K Michels Willemann¹, Francisco Simões Pabis¹, Paulo Gimenes^{II}, Paulo Henrique Condeixa de França¹, Jean Carl Silva¹

^I Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE),

^{II} Laboratório Gimenes

*Correspondência do autor

Departamento de Medicina

Universidade da Região de Joinville.

Endereço: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial CEP: 89219-710.

Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Tel.: +554734619197

Fax: +554734730131

E-mail: rejane@icedjoinville.com.br

5.1 Resumo

OBJETIVO: Analisar a influência da associação do polimorfismo G54D do gene *MBL2* quanto à necessidade de tratamento complementar e ocorrência de recém-nascidos grandes, para a idade gestacional na diabetes mellitus gestacional.

SUJEITOS E MÉTODOS: Cento e cinco pacientes recrutadas em Joinville - Brasil foram avaliadas no período de novembro de 2010 a outubro de 2012. As gestantes foram divididas em dois grupos correspondentes a presença (n=37) ou ausência do alelo mutado (n=68). As variantes do polimorfismo G54D do gene *MBL2* foram identificado por meio da análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP), a partir de segmentos gênicos obtidos via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os desfechos primários avaliados foram parâmetros antropométricos e bioquímicos da mãe e do recém-nascido (RN), bem como a necessidade de terapia complementar associado à dietoterapia quando comparado como os dois grupos. **RESULTADOS:** 35,2 % das pacientes analisadas carregavam pelo menos um alelo mutado do polimorfismo G54D. Os dois grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao ganho de peso, paridade, idade, índice de massa corporal e idade gestacional de chegada à maternidade. Os grupos não diferiram quanto à necessidade de tratamento complementar à dietoterapia (16,2% vs 26, 7%) e à presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional (24,3% vs 13, 2%) nas pacientes portadoras ou não do alelo mutado, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Nossos dados demonstraram que o polimorfismo G54D do gene *MBL2* não está associado à maior necessidade de tratamento complementar à dietoterapia e à ocorrência de recém-nascidos grandes, para a idade gestacional na população estudada.

Palavras-Chaves: *MBL2*; polimorfismo de nucleotídeo único; diabetes mellitus gestacional.

5.2 Abstract

AIM: To assess the association of the G54D *MBL2* polymorphism with the need for additional treatment and the presence of large for gestational age newborns in gestational diabetes mellitus. **SUBJECTS AND METHODS:** One hundred and five patients recruited in Joinville - Brazil were evaluated between November 2010 until October 2012. Pregnant woman were divided into two groups correspondents to the presence (n = 37) or absence (n = 68) of the mutant allele. The variants polymorphisms of the G54D *MBL2* were identified by restriction fragment lengths polymorphic (RFLP) analysis, from gene segments obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR). Assessed outcomes were anthropometric and biochemical parameters of the mother and newborn, and the necessity of additional therapy associated with diet when compared to the two groups. **RESULTS:** 35.2% of the evaluated group carried at least one mutated allele of G54D *MBL2* polymorphism. There were no statistically significant differences in weight gain, parity, age, body mass index and gestational age of arrival maternity between the two groups. The groups did not differ in the need for additional treatment with diet therapy (16.2% vs 26, 7%) and presence of large for gestational age neonates (24.3 vs 13%, 2%) in the patients with the mutated allele or did not respectively. **CONCLUSION:** Our data showed that G54D *MBL2* polymorphism had no effect on the need for additional treatment added to the diet therapy and the occurrence of large for gestational age newborns in the studied population.

Keywords: *MBL2*, single nucleotide polymorphism; gestational diabetes mellitus.

5.3 Introdução

O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é conceituado como o aparecimento de um grau variável de intolerância à glicose diagnosticada pela primeira vez durante a gestação e que pode ou não persistir após o parto (1,2). Ocorre em 7% das gestações, podendo variar de 1% a 18% dependendo da população estudada (3,4).

DMG é um distúrbio heterogêneo no quais vários fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos. Duas características marcantes na gravidez são a hiperinsulinemia e a resistência à insulina, que podem predispor a mulher ao desenvolvimento do DMG. No diabetes tem-se um estado de inflamação crônica subclínica no tecido adiposo, músculos e fígado, caracterizados pela produção anormal de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (5-7).

A proteína Lectina de Ligação a Manose (MBL) tem capacidade de ativar a cascata do complemento e estimular a fagocitose. Adicionalmente, a MBL também inibe a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Então, a deficiência de MBL favorece uma resposta inflamatória prolongada e sustentada, favorecendo a atividade do TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 que, por sua vez, participam das vias moleculares de resistência à insulina (8-10).

A MBL é uma proteína sintetizada no fígado, considerada um componente importante do Sistema Imune Inato, cujo nível sérico é determinado geneticamente (11). São conhecidos 3 alelos mutantes principais no éxon 1 do gene *MBL2* associados à deficiência de MBL e implicados na redução da funcionalidade da proteína: R52C, G54D e G57E(11,12).

No presente estudo, trabalhamos com a hipótese de que a deficiência de MBL poderia estar envolvida no aparecimento de algum grau de resistência à insulina. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a prevalência do polimorfismo G54D do gene *MBL2* nas gestantes apresentando DMG. Avaliamos também a relação dos genótipos com parâmetros antropométricos da mãe e do recém-nascido (RN), assim como a necessidade de terapia complementar.

5.4 Materiais e Métodos

5.4.1 Sujeitos e variáveis clínico-laboratoriais

Estudo de coorte prospectivo com recrutamento consecutivo de participantes entre novembro de 2010 a outubro de 2012, na Maternidade Darcy Vargas (MDV) em Joinville – SC. Participaram do estudo, gestantes diagnosticadas com DMG conforme os critérios da Organização Mundial de Saúde (1,3).

