UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINA SERRI LÉPORE

Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (*Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY*) em gestantes e neonatos.

Ribeirão Preto
2016

CAROLINA SERRI LÉPORE

Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientadora: Profa Dra Elaine Christine Dantas Moisés

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lépore, Carolina Serri

Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos. Ribeirão Preto, 2016.
104p. : il. ; 30cm

Tese de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Moisés, Elaine Christine Dantas

1. Diabetes Mellitus; 2. Gestação; 3. MODY; 4. MODY GCK; 5. Polimorfismo genético.

Folha de Aprovação

Carolina Serri Lépore

Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos.

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado em Ciências Médicas. Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO:

A **Deus,** que

vem guiando meu caminho.

Aos meus pais **Armando Lépore Júnior** e **Terezinha da Cruz Serri Lépore**, dos quais me orgulho, e que com muito amor, paciência e dedicação me ensinaram a ser a pessoa em que me tornei,

Aos meus avós **Júlio Serri** e **Armando Lépore**, *in memoriam*, que me ensinaram a importância da educação e da perseverança no trabalho,

À minha mestre, orientadora, amiga, e conselheira **Profa. Dra. Elaine Christine Dantas Moisés**, pela dedicação, carinho e incentivo durante os anos de minha formação profissional e agora durante a execução deste trabalho.

Agradecimentos

AGRADEÇO

Aos meus amigos, colegas, quase irmãos, Rodrigo Soler Coltro e Suzana Eggers Turra, que me ensinaram o real significado de parceria, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Ênio, Luis Augusto, Luiz Gustavo, Ana Carolina, Patrícia, Viviane, Flávia, Roseane, Caio e Tatiana; presentes desde a minha especialização, proporcionando implementação de conhecimentos, troca de ensinamentos profissionais constante, companheirismo e ajuda mútua.

À Daniela Miarelli, parceira durante toda a execução desse projeto e amiga querida.

À minha família, a meus amigos de Ribeirão Preto e Monte Alto, pela compreensão nos muitos momentos de ausência a fim de completar este projeto.

Ao Prof. Dr. Raphael Del Roio Liberatore Junior pela ajuda e apoio na mentalização e realização desse trabalho, sua ajuda foi imprescindível. Agradeço ainda por aceitar participar da banca examinadora da defesa de meu mestrado.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, por também aceitar participar da banca examinadora da defesa de meu mestrado; aguardo ansiosamente pela sua presença.

Ao Prof. Dr. Geraldo Duarte, sua dedicação e amor à vida acadêmica e científica são estímulos para minha formação profissional. Pela disciplina e aprendizado, pela confiança depositada em meu trabalho, como integrante de sua equipe.

Ao Dr. Rafael Yano, com sua tranquilidade e maestria no manejo da obstetrícia, seus ensinamentos foram e sempre serão essenciais na minha formação profissional.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e à Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, Coordenador da Pós-graduação em Tocoginecologia; professor valoroso durante minha especialização médica e hoje companheiro de trabalho que muito estimo na equipe de Gestação de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Agradeço a toda a equipe do Setor de Gestação de Alto Risco, local em que me orgulho de ter realizado a minha especialização médica. Ressalto meu agradecimento e carinho à equipe do Centro Obstétrico e do ambulatório de

Gestação de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; suas assistências foram fundamentais em diversas etapas da realização deste trabalho.

À Veridiana Kiill Suazo, Rosane Gomes de Paula Queiroz, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone e equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; o espaço cedido e assistência foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento, Ilza, Reinaldo, Ricardo, Rosane; bem como pela equipe da Pós graduação de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Suelen e Suleimy, pela amizade e disponibilidade.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Às pacientes que participaram desse estudo; sua participação, colaboração e confiança depositadas, foram fundamentais.

Sumário

RESUMO **11**
ABSTRACT **12**
LISTA DE FIGURAS: **13**
LISTA DE GRÁFICOS: **14**
LISTA DE TABELAS: **15**
LISTA DE ABREVIATURAS: **16**
1 Introdução **18**
1.1 Diabete *Mellitus* 18
1.1.1 Conceito 18
1.1.2 Classificação 18
1.2 Diabete *Mellitus* e gestação 24
1.2.1 Epidemiologia 24
1.2.2 Prognóstico materno, fetal e neonatal 25
1.2.3 Manejo 26
1.3 Diabete da Maturidade Com Início No Jovem (MODY) 28
1.3.1 Caracterização 28
1.3.2 Prevalência 29
1.3.3 Diagnóstico 31
1.3.4 Manejo e prognóstico 32
1.3.5 MODY e gestação 33
2 Justificativa **34**
3 Objetivos **35**
3.1 Geral 35
3.2 Específicos 35
4 Hipóteses **36**
5 Casuística e Métodos **37**
5.1 Casuística 37
5.1.1 Seleção de pacientes 37
5.1.2 Cálculo amostral 37
5.1.3 Aspectos éticos do projeto 37
5.1.4 Critérios 38
5.1.4.1 Critérios de inclusão 38
5.1.4.2 Critérios de exclusão 38
5.1.4.3 Critério de descontinuidade 38

5.2 Métodos 39
5.2.1 Tipo de estudo 39
5.2.2 Dados Clínicos 39
5.2.2.1. Dados epidemiológicos 39
5.2.2.2 Exame físico 39
5.2.2.3 Exames laboratoriais e complementares 40
5.2.2.4 Dados do trabalho de parto e parto 40
5.2.2.5 Complicações maternas durante pré-natal e puerpério 41
5.2.2.6 Complicações perinatais 41
5.2.2.7 Análise genética 41
5.2.3 Técnica laboratorial 42
5.2.3.1 Coleta de amostras biológicas 42
5.2.3.2. Extração de DNA e PCR convencional 42
5.2.3.3. Sequenciamento 44
5.2.3.4. Análise 45
6 Resultados 46
6.1 Caracterização da amostra materna 46
6.2 Caracterização da amostra dos recém-nascidos 54
6.3 Resultados do sequenciamento do DNA. 56
6.4 Caracterização da casuística materna conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA 60
6.5 Caracterização da casuística neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA. 62
7 Discussão 65
7.1 Casuísticas materna e neonatal 65
7.2 Avaliação do sequenciamento do DNA 70
7.3 Análise da casuística materna e neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA. 71
7 Conclusões 73
8 Referências 74
9 Anexos 79

RESUMO

LEPORE, C.S. **Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: Diabetes Mellitus é a alteração metabólica mais comum na gestação, com prevalência variável de acordo com a população e métodos diagnósticos. Diabetes monogenética ou Diabetes do adulto de início no jovem (Maturity-Onset Diabetes of the Young - MODY) consiste em um subtipo ocasionado por defeito primário na secreção de insulina determinado por herança autossômica dominante, sendo responsável por aproximadamente 1 a 2% dos casos. O diagnóstico genético de gestantes e neonatos acometidos pode propiciar manejo específico, possibilitando melhor prognóstico evolutivo da doença em curto e longo prazo.

Objetivos: Analisar alterações moleculares do gene GCK em gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* e seus neonatos.

Metodologia: Estudo transversal, com amostragem consecutiva, sendo incluídas gestantes diabéticas em seguimento no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de agosto de 2013 a dezembro de 2015. Amostras sanguíneas maternas e de cordão umbilical foram colhidas no momento do parto e enviadas para extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de alterações moleculares no gene GCK.

Resultados: Foram encontrados duas mutações que geraram dois polimorfismos no gene da glucoquinase, respectivamente em 13 e em sete pacientes; e uma mutação deletéria que cursou com diagnóstico de MODY GCK em dois pacientes (uma amostra materna e uma de neonato), totalizando alterações em 10,6% dos pacientes. Este diagnóstico permitirá intervenções profiláticas e terapêuticas, interferindo beneficamente na evolução natural da doença.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, MODY, gestação, polimorfismo genético.

ABSTRACT

LEPORE, C. S. **Study of molecular changes in the Glucokinase gene (GCK) associate with the diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) in pregnant women and newborns.** 2016. 104 p. Dissertation (Master's degree) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 2016.

Introduction: Diabetes mellitus is the most common metabolic disorder in pregnancy, with prevalence varying according to the population and diagnostic methods. Monogenetic diabetes or Maturity - Onset Diabetes of the Young (MODY) consists of a subtype caused by primary defect in insulin secretion, which is determined by autosomal dominant inheritance and it is responsible for approximately 1-2 % of cases. Genetic diagnosis of affected pregnant women and newborns can provide specific management enabling better evolutionary prognosis of the disease in short and long term.

Objectives: To analyze the molecular changes in the GCK gene in pregnant women diagnosed with Diabetes Mellitus and their neonates.

Methods: Cross-sectional study with consecutive sampling, that included diabetic pregnant women in follow-up at the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, from August 2014 to December 2015. Maternal and umbilical cord blood samples was collected at time of delivery and sent for DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) to identify molecular changes in the GCK gene.

Results: We found mutations that generated two different polymorphisms in the glucokinase gene, one in 13 patients, and the other in seven patients; and a deleterious mutation that was diagnosed with MODY GCK in two patients (a maternal sample and in a neonate), resulting in change in 10,6% of the patients. This diagnosis will determine prophylactic and therapeutic interventions interfering beneficially in the natural evolution of the disease.

Keywords: Diabetes Mellitus, MODY, pregnancy, genetic polymorphism, MODY GCK.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Rastreamento e diagnóstico de Diabetes *Mellitus* durante a gestação (adaptado de 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 2010; 33:676) 24

Figura 2: Algoritmo de rastreamento de DM tipo MODY (adaptado de Thanabalasingham G; Owen KR, 2011) 31

Figura 3: Gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 5 (poços 1 e 2), exon 6 (poços 3 a 10) e exon 7 (poços 11 a 14) 40

Figura 4: Gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 7 (poços 1 e 4), exon 8 (poços 5 a 12) e exon 9 (poços 13 a 14) 40

Figura 5: Gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 9 (poços 1 e 6), exon 10 (poços 7 a 4) e prom (poços 15 a 22).... 40

Figura 6: Gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 1 (poços 1 e 8), exon 2 (poços 9 a 16) 40

Figura 7: Gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 3 (poços 1 e 8) 41

Figura 8: Algoritmo das mutações encontradas conforme amostras..... 56

Figura 9: Polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm). 57

Figura 10: Polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm).. 58

Figura 11 Polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm).. 58

Figura 12: Polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm). 59

Figura 13: Mutação provavelmente deletéria, g.48377C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm). 59

Figura 14: Mutação provavelmente deletéria, g.48377C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation - http://www.codoncode.com/aboutus.htm)..... 60

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Caracterização do Índice de Massa Corporal 46
Gráfico 2: Distribuição das intercorrências maternas no pré-natal. 49
Gráfico 3: Descritivo das intercorrências fetais..... 50
Gráfico 4: Distribuição quanto ao início do trabalho de parto. 51
Gráfico 5: Descrição quanto aos tipos de partos. 52
Gráfico 6: Descrição de intercorrências no período puerperal..... 53
Gráfico 7: Esquemas de utilização de insulinoterapia 54
Gráfico 8: Demonstrativo das complicações no período neonatal. 55

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1	Classificação etiológica do Diabetes *Mellitus* (modificado de ADA, 2005; ADA, 2009)	20
Tabela 2	Classificação etiológica do Diabetes mellitus tipo MODY (modificado de Colom C, Corcoy R, 2010)	30
Tabela 3	Sequências dos primers *Foward* e *Reverse* dos exons	43
Tabela 4	Distribuição das pacientes conforme idade, peso e Índice de massa corporal	46
Tabela 5	Distribuição do número de casos de pacientes com Diabetes *Mellitus* avaliados, segundo paridade	47
Tabela 6	Distribuição do número de casos de pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional, segundo comorbidades associadas	47
Tabela 7	Mediana e percentis da avaliação laboratorial das pacientes	48
Tabela 8	Distribuição do número de casos segundo idade gestacional da resolução da gestação	51
Tabela 9	Distribuição das indicações de realização de parto cesárea**.**	52
Tabela 10	Mediana e percentis 25 e 75 dos dados referentes à insulinoterapia	53
Tabela 11-	Distribuição de peso ao nascimento	54
Tabela 12	Características dos neonatos	55
Tabela 13	Alterações no DNA baseado no Ensemble transcript ID – ENST 00000403799	57
Tabela 14	Caracterização da casuística materna conforme polimorfismo .	61
Tabela 15	Caracterização da casuística materna conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6	62
Tabela 16	Comparação dos desfechos neonatais conforme polimorfismo – Parte I	63
Tabela 17	Caracterização dos desfechos neonatais conforme polimorfismo – Parte II	63
Tabela 18	Comparação dos desfechos neonatais conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6 – Parte I	64
Tabela 19	Comparação dos desfechos neonatais conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6 – Parte II	64

LISTA DE ABREVIATURAS:

AD	Herança autossômica dominante
ADA	American Diabetes Association
AENDOB	Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia
ATP	Adenosina trifosfato
CTI	Centro de terapia intensiva
DM	Diabetes *mellitus*
DMG	Diabetes *mellitus* gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ExAC	The Exome Aggregation Consortium
FR	Fator de risco
g	Gramas
GCK	Glucoquinase
GAD65	Ácido glutâmico descarboxilase-65
GGT	Gamaglutamil transferase
GIG	Grande para a idade gestacional
GJ	Glicemia de jejum
GTT	Glucose tolerance test
HAG:	Hipertensão arterial gestacional
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HBsAg	Antígeno da hepatite B
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDL	High density lipoproteins
HGMD	The Human Gene Mutation Database
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNF1A	Fator nuclear do hepatócito-1α
HNF1B	Fator nuclear do hepatócito-4β
HNF-4α	Fator nuclear do hepatócito-4α
HLA	Antígeno leucocitário humano
IAA	Anticorpo antiinsulina
ICA512	Anticorpo de células da ilhota
IG	Idade gestacional
IPF-1α	Fator promotor de insulina 1α
IMC	Índice de massa corporal

ITU	Infecção do trato urinário
Kg/m²	Quilograma por metro quadrado
kcal/kg/dia	Quilocaloria por quilograma por dia
LADA	Diabetes Latente Autoimune do Adulto
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mg/dL	Miligramas por decilitro
mm	Milimitro
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
N	Número
NEUROD1	Fator 1 de diferenciação neurogênica
NPH	Neutral Protamine Hagedorn
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P 25	Percentil 25
P 75	Percentil 75
RCIU	Restrição de Crescimento Intrauterino
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico- pirúvica
TPPT	Trabalho de parto pré-termo
TSH	Hormônio estimulador da tireóide
U/Kg	Unidades por quilo

1 Introdução

1.1 Diabete *Mellitus*

1.1.1 Conceito

O Diabete *Mellitus* (DM) consiste em uma síndrome metabólica crônica, caracterizada pela hiperglicemia como sintoma principal. Esta hiperglicemia é decorrente da deficiência insulínica que pode ser proveniente da produção e secreção insuficientes de insulina devido a alterações e/ou destruição das células β pancreáticas; e da resistência à insulina ao nível dos músculos esqueléticos, fígado e tecido adiposo (1).

DM não é uma entidade única e sim um grupo heterogêneo de distúrbios, nos quais existem distintos modelos genéticos, bem como outros mecanismos etiológicos e fisiopatológicos que induzem à redução da tolerância à glicose (2).

1.1.2 Classificação

A primeira classificação para o Diabetes mellitus foi publicada por Priscilla White em 1949, categorizando essa patologia nas classes A, B, C, D, E, F, R, H e T, de acordo com a severidade da doença, idade de início, duração, necessidade de uso de insulina e presença ou ausência de doenças vasculares decorrentes do Diabetes. Esta classificação ainda é extensamente utilizada para predizer complicações durante a gravidez e é considerada como um sistema etiológico e prognóstico (3).

National Diabetes Data Group (1979) sugeriu a classificação clínica baseada no tipo de Diabetes, considerando três grupos: Diabetes mellitus insulina-dependente ou Tipo I; Diabetes mellitus não insulina-dependente ou Tipo II; e Diabetes mellitus gestacional, que é diagnosticado durante a gestação. Essa classificação foi, em 1980, recomendada pelo World Health Organization Expert Committee on Diabetes Mellitus, sendo incluído na mesma o grupo de intolerância a glicose. Essa classificação pretendeu estabelecer uma estrutura uniforme para a pesquisa clínica e epidemiológica (4) .

American Diabetes Association (ADA), em 1999, reestruturou a classificação e os critérios diagnósticos para o Diabetes, enfatizando a etiologia do mesmo. Posteriormente, a ADA (2005) ratificou essa classificação e reconheceu dois estágios intermediários da doença, sendo chamados de pré-Diabetes, caracterizados pela intolerância à glicose e intolerância em jejum à glicose (Tabela 1) (5) (6).

O **Diabetes *Mellitus* tipo 1** consiste em um distúrbio metabólico causado pelo dano decorrente do sistema autoimune nas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans; tornando a secreção de insulina insuficiente com necessidade de administração exógena de insulina para correção dos níveis glicêmicos. Pode ser dividida em uma fase pré-clínica em que as células β do pâncreas sofrem destruição gradual por ataque autoimune mediado pelo Antígeno Leucocitário Humano (HLA), marcadores autoimunes Ácido Glutâmico Descarboxilase-65 (GAD65), Anticorpo de células da ilhota (ICA512) e Anticorpo Antiinsulina (IAA) e por outros fatores genéticos, bem como pelo meio ambiente; e uma fase clínica sintomática em que os pacientes apresentam poliúria, polidipsia, polifagia, cetonúria e perda de peso (1).

Sua patologia ocorre por predisposição genética e fatores ambientais que induzem a processo autoimune contra as ilhotas pancreáticas em que auto anticorpos são produzidos contra um ou vários antígenos, determinando a progressão da doença. Acredita-se que a resposta imune contra as células β ocorra por fases: agravo ambiental, ativação de células T, diferenciação de células T e destruição das células β através de uma resposta inflamatória (insulite) (1). Os fatores ambientais consistem principalmente em vírus (coxsackie, rubéola, citomegalovírus) que induzem à formação de auto anticorpos (2).

As pacientes portadoras de DM tipo 1 geralmente necessitam de insulinoterapia em altas doses para correção do metabolismo alterado. Entretanto, pode ocorrer uma fase denominada “período de lua-de-mel” em que as células β pancreáticas ainda mantêm função exócrina parcial, com secreção de insulina em pequenas doses (2).

Tabela 1: Classificação etiológica do Diabetes *Mellitus* (modificado de ADA, 2005; ADA, 2009) [5; 6].

I. Diabetes tipo 1 (destruição da célula β, conduzindo geralmente à deficiência absoluta de insulina)
- A. Imuno mediado
- B. Idiopático

II. Diabetes tipo 2 (pode variar desde predominantemente devido a resistência à insulina com deficiência relativa de insulina a um defeito predominantemente secretor com resistência de insulina)

III. Outros tipos específicos
- A. Defeitos genéticos de função da célula
  - Cromossomo 12, HNF-1α (MODY -3)
  - Cromossomo 7, glucoquinase (MODY – 2)
  - Cromossomo 20, HNF-4α (MODY – 1)
  - DNA mitocondrial
  - outros
- B. Defeitos genéticos na ação da insulina
  - Insulino –resistência tipo A
  - Leprechaunismo
  - Síndrome de Rabson – Mendenhall
  - Diabete lipoatrófica
  - outros
- C. Doenças do pâncreas exócrino
  - pancreatite
  - trauma/ panceatectomia
  - neoplasia
  - fibrose cística
  - hemocromatose
  - pancreatopatia fibrocalculosa
- D. Endocrinopatias
  - acromegalia
  - doença de Cushing
  - glucagonoma
  - feocromocitoma
  - hipertireoidismo
  - somastotinoma
  - aldosteronoma
- E. Drogas ou químico induzido
  - ácido nicotínico
  - glicocorticóides
  - hormônio tireoidiano
  - agonistas β-adrenérgicos
- F. Infecção
  - Rubéola congênita
  - ciomegalovírus
- G. Incomuns formas de Diabetes imuno mediado
  - citomegalovírus
- H. Outras síndromes genéticas algumas vezes associadas ao Diabetes
  - Síndrome de Down
  - Síndrome de Klinefelter
  - Síndrome de Turner

IV. Diabetes *Mellitus* gestacional

V. Diabetes *Mellitus* Neonatal

O Diabetes Latente Autoimune do Adulto (LADA) pode ser considerado um subtipo do DM tipo 1 e pode ser classificado em pacientes acima de 30 anos de idade, positivo em pelo menos 1 dos auto-anticorpos : anticorto anti-ilhota, anticorpo anti-Gad (descarboxilase do ácido glutâmico), autoantígeno 2 do insulinoma e anticorpos anti-insulina) presentes no DM tipo I e ausência de necessidade de insulinoterapia nos primeiros 6 meses após o diagnostico (7).

Já no **Diabetes *mellitus* tipo 2** as pacientes mantém a capacidade de secreção endógena de insulina, entretanto seus níveis encontram-se abaixo dos níveis de glicemia circulante, associado à resistência periférica à insulina. O uso de insulina nestas pacientes pode ser necessário para o controle glicêmico adequado (8).

As pacientes obesas com DM tipo 2 apresentam o quadro de hiperglicemia em decorrência de resistência à insulina em receptores de células de músculos esqueléticos associada à aceleração da produção de glicose hepática e decréscimo na produção de insulina induzida por glicose. A permanência de quadro crônico de hiperglicemia e hiperlipidemia desencadeiam efeitos de glicotoxicidade e lipotoxicidade sobre as células β, gerando descompensação progressiva (7).

DM 2 é considerada uma doença poligênica que é agravada por fatores ambientais como falta de atividade física e dieta hipercalórica-lipídica. Apresenta um componente genético importante e complexo, porém sem predomínio de defeito único identificado (6).

Intolerância à glicose refere-se a estágio metabólico intermediário entre a homeostase normal da glicose e o diabete, sendo o diagnóstico realizado através de valores de glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL e valores de glicemia maiores que 140 e menores que 200 mg/dL após 2 horas de sobrecarga de 75g de glicose. Este ponto escolhido representa o nível acima do qual a fase aguda da secreção de insulina em resposta à injeção intravenosa de glicose não ocorre de maneira adequada, sendo relacionada a um risco progressivamente maior de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares (9).

Muitos indivíduos com intolerância à glicose mantêm-se euglicêmicos nas suas vidas diárias, apresentando níveis perto da normalidade de hemoglobina glicada. Nestes casos, a hiperglicemia é observada somente após a carga de glicose durante a prova de tolerância à glicose (8).

A Intolerância à glicose fora do período gestacional representa um fator de risco para o desenvolvimento futuro de Diabetes *Mellitus* e doença cardiovascular, estando relacionada à Síndrome Metabólica. Sendo esta constituída por: resistência à insulina, hiperinsulinemia compensadora para manter a homeostase da glicose, obesidade, dislipidemia e hipertensão (8).

Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como intolerância à glicose, de gravidade variável, que aparece ou é primeiramente diagnosticada durante a gravidez (6). Sua fisiopatologia consiste em aumento progressivo de resistência a insulina durante a gestação (10). Este é decorrente ao efeito antagônico do hormônio lactogênio-placentário produzido em níveis elevados, efeito anti-insulínico ocasionado pelo cortisol, estriol e progesterona produzidos pela placenta; e pelo aumento no catabolismo da insulina na placenta e rins (11).

Na maior parte dos pacientes o controle pode ser feito somente com dieta, mas uma minoria dos pacientes necessita de tratamento medicamentoso (10).