Dividiram-se as gestantes em dois subgrupos correspondentes, um com a presença alelo selvagem e outro com a presença do alelo mutado. As gestantes apresentavam idade mínima de 18 anos, idade gestacional entre 20 e 32 semanas (calculada a partir da primeira ultrassonografia realizada pela paciente) e gestação única. Na primeira consulta de pré-natal foi verificado a massa corporal, a estatura e o Índice de Massa Corporal (IMC). Considerou-se sobrepeso, resultados obtidos acima de 25 kg/cm² até 29,9 kg/cm² e obesidade igual ou acima de 30 kg/cm². Foi verificado o ganho de peso durante a gestação, necessidade de tratamento complementar, tipo de tratamento (hipoglicemiante oral ou insulina), ausência de outras patologias interferentes, como Doença Hipertensiva Específica da Gravidez (DHEG). Foram excluídas 3 gestantes que tiveram DHEG e uma que teve aborto hidrópico.

Em todas as gestantes após o jejum de 8 a 12 horas, foram coletadas as amostras de sangue em veia antecubital. As variáveis avaliadas foram as glicemias da curva glicêmica com 75 gramas de glicose entre a 24^a e 28^a semanas de gravidez no diagnóstico, e a glicemia de jejum, pós-prandial e hemoglobina glicada (HbA1c) durante o tratamento. As mensurações das glicemias foram realizadas através do método de química seca no aparelho Vitros Fusion 5.1. Foi coletado 1 mL de sangue, no mesmo local, e no mesmo momento das coletas da rotina de acompanhamento pré-natal destas pacientes, sem necessidade de uma punção venosa específica. O sangue foi encaminhado para o Laboratório de Biologia

Molecular da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, onde foi processado e analisado para a pesquisa do polimorfismo da MBL.

Os dados dos recém-nascidos avaliados foram: peso ao nascer, sendo considerados recém-nascidos grandes, para a idade gestacional (peso acima do percentil 90 em curvas de crescimento) e ou macrossomia (peso > 4000 g) (13). Suspeita de hipoglicemia (glicemia capilar < 40 mg/dL), APGAR de primeiro e APGAR de quinto minuto.

Todas as gestantes foram acompanhadas no ambulatório do serviço de alto risco da MDV, pela mesma equipe multidisciplinar, composta por: médicos, nutricionista, enfermeiras e fisioterapeuta. As gestantes consentiram à participação por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) - processo 203/2011.

O tamanho da amostra foi calculado estimando que na Maternidade Darcy Vargas sejam atendidas, em média, 500 gestantes diagnosticadas com DMG por ano. A presença da deficiência da MBL na população geral é estimada em, aproximadamente, 10% (10). Os outros dois desfechos primários selecionados (ocorrência de recém-nascido grande para a idade gestacional e necessidade de terapia complementar) apresentam frequência estimada de 30% (14). Uma vez que se estabeleceu comparar a diferença das frequências de necessidade de implementação de terapia complementar entre as gestantes portadoras e não portadoras do alelo mutado do polimorfismo G54D, então a frequência estimada calculada é de 3% (30% x 10%). Considerando o intervalo de confiança da prevalência estimada (IC) de 1,5 a 4,5%, chega-se a uma amostra de 109 (80% de nível de confiança).

5.4.2 Análises genotípicas

As amostras de sangue periférico (300 µL) foram submetidas à extração do DNA genômico utilizando-se os procedimentos recomendados pelo fabricante do kit *Genomic DNA Extraction Kit* (Real Biotech Corporation, Taiwan).

Um segmento do gene *MBL2*, correspondente ao éxon 1 e parte da região 5' não traduzida, foi amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com emprego dos iniciadores GAGGCTTAGACCTATGGGGCTAG e CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG (15). As reações (50 µL) foram preparadas em cabine de uso específico e continham 50 - 500 ng DNA, 200 µM dNTP's, 1,5 mM MgCl₂, 1 U Platinum Taq[®] DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), tampão de reação (Invitrogen), 50 pmol iniciadores e água grau PCR. A termociclagem foi conduzida no aparelho XP Cyclor (Bioer Technology Co., Japão), segundo .

Os produtos gerados na PCR (*amplicons*) foram submetidos à digestão pela endonuclease *BanI* (New England Biolabs, EUA), com sítio de reconhecimento específico correspondente a GGYRCC, a 37°C durante 2 horas, conforme recomendações do fabricante. Os padrões de restrição obtidos foram verificados por meio de eletroforese (100V/2h) em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, e foto documentado sob luz ultravioleta (MiniBis-Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltda., Israel). São previstos 3 padrões de restrição para o genótipo heterozigoto (A/B) são esperados três fragmentos distintos (83, 1034 e 1117 pb- pares de base), para o genótipo homozigoto selvagem (A/A) preveem-se dois fragmentos (83 e 1034 pb) e para o genótipo homozigoto mutante (B/B) espera-se observar apenas o segmento de 1117 pb.

5.4.3 Análises estatísticas

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas (quantitativas), a análise foi realizada através do cálculo de médias e desvios padrão. Para as variáveis categóricas (qualitativas), calcularam-se frequências absolutas e relativas.

Para a análise da hipótese de igualdade entre as médias dos grupos foi utilizado o teste t. Se a normalidade foi rejeitada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O teste de normalidade utilizado foi Kolmogorov-Smirnov.

Para se testar a homogeneidade dos grupos em relação às proporções foi utilizado o teste qui-quadrado. Ficou estabelecido nível de significância menor que 0,05.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o software SPSS versão 11.0.

5.5 RESULTADOS

O polimorfismo G54D no éxon 1 do gene *MBL2* foi investigado em um grupo de 109 pacientes com DMG. Foram excluídas três gestantes que desenvolveram doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) e uma que teve aborto hidrópico, resultando em 105 pacientes efetivamente consideradas no presente estudo. As gestantes foram divididas em dois subgrupos correspondentes a presença (n=37) ou ausência (n=68) do alelo mutado.

O perfil epidemiológico dos subgrupos foi comparado quanto ao ganho de peso, paridade, idade, IMC e idade gestacional de chegada à maternidade, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 1). No tocante à antropometria e à composição corporal das gestantes, identificou-se excesso de peso na maioria da população estudada. No subgrupo das pacientes portadoras do genótipo selvagem, 63,2% apresentavam sobrepeso, com um IMC médio de 26,5kg/m², enquanto 62,2% das pacientes portadoras do alelo mutado apresentavam sobrepeso, com um IMC médio de 26,3kg/m².

Das 105 mulheres com DMG em que as variantes do polimorfismo G54D do gene *MBL2* foram estudadas, 37 (35,2%) apresentavam ao menos um alelo mutado, sendo que quatro (3,8%) apresentavam o genótipo AA e 33 (31,4%) apresentavam o genótipo AG. Portanto, o genótipo GG (64,8%) e o alelo G (79,5%) mostraram-se os mais prevalentes na população estudada.

De forma equivalente não foram encontradas diferenças significantes quanto aos resultados laboratoriais de glicemia em jejum no diagnóstico, glicemia duas horas após curva glicêmica com 75 gramas de glicose e hemoglobina glicosilada A1c, assim como glicemias de jejum e pós prandial com tratamento, conforme apresentado na tabela 2.

Houve necessidade de tratamento complementar com metformina para 13 (35,1%) pacientes que apresentavam o alelo mutado do polimorfismo G54D e para

20 (29,4%) das pacientes com o genótipo selvagem ($p=0,537$). A terapêutica com metformina não foi suficiente, sendo realizada complementação com insulino terapia em 8 (11,8%) das gestantes que estavam no grupo do genótipo selvagem e 5 (13,5%) no grupo com o alelo mutado ($p= 0,475$).

Os RNs das mães que apresentavam o alelo mutado do polimorfismo G54D geraram infantes mais pesados, porém sem alcançar significância estatística (Tabela 3). Verificou-se a presença de RN grandes para a idade gestacional (GIG) em nove (24,3%) das pacientes no grupo dispo ndo o alelo raro e apenas 13 (13,2%) no outro grupo.

Tabela 1: Perfil Epidemiológico da População (Médias e Desvios Padrão)

Gene <i>MBL2</i>	G54D selvagem (GG) n=68	G54D mutado (AG+AA) n=37	P
Idade (anos)	30,6 (6,2)	30,6 (6,0)	0,830*
Idade gestacional (semanas)	28,1 (5,6)	26,1 (6,0)	0,373†
Gestações (número)	2,8 (1,9)	2,5 (1,5)	0,849†
IMC‡ (kg/m²)	26,5 (5,2)	26,2 (3,3)	0,520*
Ganho peso (kg)	11,3 (6,3)	10,4 (9,1)	0,923*

* teste T Student, † teste de Mann-Whitney, ‡ índice de massa corporal.

Fonte: Primária, (2013)

Tabela 2: Resultados de parâmetros clínico-laboratoriais de acompanhamento do Diabetes Mellitus Gestacional (Médias e Desvios padrão)

Gene <i>MBL2</i>	G54D selvagem(GG) n=68		G54D mutado (AG+AA) n=37		<i>P</i>
	Mean	SD	Mean	SD	
Glicemia jejum no diagnóstico	87,6 mg/dL	(12,4)	85,36 mg/dL	(10,7)	0,156*
Glicemia 2 h após GTT no diagnóstico†	155,36 mg/dL	(17,2)	154,66 mg/dL	(12,3)	0,968*
Glicemia jejum com tratamento	85,86 mg/dL	(8,9)	85,96 mg/dL	(8,6)	0,239*
Glicemia pós prandial com tratamento	114,96 mg/dL	(15,1)	114,46 mg/dL	(13,7)	0,488*
HbA1c‡	5,4%	(0,3)	5,6%	(0,5)	0,748*
Trat. somente dieta§	40		20		0,482
Trat. dieta e med. ¶	28		17		0,482

*teste T Student, †Glicemia 2 horas após curva glicêmica com 75 g de glicose, ‡Hemoglobina glicada, §tratamento somente com dieta, ||teste Qui-quadrado, ¶tratamento com dieta e medicação.
Fonte: Primária, (2013).

Tabela 3: Características do Recém-nascido

Gene <i>MBL2</i>	G54D selvagem (GG) [n (%)]	G54D mutado (AG+AA) [n (%)]	<i>P</i>
	68(64,8)	37(35,2)	
PIG	4 (5,9)	2 (5,4)	0,212*
AIG	55 (80,9)	26 (70,3)	0,216*
GIG	9 (13,2)	9 (24,3)	0,149*
Apgar 1	7,7(1,9)	8,6 (0,6)	0,326†
Apgar 2	8,9 (1,5)	9,3 (0,5)	0,940†

* teste Qui-quadrado, † Teste de *Mann-Whitney*, PIG pequeno para idade gestacional, AIG adequado para idade gestacional, GIG grande para idade gestacional.

Fonte: Primária, (2013).

5.6 DISCUSSÃO

O DMG é uma doença complexa, sendo razoável acreditar na existência de vários mediadores para a sua ocorrência. Nos RNs das mães que desenvolveram DMG há maior probabilidade de macrosomia fetal, sendo este um fator predisponente à resistência insulínica, obesidade e diabetes tipo 2 na infância e no adulto (16, 17). Para essas mães, há um risco de 10% ao ano de desenvolver diabetes tipo 2 no futuro (1).