Os fatores de risco para DMG mais habitualmente considerados são (10), (12), (13):

- Idade superior a 35 anos;
- Antecedentes obstétricos de Diabetes gestacional, macrossomia, morte fetal ou neonatal, abortos de repetição, malformações fetais;
- História familiar de Diabetes com parentesco em 1º grau;
- Obesidade (Índice de massa corporal maior que 25 Kg/m^2) ou ganho excessivo de peso na gravidez atual;
- Deposição central de gordura corporal;
- Síndrome do ovário policístico e outras patologias que levam ao hiperinsulinismo;
- Síndrome hipertensiva na gravidez atual, crescimento fetal excessivo e polidrâmnio;
- Uso de medicamentos hiperglicemiantes.

Entre os testes diagnósticos, o considerado padrão-ouro é o teste oral de tolerância com 100 gramas de glicose. Este teste é realizado sob condições muito estritas: durante os três dias que precedem o teste a paciente deve ter uma ingesta

pelo menos de 150 gramas de carboidratos por dia e, entre oito e 14 horas antes que o teste seja executado, ela não pode comer ou beber, à exceção de água. Não é permitido fumar durante as 12 horas que precedem o teste. Antes da medida da glicemia de jejum, a paciente deve descansar por 30 minutos. Após a primeira medida, a paciente ingere 100 gramas de solução de glicose, finalizando a ingestão dentro do prazo de cinco minutos. Uma, duas e três horas após o término do consumo da solução de glicose, são realizadas coletas de amostras sanguíneas para a dosagem de glicemia. Durante este período, não é permitido à paciente fumar ou caminhar. Os valores referenciais para esse teste foram originalmente descritos por O`Sullivan e Mahan em 1964 (14).

Atualmente, a American Diabetes Association (15) recomenda que o rastreamento de DM seja iniciado na primeira consulta de pré-natal. Deve ser considerado o diagnóstico de diabetes pré-gestacional (do inglês *Overt Diabetes*) nas gestantes com menos de 24 semanas de idade gestacional que apresentam Índice de massa corporal (IMC) maior que 25 Kg/m^2, associado a outros fatores de risco (rastreamento clínico positivo) e alteração laboratorial do metabolismo de carboidratos, sendo esta expressa por:

- Glicemia de jejum maior que 126 mg %; OU
- Glicemia ao acaso maior ou igual a 200 mg% associado a sintomas sugestivos de Diabetes Mellitus (confirmado por glicemia de jejum ou hemoglobina glicosilada alteradas); ou
- Hemoglobina glicosilada maior ou igual a 6,5%.

Pacientes com idade gestacional menor que 24 semanas que apresentarem rastreamento clínico negativo, porém glicemia de jejum maior que 92 mg%, devem ser consideradas com diagnóstico de DMG. Ainda de acordo com estas recomendações, a partir de 24 semanas de idade gestacional, a confirmação diagnóstica passa a ser realizada através do teste oral de tolerância com sobrecarga de 75 gramas de glicose e dosagem em três momentos, sendo considerado teste positivo se um ou mais pontos estiverem alterados. Os valores serão considerados alterados se forem maiores ou iguais a 92 mg% na glicemia de jejum, 180 e 153 mg%, uma e duas horas após sobrecarga de glicose, respectivamente (Figura 1).

Ressalta-se que aproximadamente 10% das pacientes diagnosticadas com DMG serão reclassificadas como portadoras de DM tipo 2 no período puerperal,

sendo de suma importância a realização de testes diagnósticos neste momento para adequado orientação terapêutica em longo prazo.

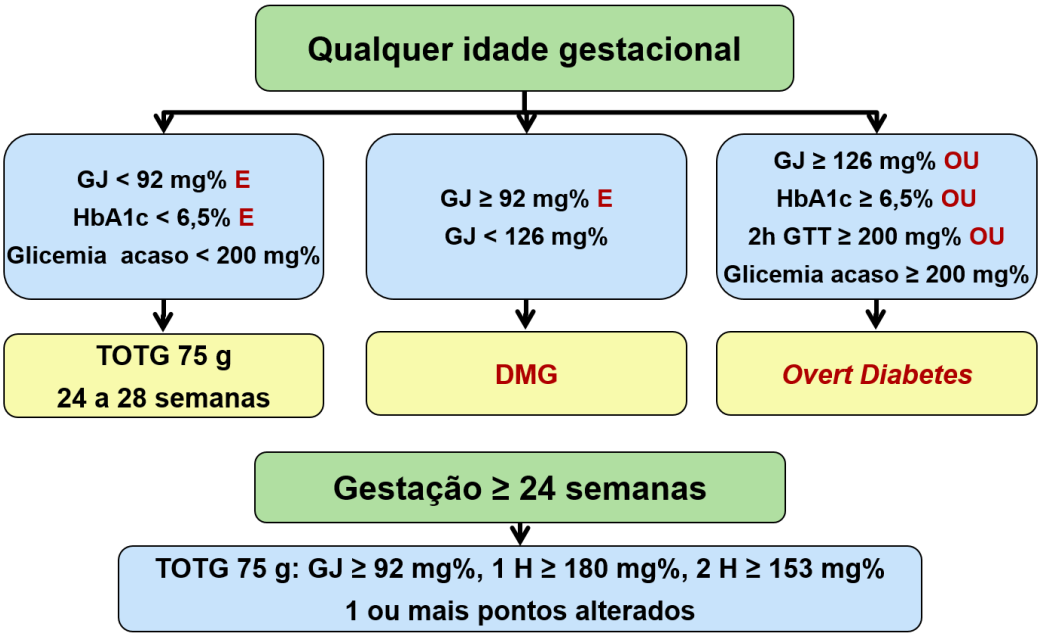

Figura 1: Rastreamento e diagnóstico de Diabetes *Mellitus* durante a gestação (adaptado de International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. Diabetes Care 2010; 33:676) [14]

IMC: Índice de Massa Corporal, GJ: glicemia de jejum, HbA1c: hemoglobina glicosilada, TOTG: Teste oral de tolerância à glicose

1.2 Diabete *Mellitus* e gestação

1.2.1 Epidemiologia

A disglicemia é a alteração metabólica mais comum na gestação. A prevalência de disglicemia durante a gravidez pode ser de até 13%, correspondendo a 0,1% de diabetes tipo 1 (DM1), 2 a 3% de diabetes tipo 2 (DM2) e 12 a 13 de diabetes gestacional (DMG), dependendo dos critérios diagnósticos utilizados e da população estudada (16).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, na idade entre 20 a 79 anos, 11,9 milhões de indivíduos apresentam diabetes no Brasil; e conforme os

critérios da Associação Internacional de Grupos de Estudo em Diabetes e Gravidez (IADPSG), a prevalência de DMG é de 18,0% (17).

1.2.2 Prognóstico materno, fetal e neonatal

Várias são as consequências e complicações maternas e perinatais decorrentes do Diabetes *Mellitus*, que, quando descompensado com hiperglicemia, principalmente na dosagem de jejum, está associado com aumento do risco de óbito fetal. Essa patologia eleva o risco de aborto espontâneo, malformações fetais e prematuridade. O Diabetes *Mellitus*, em qualquer nível de compensação está associado ao aumento do risco de macrossomia fetal. A hiperglicemia materna determina a hiperglicemia e a hiperinsulinemia fetais, resultando no crescimento anormal do feto (13).

Hipoglicemia, icterícia, desconforto respiratório, policitemia e hipocalcemia são possíveis complicações neonatais associadas ao diabetes. A hiperinsulinemia fetal atrasa a maturidade pulmonar fetal, pois inibe a produção de fosfolipídios, favorecendo a síndrome de angústia respiratória do recém-nascido. A hiperglicemia materna aumenta os níveis de hemoglobina glicosilada, que tem uma alta afinidade ao oxigênio, diminuindo a oferta do mesmo ao feto, com consequente hipóxia intrauterina. A presença de anormalidades placentárias também contribui para a instalação de hipóxia. As respostas fetais à hipóxia incluem, entre outras, a eritropoiese aumentada, resultando na poliglobulia (12).

As principais complicações clínicas maternas do diabetes são: hipoglicemia, piora de retinopatia pré-existente, nefropatia, cetoacidose diabética, infecção urinária recorrente, trabalho de parto pré-termo e polidrâmnio. O Diabetes está relacionado ao aumento do risco de síndromes hipertensivas, tocotraumatismos e necessidade de resolução da gestação por cesárea (12).

Após a gestação índice, as mulheres que apresentaram DMG possuem risco elevado de desenvolvimento de Diabetes, principalmente Tipo 2 (16).

1.2.3 Manejo

O manejo do Diabetes *mellitus* durante a gestação é direcionado no sentido de supervisionar e controlar o metabolismo glicêmico, evitando-se a hiperglicemia, que está correlacionada ao aumento dos riscos maternos e perinatais.

O acompanhamento pré-natal da gestante diabética deve ser realizado com equipe multidisciplinar que contenha médicos, psicólogos, nutricionistas, educador físico, equipe de enfermagem e assistente social (12).

Todas as pacientes devem receber aconselhamento nutricional especializado e individualizado, determinando-se uma dieta com adequado aporte calórico e de nutrientes, que dependerá do IMC, frequência e intensidade de exercícios físicos, padrão de crescimento fetal e ganho de peso materno. Na prática clínica, para as mulheres que apresentam IMC pré-gestacional abaixo de18,5 kg/m^2, a prescrição de ingestão calórica pode ser até 40 kcal/kg/dia; para as mulheres com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 o aporte energético deve ser 30 kcal/kg/dia; para as gestantes que estão acima do peso ideal, a oferta calórica é 22 a 25 kcal kg dia; para as pacientes obesas mórbidas a prescrição deve ser de 12 a 14 kcal/kg/dia. O objetivo é manter ganho de peso em torno de 300 a 400 gramas por semana a partir do segundo trimestre da gravidez e normalização da glicemia. A dieta deve ser planejada e distribuída ao longo do dia, sendo fracionada em três refeições grandes e três pequenas (18).

Recomenda-se a realização de atividade física de baixo impacto, considerando o efeito benéfico de redução da resistência à insulina, o qual facilita a utilização periférica de glicose com consequente melhora do controle glicêmico. Deve ser praticado diariamente por pelo menos 30 minutos, que podem ser divididos em três sessões de dez minutos cada, realizadas de preferência após as refeições desde que não haja contraindicações à sua prática, como ocorre nos casos de DM tipo 1 com vasculopatia (12).

O controle glicêmico deve ser realizado em todas as consultas de pré-natal através de pelo menos uma glicemia de jejum e duas glicemias pós-prandiais; e em regime domiciliar a partir do uso de insulinoterapia. Os valores glicêmicos considerados adequados são: jejum menor que 95 mg/dL, pré-prandial menor que

100 mg/dL, uma hora pós-prandial menor que 140 mg/dl, e duas horas pós-prandial menor que 120 mg/dL (12).

Após uma a duas semanas de dieta, se os níveis glicêmicos permanecerem acima dos preconizados em mais de 30% dos valores avaliados, recomenda-se iniciar o tratamento farmacológico ou ajustado, nos casos do uso prévio. E nas pacientes que apresentarem níveis superiores a 200mg/dL deve ser avaliada a internação para controle das glicemias.

As insulinas constituem o tratamento de escolha para as pacientes portadoras de disglicemia durante a gestação, podendo ser usadas doses subcutâneas das formulações de ação longa, intermediária, rápida ou ultrarrápida. Gestantes com diagnóstico de DMG, cujo controle não foi atingido apenas com adequações nos hábitos de vida e dietéticos, habitualmente necessitam de uma dose inicial diária 0,5 a 1,0 U/Kg de peso, dependendo do período da gestação. Por sua vez, pacientes com DM tipo 2 apresentarão necessidade de dose inicial variando de 0,7 a 1,0 unidade/kg de peso (12).

As consultas devem englobar toda a rotina pré-natal básica e orientações próprias do período gestacional, com ênfase nos cuidados com o diabetes. Os intervalos dependerão do controle glicêmico e existência e progressão de complicações maternas e fetais.

Exame ultrassonográfico deverá ser realizado a cada trimestre, com os seguintes propósitos: verificação de viabilidade e datação da gestação no primeiro trimestre, ultrassonografia morfológica complementada pela ecocardiografia fetal para a avaliação das quatro câmaras cardíacas no segundo trimestre, e avaliação de crescimento e o bem-estar fetal no terceiro trimestre (12).

Nas pacientes com controle glicêmico inadequado e nas portadoras de outras morbidades, os testes para avaliação de bem-estar fetal devem ser antecipados e realizados em intervalos menores de tempo.

O controle glicêmico, presença ou não de comorbidades, repercussões fetais e apresentação do Diabete *Mellitus* vão orientar a melhor idade gestacional para interrupção da gestação, sendo a via de parto habitualmente determinada de acordo com as condições obstétricas. A monitorização glicêmica deve ser realizada a cada hora durante todo o trabalho de parto, com objetivo de manter os níveis entre 70 e

120 mg/dl. Em casos de descontrole metabólico, é preciso fazer uso intravenoso de glicose e/ou insulina em forma de infusão contínua endovenosa (12).

Em gestantes com diabetes pré-gestacional, as necessidades de insulina caem abruptamente após o parto, devendo a dose diária ser ajustada nos dias subsequentes.

O retorno ou continuação do uso de agentes antidiabéticos orais, como metformina e glibenclamida, imediatamente após o parto em pacientes com DM2 pré-existente pode ser considerado. As pacientes portadoras de diabetes pré-gestacional devem ser encaminhadas para seus locais originais de tratamento.

1.3 Diabete da Maturidade Com Início No Jovem (MODY)

1.3.1 Caracterização

Diabetes monogenética ou MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) consiste em um subtipo do *Diabetes Mellitus* caracterizado por início entre as idades de 9 a 25 anos ocasionado por defeito primário na secreção de insulina, ocorrendo transmissão por herança autossômica dominante (AD).

Consiste em um grupo heterogêneo de desordens monogenéticas responsável por aproximadamente 1 a 2% dos pacientes com DM (19).

Atualmente, são conhecidos dez defeitos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento de MODY, todos caracterizados clinicamente por alteração na função da célula β, sendo que em MODY HNF1A e MODY HNF1B observa-se a associação de resistência à insulina (20).

Os genes acometidos são os responsáveis pela expressão de: fatores nucleares do hepatócito-4α, -1α e -1β (HNF-4α, HNF -1α e HNF -1β), glucoquinase, fator promotor de insulina 1α (IPF-1α) e Fator 1 de diferenciação neurogênica (NEUROD1). Cinco proteínas codificadas por esses genes são fatores de transcrição presentes no núcleo da célula β, com exceção apenas da glucoquinase, que é expressa no pâncreas exócrino e no fígado (21).

A glucoquinase consiste em uma chave enzimática reguladora das células β pancreáticas, que catalisa a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato, passo importante na produção de energia, síntese de ATP e secreção de insulina. As

mutações identificadas na glucoquinase são responsáveis por um fenótipo diabético leve com alteração na sensibilidade da célula β à glicose e na secreção de insulina (21).

Os fatores de transcrição são um grupo heterogêneo de proteínas, sendo cada um vinculado a uma sequência específica de DNA. HNFs, IPF1α e NEUROD1 expressam genes responsáveis pela produção de proteínas, ciclo de Krebs, transportadores de glicose e secreção de insulina. Como estão presentes em vários órgãos, apresentam ainda manifestações extra pancreáticas como desenvolvimento anormal uterino e renal (podendo variar entre agenesia, transtornos císticos e tubulopatia), além de anormalidades lipídicas como concentração sérica diminuída de triglicérides, apolipoproteína AII, apolipoproteína CIII e Lp(a) lipoproteína (20).

A apresentação é heterogênea e depende especificamente da mutação, sendo o diagnóstico geralmente feito durante a infância, adolescência, e especialmente nos defeitos da glucocinase, durante a gestação (20).

As características clínicas e classificação de Diabetes *Mellitus* tipo MODY de acordo com o defeito genético estão expressas na tabela 2 (20).

1.3.2 Prevalência

Estima-se que MODY seja responsável por 1-5% de todos os casos de DM diagnosticados antes dos 45 anos(4,18, 21, 25), e dentre as formas de MODY, tipo 1 pode variar de 3 a 5%, o tipo 3 de 20 a 70% ; e o tipo 2 pode variar de 14 a 50% (no Brasil, 19%, [26]), (20) (22).

Entre as pacientes DMG, a prevalência de GCK-MODY; é de 1% (23).

Ressalta-se que os dados de prevalência são escassos na literatura já que testes de rastreamento não são aplicados a todos os pacientes diabéticos e que 11% dos pacientes com Diabetes monogenética possuem a sua etiologia genética não identificada (19).

Tabela 2: Classificação etiológica do Diabetes mellitus tipo MODY (modificado de Colom C, Corcoy R, 2010 (19)**.**

Classificação	Gene acometido	Frequência entre MODY	Idade de diagnóstico	Manifestações adicionais	Tratamento usual	Complicações microvasculares
MODY 1	HNF- 4α	3	Adulto jovem	↓ triglicérides	Dieta → Sulfoniuréias → Insulina	Freqüentes
MODY 2	Glucocinase	14	Neonatos/adolescentes	↓ triglicérides	Dieta e atividade física Insulina durante gestação	Raras
MODY 3	HNF -1α	69	Adolescentes	↓ excreção renal de glicose ↑ HDL colesterol	Dieta → Sulfoniuréias (SU) → Insulina	Freqüentes
MODY 4	Gene homeobox 1 pancreático e duodenal (PDX 1)	< 1	-neonatos (homozigoto) -adultos jovens (heterozigotos)	Agenesia renal	Insulina Hipoglicemiantes orais	Poucos dados
MODY 5	HNF - 1β	3	Neonatos/adolescentes	Doença renal Anomalias genitais Atrofia pancreática e disfunção exógena Disfunção pancreática e biliar	Hipoglicemiantes orais e Insulina	Poucos dados
MODY 6	NEUROD 1	Extremamente raro	Adulto jovem		Insulina	Poucos dados
MODY 7	Kruppel-like fator 11 (KLF11)	Extremamente raro	Adulto jovem		Poucos dados	Poucos dados
MODY 8	Enzima carboxil Ester lípase(CEL)	Famílias thailandesas	Adulto jovem		Poucos dados	Poucos dados
MODY 9	Gene pareado Box 4 (PAX 4)	Extremamente raro	Adulto jovem		Poucos dados	Poucos dados
MODY 10	Gene insulínico (INS)	Extremamente raro	Dados raros		Poucos dados	Poucos dados

1.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado através de análise genética, a partir do sequenciamento de genes, sendo usado amplamente em alguns países como no Reino Unido em que o teste apresentou sensibilidade superior a 99% em detectar uma substituição de bases heterozigota (19).

Entretanto, como a realização de análise genética de todos os pacientes com DM é dispendiosa, os protocolos clínicos sugerem a realização criteriosa, restringindo a indicação da realização desta avaliação apenas em indivíduos com apresentação do DM antes dos 25 anos, forte antecedente familiar e controle glicêmico sem o uso de insulina. Outras situações especiais consideradas como indicação dos testes genéticos são pacientes jovens diagnosticados com DM1 com evidências de manter produção endógena de insulina evidenciada por dosagem de peptídeo C, não apresentando cetoacidose na ausência da prescrição de insulina. Além de pacientes com diagnóstico prévio de DM 2 que não apresentam sinais de resistência periférica à insulina (acantose nigricans, obesidade central, hipertensão e dislipidemia) (18).

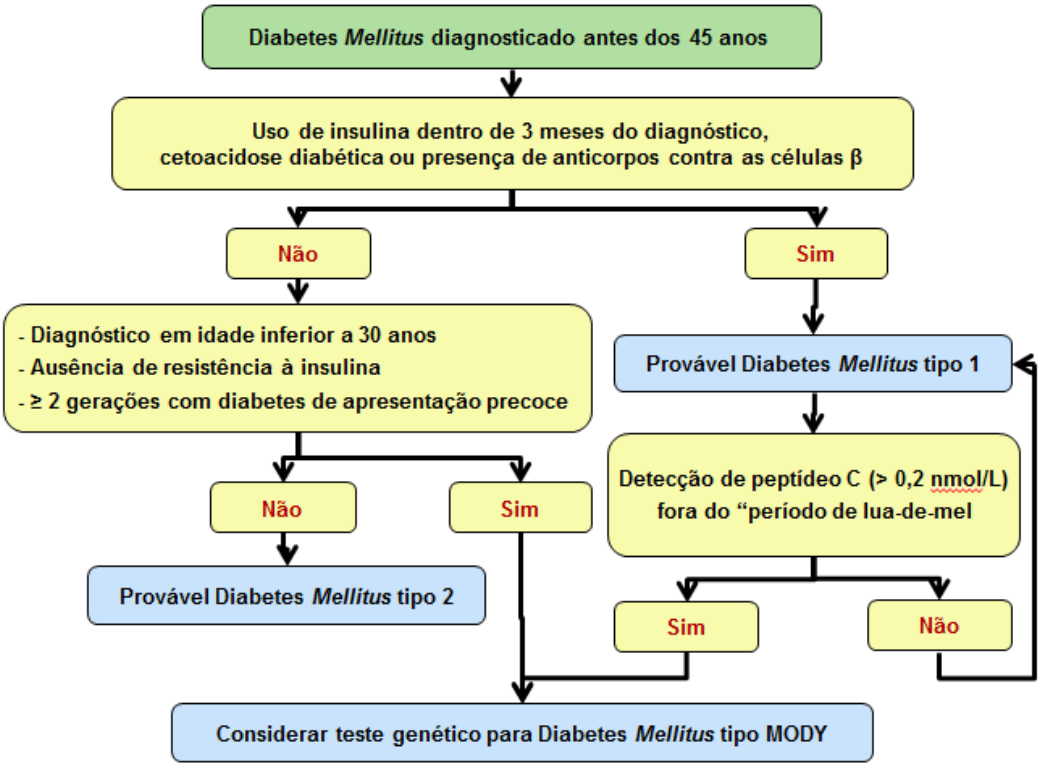

Figura 2: Algoritmo de rastreamento de DM tipo MODY (adaptado de Thanabalasingham G; Owen KR, 2011) (18).

1.3.4 Manejo e prognóstico

No MODY GCK, as mutações no gene da glucoquinase causam um defeito na transdução do sinal de glicose para as células β com redução de sua atividade, resultando em hiperglicemia leve e crônica com leve alteração nos níveis de glicemia em jejum e da hemoglobina glicosilada, com boa resposta a dieta e atividade física. Em consequência do adequado controle metabólico, as lesões microvasculares são raras. Por outro lado, se associado a outros fatores de risco como obesidade, o processo para desenvolvimento de DM 2 ocorre superposto ao defeito na glucoquinase; impondo-se nesse ponto o tratamento farmacológico (20).

Já os pacientes com MODY HNF1A, HNF4A e 5beta mostram anormalidades mais severas no metabolismo dos carboidratos, apresentando desfechos clínicos que podem variar de intolerância à glicose a diabete moderado a grave com complicações vasculares, e necessidade de maiores doses de insulina.

Geralmente são normoglicêmicos durante a infância, mas apresentam um defeito progressivo na secreção de insulina, sendo diagnosticados como DM a partir da segunda a quinta décadas de vida (21).

Desta forma observa-se que o manejo dos pacientes com MODY varia desde dieta e atividade física no tipo 2, e uso de hipoglicemiantes orais como sulfoniuréias que agem na célula β e incrementam a secreção de insulina, com progressão para insulinoterapia nas demais formas, em que a incidência de complicações crônicas do diabetes é mais frequentemente resultante do pior controle glicêmico quando comparado com o MODY GCK.