A identificação de variantes genéticas que influenciam o DMG é um foco importante de pesquisas na atualidade com vistas a melhorar o entendimento dos mecanismos subjacentes à patogênese desta desordem. A mutação G54D do gene *MBL2* está associada a uma diminuição dos níveis de MBL (18).

O primeiro relato sobre o risco aumentado para o desenvolvimento de DMG associado a uma mutação no gene *MBL2* foi realizado por Megia e colaboradores em 2004 (10). A mutação no códon 54 do éxon 1 é considerada a mutação mais frequente do gene *MBL2*. A presença de ao menos um alelo mutado do polimorfismo G54D foi observada em 30% da população na maioria dos grupos étnicos avaliados (19, 20). Em nosso estudo, 35,2% das pacientes analisadas carregavam o alelo mutado do polimorfismo G54D, enquanto 43,8% das gestantes diabéticas apresentavam o mesmo alelo no grupo de espanholas estudado por Megia e colaboradores (2004).

Na análise do peso das gestantes com DMG, observou-se que a maioria das pacientes de ambos os subgrupos apresentavam excesso de peso. É reconhecido que a obesidade constitui um fator de risco significativo para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) após o parto (21, 22). A identificação da alta frequência (62,7%) de sobrepeso é de suma importância, pois as mulheres com DMG, avaliadas no presente estudo, encontram-se sob elevado risco de desenvolver DM2 após a gestação. Tal fato indica um aspecto a ser considerado no planejamento da assistência durante e após a gestação, o que também foi apontado por outros autores, constituindo fator de risco modificável passível de intervenção e prevenção quanto à ocorrência de DM2 após DMG (23-25).

Há estudos que demonstraram que a presença do alelo mutado está associada à deficiência de MBL, ocorrência que favorece o desenvolvimento de diabetes gestacional mais severo (10,26). No estudo de Megia e colaboradores (2004), as gestantes portadoras do alelo mutado necessitaram mais de insulina em

seu tratamento complementar à dietoterapia, o que não foi observado em nossa população estudada. No estudo de Megia o critério diagnóstico utilizado para DMG foi ADA 2002, diferente deste estudo que utilizou os critérios IADPSG 2010. O ponto de corte mais baixo proposto no IADPSG 2010 pode justificar esta diferença.

Os resultados do nosso estudo demonstraram que o polimorfismo não esteve significativamente associado aos parâmetros do RN, inclusive peso ao nascimento e ocorrência de RN classificado como GIG. Enquanto alguns autores encontraram uma relação com aumento do risco para o parto prematuro e peso reduzido ao nascimento quando as pacientes apresentavam o alelo mutado do polimorfismo G54D (26), outros autores, como Megia e colaboradores, demonstraram uma associação com maior peso ao nascimento (10).

Considerando os resultados aqui apresentados fazem-se necessários estudos adicionais para investigar a associação e o impacto do polimorfismo G54D do gene *MBL2* em relação a DMG, visto que o número limitado de sujeitos alocados pode justificar a ausência de diferenças entre os subgrupos). A exclusão dos casos com DHEG e outras doenças que pudessem interferir no peso do RN podem estar relacionados ao nosso resultado.

A conclusão do estudo foi que 35,2% das pacientes carregavam pelo menos um alelo da variante G54D do gene *MBL2*. Os dados dessa pesquisa sugerem que a presença do polimorfismo da *MBL2* pode não estar associada com a necessidade de tratamento complementar à dietoterapia e presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional na população estudada. Não foram avaliadas as características étnicas da população.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse científico nesse estudo.

5.7 Bibliografia

1. ADA American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes Position Statement. Diabetes Care. 2011;34 (Suppl1):S11-61.
2. Committee opinion no. 504: screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. Obstet Gynecol. 2011; 118(3):751-3.

3. IADPSG Consensus Panel. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676-82.
4. Bardenheier BH, Elixhauser A, Imperatore G, et al. Variation in prevalence of gestational diabetes mellitus among hospital discharges for obstetric delivery across 23 States in the United States. *Diabetes Care*. 2013; 36(5):1209-14.
5. Petry CJ. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. *Br J Nutr*.2010; 104(6):775-87.
6. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr*. 2003;133(5 Suppl 2):1674S-1683S.
7. Denison FC, Roberts KA, Barr SM, Norman JE. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction*. 2010;140(3):373-85.
8. Soell M, Lett E, Holveck F, Schöller M, Wachsmann D, Klein JP. Activation of human monocytes by streptococcal manose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF-alpha release. *J Immunol*. 1995; 154(2):851-60.
9. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5):373-84.
10. Megia A, Gallart L, Fernández-Real JM, Vendrell J, Simón I, Gutierrez C, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms associated with gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89(10):5081-7.
11. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *Journal of Immunology*.1995; 155(6):3013-20.
12. Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immun Methods*. 2000; 241(1-2):33-42.

13. Marcondes E. Crescimento normal e deficiente. São Paulo: Editora Sarvier; 1989.
14. Jolly MC, Sebire NJ, Harris JP, Regan L, Robinson S. Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 111(1):9-14.
15. Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Iwata K, Matsumoto M, Nakao K, et al. Hepatitis C virus 116 infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Archives of Virology.* 1998; 143(4):645-51.
16. Silva JC, Bertini AM, Ribeiro TE, de Carvalho LS, Melo MM, Barreto Neto L. Fatores relacionados à presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional em gestantes com diabetes mellitus gestacional. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(1):5-9.
17. Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care.* 2007; 30 (2):169-74.
18. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol.* 2003; 40(2-4):73-84.
19. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, et al. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol.* 2002; 56(6):630-41.
20. Van Till JW, Boermeester MA, Modderman PW, et al. Variable mannose-binding lectin expression during postoperative acute-phase response. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7(5):443-52.
21. Baptiste-Roberts K, Barone BB, Gary TL, Golden SH, Wilson LM, Bass EB, et al. Risk factors for type 2 diabetes among women with gestational diabetes: a systematic review. *The American Journal of Medicine.* 2009; 122(3):207-214.
22. Tovar A, Chasan-Taber L, Eggleston E, Oken E. Postpartum screening for diabetes among women with a history of gestational diabetes mellitus. *Prev Chronic Dis.* 2011; 8(6): A124.

23. Lee AJ, Hiscock RJ, Wein P, Walker SP, Permezel M. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long-term risk of developing type 2 diabetes: a retrospective cohort study using survival analysis. *Diabetes Care*. 2007; 30(4):878-83.
24. Ratner RE. Prevention of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30 (2): 242-5.
25. Kim SY, England L, Sappenfield W, Wilson HG, Bish CL, Salihu HM, et al. Racial/ethnic differences in the percentage of gestational diabetes mellitus cases attributable to overweight and obesity, Florida, 2004-2007. *Prev Chronic Dis*. 2012;9:E88.
26. Anells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, Bardy P, et al. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191(6):2056-67.

6 CONCLUSÕES

No estudo realizado 35,2% das pacientes carregavam pelo menos um alelo da variante G54D do gene *MBL2*.

De acordo com essa pesquisa os dados sugerem que a presença do polimorfismo da *MBL2* pode não estar associada com a necessidade de tratamento complementar à dietoterapia e presença de recém-nascidos grandes, para a idade gestacional na população estudada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E.M.A. Nutrição em Obstetrícia e Pediatria. **Terceira reimpressão revisada e atualizada Cultura Médica**, 2005.

ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. *Tolerance, suppression and the fetal allograft.* **J Mol Med.** V.83, p. 88-96, 2005.

ACOG - American College of Obstetricians and Gynecologists. *Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists, Number 30, (Replaces Technical Bulletin Number 200. December 1994). Gestational diabetes.* **Obstetrics and Gynecology** .v.98,525-538, 2001.

ADA - American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes.. *Position Statement.* **Diabetes Care.**v.34, (Suppl1), p. 11-61,2011.

ANNELLS, M.F.*et. al.* *Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: risk of preterm birth.* **Am J Obstet Gynecol.** v.191, p. 2056-2067, 2004.

ARAUJO, J. *et. al.* *Mannose binding lectin gene polymorphisms are associated with type 1diabetes in Brazilian children and adolescents.* **Hum Immunol.**v.68, p. 739-743, 2007.

BAPTISTE-ROBERTS, K. *et. al.* *Risk factors for type 2 diabetes among women with gestational diabetes: a systematic review.* **The American Journal of Medicine.** v. 122, n. 3, p. 207-214, 2009.

BARDENHEIR, B.H.; ELIXHAUSER,A.; IMPERATORE,G.; *et. al.* *Variation in prevalence of gestational diabetes mellitus among hospital discharges for obstetric delivery across 23 States in the United States.* **Diabetes Care.** v.36, n.5, p.1209-1214. 2013.

BASSO, N.A.S *et. al.* Insulinoterapia, controle glicêmico materno e prognóstico perinatal: diferença entre o diabetes gestacional e o clínico. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 29, n.5, p.253-259, 2007.

BONIOTTO, M. *et. al.* Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. **J Mol Med.** v. 83, p. 308-315, 2005.

BOUWMAN, L.H. *et. al.* Elevated levels of mannose-binding lectin at clinical manifestation of type 1 diabetes in juveniles. **Diabetes.** v. 54, p.3002-3006, 2005.

CARICILLI, A.M.; SAAD, M.J. *The role of gut microbiota on insulin resistance.* **Nutrients.** v. 12, p.829-851, 2013.

CASTORINO, K.; JOVANOVIC, L. *Pregnancy and diabetes management: advances and controversies.* **Clinical chemistry.** v. 57, n.2, p 221-230, 2011.

CATALANO, P.M. *et. al.* Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. **J Nutr.**v.133, n. 5, (suppl 2),p.1674S-1683S. 2003.

CHON, S.J. *et.al.* Association of variants in PPAR γ ², IGF2BP2, and KCNQ1 with a susceptibility to gestational diabetes mellitus in a Korean population. **Yonsei Med J.** v.54, n.2. P.352-357, 2013.

Committee opinion no. 504: screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. **Obstet Gynecol.**v.118, p. 751-753. 2011.

COOK, H.T.; BOTTO, M. *Mechanisms of Disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* **Nature Reviews Rheumatology.** v.2, p. 330-337, 2006.

DABELEA, D. *The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers.* **Diabetes Care.** v. 30, Suppl. 2, 169-174, 2007.

DAHER, S. *et. al.* Inflammatory mediator genes polymorphisms and gestational diabetes: a review of the literature. **Journal of Reproductive Immunology.** v. 90, p. 111-116, 2011.

DANILENKO-DIXON, *et. al.* *Universal versus selective gestational diabetes screening: application of 1997 American Diabetes Association recommendations.* ***Am J Obstet Gynecol.***v. 181, p.798-802, 1999.

DAVIES, E.J. *et. al.* *A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population.* ***J Rheumatol*** .v.24, p.485- 458, 1997.

DENISON, F. C. *et. al.* *Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function.* ***Reproduction.***v.140, n.3, 373-385, 2010.

DOMMETT, R.M.; KLEIN, N.; TURNER, M.W. *Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.* ***Tissue Antigens.*** v. 68, p.193-209, 2006.