Portanto, a distinção entre as formas de MODY apresenta relevância clínica para o manejo adequado, instituição de insulinoterapia quando necessário e prevenção de complicações resultantes dos elevados níveis glicêmicos. O manejo de ambas as formas de apresentação durante o período gestacional segue as mesmas recomendações dos outros tipos de DM.

1.3.5 MODY e gestação

1.3.5.1 MODY GCK

Estas pacientes costumam apresentar hiperglicemia de jejum leve e hemoglobina glicosilada ligeiramente acima do normal. Geralmente são assintomáticas, sendo diagnosticadas em exame de rastreamento de disglicemias durante o pré-natal [17], em que a resistência fisiológica à insulina durante a segunda metade da gestação irá sobrepujar o defeito da célula β (20).

A glucocinase atua como um sensor de glicemia na célula β. Portanto, os fetos que carregam mutações da glucocinase não são capazes de apresentar uma secreção de insulina adequada, sendo o crescimento fetal não alterado significativamente de acordo com os níveis de glicemia materna. Por outro lado, fetos não acometidos de mães com MODY GCK apresentam maior risco de macrossomia e fetos com mutações no gene da glucocinase de mães não afetadas apresentam redução do volume placentário e baixo peso ao nascer já que a redução na produção de insulina nesses fetos chega a 70%, implicando na redução de 500g no peso ao nascimento (19).

Entretanto, na vida adulta não se observa diferença no peso, estatura ou na secreção de insulina destes fetos.

1.3.5.2 MODY HNF1a

Nestas pacientes é observada progressiva deterioração da secreção de insulina, com desenvolvimento da necessidade de tratamento farmacológico para adequado controle metabólico. Os fetos com mutações no gene HNF- 1α não apresentam alterações no peso ao nascimento (19).

1.3.5.3 MODY HNF4a

Os fetos de mães que apresentam MODY 1 apresentam maior probabilidade de desenvolver macrossomia e hipoglicemia neonatal, sendo mais frequente quando estes também são acometidos pela mutação; justificando-se a triagem genética para mutações do gene HNF-4α em fetos com o quadro clínico apresentado e história familiar de DM com início precoce (19).

2 Justificativa

A escassez de dados na literatura sobre MODY e gestação, especialmente relacionados a algoritmos de rastreamento, acarreta em elevado percentual de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus erroneamente classificado, perdendo a oportunidade de receber a melhor conduta disponível no manejo de suas patologias e de seu seguimento pré-natal.

Ademais, o diagnóstico genético precoce de crianças acometidas pode propiciar adequado diagnostico e seguimento.

Considerando a elevada prevalência de Diabetes Mellitus na gestação e de neonatos de mães diabéticas com alterações no peso ao nascimento e no metabolismo dos carboidratos; torna-se imprescindível o estudo do perfil genético destas pacientes e de seus recém-nascidos para diagnósticos precisos e manejo adequado destes pacientes.

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a presença de alterações moleculares do gene GCK nas gestantes portadoras de Diabetes Mellitus Gestacional, assim como em seus neonatos; atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.2 Específicos

- Avaliar a presença de mutações do gene GCK nas gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional e em seus neonatos;
- Avaliar as taxas de complicações maternas de gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* tipo MODY em comparação com as pacientes com Diabetes Mellitus Gestacional;
- Comparar o peso ao nascimento e as taxas de complicações perinatais de neonatos portadores de marcadores genéticos de Diabetes *Mellitus* tipo MODY em relação a neonatos não acometidos.

4 Hipóteses

H0: Não haverá casos de polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes, e seus neonatos, diagnosticadas como Diabetes *Mellitus* Gestacional e semseguimento no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

H1: Haverá porcentagem significativa de casos de polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes, e seus neonatos, diagnosticadas como Diabetes *Mellitus* Gestacional e sem seguimento no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

5 Casuística e Métodos

5.1 Casuística

5.1.1 Seleção de pacientes

As pacientes selecionadas para o estudo foram as gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* atendidas no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia (AENDOB) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP.

5.1.2 Cálculo amostral

Foi realizada avaliação estatística considerando uma população infinita e assumindo uma prevalência de 15% (baseada em um estudo piloto) e um erro tolerável de 5%, com uma confiabilidade de 95%, temos que o tamanho da amostra será 196, de acordo com o seguinte cálculo (ref – 40):

$$n = \frac{z^2_{\alpha/2}\, p(1-p)}{e^2} = \frac{1,96^2\, 0,15(1-0,15)}{0,05^2} = 196$$

Foram coletadas 201 amostras (128 gestantes e 73 neonatos). Das gestantes, sete realizaram o parto em outro serviço, sete amostras maternas foram perdidas devido a coagulação do material, em dois casos ocorreu óbito fetal e foi colhida amostra do binômio materno-fetal em 66 gestantes(2 neonatos gemelares).

Foram incluídas as gestantes diabéticas em seguimento no AENDOB do HCFMRP-USP, de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

5.1.3 Aspectos éticos do projeto

O projeto de pesquisa “Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (*Maturity* Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos.” foi cadastrado na Unidade de Pesquisas Clínicas e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Esta pesquisa não interferiu na conduta obstétrica adotada para as pacientes selecionadas, sendo que a evolução das mesmas seguiu os protocolos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (DGO-HCFMRP-USP).

As pacientes submetidas a qualquer tipo de intervenção foram informadas, de forma clara e objetiva, com palavras simples, sobre os protocolos de pesquisa a serem executados, dando-se seguimento aos mesmos apenas com a anuência espontânea da paciente ao projeto. Foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I) de todas as pacientes que participaram do estudo no momento da internação hospitalar. Foi garantida a liberdade dos sujeitos da pesquisa em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

5.1.4 Critérios

5.1.4.1 Critérios de inclusão

- Gestantes diabéticas que fizeram seguimento no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia (AENDOB) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP.

5.1.4.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que não apresentaram diagnóstico de Diabetes *Mellitus*;
- Pacientes que não concordaram em participar do estudo ou não assinaram o “Termo de consentimento pós-informado”.

5.1.4.3 Critério de descontinuidade

- Pacientes que desistiram de sua participação ao longo do estudo.

5.2 Métodos

5.2.1 Tipo de estudo

Estudo analítico, transversal.

5.2.2 Dados Clínicos

5.2.2.1. Dados epidemiológicos

Dados epidemiológicos coletados:

- Idade
- Tabagismo
- Uso de drogas ilícitas (especificando qual droga)
- Uso de medicamentos (especificando qual droga)
- Antecedentes pessoais de outras comorbidades
- Antecedentes familiares de distúrbios de coagulação
- Número de gestações (incluindo abortamentos, gravidez ectópica, mola hidatiforme)
- Número de partos (vaginais espontâneos, fórceps, cesáreas - indicações)
- Número de abortamentos (espontâneos, provocados, complicados por infecções, curetagem pós-abortamento)
- Diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 ou gestacional.
- Se diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 1 ou tipo 2
    - Tempo de diagnóstico
    - Tratamentos prévios
    - Complicações clínicas já diagnosticadas
- Idade gestacional do diagnóstico do Diabetes mellitus gestacional
- Idade gestacional de admissão no AENDOB do HC-FMRP-USP

5.2.2.2 Exame físico

Para a avaliação antropométrica foram obtidos dados sobre os seguintes parâmetros:

- Peso corporal pré-gestacional e no dia do parto (quilogramas);
- Estatura (metros);
- Índice de massa corporal pré-gestacional e no dia do parto (Kg/m2).

O índice de massa corporal (IMC) será calculado pela seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{Peso\ (kg)}{Estatura^2\ (m^2)}$$

Esse índice, pela relação entre peso e altura, fornece dados mais precisos de alterações da massa corporal. Os valores considerados normais do IMC, para o período não-gestacional, são de 19 a 24 kg/m^2 para mulheres (THOMAS; McKAY; CUTLIP, 1976).

5.2.2.3 Exames laboratoriais e complementares

Coletados os resultados de exames laboratoriais e complementares mais próximos do momento do parto que integraram a avaliação habitual das gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* em seguimento no AENDOB.

- Valores do teste oral de tolerância à glicose
- Hemoglobina
- Hematócrito
- Contagem de plaquetas
- Lipidograma
- Hemoglobina glicosilada
- Proteínas totais
- Albumina
- Sódio e potássio séricos
- Urina do tipo 1
- Urocultura
- Proteinúria de 24 horas

5.2.2.4 Dados do trabalho de parto e parto

Obtidas informações em relação ao trabalho de parto e parto:

- Se o início do trabalho de parto foi espontâneo ou induzido
- Tipo de parto (vaginais espontâneos, fórceps, cesáreas – indicações)
- Cesárea eletiva ou de urgência
- Dados do recém-nascido: sexo, peso, estatura e Índice de Apgar

5.2.2.5 Complicações maternas durante pré-natal e puerpério

- Medicamentos administrados
- Necessidade de insulina (dosagem total de insulina prévia ao parto)
- Episódios de hipoglicemia e/ou hiperglicemia (dosagem da glicemia mais baixa e mais elevada)
- Cetoacidose diabética
- Infecções
- Diagnóstico de outras comorbidades durante o pré-natal
- Necessidade de internação hospitalar (além da internação para resolução da gestação)
- Internação em CTI
- Tempo de internação hospitalar após parto

5.2.2.6 Complicações perinatais

- Medicamentos administrados
- Tocotraumatismos
- Episódios de hipoglicemia e/ou hiperglicemia (glicemia mais baixa e mais elevada)
- Infecções
- Icterícia
- Distúrbios hidroeletrolíticos (hipocalemia)
- Internação em CTI
- Tempo de internação hospitalar após parto
- Óbito fetal ou neonatal
- Outros diagnósticos de complicações

5.2.2.7 Análise genética

- Perfil genético das gestantes diabéticas e de seus neonatos em relação ao gene da glucocinase.

5.2.3 Técnica laboratorial

5.2.3.1 Coleta de amostras biológicas

Nas pacientes selecionadas e que concordaram em participar do estudo, foram colhidos 05 mL de sangue venoso de cada participante, em punção periférica de membro superior, utilizando “vacutainer” com anticoagulante EDTA. A amostra foi aliquotada e armazenada a 20ºC negativos.

Após o nascimento da criança, a placenta foi transferida para uma mesa de procedimento, protegida com compressas estéreis, instalada na sala de parto. O lado basal ou fetal foi voltado para cima de forma que o cordão umbilical ficou exposto para ser lavado com solução fisiológica 0,9 %. Seguido este procedimento, e localizada a veia umbilical, coletou-se uma amostra de 05 mL de sangue com o auxílio de seringa não heparinizada e agulha 21G (0,8 x 25 mm), sendo posteriormente transferida para 1 tubo de 5 mL com EDTA K3 (Vacuplast®). A amostra foi aliquotada e armazenada a 20ºC negativos para posterior extração do DNA e avaliação quanto ao gene do glucocinase.

5.2.3.2. Extração de DNA e PCR convencional

O DNA genômico foi extraído do sangue total congelado por meio do kit QIAmp DNA Blood mini kit (cat 51106 - QIAGEN, Germantown, USA) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA), diluído na concentração de 20 ng/µl para ser utilizado nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) dos exons do gene GCK. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, com concentração de cloreto de magnésio de 1,5mM, 15pmoles de primers e 1 unidade de taq polimerase. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C,40 ciclos (95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72° por 1 minuto) e extensão final de 10 minutos a 72°C. As sequencias dos primers *Foward* e *Reverse* de cada um dos exons encontram-se na tabela a seguir. Todos os primers foram sintetizados pela empresa Invitrogen e foram desenhados com a cauda M13 com sequencia (M13 F – TGTAAAACGACGGCCAGT, e M13 R – CAGGAAACAGCTATGACC) para as posteriores reações de sequenciamento.

Tabela 3: Sequências dos primers *Foward* e *Reverse* dos exons			
EXON	DNA conc. (ng/µl)	Forward and Reverse Primer sequences	Size (bp)
1	10	GCKex1F and GCKex1R TCCACTTCAGAAGCCTACTG TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	195
2	10	GCKex2F and GCKex2R GGGGTCAGAAGACAGAAGGA AGAGGAGCCAAGGGTGAGA	511
3	10	GCKex3F and GCKex3R TAATATCCGGGCTAGTACC CTGAGATCCTGCATGGCCTTG	331
4	10	GCKex4F and GCKex4R TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG	308
5	10	GCKex5F and GCKex5R TCACTCACGGCAAAGCA TGGAAGCCAAGGAGAAAGG	634
6	10	GCKex6F and GCKex6R TGAGAGACGCTATCAAACG GGCTCTGCTCTGACATCACC	358
7	10	GCKex7F and GCKex7R CCATTGTTCCAGACAAAGCA CAAGCCATTATCTGCAATG	436
8	10	GCKex8F and GCKex8R CATTTCTAAAGCTCGGCTCAT TGTCCTGTCCCAGCCTCCT	634
9	10	GCKex9F and GCKex9R CTTTGGCTGGGTGAGGTG AGGGGGACGAGAAGAGGAC	574
10	10	GCKex10F and GCKex10R CCTCTTCTCGTCCCCCTTG ATGGAGGCCTGGGTGCTGT	360
PROM	10	GCKexpromF and GCKexpromR GCTCGGCATTTCCTGCT AGTCAGGCTGCCAAGAGGT 7	512

Os produtos de PCR de cada um dos exons foram checados por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo e, após verificação de qualidade para o sequenciamento procedeu-se à reação de sequenciamento com os primers M13 foward e reverse citados anteriormente.

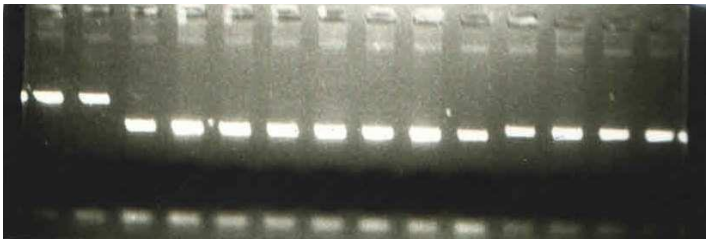

Figura 3: gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 5 (poços 1 e 2), exon 6 (poços 3 a 10) e exon 7 (poços 11 a 14).

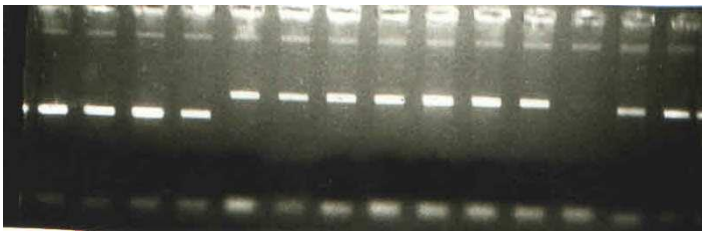

Figura 4: gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas : exon 7 (poços 1 e 4), exon 8 (poços 5 a 12) e exon 9 (poços 13 a 14).

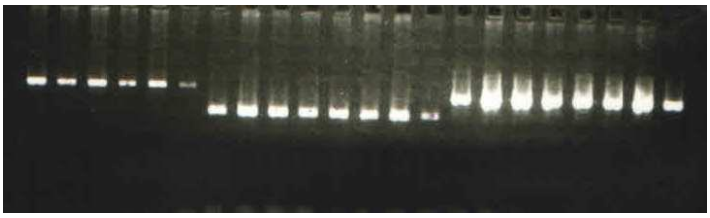

Figura 5: gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas : exon 9 (poços 1 e 6), exon 10 (poços 7 a 14) e prom (poços 15 a 22).

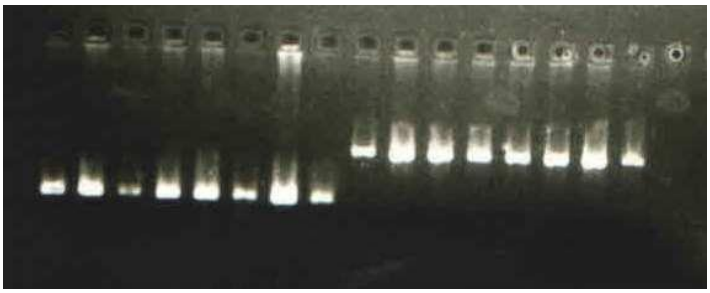

Figura 6: gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 1 (poços 1 a 8) e exon 2 (poços 9 a 16).

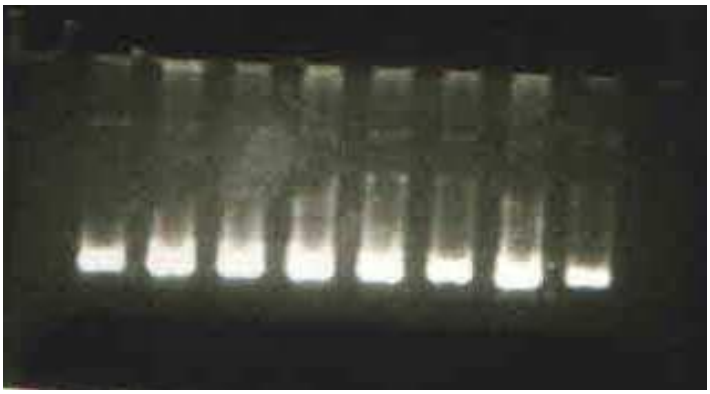

Figura 7: gel de agarose mostrando amostras para serem sequenciadas: exon 3 (poços 1 a 8).

5.2.3.3. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 cyclesequencing kit (cat 4337457 – Life Technologies, Waltham - USA, segundo as instruções do fabricante,) e os primers M13 foward e reverse. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas e levadas ao Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Do total de 213 amostras, 170 foram sequenciadas no aparelho ABI3500XL (AppliedBiosystems, Waltham - USA); e as 40 demais amostras no Sequenciador de Nova Geração MiSeq, utilizando o kit MiSeq V2

(500 ciclos) com preparo dos painéis seguindo a metodologia TruSeq Custom Amplicon (Illumina).

5.2.3.4. Análise

As sequências geradas foram analisadas com o programa CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm), com ênfase na região de exon dos produtos de PCR e as alterações encontradas verificadas com a ferramenta mutationtaster (http://www.mutationtaster.org/) [27], e posteriormente correlacionadas com os aspectos clínicos dos pacientes.

6 Resultados

6.1 Caracterização da amostra materna

Foram avaliadas 128 gestantes que realizaram acompanhamento pré-natal no Ambulatório de Gestação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A mediana da idade das pacientes foi de 31 anos (P25: 27 anos, P75: 35 anos) e no tocante ao número de consultas, a mediana foi de 7,0 consultas (P25: 4,0; P75: 10,0) (Tabela 4).

As pacientes apresentaram Índice de massa corporal (IMC) com mediana em 33,5 (P25: 29,2, P75: 39,3) (Tabela 4, Gráfico 1).

Tabela 4: Distribuição das pacientes conforme idade, peso e Índice de massa corporal.

Paridade	Mediana	P25- P75
Idade	31	27 - 35
Peso	84,5	73 – 102,35
Número de consultas	7,0	4,0 – 10,0
IMC	33,5	29,2 – 39,3

IMC: Índice de massa corporal

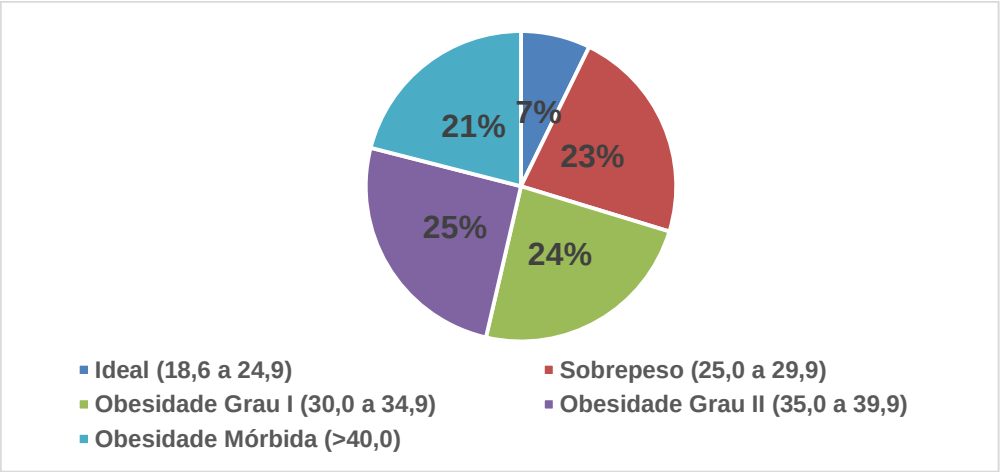

Gráfico 1: Caracterização do Índice de Massa Corporal (IMC) (n = 128).

Quanto à paridade, 27 (21,1%) pacientes eram primigestas e 78,9% das pacientes tinham dois ou mais partos anteriores (Tabelas 5).

Tabela 5: Distribuição do número de casos de pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional avaliados, segundo paridade.

Paridade	N	%
Primigesta	27	21,1
Secundigesta	38	29,7
Tercigesta	31	24,2
Quatro ou mais gestações	32	25,0
Total de casos avaliados	**128**	**100**

Das 128 gestantes avaliadas, 16 apresentaram diagnóstico isolado de Diabetes Mellitus e 112 (87,5%) apresentaram uma ou mais comorbidades associadas. Dessas, as mais prevalentes foram Obesidade (63,4%), Hipertensão arterial sistêmica (21,4%) e Dislipidemia (19,6%). Três pacientes apresentavam diagnóstico de sífilis tratada, duas apresentavam critérios para Hepatite C curada e uma paciente com retrovirose em vigência de tratamento (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição do número de casos de pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional, segundo comorbidades associadas

Patologia materna	N	%
Hipertensão arterial sistêmica	24	21,4
Hipertensão arterial gestacional	13	11,6
Obesidade	71	63,4
Dislipidemia	22	19,6
Pré – eclâmpsia	1	0,9
Anemia materna	4	3,6
Hipotireoidismo	11	9,8
Hipertireoidismo	3	2,7
Síndrome dos ovários policísticos	2	1,8
Infecção urinária de repetição	1	0,9
Outros*	**52**	**46,4**
Total de casos avaliados	**112**	**100**

* Outros: epilepsia, Deficiência de proteína S, Mutação do fator V de Leiden com Trombose Venosa Profunda, Asma, Depressão grave, Condilomatose, Leiomiomatose, Aborto de repetição, Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide, Útero bicorno, Colonização *S. Agalactiae,* Idade Materna Avançada, Incompetência Istmo-cervical, Neoplasia Intracervical e nefrolitíase.

Foram realizados exames laboratoriais para a avaliação da normalidade funcional dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino; sendo que a maioria dos exames se encontraram dentro da normalidade com exceção do perfil lipídico em que a mediana esteve acima dos valores considerados normais e dos resultados dos Testes de Tolerância Oral à glicose, referentes ao diagnóstico de DMG (Tabela 7).

Tabela 7: Mediana e percentis da avaliação laboratorial das pacientes.