FERNANDEZ-REAL J.M. *et. al.* *Protection from inflammatory disease in insulin resistance: the role of mannan-binding lectin.* ***Diabetologia.*** v. 49, p.2402-2411, 2006.

FRUEBIS, J. *et. al.* *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.* ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** v.98, p.2005-2010, 2001.

FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y. *The lectin complement pathway- its role in innate immunity and evolution.* ***Immunological Rewies.*** v.198, p. 185-202, 2004.

GARRED, P. *et. al.* *Mannose-binding lectin deficiency--revisited.* ***Mol Immunol.*** v. 40, n.2-4, p. 73-84. 2003.

GARRED, P. *et. al.* *Mannose-binding lectin and its genetic variants.* ***Genes Immun.*** v.7, p. 85-94, 2006.

GARRED, P. *Mannose-binding lectin genetics: from A to Z.* ***Biochem Soc Trans.*** v. 36, p.1461-1466, 2008.

GERGELY, P.J. *et. al.* *Structural polymorphisms in the mannose-binding lectin gene are associated with juvenile idiopathic arthritis.* ***Rheumatol.*** v.4, p. 843-847, 2009.

GUO, T.N. *et. al.* Genome he human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. **Department of Pathology Boston University School of Medicine, Massachusetts.** v. 9, p. 246, 1998.

GUZMÁN-FLORES, J.M, *et. al.* Association analysis between -308G/A and -238G/A TNF-alpha gene promoter polymorphisms and insulin resistance in Mexican women with gestational diabetes mellitus. **J Investig Med.** V.61, n.2, p. 265-269, 2013.

HANSEN, T.K. *et. al.* Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. **Diabetes.** v.53, n.6, p.1553 -1570, 2004.

HANSEN, T.K. *et. al.* GH strongly affects serum concentrations of mannan-binding lectin: evidence for a new IGF independent immunodulatory effect of GH. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** v. 86, p. 5383-5388, 2001.

HEDDERSON, M.M. *et. al.* Body mass index and weight gain prior to pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol.** v.198, p.409-417, 2008.

HOLLANDER, M.H.; PAARLBERG, K.M.;HUISJES, A.J.M. Gestational Diabetes: A Review of the Current Literature and Guidelines. **Obstet Gynecol Surv.** v. 62, p.125-136, 2007.

HOVIND, P.*et. al.* Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes: an inception cohort study. **Diabetes.** v.54, n.5, p. 1523-1527, 2005.

IKEDA, K.*et. al.* Serum lectin with know structure activates complement through classical pathway. **J Biol Chem.** v. 262, p. 7451-7454, 1987.

IADPSG - *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups, recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy.* **Diabetes Care.**v.33, n.7, p. 676-682, 2010.

JACK, D.L.; KLEIN, N.J.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunology Reviews.** v. 180, p. 86-99, 2001.

JANEWAY, C.A. *et.al. Immunobiologia* - O sistema imune na saúde e na doença. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JOLLY, M.C. *et.al. Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* v. 111, p. 9-14, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol.* v. 11, n.5, p.373-384, 2010.

KILPATRICK, D.C. *Mannan-binding lectin and role in innate immunity. Transfusion Medicine.* v. 12, p. 335-351, 2002a.

KILPATRICK, D.C. *Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. Biochimica et Biophysica Acta.* v. 1572, p. 401-413, 2002b.

KILPATRICK, D.C. *Introduction to mannan-binding lectin. Biochem Soc Trans.* v. 31, p.745-747, 2003.

KIM, S.Y. *et. al. Racial/ethnic differences in the percentage of gestational diabetes mellitus cases attributable to overweight and obesity, Florida, 2004-2007. Prev Chronic Dis.* v.9, p.88, 2012.

LANDON, M.B. *et. al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. N Engl J Med.* v. 361, p. 1339-1348, 2009.

LANDON, M.B. *et. al. National Institute of Child Health, and Human Development (NICHD) Maternal-Fetal Medicine Units (MFMU) Network, The relationship between maternal glycemia and perinatal outcome. Obstet Gynecol.* v. 117, n. 2, p. 218-224, 2011.

LEE, A. J. *et. al. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long-term risk of developing type 2 diabetes: a retrospective cohort study using survival analysis. Diabetes Care.* v. 30, n. 4, p. 878-883, 2007.

- LIPSCOMBE, R.J. *et. al.* High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet.** v. 1, n.9, p.709-715. 1992.
- MADSEN, H.O. *et. al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **Journal of Immunology.** v. 155, p. 3013-3020, 1995.
- MARCONDES, E. Crescimento normal e deficiente. São Paulo: Editora Sarvier; 1989.
- MATSUSHITA, M. *et. al.* Hepatitis C vírus 116 infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. **Archives of Virology.** v. 143, p. 645-665, 1998.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. Innate immunity. **New England Journal of Medicine.** v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.
- MEGIA A. *et. al.* Mannose-binding lectin gene polymorphisms associated with gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 89, n.10, p.5081-5087, 2004.
- METZGER, B.E. *et. al.* HAPO – Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med.** v. 358 n.19, p.1991-2002, 2008.
- MESTMAN, J.H. *Interaction between pregnancy, gestational diabetes, and long-term maternal outcome. Diabetes in Women, Adolescence, Pregnancy and Menopause. Williams and Wilkins.* p. 233-241, 2004.
- MINCHINTON, R.M. *et. al.* Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. **Scand J Immunol** .v. 56, n. 6, p. 630-641. 2002.
- OSTERGAARD, J.A. *et.al.* Diabetes-induced Changes in Mannan-binding Lectin Levels and Complement Activation in a Mouse Model of Type 1 Diabetes. **Immunol.** v. 77, p.187-194, 2013.
- O'SULLIVAN, J.B. *et.al.* The potential diabetic and her treatment in pregnancy. **Obstet Gynecol.** v. 27, p.683, 1966.

PADILHA, P.C. *et. al.* **Terapia nutricional no diabetes gestacional.** *Rev. Nutr.* v. 23, n. 1, 2010.

PETERSEN, S.V; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. *The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association.* **Molecular Immunology.** v. 38, p. 133-149, 2001.

PETRY, C.J. *Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment.* **Br J Nutr.** v. 104, p. 775-787, 2010.

RATNER, R. E. *Prevention of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes.* **Diabetes Care.** v. 30, p. 242-245, 2007.

ROY, S.*et .al.* *MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case control study.* **Lancet.** v. 359, p. 1569-1573, 2002.

SASTRY, K. *et.al.* *The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10.* **Journal of Experimental Medicine.** v. 170, n.4, p. 1175-1198, 1989.

SAUNDERS, C. PADILHA, P.C. *Diabetes na gestação.* **Nutrição em obstetrícia e pediatria.** Cultura Médica, p. 191-207, 2011.

SILVA, J. C. *et. al.* *Tratamento do diabetes mellitus gestacional com glibenclamida: fatores de sucesso e resultados perinatais.* **Rev Bras Ginecol Obstet.** v.29, n. 11, p. 555-560, 2007.

SILVA, J. C.*et. al.* *Fatores relacionados à presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional em gestantes com diabetes mellitus gestacional.* **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 31, n. 1, 2009.

SIMMONS, D.S.*et.al.* *Gestational a comparison of the American Diabetes Association and the American College of Obstetricians and Gynecologists guidelines with the U.K. National Institute for Health and Clinical Excellence guidelines.* **Diabetes Care.** v. 33, n.1, p. 34-37, 2010.

SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011.

SOELL, M. *et. al.* Activation of human monocytes by streptococcal manose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF-alpha release. **J Immunol.** v. 154, p. 851-860, 1995.

STEFFENSEN R. *et.al.* Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **J Immun Methods.** v. 241, p. 33-42, 2000.

SUPER M. *et. al.* Association of low levels of mannanbinding protein with a common defect in opsonisation. **Lancet.** v. 2, p. 1236-1239,1989.

THIEL S.*et. al.* Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. **Ped Allergy Immunol.** v. 6, p. 20-23, 1995.

TOVAR, A. *et.al.* Postpartum screening for diabetes among women with a history of gestational diabetes mellitus. **Prev Chronic Dis.**v. 8, n.6, 2011.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today.** v. 17, p. 532- 540, 1996.

TURNER, M. W. *et. al.* Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. **Hum Mol Genet.** v. 9, p.1481-1486,2000.

TURNER, M. W. *The role of mannose-binding lectin in health and disease.* **Molecular Immunology.** v. 40, p. 423-429, 2003.

VAN DE GEIJIN, F. E. *et.al.* Mannose-binding lectin levels during pregnancy: a longitudinal study. **Human reproduction.** v. 22, p. 362-371, 2007.

VAN TILL, J.W. *et. al.* Variable mannose-binding lectin expression during postoperative acute-phase response. **Surg Infect (Larchmt).** v.7, n. 5, 443-452, 2006.

VOGEL,F.; MOTULSKI, A.G. Genética Humana. **Problemas e abordagens.** v.3, p.199-200, 2000.

WALLIS, R. *Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein.* **Immunobiology.** v. 205, p. 433-445, 2002.

WANG, M. *et.al. Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells.* **Cellular & Molecular Immunology.** v. 8, p. 265-275, 2011.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Diabetes da gravidez é uma doença caracterizada pelo aumento do açúcar no sangue e pode trazer complicações à saúde da mãe e do bebê. Para a mãe pode aumentar o risco de elevação anormal da pressão sanguínea, entre outras complicações. Para o bebê, o diabetes pode aumentar seu peso, dificultando o parto normal, além de problemas de adaptação de respiração após o parto, obesidade na infância, diabetes mellitus no futuro adulto, e até mesmo a possibilidade de morte do bebê ainda dentro do útero. Todas estas alterações podem ocorrer principalmente quando o tratamento indicado não é realizado.

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa que será realizada na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE e na Maternidade Darcy Vargas, que se intitula **“Impacto do polimorfismo (G54D) do gene *MBL2* no diabetes gestacional”**, mediante conhecimento da sua proposta, riscos e benefícios. Esta pesquisa será realizada pela médica e aluna do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Rejane Baggenstoss, orientada pelo Professor Dr. Jean Carl Silva.

Este estudo tem como objetivos:

- calcular a quantidade do polimorfismo “G54D” do gene *MBL2* em gestantes com diagnóstico já confirmado de diabetes gestacional. O polimorfismo “G54D” é uma variante genética, ou seja, uma alteração no material hereditário (genético) ocasionada por uma mutação.

- verificar se as pacientes diabéticas que apresentam esse polimorfismo necessitam de mais tratamento complementar e se os recém-nascidos dessas mães são maiores do que a normalidade.

Nesta pesquisa somente será investigada a variante “G54D” do gene *MBL2*. Adicionalmente, pedimos sua autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA por 5 anos, para a investigação de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) no futuro. De qualquer forma, nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todas as participantes serão mantidas sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. Não será permitido o acesso de pessoas não autorizadas às amostras e aos

resultados. É garantido seu direito de ser informada quanto ao resultado da pesquisa, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide contatos ao final do documento) antes, durante ou após a conclusão do estudo.