Exame laboratorial	Valor Normal Unidade	Mediana	P25 – P75
Uréia	10-50 mg/dL	15,0	12,3 – 18,0
Creatinina	0,7-1,5 mg/dL	0,60	0,54 – 0,66
TSH	0,3-4,0 g/dL	1,99	1,44 – 2,72
TOTG jejum	< 92 mg/dL	99,0	91,0 – 109,0
TOTG 1ª hora	< 180 mg/dL	187,0	160,0 – 200,0
TOTG 2ª hora	< 153 mg/dL	159,5	131,25 – 180,75
Hemoglobina glicosilada	<6,0 %	5,70	5,3 – 6,2
Proteinúria de 24 horas	< 300 mg	133,5	80,9 – 217,1
Colesterol total	< 200 mg/dL	210.0	182,25 – 238,75
HDL colesterol	> 45 mg/dL	54,0	47,75 – 62,5
Triglicérides	< 150 mg/dL	201,0	153,75 – 265,75
Hematócrito	37-47 %	36,0	33,0 - 38,0
Hemoglobina	12-16 g/dL	12,1	11,4 – 12,9
Plaquetas	150-450 $10^3/\mu L$	244,0	205,0 – 286,0
Albumina	3,5-5,0 g/dL	3,6	3,5 – 3,8
TGO	Até 32,0 U/L	15,3	12,0 – 20,0
TGP	Até 31,0 U/L	11,95	8,85 – 17,2
GGT	11,0 – 50,0 U/L	17,0	11,5 – 27,7
Sódio	135,0 – 145,0 mmol/L	137,0	136,0 – 138,5
Potássio	3,5 – 5,0 mmol/L	4,1	3,9 – 4,4
Proteínas totais	6,0 – 8,5 g/dL	6,25	5,9 – 6,4
Bilirrubina total	0,2 – 1,2 mg/dL	0,31	0,23 – 0,43
Bilirrubina direta	Até 0,3 mg/dL	0,10	0,08 – 0,13
Bilirrubina indireta	Até 0,9 mg/dL	0,24	0,18 – 0,33

TSH = Hormônio estimulante da tireoide; TOTG = Teste oral de tolerancia à glicose; HDL = High density lipoproteins; GGT = Gamaglutamil transferase; TGO = Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP = Transaminase glutâmico- pirúvica

Durante o pré-natal, ocorreram uma ou mais intercorrências maternas em 26 pacientes (20,3%, porcentagem calculada em relação ao total de 128 gestantes). Dentre estas 26 gestantes, duas pacientes desenvolveram hipertensão arterial gestacional (7,7%), sete apresentaram pré-eclâmpsia (26,9%), uma gestante desenvolveu eclâmpsia (3,8%), uma paciente teve um episódio de trombose venosa profunda (3,8%), sete gestantes apresentaram infecção do trato urinário baixa (26,9%) e uma paciente desenvolveu pielonefrite (3,8%), cinco pacientes necessitaram de internação para inibir trabalho de parto pré-termo (19,2%). Cinco pacientes receberam diagnóstico de má adesão ao pré-natal, não seguindo as orientações recebidas (19,2%) (Gráfico 2).

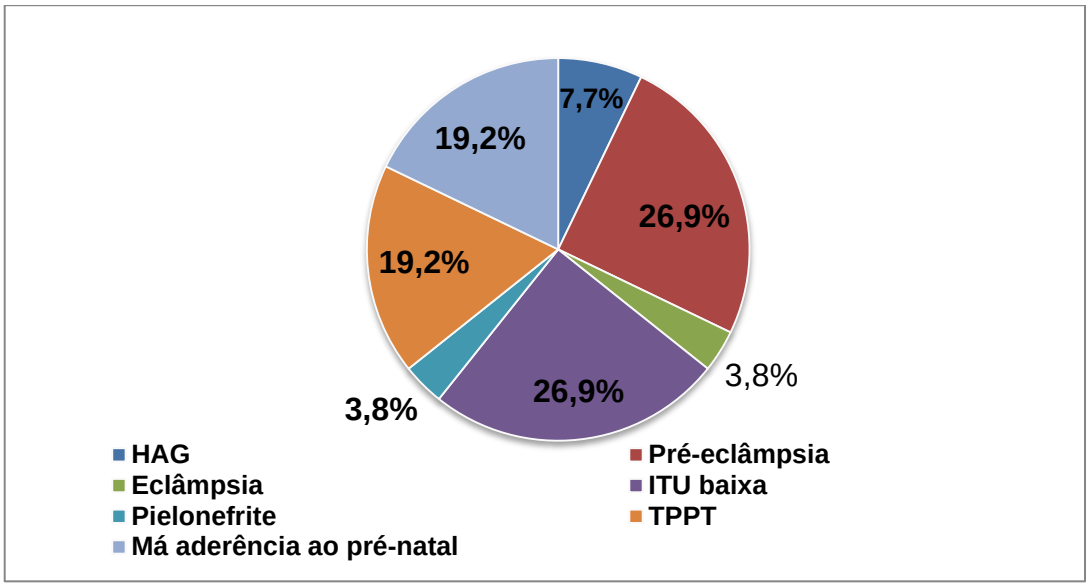

Gráfico 2: Distribuição das intercorrências maternas no pré-natal (n = 26).

HAG : Hipertensão arterial gestacional

ITU: Infecção do trato urinário

TPPT: Trabalho de parto pré-termo

Durante o pré-natal, do total de 128 gestantes, 23 (17,9%) apresentaram uma ou mais intercorrências fetais, totalizando 27 complicações identificadas. Dentre essas, observaram-se 12 casos de polidrâmnio (46%), dez fetos grandes para a idade gestacional (38%), um caso de corioamniorrexe prematura pré-termo (4,0%), uma paciente apresentando oligoâmnio (4,0%), um diagnóstico de restrição de crescimento intrauterino e dois casos de óbito fetal (8,0%) (Gráfico 3).

O primeiro caso de óbito fetal ocorreu na idade gestacional de 35 semanas e 5 dias em uma gestante acompanhada devido aos diagnósticos de HAG, Iteratividade e DMG em uso de insulinas NPH e regular. Paciente apresentava má adesão às

orientações da equipe assistencial e ao seguimento pré-natal, evoluindo com controle glicêmico inadequado caracterizado por glicemias em jejum entre 62 a 163 mg/dL, pré-prandial entre 145 e 225 mg/dL, uma hora pós-prandial entre 48 e 129 mg/dL.

O segundo óbito fetal foi decorrente a descolamento prematuro de placenta durante trabalho de parto que ocorreu em outro serviço, em idade gestacional de 36 semanas e 4 dias. Essa gestante fazia seguimento de pré-natal com diagnósticos de obesidade, dislipidemia e DMG controlado com dieta, apresentando adequado controle glicêmico durante a gestação.

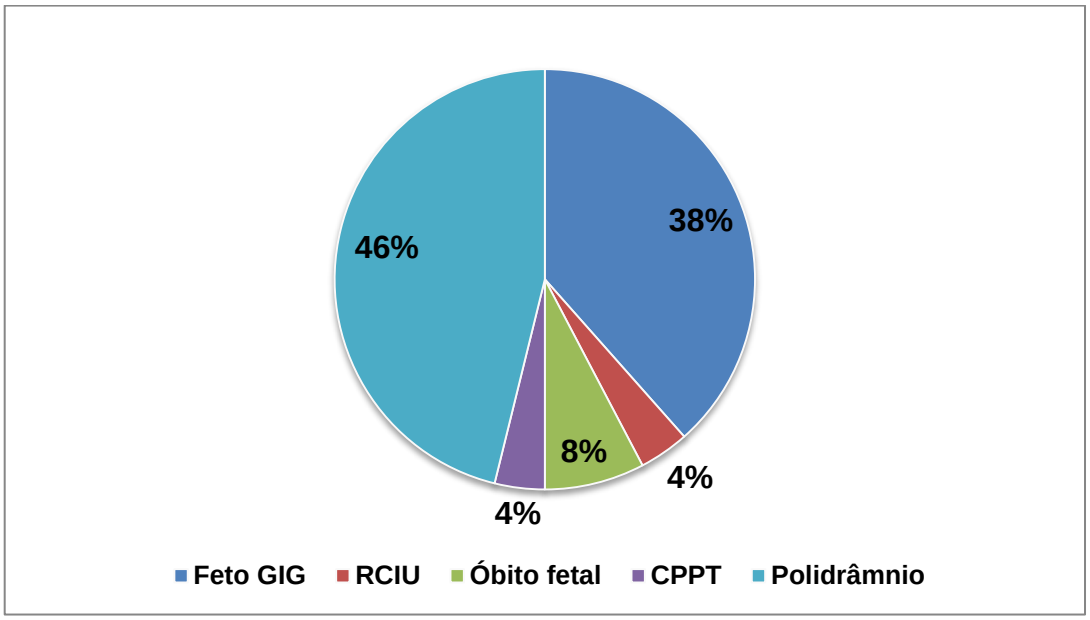

Gráfico 3: Descritivo das intercorrências fetais (n = 27).

RCIU = Restrição de Crescimento Intrauterino
CPPT = Corioamniorrexe prematura pré-termo
GIG = Grande para a idade gestacional

De total de mulheres, sete (5,4%) delas realizaram parto em outro serviço que não o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Apenas sete (5,4%) pacientes apresentaram resolução da gestação em idade gestacional inferior a 37 semanas de idade gestacional (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição do número de casos segundo idade gestacional da resolução da gestação.

Idade gestacional (semanas)	N	%
≥ 37	114	94,2
≥ 34 < 37	7	5,8
≥ 28 < 34	0	0
< 28	0	0
Total	**121**	**100**

* Sete pacientes tiveram parto em outro serviço que não o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O início do trabalho de parto foi espontâneo em 25,5% das pacientes (24 pacientes) e induzido em 74,5% dos casos (70 pacientes) (Gráfico 4). A resolução da gestação foi via vaginal em 40,2% (49 partos vaginais, sendo um parto vaginal operatório), a via alta em 71 casos (58,8%), sendo realizada cesárea eletiva em 28 pacientes (39,4%), e em caráter de urgência em 43 pacientes (60,6%) (Gráfico 5).

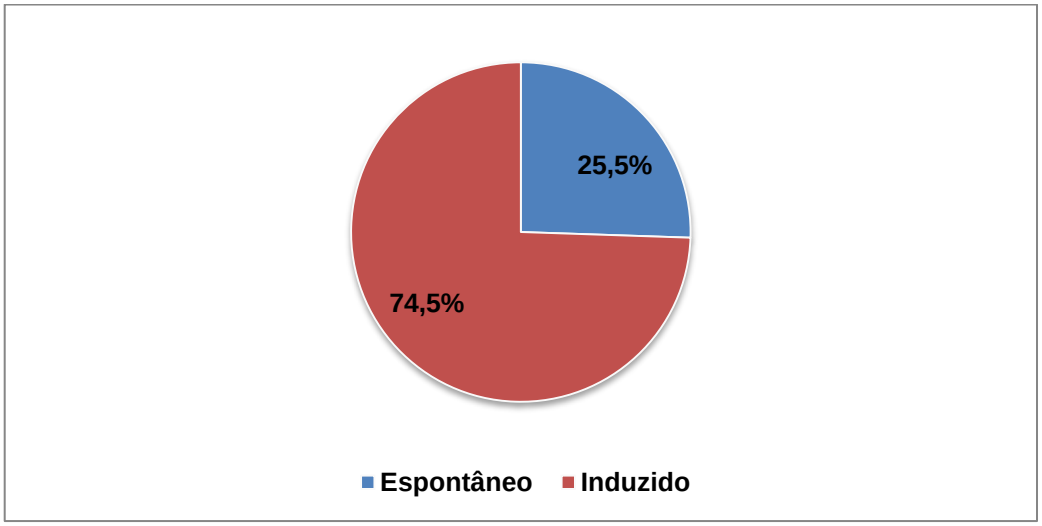

Gráfico 4: Distribuição quanto ao início do trabalho de parto (n = 121).

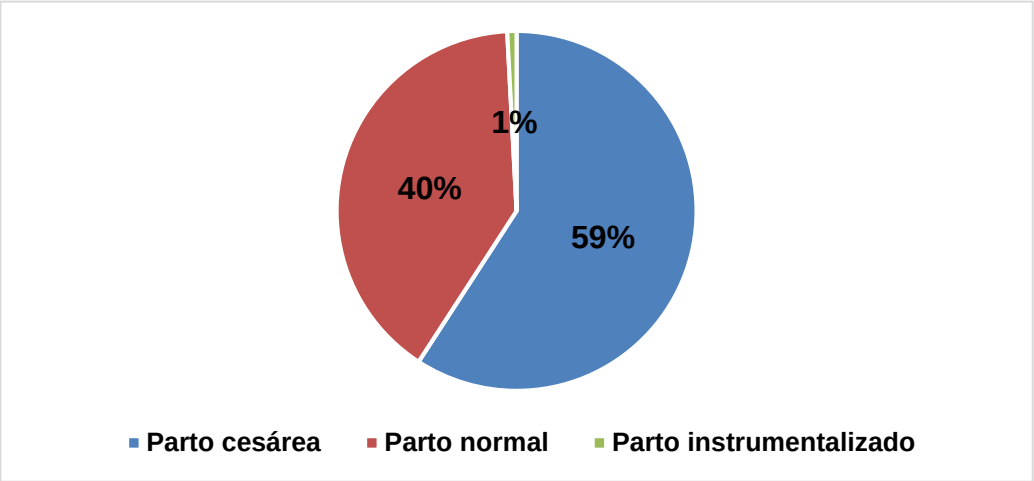

Gráfico 5: Descrição quanto aos tipos de partos (n = 121).

As indicações de resolução por parto cesárea foram: alteração da vitalidade fetal aguda (20 casos, 28,2%), iteratividade (15 casos, 21,1%), falha de indução do trabalho de parto (12 casos, 16,9%), parada secundária da dilatação (10 casos, 14,0%), feto pélvico (7 casos, 9,8%), feto grande para a idade gestacional (6 casos, 8,4%). Uma paciente foi submetida a parto via abdominal por recomendação de outra clínica, devido a introdução recente de filtro em Veia Cava (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição das indicações de realização de parto cesárea.

Manejo	**N**	**%**
Iteratividade	15	21,1
Feto grande para a idade gestacional	6	8,4
Sofrimento fetal agudo	20	28,2
Falha de indução do trabalho de parto	12	16,9
Feto pélvico	7	9,8
Parada secundária da dilatação	10	14,0
Outras	1	1,4
Total	**71**	**100**

Durante o período puerperal, 115 (95,0%) pacientes não apresentaram nenhuma intercorrência. Do total de pacientes, três (2,3%) apresentaram infecção de ferida operatória, uma (0,7%) paciente desenvolveu endometrite, uma (0,7%) evoluiu com

deiscência de ferida operatória, uma (0,7%) paciente apresentou atonia uterina no puerpério imediato (Gráfico 6).

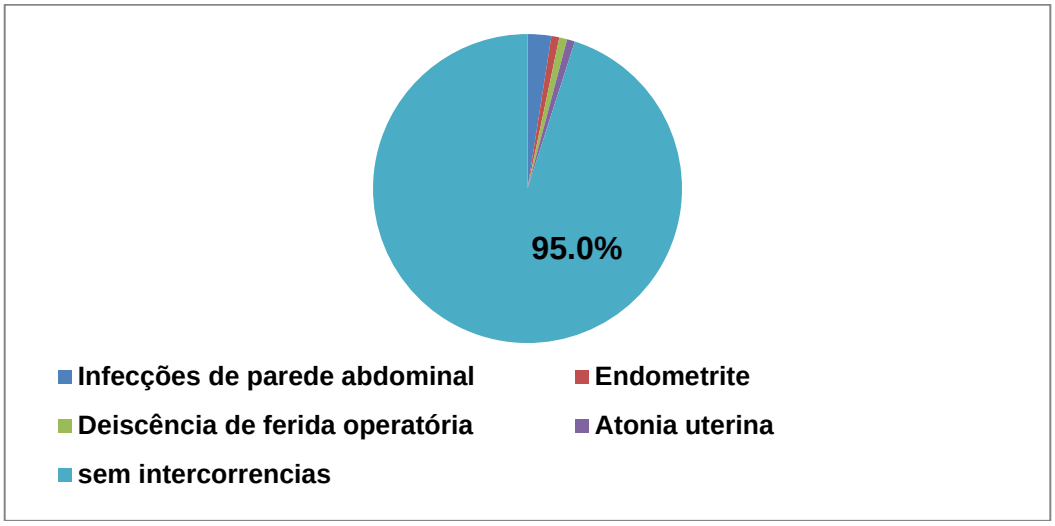

Gráfico 6: Descrição de intercorrências no período puerperal (n = 121).

O tratamento para o Diabetes Mellitus consistiu somente em orientação nutricional e de exercícios físicos em 73 pacientes. Em 55 (42,9%) gestantes houve indicação de insulinoterapia para o controle glicêmico. A mediana de introdução de insulinoterapia foi de 29,4 semanas (P25 - P75 :22,4 - 33,2). A mediana da dose total de insulina no momento da resolução foi de 37 Unidades Internacionais (P25 - P75 : 24 – 59,5) (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição dos dados referentes à insulinoterapia (n=55)

Manejo	**Mediana**	**P25 - P75**
IG de introdução da insulinoterapia	29,4	22,4 – 33,2
Dose total na resolução (UI)	37	24 – 59,5
Total	**55**	**100**

IG: idade gestacional

UI : Unidades Internacionais

Entre as pacientes que fizeram uso de insulinoterapia, 29 fizeram uso apenas de insulina NPH (53%), 25 associaram insulina NPH e insulina Regular/Rápida (45%), e uma paciente fez uso isolado de Insulina Lispro (2,0%). Nenhuma gestante fez uso de análogo de insulina de ação prolongada (Gráfico 7).

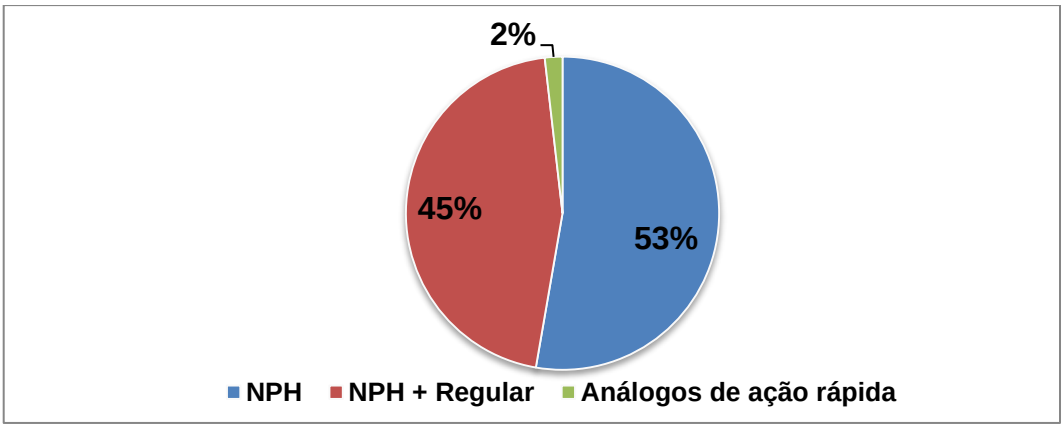

Gráfico 7: Esquemas de utilização de insulinoterapia (n = 55).

NPH : Neutral protramina hagedorm

6.2 Caracterização da amostra dos recém-nascidos

Os dados dos recém-nascidos evidenciaram que a mediana do peso ao nascimento foi de 3365 gramas, 23 recém-nascidos foram considerados macrossômicos (19,0%). A mediana da estatura foi de 49,5 centímetros e os percentis 25 e 75 de 48 e 50,5 centímetros. A mediana dos índices da escala de Apgar no primeiro minuto foi de 9 e no quinto 10 ; e as percentis 25 e 75 foram respectivamente de 7e 9; 9 e 10 (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Distribuição de peso ao nascimento.

Peso ao nascimento (gramas)	N	%
≥ 4500	3	2,5
≥ 4000 < 4500	20	16,5
≥ 3500 < 4000	27	22,3
≥ 3000 < 3500	51	42,1
≥ 2500 < 3000	17	14,0
< 2500	3	2,5
Total	**121**	**100**

* Sete pacientes tiveram parto em outro serviço que não o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Tabela 12: Características dos neonatos.		
	Mediana	**P25 – P75**
Peso (gramas)	3365	3115 - 3870
Estatura (centímetros)	49,5	48 – 50,5
Índice de Apgar no primeiro minuto	9	7 -9
Índice de Apgar no quinto minuto	10	9 - 10
Total	**121**	**100**

Na presente casuística, 108 recém-nascidos (80,2%) não apresentaram nenhuma intercorrência no período neonatal precoce. Dentre os demais 24 neonatos, observou-se uma ou mais complicações caracterizadas por: 12 casos de hipoglicemia (42,8%), nove de icterícia com necessidade de tratamento com fototerapia (32,0%), um caso de policitemia (3,5%), cinco de Síndrome do desconforto respiratório (17,8%), e um recém-nascido necessitou de internação em Centro de Terapia Intensiva (3,5%) (Gráfico 8).

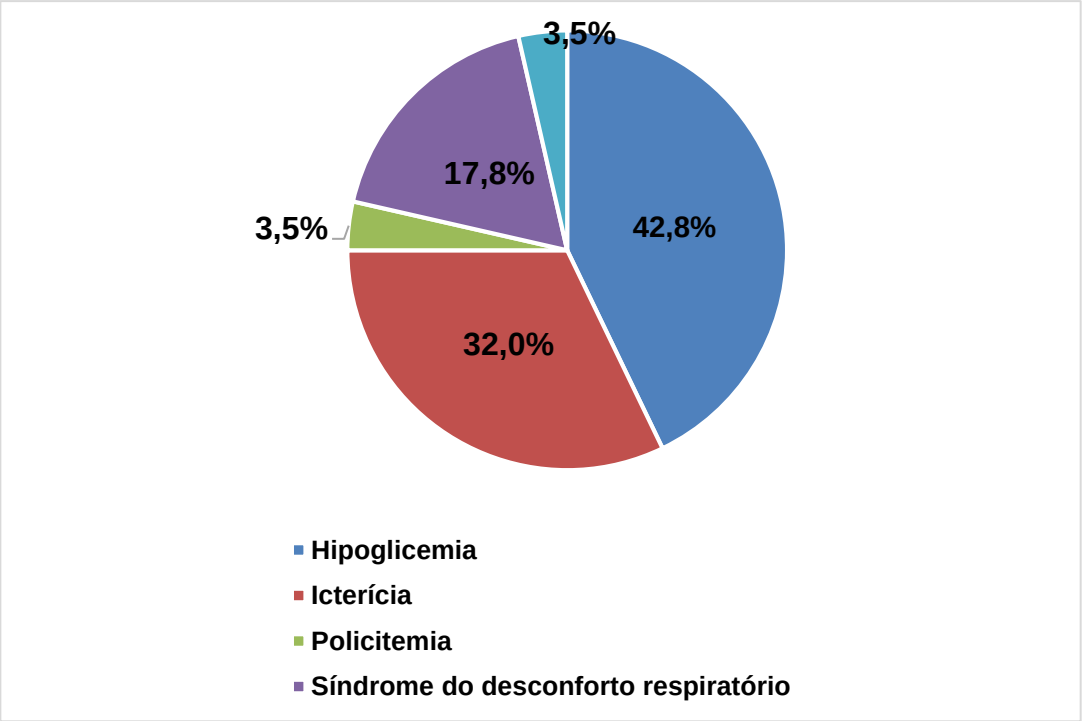

Gráfico 8: Demonstrativo das complicações no período neonatal (n = 28).

6.3 Resultados do sequenciamento do DNA.

Do total de 200 amostras (128 maternas e de 72 neonatos), foram encontradas alterações em 21 (10,5 %), sendo 12 amostras maternas (6,0 %) e 9 amostras de nenonatos (4,5 %). Observou-se ainda que foi encontrada a mesma mutação em 4 binômios materno-fetais e que um neonato apresentou duas alterações genéticas (Figura 8).