Os resultados a serem gerados nesta pesquisa ainda serão considerados insuficientes para aplicação imediata como um critério de diagnóstico ou tratamento, necessitando de validação (comprovação) futura. Justamente por essa razão, não será realizado aconselhamento genético quanto à investigação da variante "G54D".

Não haverá compensação (pagamento) financeira pela sua participação ou ressarcimento de despesas, uma vez que a coleta de sangue será realizada durante uma visita de acompanhamento médico rotineiro. Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde.

Você não será prejudicada de forma alguma, caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Você pode livremente recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento (autorização) durante o andamento das atividades do estudo. Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento. A participação em qualquer pesquisa é voluntária.

Portanto, será necessária sua autorização para:

a) obtenção de dados pessoais, por meio de entrevista e coleta de informações no prontuário médico, como idade, data da última menstruação, idade gestacional, número de gestações prévias, história de diabetes na família, peso inicial e final na gravidez, altura, fatores de risco para pré-eclâmpsia, como foi feito o diagnóstico de diabetes gestacional, circunferência abdominal do feto, qual o tratamento que você usou durante a gravidez, como foram suas glicemias, exame de hemoglobina glicada, se teve alguma problema durante a gravidez, peso do seu filho e se necessitou de internação em UTI e por quanto tempo.

b) coleta e uso de uma amostra de sangue. A coleta da única amostra de sangue será realizada na própria Maternidade, pelo pessoal técnico do Laboratório Gimenes, portanto no mesmo local e momento da coleta de sua rotina de acompanhamento pré-natal. Será tão somente necessário 1 mL adicional de sangue, sem necessidade de uma coleta extra, ou seja, sem aumento de risco adicional à gestante. A amostra será encaminhada para o Laboratório Saúde I da UNIVILLE, onde será processada e analisada. Os riscos e a ocorrência de dor, inchaço ou infecção no local da coleta são considerados mínimos e são os inerentes a própria coleta de sangue. Você tem direito a buscar indenização em caso de danos ou prejuízos relativos à pesquisa, sempre que julgar necessário. E se ocorrer esta situação a responsabilidade de custas fica por conta da pesquisadora Rejane Baggenstoss.

Atenção: Sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Campus Universitário, s/n – Bairro Bom Retiro. Caixa Postal 246. CEP: 89219-905, Joinville, SC. FONE do Comitê de ética em pesquisa da Univille 34619235.

Declaração de Consentimento:

Eu, _____ (nome da paciente), após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei cancelar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa “**Impacto do polimorfismo G54D do gene MBL2 no diabetes gestacional**”.

Assinatura do Participante

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Data: ___ / ___ / _____

Responsáveis pela pesquisa:

Aluna Mestranda (Pesquisadora Responsável): Rejane Baggenstoss

Professor Orientador: Prof. Dr. Jean Carl Silva

Professor Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Contatos:

Telefones:

Instituição (Laboratório de Saúde I da UNIVILLE): (47) 34619197

Rejane Baggenstoss: (47) 91925580

E-mail:

rejane@icedjoinville.com.br

APÊNDICE B – Ficha de coleta

Ficha de coleta

Nome: _____ Idade: _____

DUM; ___/___/___ IG/DUM: _____ inclusão Gesta: _____

Historia mórbida familiar de diabetes sim () não()

Peso pré-gest: ___ Estatura: ___ IMC pré-gest: ___ Peso final: ___ G peso total ___

FR para DHEG: () DHEG prévia () Hist familiar de DHEG

Diag. DMG: GJ: ___ G2hs 75g ___ USG 1º Circunf. Abd. fetal ___

TTO utilizado: () Glibenclamida dose ___ () Metformina dose ___

() Troca/TTO p/ Insulina: Dose final: ___

G média em jejum: ___ G média pós-prandial: ___ HBA 1C (3T) ___

Síndrome hipertensiva () (DHEG / hipert transit)

Patologias associadas e outras intercorrências _____

Parto Data ___/___/___ Tipo: () PN () CS

IG ___s Peso: _____g () AIG () PIG () GIG.

Apgar: 1º ___e 5º ___minuto Morfologia: () Alterado: _____

() internação em UTI ___ dias causa _____

() Outras _____

EXCLUIDA: () motivo: () Intol droga () CA fetal (>97) () CA fetal <5) () desejo da paciente

APÊNDICE C – Regulamento para implantação e funcionamento de banco de amostras de DNA de portadoras de diabetes gestacional

Considerando as exigências dispostas no item 2 da Resolução 347 do Conselho Nacional de Saúde, de 13 de janeiro de 2005, determina-se que:

1. As responsabilidades pela guarda e pela autorização do uso do material armazenado ficam reservadas aos investigadores Rejane Baggenstoss e Paulo Henrique Condeixa de França.

2. Os mecanismos que garantem o sigilo e a confidencialidade de cada espécime envolvem:

2.1. Codificação das amostras colhidas na Maternidade Darcy Vargas.

2.2. Confeção e utilização de dois arquivos independentes. O primeiro arquivo relaciona os dados pessoais com o número de registro atribuído à amostra da gestante na pesquisa. O segundo confronta os dados epidemiológicos, terapêuticos e resultados analíticos (bioquímica e genotipagem) com a codificação da amostra no banco.

2.2.1. O acesso aos arquivos contendo as informações pessoais dos sujeitos da pesquisa é restringido por senha. O conhecimento da senha é limitado, por questões éticas, aos investigadores Rejane Baggenstoss e Paulo Henrique Condeixa de França.

3. A possibilidade de contato com as gestantes para fornecimento de informações de seu interesse é assegurada através de registro e conservação de dados que permitam sua localização (endereço residencial, telefone) em arquivo, conforme descrito no item 2.2.1.

Joinville, 22 de junho de 2011.

Rejane Baggenstoss

Paulo Henrique Condeixa de França