Em 13 pacientes, no exon 6, posição 44708, identificou-se uma mutação com troca da base citosina por timina. Ao verificar esta alteração com a ferramenta mutationtaster, observou-se que trata-se de um polimorfismo, localizado em região intrônica (Figuras 9 e 10, Tabela 13).

Em sete pacientes, observou-se uma mutação na região promotora do gene, na posição 8450, com troca da base citosina por timina. Através da ferramenta mutationtaster, evidenciou-se que trata de um polimorfismo heterozigoto, também em região intrônica (Figuras 11 e 12, Tabela 13)

Ainda em dois pacientes foi encontrada uma alteração no exon 6, na posição 48377, com troca da base citosina por timina; ao checar-se com a ferramenta mutationtaster, observou-se que trata de uma mutação provavelmente deletéria, ou seja, diagnóstica de MODY-GCK (Figuras 13 e 14, Tabela 13).

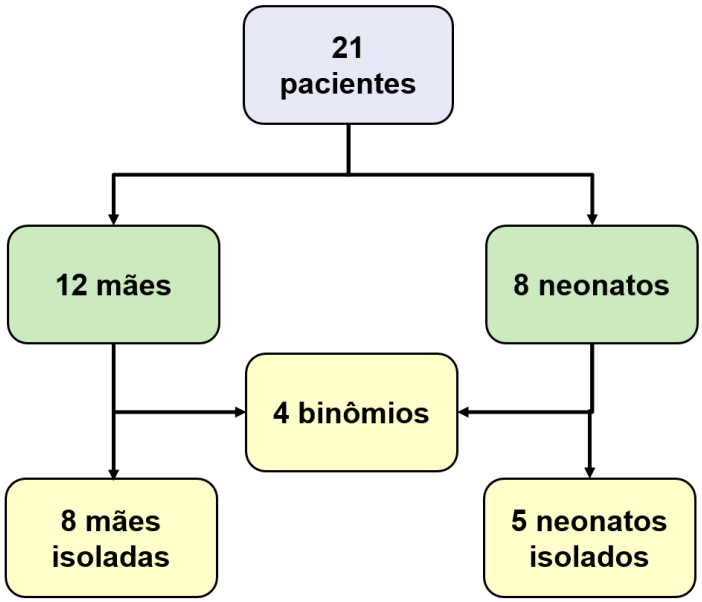

Figura 8 : Algoritmo das mutações encontradas conforme amostras.

***1 neonato apresentou duas mutações diferentes.**

Tabela 13: Alterações no DNA baseado no Ensemble transcript ID – ENST 00000403799

Número de pacientes	Mutações no DNA	Exon
13	Polimorfismo heterozigoto g.44708C>T	6
7	Polimorfismo heterozigoto g.8450C>T	Região promotora
2	Mutação provavelmente deletéria g.48377C>T	6

***1 neonato apresentou duas mutações diferentes.**

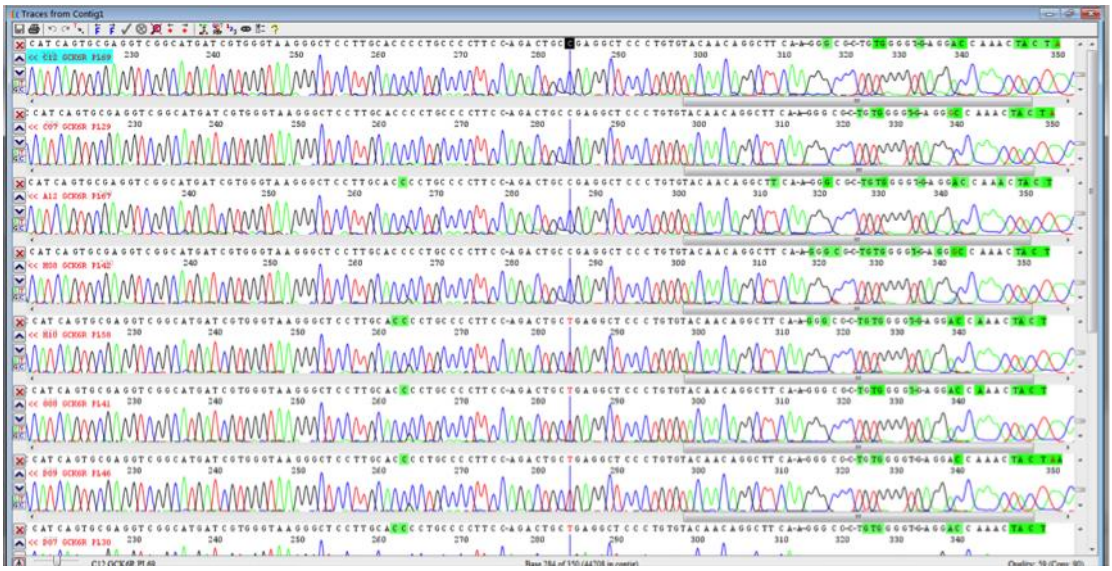

Figura 9 : Polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

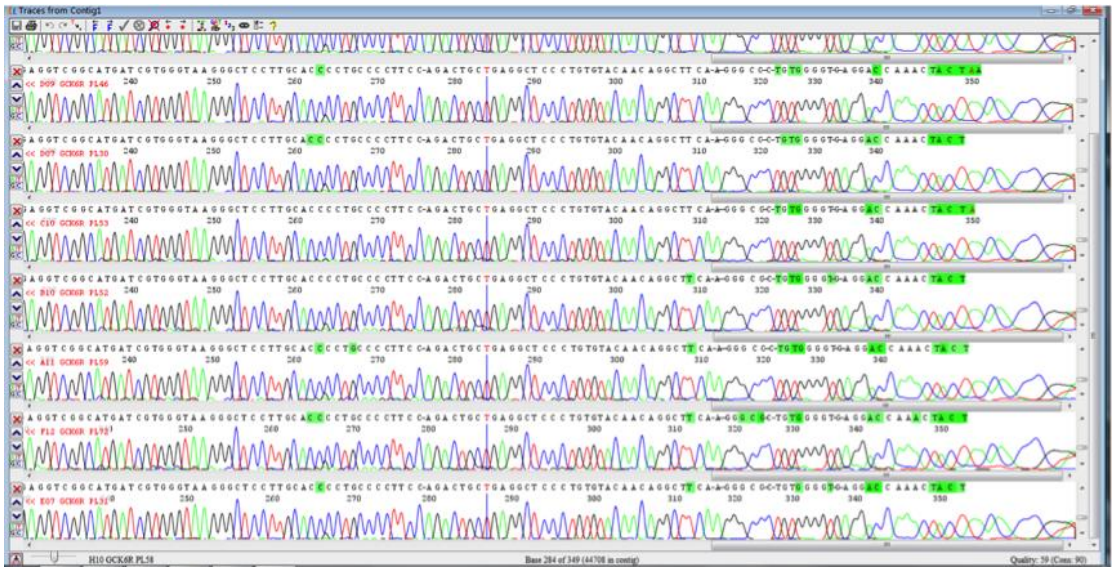

Figura 10 : Polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

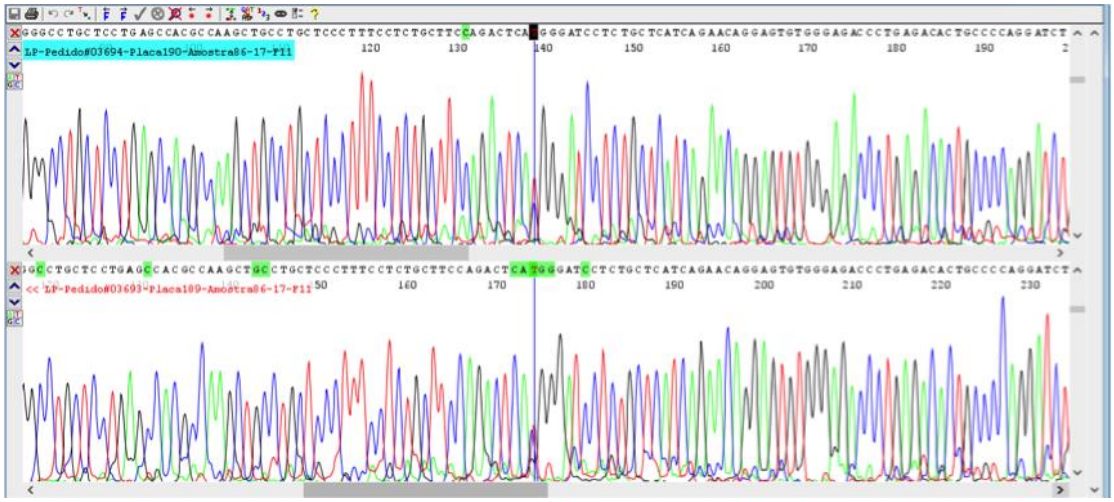

Figura 11 : Polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

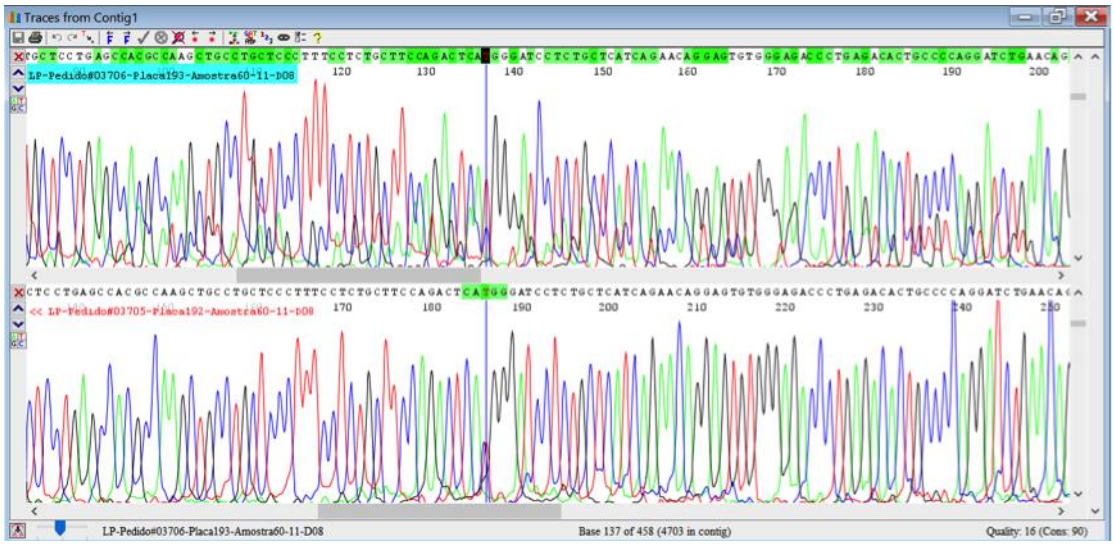

Figura 12: Polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

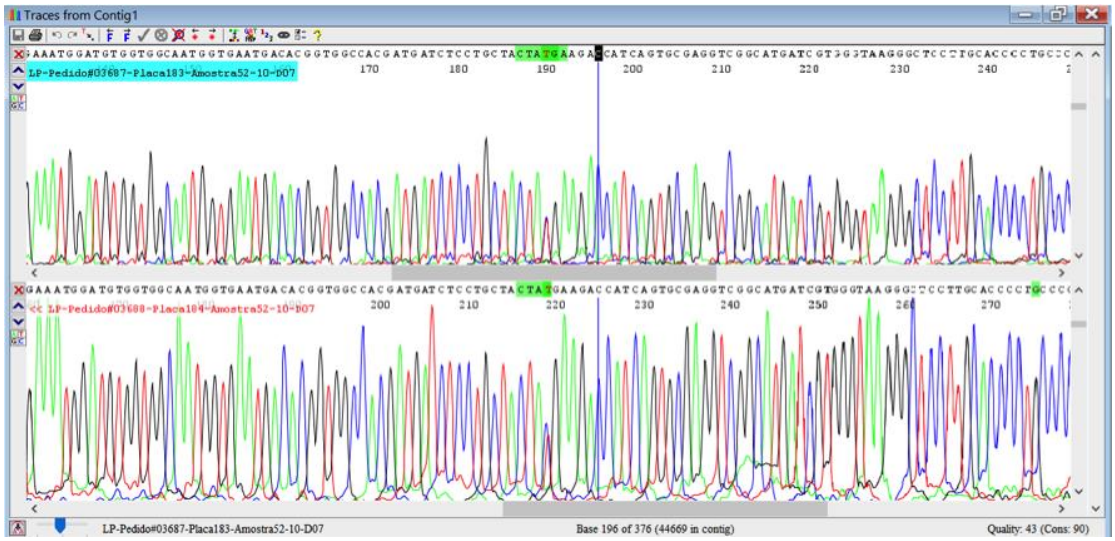

Figura 13: Mutação provavelmente deletéria, g.48377C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

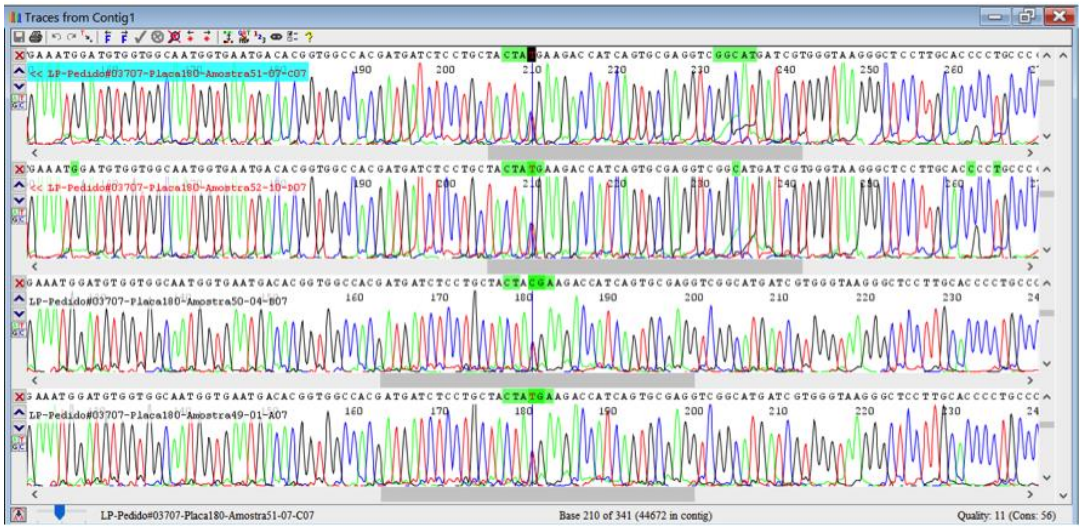

Figura 14: Mutação provavelmente deletéria, g.48377C>T, exon 6. Adaptado do CodonCodeAligner v5.1.4 (CodonCode Corporation (http://www.codoncode.com/aboutus.htm).

6.4 Caracterização da casuística materna conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA

Das 128 gestantes incluídas neste estudo, foi encontrado polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6 em seis pacientes, polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora em cinco pacientes e mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK em uma gestante.

Referente aos polimorfismos g.44708C>T identificado no exon 6, e g.8450C>T na região promotora do gene da glucoquinase; ao avaliarmos as variáveis idade materna, IMC materno, idade gestacional na resolução da gravidez, e peso ao nascimento; observou-se os valores de mediana e percentis 25 e 75 encontraram-se semelhantes com os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas pacientes em que não foi identificada nenhum tipo de alteração no gene GCK, e que o P-valor não apresentou relevância estatística (Tabela 14).

Quanto à variável Hemoglobina glicosilada, observa-se que os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas pacientes com polimorfismo encontram-se discretamente superiores que os mesmos valores nas pacientes em que não identificou-se nenhum tipo de polimorfismo; entretanto, o P-valor não apresentou significância estatística (Tabela 14).

Relevante à variável dose diária de insulina prévia à resolução, foi identificado P-valor de 0,0478 com presença de relevância estatística, e valores de mediana e percentis 25 e 75 mais elevados em comparação com os valores de dose diária de insulina prévia à resolução nas pacientes sem polimorfismos no gene da glucoquinase (Tabela 14).

Tabela 14: Caracterização da casuística materna conforme polimorfismo

	Sem polimorfismo e mutação (n=116) Mediana (P25-P75)	Com polimorfismo g.44708C>T exon 6 (n=6) Mediana (P25-P75)	Com polimorfismo g.8450C>T região promotora (n=5) Mediana (P25-P75)	P-valor
Idade materna (anos)	31,0 (27,0 – 35,0)	30,0 (27,0 – 34,0)	29,00 (29,0 – 32,0)	0,855
IMC materno (Kg/m^2)	33,52 (29,41 – 39,3)	34,52 (28,43 – 42,45)	31,69 (23,0 – 37,7)	0,7276
HbA1c (%)	5,70 (5,3 – 6,2)	6,0 (5,70 – 6,80)	6,0 (5,8 – 6,0)	0,3741
DDI prévia ao parto (UI)	35,00 (22,0 – 54,0)	82,0 (49,0 – 101,0)	176,0 (176,0 – 176,0)	0,0478
IG do parto (semanas)	39,10 (38,4 – 39,4)	38,55 (37,1 – 39,2)	37,4 (37,3 – 39,4)	0,2269
Peso ao nascer (g)	3441,9 (3115,0 – 3845,0)	3427,50 (2930,0 – 4120,0)	3445,0 (2930,0 – 3630,0)	0,9477

IMC = Índice de Massa Corpórea
HbA1c = Hemoglobina glicosilada
DDI = Dose diária de insulina
IG = Idade gestacional
P 25 = percentil 25
P 75 = percentil 75
*P-valor referente ao teste Kruskal – Wallis

A mutação g.48377C>T, diagnóstica de MODY-GCK, identificada no exon 6 do gene da glucoquinase, foi identificada em apenas uma gestante. Essa paciente possuía idade de 22 anos e IMC de 27,7 Kg/m^2, menores que os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas gestantes que não apresentaram alterações no gene da glucoquinase (31 anos e 33,5 27,7 Kg/m^2, respectivamente). Seu controle glicêmico foi alcançado durante o pré-natal com dose total de insulina prévia ao parto de 38 UI. O valor de hemoglobina glicosilada foi de 4,8%, sendo menor que os valores de mediana e percentis 25 e 75 das gestantes que não apresentaram mutação. A resolução da gestação ocorreu via parto vaginal com 40,2 semanas de idade gestacional, não ocorrendo complicações no período puerperal. Contudo, o peso ao nascer da criança foi de 4160 g, sendo superior ao da mediana e percentis 25 e 75 das gestantes que não apresentaram mutação. (Tabela 15).

Tabela 15: Caracterização da casuística materna conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6

	Com mutação (n=1)	Sem polimorfismo e mutação (n=116) Mediana (P25-P75)
Idade materna (anos)	22	31,0 (27,0 – 35,0)
IMC materno (Kg/m^2)	27,7	33,5 (29,4 – 39,3)
HbA1c (%)	4,8	5,7 (5,3 – 6,2)
DDI prévia ao parto (UI)	38	35,0 (22,0 – 54,0)
IG do parto (semanas)	40,2	39,1 (38,4 – 39,4)
Peso ao nascer (g)	4160	3355,0 (3115,0 – 3845,0)

IMC = Índice de Massa Corpórea
HbA1c = Hemoglobina glicosilada
DDI = Dose diária de insulina
IG = Idade gestacional
P 25 = percentil 25
P 75 = percentil 75

6.5 Caracterização da casuística neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA.

Dos 72 recém-nascidos genotipados neste estudo, foi encontrado polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T no exon 6 em sete pacientes, polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T na região promotora do gene da glucoquinase em dois recém-nascidos; sendo que um destes neonatos também apresentou mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK.

Ao comparar-se a variável peso ao nascimento, os pacientes que apresentaram o polimorfismo g.44708C>T identificado no exon 6 do gene da glucoquinase, observou-se que os valores de mediana e percentis 25 e 75 encontraram-se superiores aos dos pacientes sem alterações no gene da glucoquinase e aos pacientes com polimorfismo g.8450C>T na região promotora do gene GCK; entretanto não foi identificada significância estatística (P-valor de 0,6457). Quanto às variáveis Apgar de primeiro e quinto minutos, não houve diferenças entre os valores de mediana e percentis 25 e 75, e P-valor entre os pacientes com polimorfismo e os não acometidos (Tabela 16).

Tabela 16: Comparação dos desfechos neonatais conforme polimorfismo – Parte I

	Sem polimorfismo e mutação (n=63) Mediana (P25-P75)	Com polimorfismo g.44708C>T exon 6 (n=7) Mediana (P25-P75)	Com polimorfismo g.8450C>T região promotora (n=2) Mediana (P25-P75)	P-valor
Peso ao nascer (g)	3410,0 (3200,0 – 3855,0)	4040,0 (2930,0 – 4120,0)	3460,0 (3200,0 – 3720,0)	0,6457
Apgar de 1 minuto	8,0 (7,0 – 9,0)	9,0 (9,0 – 9,0)	9,50 (9,0 – 10,0)	0,0651
Apgar de 5 minuto	9,0 (9,0 – 10,0)	10,0 (9,0 – 10,0)	10,0 (10,0 – 10,0)	0,3662

*P-valor referente ao teste Kruskal – Wallis

A análise referente aos eventos adversos perinatais, caracterizados como tocotraumatismo, hipoglicemia, icterícia, policitemia, hipocalcemia, síndrome de desconforto respiratório, óbito neonatal e internação em centro de terapia intensiva; não se identificou significância estatística (P-valor) entre os pacientes com polimorfismo g.44708C>T, polimorfismo g.8450C>T e em relação aos pacientes sem acometimento do gene na glucoquinase. O único desfecho neonatal adverso encontrado entre os pacientes com os polimorfismos g.44708C>T e g.8450C>T foi Síndrome de Desconforto Respiratório em apenas um paciente em cada (Tabela 17).

Tabela 17: Comparação dos desfechos neonatais conforme polimorfismo – Parte II

	Sem polimorfismo e mutação (n=63)	Com polimorfismo g.44708C>T exon 6 (n=7)	Com polimorfismo g.8450C>T região promotora (n=2)	P-valor
Tocotraumatismo	0	0	0	0
Hipoglicemia	6 (9,5%)	0	0	0,6265
Icterícia	3 (4,7%)	0	0	0,7996
Policitemia	0	0	0	0
Hipocalcemia	0	0	0	0
SDR	5 (7,9%)	1 (14,3%)	1 (50%)	0,1293
Óbito neonatal	1 (1,6%)	0	0	0,9301
Internação em CTI	1 (1,6%)	0	0	0,9301

SDR = Síndrome de Desconforto Respiratório
CTI = Centro de terapia intensiva
*P-valor referente ao teste Qui-quadrado

O recém-nascido em que foi identificada a mutação g.48377C>T, no exon 6 do gene GCK; apresentou Índice de Apgar de primeiro e quinto minutos de 9 e 10,

respectivamente, sendo seu peso ao nascer de 4105,0 gramas. Ao compararmos com os pacientes não acometidos por alterações no gene da glucoquinase, observou-se que os valores de mediana e percentis 25 e 75 foram superiores em relação à variável peso ao nascimento, e semelhantes quanto às variáveis Apgar de primeiro e quinto minutos (Tabela 18). Ademais, este neonato acometido com a mutação g.48377C>T, não apresentou os defechos desfechos adversos perinatais avaliados (Tabela 19).

Tabela 18: Comparação dos desfechos neonatais conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6 – Parte I

	Com mutação (n=1)	Sem polimorfismo e mutação (n=63) Mediana (P25-P75)
Peso ao nascer (g)	4105,0	3410,0 (3200,0 – 3855,0)
Apgar de 1 minuto	9	8 (7 – 9)
Apgar de 5 minuto	10	9 (9 – 10)

Tabela 19: Comparação dos desfechos neonatais conforme mutação g.48377C>T, identificada no exon 6 – Parte II

	Com mutação (n=1)	Sem polimorfismo e mutação (n=63)
Tocotraumatismo	0	0
Hipoglicemia	0	6 (9,5%)
Icterícia	0	3 (4,7%)
Policitemia	0	0
Hipocalcemia	0	0
SDR	0	5 (7,9%)
Óbito neonatal	0	1 (1,6%)
Internação em CTI	0	1 (1,6%)

SDR = Síndrome de Desconforto Respiratório
CTI = Centro de terapia intensiva

7 Discussão

7.1 Casuísticas materna e neonatal

A gestantes incluídas neste estudo fizeram acompanhamento de pré-natal no Ambulatório de Gestação de Alto Risco, sendo que apenas sete pacientes tiveram seus partos em outro local que não o Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A mediana do número total de consultas das pacientes durante o pré-natal foi considerada adequada, de acordo com os critérios estabelecidos para pré-natal de um modo geral pelo Manual Técnico Pré-natal e Puerpério do Ministério da Saúde que prevê um mínimo de 6 consultas de pré-natal, sendo pelo menos uma no primeiro, duas no segundo e três no terceiro trimestre gestacional (2005). Não há uma definição exata do número ideal de consultas de pré-natal para gestantes consideradas de alto risco obstétrico e perinatal. Ressalta-se que o percentil 25 de número de consultas de pré-natal foi de quatro, o que pode refletir questões sociais e econômicas como baixo acesso ao serviço de saúde, com diagnósticos e encaminhamento tardios ao serviço especializado em gestação de alto risco, além de baixa adesão à orientações e condutas da equipe assistencial, podendo acarretar em desfechos perinatais desfavoráveis (24).

A idade mediana das pacientes foi de 31 anos, ligeiramente superior à encontrada em pesquisas brasileiras populacionais em gestantes que variaram de 25,6 a 25,7 anos de idade (25) (26) .

Quanto à paridade, 27 (21,1%) pacientes eram primigestas, 38 (29,2%) eram secundigestas e 63 (49,2%) tinham três ou mais gestações anteriores; portanto a taxa de multiparidade, considerando três ou mais gestações anteriores, mostrou-se maior quando comparada com dados reportados pela pesquisa Nascer no Brasil de 2012, que foi de 10,4 % (25). Esta pesquisa foi um estudo nacional de base hospitalar, que incluiu durante o período de fevereiro de 2011 a julho de 2012, 24.197 puérperas e seus recém-nascidos. A taxa de pacientes autodeclaradas tabagistas foi de 6,2%, similar a 7,0% descrito na pesquisa previamente mencionada (24). Apenas uma gestante referiu etilismo e drogadição durante a gravidez.

Quanto ao índice de massa corporal (IMC), apenas 21% delas apresentaram-se na faixa considerada ideal para a idade gestacional, sendo que 79% das pacientes apresentavam sobrepeso ou algum grau de obesidade. Esses dados estão de acordo com

a literatura que demonstra aumento do risco em aproximadamente quatro vezes de gestantes obesas em desenvolver DMG (27) (28). Além da pré-eclâmpsia, DMG também correlaciona-se aos demais diagnósticos de síndromes hipertensivas que podem ocorrer previamente ou durante o período gestacional (31). As intercorrências hipertensivas (hipertensão arterial crônica, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia) totalizaram 30,9% das comorbidades associadas, sendo 26,9% caracterizadas como pré-eclâmpsia.

Dentre outras comorbidades apresentadas pelas pacientes incluídas na casuística, destacou-se a dislipidemia (19,6%) e em especial a hipertrigliceridemia, componente associado ao aumento de resistência à insulina apresentado em pacientes com DMG (30).

Os valores do teste oral de tolerância à glicose apresentaram valores de mediana acima do esperado em todas as medidas considerando que a casuística foi constituída por pacientes com diagnóstico de DMG. Entretanto, os resultados de hemoglobina glicosilada encontraram-se dentro de valores aceitáveis, indicando controle adequado durante o pré-natal. De acordo com a literatura, a avaliação através da hemoglobina glicosilada é um método auxiliar eficaz em traduzir o controle glicêmico durante a gestação (32) (33), sendo que valores abaixo de 6.0 % podem sem atingidos com o manejo do DMG sem causar hipoglicemia (34). A avaliação laboratorial de repercussão da disglicemia sobre órgãos e sistemas funcionais das gestantes encontrou-se dentro dos padrões de normalidade de maneira uniforme.

Durante o tratamento das gestantes, 56,3% das pacientes atingiram valores de glicemia de jejum e pós-prandiais considerados adequados, ou seja, abaixo dos estipulados pela ADA (American Diabetes Association) somente com acompanhamento nutricional e mudança do estilo de vida (33). Dessa forma, 43,7% necessitaram de tratamento farmacológico complementar. As estatísticas demonstram taxas de sucesso do tratamento não farmacológico no controle glicêmico variando de 60 a 80%. A mediana da idade gestacional de início da insulinoterapia foi de 29,4 semanas. Considera-se a idade gestacional entre 24 a 29 semanas como período mais adequado para o início de tratamento medicamentoso, quando necessário, para alcance de desfechos gestacionais mais favoráveis (34).

No presente estudo, um importante desfecho gestacional foi a taxa de macrossomia (19%) que esteve dentro do descrito na literatura de 15 a 45% (35). Obesidade e DMG são considerados fatores independentes para associação com

macrossomia fetal e desenvolvimento de pré-eclâmpsia, sendo o impacto potencializado quando apresentam-se combinados (29).

Outras complicações observadas foram polidrâmnio (46% do total de eventos adversos), óbito fetal (8,0% das complicações; 1,5% do total de gestantes) e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (4%). Um dos casos de óbito fetal foi relacionado à ocorrência de descolamento de placenta normalmente inserida em outro serviço assistencial, intercorrência obstétrica não diretamente correlacionada ao controle metabólico dos carboidratos. O outro caso de óbito fetal ocorreu provavelmente em decorrência de descontrole glicêmico secundário ao tratamento irregular seguido pela paciente. De acordo com Rosenstein e colaboradores (2012), o risco de óbito fetal entre 36 e 42 semanas em gestantes com DMG é maior quando em comparação com as mulheres sem diabetes (17,1 versus 12,7 por 10.000 partos) com um risco relativo (RR) de 1,34 e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) variando de 1,2 a 1,5 (61). Por outro lado, o risco de morte perinatal em pacientes com DMG é ligeiramente menor do que em pacientes com diabetes pré-gestacional (48) (49). O aumento desse risco ocorre principalmente em decorrência da hiperglicemia e hiperinsulinemia fetais que determinam elevação da taxa metabólica fetal, sem correspondente aumento de oferta de oxigênio tecidual, com consequente hipóxia tecidual e acidemia fetal (62).

Por sua vez, a RCIU está menos associada com gestações complicadas por DMG, mas é descrita principalmente em pacientes portadoras de Diabetes Mellitus pré-gestacional que apresentam índices glicêmicos já aumentados previamente à gestação e no primeiro trimestre associados à vasculopatia, hipertensão e má perfusão placentária, fenômenos que interferem na placentação adequada (36) (37).

O risco elevado de eventos adversos perinatais relacionados à hiperglicemia durante a gestação acarreta em aumento de resolução programada da gestação em parcela significativa desta população. A idade gestacional de escolha para a resolução programada da gestação também deve levar em consideração o fato da maturidade pulmonar fetal em gestações diabéticas ser mais lenta, ocorrendo próximo a 38,5 semanas, além da relação entre condições de colo uterino e de taxa de sucesso de indução (40) (41).

Em decorrência da casuística do presente estudo ser composta predominantemente por pacientes que necessitaram medicalização para controle metabólico ou que apresentavam comorbidades associadas, a resolução programada da gestação foi a opção preponderante. Dessa forma, em 74,5% dos casos foi realizada

indução de trabalho de parto. Essa conduta é embasada no fato de que em situações de gestações com elevado risco de eventos adversos maternos ou perinatais, o nascimento programado, em idade gestacional pré-termo tardia ou termo precoce, melhora o prognóstico para mãe, concepto ou ambos, devido às condições que podem resultar em resultados piores se conduta expectante for adotada (63) (64) (67). Neste contexto, o diagnóstico de Diabetes Mellitus está associado à indicação de resolução programada da gestação, apresentando um Odds Ratio ajustado para demais variáveis de 2,90 (IC 95% 2,21–3,79) para nascimento em idade gestacional pré-termo tardia e de 4,09 (IC 95% 3,50–4,65) para termo precoce (65).

No presente estudo, de 70 pacientes em que foi indicada a indução do trabalho de parto, apenas 30 pacientes (42,8%) teve evolução para parto normal. A mediana da idade gestacional nas induções foi de 39,2 semanas (P25 de 39,0 semanas, P 75 de 40,0 semanas). Seis pacientes tiveram sua indução de trabalho de parto iniciada antes de 38 semanas, sendo duas das indicações decorrentes de oligoâmnio e corioamniorrexe prematura pré-termo.

A resolução via alta ocorreu em 59,2% da amostra, sendo que mais da metade das cesarianas (60,6%) foram classificadas como sendo de urgência, de acordo com a seguinte distribuição: 12 (16,9%) indicações de resolução via alta foram devido a falha de indução, dez (14,0%) por parada secundária da dilatação e em seis (8,4%) por feto grande para a idade gestacional. A taxa encontrada de resoluções vai alta no atual estudo foi comparativamente maior à descrita no Brasil em pacientes com risco obstétrico habitual de 45,5% (25); e semelhante às taxas mundiais para pacientes com DMG que se apresentam acima de 50% (42) (64) (67). Macrossomia fetal, e consequentemente o risco de distocia de ombro, é um dos fatores predominantemente relacionados ao aumento da taxa de partos operatórios (cesarianas ou vaginais instrumentalizados), e partos cesariana em caráter de urgência (35) (38) (39) (64) (66) (67).

Foram observadas complicações puerperais em 4,9% das gestantes, dentro estas um caso de hemorragia puerperal por atonia uterina, em paciente cujo recém-nascido pesou 4.060g e Índice de Apgar de 8/9 no primeiro e quinto minutos. A literatura descreve aumento de três a cinco vezes no risco de hemorragia puerperal e de lesões do canal de parto em mulheres mães de recém-nascidos macrossômicos (44).

Em relação às características dos recém-nascidos, observou que a mediana do peso ao nascimento foi de 3365 gramas, sendo 23 (19,0%) recém-nascidos foram considerados macrossômicos. A mediana da estatura foi de 49,5 centímetros (P25 = 48;

P75 = 50,5 cm). Sabe-se que o risco de recém-nascidos grandes para a idade gestacional é três vezes maior em gestações com diabetes em comparação a gestações normais (35). Nas gestações diabéticas, os fetos macrossômicos desenvolvem um padrão de supercrescimento, que resulta em deposição de gordura subcutânea na região abdominal e interescapular (43). De acordo com a hipótese modificada de Pedersen, a fisiopatologia da macrossomia fetal decorre da hiperglicemia e hiperinsulinemia fetais decorrente da hiperglicemia materna, levando ao acúmulo de tecido adiposo fetal (35).

No grupo avaliado, um parto teve como complicação distocia de ombro, sendo corrigida por manobras clínicas. Ressalta-se que o neonato pesou 4.120 g e teve score no Índice de Apgar de 5/8 no primeiro e quinto minutos, não apresentando outras complicações durante a internação. Descreve-se que recém-nascidos microssômicos, principalmente com peso ao nascimento acima de 4.500 g, apresentam risco seis vezes maior de trauma decorrente do parto e 20 vezes maior de lesão de plexo braquial (46) (47).

Sabe-se que o Índice de Apgar é afetado por muitos fatores, dentre eles a idade gestacional, medicamentos maternos, reanimação cardiorrespiratória e condições neurológicas. Apesar de não ser um preditor isolado de morbidade e mortalidade perinatal, quando devidamente aplicado é capaz de fornecer as condições do neonato imediatamente após o nascimento. Ademais, valores no quinto minuto acima de 7 afastam risco de encefalopatia neonatal. No presente estudo, a mediana no primeiro minuto foi de 9 e no quinto minuto de 10 (P25 = 7 e 9; P75 = 9 e 10), indicando boa vitalidade pós-natal (45).

Ainda no quesito das complicações perinatais, destaca-se devido prevalência e relevância a hipoglicemia neonatal decorrente da hiperinsulinemia fetal reativa à hiperglicemia materna; a policitemia que decorre do maior aporte necessário de oxigênio aos fetos macrossômicos cursando com aumento da eritropoiese; e a icterícia neonatal decorrente da clivagem dessas hemácias e também de prematuridade (35). Entre nossos pacientes, 12 recém-nascidos apresentaram hipoglicemia (9,9%), nove desenvolveram icterícia com necessidade de tratamento com fototerapia (7,4%), um neonato desenvolveu policitemia (0,8%); estas porcentagens foram calculadas em relação ao total de 121 neonatos.

Os neonatos de mães diabéticas apresentam maior risco de desenvolvimento de síndrome da angústia respiratória, sendo responsável pelas internações em unidades de terapia intensiva (37). Entre os recém-nascidos avaliados no estudo, cinco apresentaram

síndrome do desconforto respiratório (4,1%), e um recém-nascido necessitou de internação em Centro de Terapia Intensiva (0,8%); estas porcentagens foram calculadas em relação ao total de 121 neonatos.

7.2 Avaliação do sequenciamento do DNA

Por definição, quando uma variante genética alcança 1% da população é considerada um polimorfismo. Mais de 600 mutações no gene GCK já foram relatadas na literatura. Estima-se que 2 a 5% dos casos de DMG na Europa são decorrentes de SNPs (Short Genetic Variations) (53).

Quanto à primeira mutação encontrada, na posição 44708, com troca da base citosina por timina; após checagem com a ferramenta mutationtaster, verificou-se que trata de um polimorfismo descrito como rs2268574 T>C, localizado na região intrônica do exon 6 em que não ocorre alteração na sequência de aminoácidos. Conforme verificação com o banco de dados ExAC (The Exome Aggregation Consortium) verificou-se que a frequência alélica dessa mutação é de 0,5295, e conforme a ferramenta dbSNP (Short Genetic Variations) esta alteração não apresentaria significância clínica (50) (51). Entretanto é descrito na literatura que o alelo rs2268574 T>C está localizada em uma suposta região de splicing e que este polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) poderia afetar a transcrição do gene GCK ou até gerar desequilíbrio em outra variação genética; e estar relacionado com DMG (52).

Quanto à segunda alteração encontrada em sete pacientes por meio do sequenciamento de DNA, localizada na região promotora do gene glocoquinase, na posição 8450 com troca da base citosina por timina, também em região intrônica, é referida pelo mutationtaster como causadora de possível alteração na transcrição proteica. A referência da sua variação é de rs35670475 e conforme o banco de dados dbSNP não apresentaria significância clínica. Apesar de ter sido considerada como polimorfismo não é possível excluir a possibilidade de causar alteração fenotípica. Não foi encontrada descrição desta mutação na literatura (54), não sendo encontrada também no banco de dados ExAC.

A mutação 48377 encontrada em dois pacientes, localizada no exon 6, que desencadeou a troca da base citosina por timina; foi descrita pelo mutationtaster como deletéria e causadora de doença. A mudança da base citosina por timina gerou a mudança do aminoácido tirosina por um codão de terminação (mutação nonsense),

afetando as características da proteína trasncrita. Conforme o banco de dados ExAC, este alelo apresenta frequência de 0,009053. A referência dessa variação é rs144723656 e a referência do transcrito no Genbank é NM_000162 (55) (56) (57). No banco de dados HGMD (The Human Gene Mutation Database) esta mutação está descrita com a referência CM004359 e já foi refereciada na literatura como Y215X, sendo relacionada a importante reduçãoo na atividade da glucoquinase, sendo diagnóstica de MODY GCK (58) (59).

7.3 Análise da casuística materna e neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA.

As gestantes em que foram identificadas com os polimorfismos g.44708C>T e g.8450C>T quando comparadas com as pacientes sem polimorfismo, não apresentaram P-valor com significância estatística referente à avaliação das variáveis idade materna, IMC materno, idade gestacional na resolução da gravidez e peso ao nascimento. Também não foi observada diferença em relação aos níveis de hemoglobina glicosilada, que foram discretamente mais elevados no primeiro grupo. Entretanto, salienta-se que o número limitado de pacientes acometidos com os polimorfismos g.44708C>T no exon 6, e g.8450C>T na região promotora, e com a mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, no gene da glucoquinase; foi fator prejudicial para a análise entre as variáveis e verificação de interferência estatística.

Foi identificada diferença estatística (P-valor =0,0478) em relação à dose diária de insulina prévia à resolução. Entretanto, projeções clínicas ficam restritas considerando-se que apenas uma pacientes fez uso de insulinoterapia no grupo do polimorfismo g.8450C>T, o que poderia ter interferido nestas avaliações.

Referente à paciente portadora da mutação g.48377C>T no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK, foram identificados valores de medianas das variáveis idade e IMC maternos abaixo da mediana no grupo de pacientes não acometidas por esta mutação. Conforme descrição na literatura esta paciente sinalizaria para o rastreio de pacientes MODY-GCK, utilizando-se como parâmetros pacientes DMG com IMC < 30 kg/m e valores de glicemia de jejum ≥ 5,5 mmol/L, com altos valores de sensibilidade e especificidade(23). Foi observado ainda que esta paciente apresentou valores de hemoglobina glicosilada abaixo da mediana dos resultados apresentados nas pacientes não acometidas, indicando bom controle glicêmico durante a gestação. Relata-se que os valores de hemoglobina glicosilada não discriminam adequadamente pacientes com DMG de pacientes com MODY-GCK (60).

O recém-nascido dessa paciente pesou 4160 gramas, peso superior ao da mediana das gestantes não acometidas por nenhuma mutação cuja valor foi de 3360g (P 25 = 3099g e P 25 = 3869g). Lamentavelmente, a amostra de cordão umbilical desse recém-nascido não foi coletada e por consequência não foi realizado sequenciamento genético deste paciente. Entretanto, pressupõe-se que este apresente-se sem alterações referente ao gene da glucoquinase. De acordo com a literatura, em fetos não acometidos de gestantes com alterações no gene da glucoquinase, o platô hiperglicêmico materno decorrente do ajuste superior à normalidade da glicemia materna provoca hiperglicemia fetal com consequente macrossomia fetal. Quando os fetos também são acometidos por alterações no gene GCK, apresentam o mesmo ajuste homeostático elevado para a glicose que suas mães, sendo a hiperglicemia materna interpretada pelo organismo como normoglicemia, o que acarreta em uma não interferência no peso ao nascimento (23).

Os neonatos que apresentaram os polimorfismos g.44708C>T no exon 6 e g.8450C>T na região promotora, e a mutação g.48377C>T, no exon 6 do gene da glucoquinase não apresentaram significância estatística em relação às pacientes não acometidas ao avaliar-se peso ao nascimento e Índice de Apgar no primeiro e quinto minutos. O único desfecho adverso observado foi síndrome do desconforto respiratório em dois recém-nascidos; indicando que apesar da alteração genotípica, não houve implicação clínica nem desfechos fetais e neonatais adversos.

7 Conclusões

Os dados obtidos e analisados no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- Na presente casuística, encontrou-se mutações no gene da glucoquinase em 12 gestantes (9,3%, em relação ao total de 128 gestantes), e em nove neonatos (1,2%, de 72 recém-nascidos em que foi realizado sequenciamento genético).
- Evidenciou-se que estas gestantes e seus neonatos beneficiaram-se do controle glicêmico, não havendo diferença em taxa de desfechos adversos maternos e perinatais em relação ao grupo de pacientes não portadores de alterações moleculares relacionadas a MODY GCK.
- Infere-se que a realização de fluxogramas diagnósticos durante a gestação possa contribuir para melhorar a eficácia na correta classificação do Diabete Mellitus, resultando em intervenções profiláticas e terapêuticas, e interferindo beneficamente na evolução natural da doença em gestantes e em seus neonatos.
- Sugere-se que sejam realizados estudos populacionais para determinação mais precisa da prevalência das alterações moleculares ligadas ao gene da glucoquinase e do impacto do diagnóstico no manejo das pacientes portadoras.

8 Referências

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 1998:539–53.
2. Behrman, Richard E.; Kliegman, Robert M,; Jenson HB. Nelson Textbook of Pediatrics: 16th Edition. 2003.
3. Calderon IMP, Kerche LTRL, Damasceno DC, Rudge MVC. Diabetes and pregnancy: An update of the problem. Annu Rev Biomed Sci. 2007;9:1–11.
4. WHO. Definisi,diagnosis dan klasifikasi diabetes. 1999.
5. American Diabetes Association. Diabetes Mellitus and other categories of description of Diabetes. 2004;27:5–10.
6. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2009;32(SUPPL. 1).
7. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. Med Clin North Am . 2015;99(1):1–16.
8. Ismail-Beigi F. Pathogenesis and glycemic management of type 2 diabetes mellitus: a physiological approach. Arch Iran Med 2012;15(4):239–46.
9. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. Diabet Med. 2002;19(9):708–23.
10. Unger J. Management of diabetes in pregnancy, childhood, and adolescence. Prim Care. Elsevier; 2007;34(4):809–43, vii.
11. Moisés ECD. Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment. Sobrevia L, editor. InTech; 2013.
12. Ministério da Saúde do Brasil. Pré-natal e puerpério - atenção qualificada e humanizada - Manual técnico.
13. Negrato CA, Montenegro RM, Mattar R, Zajdenverg L, Francisco RP V, Pereira BG, et al. Dysglycemias in pregnancy: from diagnosis to treatment. Brazilian consensus statement. Diabetol Metab Syndr. BioMed Central; 2010;2(1):27.
14. Diabetes G. John B . O ’ Sullivan : A Pioneer in the Study of Gestational Diabetes. 1954;943–4.
15. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. 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.

16. Christine E, Moisés D. Multidisciplinary Care of Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus : Non-Pharmacological Strategies to Improve Maternal and Perinatal Outcomes. 2009;
17. Coutinho WF, Silva Júnior WS. Diabetes Care in Brazil. Ann Glob Heal. Elsevier; 2015 ;81(6):735–41.
18. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. J Am Diet Assoc. 2004104(2):255–75.
19. Thanabalasingham G, Owen KR. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). BMJ. 2011;343:d6044.
20. Colom C, Corcoy R. Maturity onset diabetes of the young and pregnancy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010;24(4):605–15.
21. Malecki MT, Mlynarski W. Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease. Diabetes Obes Metab. 2008;10(8):607–16.
22. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia. 2008;51(4):546–53.
23. Chakera AJ, Spyer G, Vincent N, Ellard S, Hattersley AT, Dunne FP. The 0.1% of the population with glucokinase monogenic diabetes can be recognized by clinical characteristics in pregnancy: the Atlantic Diabetes in Pregnancy cohort. Diabetes Care. 2014;37(5):1230–6.
24. MInistério da Saúde. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada - manual técnico. Série A. Normas e Manuais Técnicos\rSérie Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos - Caderno nº 5. 2005. 158 p.
25. Nascer no Brasil - Inquérito nacional sobre parto e nascimento. doi: http://www6.ensp.fiocruz.br/nascerbrasil/
26. Theme Filha MM, Ayers S, Da Gama SGN, Leal MDC. Factors associated with postpartum depressive symptomatology in Brazil: The Birth in Brazil National Research Study, 2011/2012. J Affect Disord. Elsevier; 2016;194:159–67.
27. Kennelly MA, McAuliffe FM. Prediction and Prevention of Gestational Diabetes: an update of recent literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016;202:92–8.
28. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. Diabetes Care. 2007;30(8):2070–6.

29. Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, et al. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. Diabetes Care. 2012;35(4):780–6.
30. Ryckman KK, Spracklen CN, Smith CJ, Robinson JG, Saftlas AF. Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. BJOG. 2015;122(5):643–51.
31. Diabetes & Metabolism - Présentation - EM consulte.doi: http://www.em-consulte.com/article/276425/pdf/maternal-outcome-of-gestational-diabetes-mellitus
32. Griffiths RJ, Vinall PS, Stickland MH, Wales JK. Haemoglobin A1c levels in normal and diabetic pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1987 Mar;24(3):195–200.
33. Jovanovic L, Savas H, Mehta M, Trujillo A, Pettitt DJ. Frequent monitoring of A1C during pregnancy as a treatment tool to guide therapy. Diabetes Care. 2011;34(1):53–4.
34. Kelley KW, Carroll DG, Meyer A. A review of current treatment strategies for gestational diabetes mellitus. Drugs Context. 2015;4:212282.
35. Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. Ann Nutr Metab. Karger Publishers; 2015;66 Suppl 2(Suppl. 2):14–20.
36. Vambergue A, Fajardy I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. World J Diabetes. 2011 ;2(11):196–203.
37. Mitanchez D, Yzydorczyk C, Siddeek B, Boubred F, Benahmed M, Simeoni U. The offspring of the diabetic mother – Short- and long-term implications. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2015;29(2):256–69.
38. Rossi AC, Mullin P, Prefumo F. Prevention, management, and outcomes of macrosomia: a systematic review of literature and meta-analysis. Obstet Gynecol Surv. 2013;68(10):702–9.
39. Lipscomb KR, Gregory K, Shaw K. The outcome of macrosomic infants weighing at least 4500 grams: Los Angeles County + University of Southern California experience. Obstet Gynecol [Internet]. 1995;85(4):558–64.
40. Cheng YW, Sparks TN, Laros RK, Nicholson JM, Caughey AB. Impending macrosomia: will induction of labour modify the risk of caesarean delivery? BJOG. 2012;119(4):402–9.
41. Friesen CD, Miller AM, Rayburn WF. Influence of spontaneous or induced labor on

delivering the macrosomic fetus. Am J Perinatol. 1995;12(1):63–6.
42. Maresh M. Diabetes in pregnancy. Curr Opin Obs Gynecol. Elsevier Ltd; 2001;13(2):103–7.
43. McFarland MB, Trylovich CG, Langer O. Anthropometric differences in macrosomic infants of diabetic and nondiabetic mothers. J Matern Fetal Med.7(6):292–5.
44. Lazer S, Biale Y, Mazor M, Lewenthal H, Insler V. Complications associated with the macrosomic fetus. J Reprod Med. 1986;31(6):501–5.
45. Glinianaia S V, Tennant PWG, Bilous RW, Rankin J, Bell R. HbA(1c) and birthweight in women with pre-conception type 1 and type 2 diabetes: a population-based cohort study. Diabetologia. 2012;55(12):3193–203.
46. Haji-Ebrahim-Tehrani F, Kazemi H, Kordi M. Prevalence and outcome of the macrosomic infants. Acta Med Iran. 2007;45(6):505–9.
47. McFarland L V, Raskin M, Daling JR, Benedetti TJ. Erb/Duchenne's palsy: a consequence of fetal macrosomia and method of delivery. Obstet Gynecol. 1986;68(6):784–8.
48. Dudley DJ. Diabetic-associated stillbirth: incidence, pathophysiology, and prevention. Obstet Gynecol Clin North Am. 2007;34(2):293–307, ix.
49. Cundy T, Gamble G, Townend K, Henley PG, MacPherson P, Roberts AB. Perinatal mortality in Type 2 diabetes mellitus. Diabet Med. 2000;17(1):33–9.
50. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2268574. doi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2268574
51. ExAC Browser. doi: http://exac.broadinstitute.org/variant/7-44189321-A-G
52. Frigeri HR, Martins LT, Auwerter NC, dos Santos-Weiss ICR, Pedrosa FO, de Souza EM, et al. The polymorphism rs2268574 in Glucokinase gene is associated with gestational Diabetes mellitus. Clin Biochem. 2014;47(6):499–500.
53. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. Hum Mutat. 200930(11):1512–26.
54. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs35670475. doi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=35670475
55. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs144723656. doi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=144723656
56. Homo sapiens glucokinase (GCK), transcript variant 1, mRNA - Nucleotide - NCBI

[Internet]. doi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000162

57. ExAC Browser. doi: http://exac.broadinstitute.org/variant/7-44189393-G-A

58. HGMD® gene result. doi: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GCK &accession=CM004359

59. Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, et al. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. Diabetologia. 2000;43(2):250–3.

60. Rudland VL, Hinchcliffe M, Pinner J, Cole S, Mercorella B, Molyneaux L, et al. Identifying Glucokinase Monogenic Diabetes in a Multiethnic Gestational Diabetes Mellitus Cohort: New Pregnancy Screening Criteria and Utility of HbA1c. Diabetes Care. American Diabetes Association; 2016;39(1):50–2.

61. Rosenstein MG, Cheng YW, Snowden JM, Nicholson JM, Doss AE, Caughey AB. The risk of stillbirth and infant death stratified by gestational age in women with gestational diabetes. Am J Obstet Gynecol. 2012;206(4):309.

62. Teramo KA. Obstetric problems in diabetic pregnancy - The role of fetal hypoxia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010;24(4):663-71.

63. Spong CY, Mercer BM, D'alton M, Kilpatrick S, Blackwell S, Saade G. Timing of indicated late-preterm and early-term birth. Obstet Gynecol. 2011;118(2 Pt 1):323-33.

64. Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. Practice Bulletin No. 137: Gestational diabetes mellitus. Obstet Gynecol. 2013 Aug;122(2 Pt 1):406-16.

65. Brown HK, Speechley KN, Macnab J, Natale R, Campbell MK. Maternal, fetal, and placental conditions associated with medically indicated late preterm and early term delivery: a retrospective study.BJOG. 2016;123(5):763-70.

66. Overland EA, Vatten LJ, Eskild A. Pregnancy week at delivery and the risk of shoulder dystocia: a population study of 2,014,956 deliveries. BJOG. 2014;121(1):34-41.

67. Garabedian C, Deruelle P. Delivery (timing, route, peripartum glycemic control) in women with gestational diabetes mellitus. Diabetes Metab. 2010;36(6 Pt 2):515-21.

9 Anexos

ANEXO I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo:	Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos.
Nome da Instituição:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo– HCFMRP-USP Departamento de Ginecologia e Obstetrícia Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Nome completo da paciente: _____
_____

Registro da paciente na instituição: _____

Pesquisadores:	Orientadora: Profa Dra Elaine Christine Dantas Moisés – (16) 3602-2587 Pós-graduanda: Carolina Serri Lépore (FMRP-USP) – (16) 3602-2583

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente Termo de Consentimento Pós-informado tem a finalidade de convidá-la a participar do estudo "**Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos.**" e de solicitar a sua autorização para a coleta de amostra sanguínea, conforme texto a seguir:

A senhora, que apresenta o diagnóstico de Diabetes *Mellitus,* está recebendo assistência pré-natal no ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia do Setor de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), onde será internada no momento oportuno para o parto de seu (sua) filho (a) pela via mais adequada.

Observa-se que algumas pacientes não são adequadamente classificadas quanto ao tipo de Diabetes *Mellitus* que apresentam, pois alguns exames não são feitos rotineiramente. O objetivo deste estudo é realizar exames para analisar as características genéticas relacionadas ao Diabetes *Mellitus* das gestantes atendidas neste ambulatório, assim como de seus neonatos.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, nós iremos colher uma amostra de sangue da veia do seu braço no dia do seu parto, juntamente aos exames de rotina durante a resolução da gestação. Além disso, será coletada amostra do sangue do cordão umbilical, após nascimento do seu filho (a) e saída da placenta, para a realização da avaliação genética do seu filho (a).

O único inconveniente desta pesquisa será a coleta de amostra sanguínea através da punção venosa realizada em seu braço durante a sua admissão no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP . A pesquisa não interferirá na conduta clínica e obstétrica a ser

adotada no caso da senhora e não ocasionará riscos adicionais à senhora e ao (à) seu (sua) filho (a).

Eu me comprometo a identificar os dados coletados a respeito da senhora de modo que garanta o sigilo e a confidencialidade dos mesmos. Para isso os seus registros serão identificados por meio do número do seu prontuário médico. A senhora me passará todos os dados de como posso lhe encontrar e garanto fornecer as informações de seu interesse.

Agradeço a colaboração, colocando-me à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessário.

Atenciosamente,

_____

Carolina Serri Lépore

HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, Telefone (16) 3602-2583

Certificado de Consentimento

Eu, _____, Prontuário: _____, moradora na rua _____, nº _____, bairro _____, cidade _____, telefone _____, abaixo assinado, declaro que os objetivos e detalhes deste estudo foram explicados a mim. Eu entendo que não sou obrigada a participar do estudo e que posso desistir de continuar nele a qualquer momento, sem que isso prejudique meu atendimento médico. Meu nome não será utilizado nos documentos deste estudo e a confidencialidade dos meus registros médico garantida.

Tendo recebido as informações acima, concordo em participar do estudo "Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos" e estou ciente da liberdade de me expressar durante o mesmo, favorável ou contrariamente aos procedimentos e de desistir do estudo em qualquer fase do mesmo.

Declaro que em ...../...../..... concordei voluntariamente em participar do projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informado de todos os detalhes.

Ribeirão Preto, _____de _____de _____.

_____ _____

Assinatura da paciente Assinatura do responsável legal (se aplicável)

ANEXO II: Aprovação da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 02 de maio de 2013.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Elaine Christine Dantas Moisés

Prezada Professora,

O projeto intitulado "Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (*Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY*) em gestantes e neonatos", protocolado sob nº 423 de sua autoria foi analisado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Informamos que o projeto foi APROVADO no dia 02/05/13 para ser desenvolvido em nosso Departamento, devendo ser enviado à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para análise, antes do início da coleta de dados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira
Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

ANEXO III: Aprovação do orçamento pela Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UPC HCFMRP - USP

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC USP - RIBEIRÃO

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 02 de Maio 2013.

Ilustríssima Senhora
Dr.ª Marcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Sistema UPC nº 6996

Senhora Coordenadora,
Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado
Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes de adulto de início na juventude (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.
O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) departamento de ginecologia e obstetrícia

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.
O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi aprovado.

Equipe Técnica UPC
André Oliveira

Atenciosamente,

Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

André Oliveira
Auxiliar do Trabalho Científico
Matrícula 5148

Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:

Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)

Chefe do Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada a assinatura do seguinte.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone: (16) 3602-2956 FAX: 3602-2956

ANEXO IV: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do polimorfismo genético associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) em gestantes e neonatos

Pesquisador: Carolina Serri Lépore

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 16624013.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 402.873

Data da Relatoria: 27/08/2013

Apresentação do Projeto:

Diabetes Mellitus é a alteração metabólica mais comum na gestação, com prevalência variável de acordo com a população e métodos diagnósticos. Diabetes monogenética ou Diabetes do adulto de início no jovem (Maturity-Onset Diabetes of the Young - MODY) consiste em um subtipo ocasionado por defeito primário na secreção de insulina determinado por herança autossômica dominante, sendo responsável por aproximadamente 1 a 2% dos casos. O diagnóstico genético de gestantes e neonatos acometidos pode propiciar manejo específico, possibilitando melhor prognóstico evolutivo da doença em curto e longo prazo. Objetivos: Analisar os polimorfismos dos genes envolvidos na patogenia do MODY em gestantes com diagnóstico Diabetes Mellitus e seus neonatos. Metodologia: Estudo transversal, com amostragem consecutiva, sendo incluídas aproximadamente 400 gestantes diabéticas em seguimento no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de agosto de 2013 a julho de 2014. Amostras sanguíneas maternas e de cordão umbilical serão colhidas no momento do parto e enviadas para extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de polimorfismos genéticos. Resultados esperados: A determinação da prevalência de tais polimorfismos genéticos na população de gestantes e neonatos permitirá a estruturação de protocolos clínicos de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

rastreamento durante o pré-natal, além de permitir intervenções profiláticas e terapêuticas precoces em crianças, interferindo beneficamente na evolução natural da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos

Avaliar o perfil genético das gestantes diabéticas, assim como de seus neonatos, atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Objetivos Secundários:

Avaliar o perfil genético das gestantes diabéticas e de seus neonatos.

Avaliar a prevalência das formas de DM tipo MODY entre as gestantes.

Avaliar as taxas de complicações maternas e perinatais de gestantes com diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo MODY em comparação com os outros tipos.

Comparar o peso ao nascimento e as taxas de complicações perinatais de neonatos portadores de marcadores genéticos de Diabetes Mellitus tipo MODY em relação a neonatos não acometidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de hematoma ou flebite no local da punção venosa periférica materna. Não há riscos relacionados aos neonatos, já que as amostras serão realizadas após o nascimento, através da coleta de sangue de cordão umbilical e fragmentos de placenta.

Benefícios:

Considerando-se a elevada prevalência de Diabetes Mellitus em gestantes e a falta de dados sobre o perfilgenético destas pacientes e de seus recém-nascidos, justifica-se a realização deste estudo para incrementar os dados da literatura, propiciando a estruturação de protocolos clínicos de rastreamentos durante o prénatal. Ao mesmo tempo que permitirá o diagnóstico ao nascer de crianças portadoras de marcadores genéticos de Diabetes Mellitus tipo MODY, propiciando intervenções profiláticas e terapêuticas precoces, interferindo beneficamente na evolução natural da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa visa investigar mutações genéticas associadas com Diabetes Mellitus em mulheres gravidas com tem esta doença logo através de coletas de sangue logo após o parto. Será analisado

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

DNA de sangue das mulheres e de sangue do cordão umbilical. Fora a coleta de uma amostra de sangue, não haverá interferência no tratamento do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi refeito, atendendo o pedido de mudanças sugeridas no parecer anterior.

Recomendações:

A pesquisa deve atender aos fundamentos éticos e científicos pertinentes de acordo com a Resolução CNS nº 466/2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa, assim como o TCLE, versão 3.0 datada em 26/08/13 podem ser considerados aprovados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 23 de Setembro de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO V: QIAamp® DNA Mini and Blood Mini kit

PROTOCOLO EXTRAÇÃO DE DNA – utilizando centrífuga comum

Sangue total: 200 ul – (~ 4 a 12 ug)

1. Pipetar 10 ul de proteinase K em um eppendorf de 1,5 ml
2. Adicionar 200 ul de sangue total
3. Adicionar 200 ul de tampão AL e vortexar por 15´´
4. Incubar à 56 °C por 10 min
5. Centrifugar rapidamente para retirar gotas da tampa do tubo
6. Adicionar 200 ul de etanol absoluto e vortexar por 15´´
7. Centrifugar rapidamente para retirar gotas da tampa do tubo
8. Aplicar cuidadosamente a mistura do passo 6 na coluna QIAamp e centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Coloque a coluna em um tubo coletor novo e descarte o tubo contendo o filtrado
9. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 ul de tampão AW1, tampe e centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Coloque a coluna em um tubo coletor novo e descarte o tubo contendo o filtrado
10. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 ul de tampão AW2, tampe e centrifugar a 14000 rpm por 4 min. Coloque a coluna em um tubo coletor novo e descarte o tubo contendo o filtrado.
11. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min. Identificar o tubo de 1,5 ml novo com o número da amostra. Corte a tampa da coluna e coloque-a no tubo identificado. Adicionar 200 ul de AE ou água para injeção. Aguardar de 1 a 2 min e centrifugar a 12000 rpm por 2 min.
12. Quantificar o DNA eluído

ANEXO VI: PROTOCOLO DE PRECIPITAÇÃO POR ETANOL / EDTA / ACETATO DE SÓDIO

10 µL de reações de sequenciamento

Tirar as amostras do termociclador e dar um leve spin.

Ligar a centrífuga e acionar a opção FASTCOOL para quando colocar a placa nela, já estar a 4 graus.

1. Adicionar 1µL de EDTA 125mM em cada well. NOTA: Assegure-se que o EDTA esteja no fundo do well.
2. Adicionar 1µL de acetato de sódio 3M em cada well. NOTA: Assegure-se que o acetato esteja no fundo do well.
3. Adicionar 25 µL de Etanol 100% em cada well.
4. Selar a placa com septa e inverter 4x.
5. Incubar em temperatura ambiente por 15 minutos.
6. Colocar a placa na centrífuga a 3000 rpm por 30 minutos a 4ºC. Seguir para o próximo passo imediatamente. Se isto não for possível, assim que voltar ao experimento, dê um spin na placa por mais 2 minutos imediatamente antes de iniciar o próximo passo.
7. Retirar a septa da placa e invertê-la com papel absorvente até que o papel não esteja mais úmido.
8. Adicionar 35µL de etanol 70% gelado.
9. Recolocar a septa
10. Colocar novamente na centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos.
11. Retirar a septa da placa e invertê-la com papel absorvente até que o papel não esteja mais úmido.
12. Para continuar, ressuspender as amostras no tampão de injeção (FORMAMIDA)

Para estocar, cobrir com folha de alumínio e armazenar à temperatura ambiente.

Seqüenciador: ABI 3500 XL – serviço prestado pelo **Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) -**

Hemocentro Ribeirão Preto.

ANEXO VI: ARTIGO

Estudo de alterações moleculares no gene da Glucoquinase (GCK) associado ao diagnóstico de diabetes do adulto de início no jovem (*Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY*) em gestantes e neonatos

Resumo

Introdução: Diabetes Mellitus é a alteração metabólica mais comum na gestação, com prevalência variável de acordo com a população e métodos diagnósticos. Diabetes monogenética ou Diabetes do adulto de início no jovem (Maturity-Onset Diabetes of the Young - MODY) consiste em um subtipo ocasionado por defeito primário na secreção de insulina determinado por herança autossômica dominante, sendo responsável por aproximadamente 1 a 2% dos casos. O diagnóstico genético de gestantes e neonatos acometidos pode propiciar manejo específico, possibilitando melhor prognóstico evolutivo da doença em curto e longo prazo. *Objetivos:* Analisar alterações moleculares do gene GCK em gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* e em seus neonatos. *Casuística e Métodos:* Foram coletadas 200 amostras (128 gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* atendidas no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP; e 72 neonatos destas respectivas pacientes). Foram coletados 05 mL de sangue venoso materno e da veia umbilical após o parto e enviadas para extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de alterações moleculares no gene GCK. *Resultados:* Do total de 200 amostras (128 maternas e de 72 neonatos), foram encontradas alterações em 21 (10,6 %), sendo 12 amostras maternas (6,0 %) e 9 amostras de nenonatos (4,5 %). Observou-se ainda que um neonato apresentou duas mutações diferentes, e que foi encontrada a mesma mutação em 4 binômios materno-fetais. Através do sequenciamento do DNA, foram identificados dois polimorfismos e uma mutação deletéria diagnóstica de MODY GCK. *Conclusões:* Os dados desse estudo permitem concluir que a realização de uma seleção de pacientes com base nos critérios fenotípicos do MODY GCK, resultam em maior chance de diagnóstico de alterações no gene da glucoquinase e propiciam intervenções profiláticas e terapêuticas para o binômio materno-fetal, interferindo beneficamente na evolução natural da doença**.**

Introdução

O Diabete *Mellitus* (DM) consiste em uma síndrome metabólica crônica, caracterizada pela hiperglicemia como sintoma principal; não é uma entidade única e sim um grupo heterogêneo de distúrbios, nos quais existem distintos modelos genéticos, bem como outros mecanismos etiológicos e fisiopatológicos que induzem à redução da tolerância à glicose (1) (2).

A disglicemia é a alteração metabólica mais comum na gestação. A prevalência de disglicemia durante a gravidez pode ser de até 13%, correspondendo a 0,1% de diabetes tipo 1 (DM1), 2 a 3% de diabetes tipo 2 (DM2) e 12 a 13 de diabetes gestacional (DMG), dependendo dos critérios diagnósticos utilizados e da população estudada (2).

O Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como intolerância à glicose, de gravidade variável, que aparece ou é primeiramente diagnosticada durante a gravidez (3). Sua fisiopatologia consiste em aumento progressivo de resistência a insulina durante a gestação (4). Este é decorrente ao efeito antagônico do hormônio lactogênio - placentário produzido em níveis elevados, efeito anti-insulínico ocasionado pelo cortisol, estriol e progesterona produzidos pela placenta; e pelo aumento no catabolismo da insulina na placenta e rins (5).

O manejo do Diabetes *mellitus* durante a gestação é direcionado no sentido de supervisionar e controlar o metabolismo glicêmico, evitando-se a hiperglicemia, que está correlacionada ao aumento dos riscos maternos e perinatais.

Diabetes monogenética ou MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) consiste em um subtipo do *Diabetes Mellitus* caracterizado por início entre as idades de 9 a 25 anos ocasionado por defeito primário na secreção de insulina, ocorre transmissão por herança autossômica dominante (AD); e corresponde a aproximadamente 1 a 2% dos pacientes com DM (6). Atualmente, são conhecidos dez defeitos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento de MODY; o diagnóstico é realizado através do sequenciamento de DNA (7).

O MODY GCK corresponde a 1% das pacientes com DMG (8). Ocorre por alteração no gene da glucoquinase, chave enzimática reguladora das células β pancreáticas (9); com redução de sua atividade, e resultando em hiperglicemia leve e crônica com leve alteração nos níveis de glicemia em jejum e da hemoglobina glicosilada, com boa resposta a dieta e atividade física. Em consequência do adequado controle metabólico, as lesões microvasculares são raras. Por outro lado, se associado a outros fatores de risco como obesidade, o processo para desenvolvimento de DM 2 ocorre superposto ao defeito na glucoquinase; impondo-se nesse ponto o tratamento farmacológico (10).

Casuística e Métodos

Pacientes e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da

Universidade de São Paulo. Todas as pacientes que participaram do estudo foram informadas sobre o protocolo de pesquisa executado, sendo obtido o consentimento livre e esclarecido. Ressalta-se que esta pesquisa não interferiu na conduta clínica adotada nos casos.

A casuística foi formada por 128 gestantes com diagnóstico de Diabetes *Mellitus* atendidas no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP; e 72 neonatos destas respectivas pacientes.

Os critérios de inclusão adotados foram: gestantes diabéticas que fizeram seguimento no Ambulatório de Endocrinopatias em Obstetrícia (AENDOB) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP. Os critérios de exclusão foram: pacientes que não apresentaram diagnóstico de Diabetes *Mellitus*; e/ou que não concordaram em participar do estudo ou não assinaram o "Termo de consentimento pós-informado". Os critérios de descontinuidade foram: pacientes que desistiram de sua participação ao longo do estudo.

Dados epidemiológicos foram coletados em protocolo-padrão, avaliando os parâmetros de idade, hábitos de vida, uso de medicamentos, dados antropométricos, paridade, idade gestacional, informações ultra-sonográficas sobre alterações fetais e/ou placentárias, complicações maternas ou fetais durante o pré-natal, complicações perinatais, dados sobre os recém-nascidos no nascimento como peso, estatura e Índice de Apgar.

Coleta de amostras biológicas

Foram coletados 05 mL de sangue venoso materno e da veia umbilical após o parto e enviadas para extração de DNA.

Extração de DNA e PCR convencional

O DNA genômico foi extraído do sangue total congelado por meio do kit QIAmp DNA Blood mini kit (cat 51106 - QIAGEN, Germantown, USA) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA), diluído na concentração de 20 ng/µl para ser utilizado nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) dos exons do gene GCK. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, com concentração de cloreto de magnésio de 1,5mM, 15 pmoles de primers e 1 unidade de taq polimerase. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C,40 ciclos (95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72° por 1 minuto) e extensão final de 10 minutos a 72°C. As sequencias dos primers *Foward* e *Reverse* de cada um dos exons encontram-se na tabela a seguir. Todos os primers foram sintetizados pela empresa Invitrogen e foram desenhados com a cauda M13 com sequencia (M13F– TGTAAAACGACGGCCAGT, e M13R – CAGGAAACAGCTATGACC) para as posteriores reações de sequenciamento.

Tabela 1: Sequências dos primers *Foward* e *Reverse* dos exons

EXON	DNA conc. (ng/µl)	Forward and Reverse Primer sequences	Size (bp)
1	10	GCKex1F and GCKex1R TCCACTTCAGAAGCCTACTG TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	195
2	10	GCKex2F and GCKex2R GGGGTCAGAAGACAGAAGGA AGAGGAGCCAAGGGTGAGA	511
3	10	GCKex3F and GCKex3R TAATATCCGGGCTAGTACC CTGAGATCCTGCATGGCCTTG	331
4	10	GCKex4F and GCKex4R TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG	308
5	10	GCKex5F and GCKex5R TCACTCACGGCAAAGCA TGGAAGCCAAGGAGAAAGG	634
6	10	GCKex6F and GCKex6R TGAGAGACGCTATCAAACG GGCTCTGCTCTGACATCACC	358
7	10	GCKex7F and GCKex7R CCATTGTTCCAGACAAAGCA CAAGCCATTATCTGCAATG	436
8	10	GCKex8F and GCKex8R CATTTCTAAAGCTCGGCTCAT TGTCCTGTCCCAGCCTCCT	634
9	10	GCKex9F and GCKex9R CTTTGGCTGGGTGAGGTG AGGGGGACGAGAAGAGGAC	574
10	10	GCKex10F and GCKex10R CCTCTTCTCGTCCCCCTTG ATGGAGGCCTGGGTGCTGT	360
PROM	10	GCKexpromF and GCKexpromR GCTCGGCATTTCCTGCT AGTCAGGCTGCCAAGAGGT 7	512

Os produtos de PCR de cada um dos exons foram checados por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo e, após verificação de qualidade para o sequenciamento procedeu-se à reação de sequenciamento com os primers M13 foward e reverse citados anteriormente.

Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 cyclesequencing kit (cat 4337457 – Life Technologies, Waltham - USA, segundo as instruções do fabricante,) e os primers M13 foward e reverse. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas e levadas ao Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Do total de 200 amostras, 170 foram sequenciadas no aparelho ABI3500XL (AppliedBiosystems, Waltham - USA); e as 30 demais amostras no Sequenciador de Nova Geração MiSeq, utilizando o kit MiSeq V2 (500 ciclos) com preparo dos painéis seguindo a metodologia TruSeq Custom Amplicon (Illumina).

Análise

As sequências geradas foram analisadas com o programa CodonCodeAligner v5.1.4 (Codon Code Corporation (http://www.codoncode.com), com ênfase na região de exon dos produtos de PCR e as alterações encontradas verificadas com a ferramenta mutationtaster (http://www.mutationtaster.org/), e posteriormente correlacionadas com os aspectos clínicos dos pacientes.

Resultados

Caracterização da amostra materna

Foram avaliadas 128 gestantes que realizaram acompanhamento pré-natal no Ambulatório de Gestação do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Os exames laboratoriais, realizados para a avaliação funcional dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino, não mostraram importantes alterações em relação

à normalidade, exceto pela avaliação do metabolismo glicídico no grupo de diabéticas.

Das 128 gestantes avaliadas, apenas 16 apresentaram diagnóstico de Diabetes Mellitus isolado (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição do número de casos dee pacientes com Diabetes *Mellitus* Gestacional, segundo comorbidades associadas

Patologia materna	N	%
Hipertensão arterial sistêmica	24	21,4
Hipertensão arterial gestacional	13	11,6
Obesidade	71	63,4
Dislipidemia	22	19,6
Pré – eclâmpsia	1	0,9
Anemia materna	4	3,6
Hipotireoidismo	11	9,8
Hipertireoidismo	3	2,7
Síndrome dos ovários policísticos	2	1,8
Infecção urinária de repetição	1	0,9
Outros*	**52**	**46,4**
Total de casos avaliados	**128**	**100**

***Outros:** epilepsia, Deficiência de proteína S, Mutação do fator V de Leiden com Trombose Venosa Profunda, Asma, Depressão grave, Condilomatose, Leiomiomatose, Aborto de repetição, Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide, Útero bicorno, Colonização *S. Agalactiae,* Idade Materna Avançada, Incompetência Istmo-cervical, Neoplasia Intracervical e nefrolitíase.

Caracterização da amostra dos recém-nascidos

Foram avaliados 72 neonatos, a mediana do peso ao nascimento foi de 3365 gramas, 23 recém-nascidos foram considerados macrossômicos (19,0%). A mediana da estatura foi de 49,5 centímetros e os percentis 25 e 75 de 48 e 50,5 centímetros. A mediana dos índices da escala de Apgar no primeiro minuto foi de 9 e no quinto 10; e as percentis 25 e 75 foram respectivamente de 7e 9; 9 e 10 (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição de peso ao nascimento.

	Mediana	P25 – P75
Peso (gramas)	3365	3115 - 3870
Estatura (centímetros)	49,5	48 – 50,5
Índice de Apgar no primeiro minuto	9	7 -9
Índice de Apgar no quinto minuto	10	9 - 10
Total	**121**	**100**

No período neonatal precoce, 12 recém-nascidos apresentaram hipoglicemia (41,3%), nove desenvolveram icterícia com necessidade de tratamento com fototerapia (31,0%), um neonato desenvolveu policitemia (3,4%), cinco apresentaram Síndrome do desconforto respiratório (17,2%), um recém-nascido necessitou de internação em Centro de Terapia Intensiva (3,4%) e um paciente evoluiu para óbito neonatal (3,4%).

Resultados do sequenciamento do DNA.

Do total de 200 amostras (128 maternas e de 72 neonatos), foram encontradas alterações em 21 (10,6 %), sendo 12 amostras maternas (6,0 %) e 9 amostras de neonatos (4,5 %). Observou-se ainda que um neonato apresentou duas mutações diferentes, e que foi encontrada a mesma mutação em 4 binômios materno-fetais. Através do sequenciamento do DNA.

Foram identificados dois polimorfismos e uma mutação deletéria diagnóstica de MODY GCK (Tabela 4).

Tabela 4: Alterações no DNA baseado no Ensemble transcript ID – ENST 00000403799

Número de pacientes	Mutações no DNA	Exon
13	Polimorfismo heterozigoto g.44708C>T	6
7	Polimorfismo heterozigoto g.8450C>T	Região promotora
2	Mutação provavelmente deletéria g.48377C>T	6

Caracterização da casuística materna conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA

Das 128 gestantes incluídas neste estudo, foi encontrado polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T, exon 6 em seis pacientes, polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T, região promotora em cinco pacientes e mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK em uma gestante.

Referente aos polimorfismos g.44708C>T identificado no exon 6, e g.8450C>T na região promotora do gene da glucoquinase; ao avaliarmos as variáveis idade materna, IMC materno, idade gestacional na resolução da gravidez, e peso ao nascimento; observou-se os valores de mediana e percentis 25 e 75 encontraram-se semelhantes com os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas pacientes em que não foi identificada nenhum tipo de alteração no gene GCK, e que o P-valor não apresentou relevância estatística.

Quanto à variável Hemoglobina glicosilada, observa-se que os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas pacientes com polimorfismo encontram-se discretamente superiores que os mesmos valores nas pacientes em que não identificou-se nenhum tipo de polimorfismo; entretanto, o P-valor não apresentou significância estatística .

Relevante à variável dose diária de insulina prévia à resolução, foi identificado P-valor de 0,0478 com presença de relevância estatística, e valores de mediana e percentis 25 e 75 mais elevados em comparação com os valores de dose diária de insulina prévia à resolução nas pacientes sem polimorfismos no gene da glucoquinase .

A mutação g.48377C>T, diagnóstica de MODY-GCK, identificada no exon 6 do gene da glucoquinase, foi identificada em apenas uma gestante. Essa paciente possuía idade de 22 anos e IMC de 27,7 Kg/m^2, menores que os valores de mediana e percentis 25 e 75 nas gestantes que não apresentaram alterações no gene da glucoquinase (31 anos e 33,5 27,7 Kg/m^2, respectivamente). Seu controle glicêmico foi alcançado durante o pré-natal com dose total de insulina prévia ao parto de 38 UI. O valor de hemoglobina glicosilada foi de 4,8%, sendo menor que os valores de mediana e percentis 25 e 75 das gestantes que não apresentaram mutação. A resolução da gestação ocorreu via parto vaginal com 40,2 semanas de idade gestacional, não

ocorrendo complicações no período puerperal. Contudo, o peso ao nascer da criança foi de 4160 g, sendo superior ao da mediana e percentis 25 e 75 das gestantes que não apresentaram mutação.

Caracterização da casuística neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA.

Dos 72 recém-nascidos genotipados neste estudo, foi encontrado polimorfismo heterozigoto, g.44708C>T no exon 6 em sete pacientes, polimorfismo heterozigoto, g.8450C>T na região promotora do gene da glucoquinase em dois recém-nascidos; e um destes neonatos também apresentou mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK.

Ao comparar-se a variável peso ao nascimento, os pacientes que apresentaram o polimorfismo g.44708C>T identificado no exon 6 do gene da glucoquinase, observou-se que os valores de mediana e percentis 25 e 75 encontraram-se superiores aos dos pacientes sem alterações no gene da glucoquinase e aos pacientes com polimorfismo g.8450C>T na região promotora do gene GCK; entretanto não foi identificada significância estatística (P-valor de 0,6457). Quanto às variáveis Apgar de primeiro e quinto minutos, não houve diferenças entre os valores de mediana e percentis 25 e 75, e P-valor entre os pacientes com polimorfismo e os não acometidos .

Em relação às variáveis tocotraumatismo, hipoglicemia, icterícia, policitemia, hipocalcemia, Síndrome de Desconforto Respiratório, óbito neonatal e internação em Centro de terapia intensiva; não identificou-se significância estatística (P-valor) entre os pacientes com polimorfismo g.44708C>T, polimorfismo g.8450C>T e entre os pacientes sem acometimento do gene na glucoquinase. O único desfecho neonatal adverso encontrado entre os pacientes com os polimorfismos g.44708C>T e g.8450C>T foi Síndrome de Desconforto Respiratório em apenas um paciente em cada .

Quanto ao recém-nascido em que foi identificada a mutação g.48377C>T, no exon 6 do gene GCK; apresentou Índice de Apgar de primeiro e quinto minutos de 9 e 10, respectivamente, peso ao nascer de 4105,0 gramas e não decorreu com intercorrências no período neonatal. Ao compararmos com os pacientes não acometidos por alterações no gene da glucoquinase, observou-se os valores de mediana e percentis 25 e 75 foram superiores em relação à variável peso ao nascimento, e semelhantes quanto às variáveis Apgar de primeiro e quinto minutos. Ademais, este neonato acometido com a mutação g.48377C>T, não apresentou os defechos tocotraumatismo, hipoglicemia, icterícia, hipocalcemia, policitemia, Síndrome de Desconforto Respiratório, não foi encaminhado para Centro de terapia intensiva e não evoluiu para óbito no período neonatal.

Discussão

Caracterização das casuísticas materna e neonatal

A gestantes incluídas neste estudo fizeram acompanhamento de pré-natal no Ambulatório de

Gestação de Alto Risco, sendo que apenas sete pacientes tiveram seus partos em outro local que não o Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A mediana do número total de consultas das pacientes durante o pré-natal foi considerada adequada, de acordo com os critérios estabelecidos para pré-natal de um modo geral pelo Manual Técnico Pré-natal e Puerpério do Ministério da Saúde (2015) que prevê um mínimo de 6 consultas de pré-natal, sendo pelo menos uma no primeiro, duas no segundo e três no terceiro trimestre gestacional (11).

A idade mediana das pacientes foi de 31 anos, ligeiramente superior à encontrada em pesquisas brasileiras populacionais em gestantes que variaram de 25,6 a 25,7 anos de idade (12) (13) (Nascer no Brasil - 2012).

Quanto à paridade, 27 (21,1%) pacientes eram primigestas, 38 (29,2%) eram secundigestas e 63 (49,2%) tinham três ou mais gestações anteriores; portanto a taxa de multiparidade, considerando três ou mais gestações anteriores, mostrou-se maior quando comparada com a pesquisa Nascer no Brasil de 2012, que foi de 10,4 % (12). Esta pesquisa foi um estudo nacional de base hospitalar, que incluiu durante o período de fevereiro de 2011 a julho de 2012, 24.197 puérperas e seus recém-nascidos. Considerando a mesma pesquisa, nossa taxa de pacientes tabagistas foi semelhante, já que encontramos 6,2% de gestantes que referiram fumar cigarros durante a gestação, similar a 7,0% descrito na pesquisa acima (13). Apenas uma gestante referiu etilismo e drogadição durante a gravidez

Quanto ao Índice de massa corporal (IMC), apenas 21% delas apresentaram-se na faixa considerada ideal e 79% das pacientes apresentavam-se entre sobrepeso e algum grau de obesidade. Conforme dados da literatura, ocorre aumento do risco em 4 a 8 vezes de gestantes obesas em desenvolver DMG (15) (16). Ademais, obesidade e DMG estão associados como fatores independentes e ainda com maior impacto quando combinados com macrossomia fetal e desenvolvimento de pré-eclâmpsia (17). Na nossa casuística, 26,9% das gestantes desenvolveram pré-eclâmpsia.

Dentre as outras comorbidades mais prevalentes, esteve a dislipidemia (19,6%); em especial a hipertrigliceridemia, que é associada à resistência à insulina nas pacientes com DMG (18); e as intercorrências hipertensivas (hipertensão arterial crônica, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia) que totalizaram 30,9% das comorbidades associadas e que estão correlacionadas com os níveis glicêmicos no momento do diagnóstico do DMG e após instituição do tratamento (19).

Os valores do Teste de tolerância oral à glicose apresentaram valores de mediana acima do esperado em todas as medidas corroborando o diagnóstico de DMG; entretanto, os resultados de hemoglobina glicosilada encontraram-se dentro de valores aceitáveis, indicando controle adequado durante o pré-natal. De acordo com a literatura, a avaliação através da hemoglobina glicosilada é um método auxiliar

eficaz em traduzir o controle glicêmico durante a gestação (20)(21) e valores abaixo de 6.0 % podem sem atingidos com o manejo do DMG sem causar hipoglicemia (22). Além dos resultados do perfil glicêmico, a avaliação laboratorial das gestantes encontrou-se com resultados normais de maneira uniforme.

Durante o tratamento das gestantes, 56,3% das pacientes atingiram valores adequados de glicemia pré e pós-prandiais somente com acompanhamento nutricional, realização de dieta e mudança do estilo de vida; o que representou índices abaixo dos estipulados pela ADA (American Diabetes Association) de 70 a 89% (23). Enquanto 43,7% necessitaram de tratamento farmacológico complementar (42,9% com insulinoterapia e 0,78% com hipoglicemiantes orais). A mediana da idade gestacional de inicio da insulinoterapia foi de 29,4 semanas; e é descrito que os desfechos gestacionais são similares quando o tratamento é iniciado entre 24 a 29 semanas ou acima de 30 semanas de idade gestacional (22).

No nosso grupo de pacientes, um importante desfecho gestacional foi a taxa de macrossomia (19%) que esteve dentro do descrito na literatura de 15 a 45% (18) 34. Outras complicações foram polidrâmnio (46%) e óbito fetal (8,0%) e restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) (4%). A RCIU está menos associada com gestações diabéticas, mas é descrita com pacientes com complicações vasculares e má perfusão placentária, provavelmente decorrente dos índices glicêmicos já aumentados no primeiro trimestre que interfeririam na placentação adequada (7) (10).

Macrossomia fetal está relacionada ao aumento das induções de trabalho de parto e de partos operatórios (cesarianas ou vaginais instrumentalizados), e dos partos cesariana em caráter de urgência (9) (35). Na nossa casuística os trabalhos de partos induzidos (74,5%) e as resoluções via cesariana (59,2%) foram maioria, e 60,6% das resoluções via alta foram em caráter de urgência.

Descreve-se que as induções de parto próximo ao termo tem sido uma alternativa para evitar macrossomia fetal e suas complicações; e que a indicação de resolução deve pesar a idade gestacional, salientando-se que a maturidade pulmonar fetal em gestações diabéticas é mais lenta e ocorre próximo a 38.5 semanas; e o Índice de Bishop, que quando ≥6 apresenta maior taxa de sucesso e menor indicação de cesáreas por falha de indução (8) (13).

No nosso estudo, de 70 pacientes em que foi indicada a indução do trabalho de parto, apenas 30 pacientes (42,8%) teve evolução para parto normal. A mediana da idade gestacional nas induções foi de 39.2 semanas, e os Percentis 25 - 75 foram de 39.0 – 40.0 semanas. Apenas seis pacientes tiveram sua indução de trabalho de parto iniciada antes de 38 semanas e duas das indicações foram oligoâmnio e corioamniorrexe prematura pré-termo.

A taxa encontrada de resoluções via alta no nosso estudo foi comparativamente maior à descrita no Brasil em pacientes

com risco obstétrico habitual de 45,5% (12); e semelhante às taxas mundiais para pacientes com DMG de acima de 50% (26).

Apenas 4,9% das gestantes apresentaram complicações no período puerperal e todas tiveram alta hospitalar acompanhadas de seus recém-nascidos.

Quanto aos dados dos recém-nascidos, a mediana do peso ao nascimento foi de 3365 gramas, e 23 recém-nascidos foram considerados macrossômicos (19,0%). A mediana da estatura foi de 49,5 centímetros e os percentis 25 e 75 de 48 e 50,5 centímetros. Sabe-se que o risco de recém-nascidos grandes para a idade gestacional é três vezes maior em gestações com diabetes em comparação a gestações normais (24). Nas gestações diabéticas, os fetos macrossômicos desenvolvem um padrão de supercrescimento, que resulta em deposição de gordura subcutânea na região abdominal e interescapular (37). De acordo com a Hipótese Modificada de Pedersen, a fisiopatologia da macrossomia fetal decorre da hiperinsulinemia e hiperglicemia fetais decorrente da hiperglicemia materna, levando ao acúmulo de tecido adiposo fetal (24).

Ademais, fetos macrossômicos estão relacionados a complicações durante o trabalho de parto, cesarianas de emergência e atonia uterina pós-parto (28). Na nossa casuística, mais da metade das cesarianas foram em caráter de urgencia (60,6%), 12 (16,9%) indicações de resolução via alta foram devido a falha de induçao, dez (14,0%) por parade secundária da dilatação e em seis (8,4%) por feto grande para a idade gestacional. Apenas uma paciente apresentou atonia com sangramento vaginal aumentado no pós-parto, o recém-nascido desta paciente pesou 4.060g e teve score no Índice de Apgar de 8/9 no primeiro e quinto minutos. Descreve-se na literatura que o risco de hemorragia pós-parto e de lesões do canal de parto aumenta de três a cinco vezes nos casos de fetos macrossômicos (29).

Sabe-se que o Índice de Apgar é afetado por muitos fatores, dentre eles a idade gestacional, medicamentos maternos, reanimação cardiorrespiratória e condições neurológicas; e apesar de não ser um preditor isolado de mobidade e mortalidade perinatal, quando devidamente aplicado é capaz de fornecer as condições do neonato imediatamente após o nascimento; além disso, valores no quinto minuto acima de 7 afastam risco de encefalopatia neonatal. No nosso estudo, a mediana no primeiro minuto foi de 9 e no quinto minuto de 10, sendo os percentis 25 e 75 foram respectivamente de 7 e 9; 9 e 10, indicando boa vitalidade pós-natal (30).

Quanto às complicações perinatais decorrentes da macrossomia, descreve-se que fetos ao nascimento com peso acima de 4.500 g apresentam risco seis vezes maior de trauma decorrente do parto e 20 vezes maior de lesão de plexo braquial (41) (42). No nosso contingente apenas um parto teve como complicação distócia de ombro; neste caso o neonato pesou 4.120 g e teve score no Índice de Apgar de 5/8 no primeiro e quinto minutos, e não apresentou outras complicações durante a internaçao.

Ainda no quesito das complicações perinatais, os mais

prevalentes são a hipoglicemia neonatal decorrente da hiperinsulinemia fetal reativa à hiperglicemia materna; a policitemia que decorre do maior aporte necessário de oxigênio aos fetos macrossômicos cursando com aumento da eritropoiese; e da icterícia neonatal decorrente da clivagem dessas hemácias, e também devido à prematuridade (38). Entre nossos pacientes, 12 recém nascidos apresentaram hipoglicemia (41,3%), nove desenvolveram icterícia com necessidade de tratamento com fototerapia (31,0%), um neonato desenvolveu policitemia (3,4%).

Os neonatos de mães diabéticas apresentam maior risco de desenvolvimento de síndrome da angústia respiratória, sendo responsável pelas internações em unidades de terapia intensiva (10). Entre os recém-nascidos avaliados no estudo, cinco apresentaram Síndrome do desconforto respiratório (17,2%), e um recém-nascido necessitou de internação em Centro de Terapia Intensiva (3,4%).

O risco de morte perinatal em pacientes com DMG é ligeiramente menor do que am pacientes com diabetes pré – gestacional; e nas gestações com DM tipo 2 se deve principalmente a Síndrome do desconforto respiratório e a corioamnionite (43). Na nossa casuística tivemos dois óbitos fetais e um óbito neonatal.

Avaliação do sequenciamento do DNA

Quanto à primeira mutação encontrada, na posição 44708, com troca da base citosina por timina; após checagem com a ferramenta mutationtaster, verificou-se que trata-se de um polimorfismo descrito como rs2268574 T>C, localizado na região intrônica do exon 6 em que não ocorre alteração na sequência de aminoácidos. Conforme verificação com o banco de dados ExAC (The Exome Aggregation Consortium) verificou-se que a frequência alélica dessa mutação é de 0,5295, e conforme a ferramenta dbSNP (Short Genetic Variations) esta alteração não apresentaria significância clínica (45) (46). Entretanto é descrito na literatura que o alelo rs2268574 T>C está localizado em uma suposta região de splicing e que este polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) poderia afetar a transcriçao do gene GCK ou até gerar desequilíbrio em outra variação genética; e estar relacionado com DMG (38).

Por definição, polimorfismo ocorre quando uma variante genética alcança 1% da população e mais de 600 mutações no gene GCK já foram relatadas, e 2 a 5% dos casos de DMG na Europa são decorrentes de SNPs (37).

Quanto à segunda alteração encontrada em sete pacientes através do sequenciamento de DNA, localizada na região promotora do gene cinco, na posição 8450 com troca da base citosina por timina, também em região intrônica, é referida pelo mutationtaster como causadora de possível alteração na transcrição proteica. A referência da sua variação é de rs35670475 e conforme o banco de dados dbSNP não apresenta significância clínica; entretanto apesar de ter sido considerada como polimorfismo não é possível excluir a possibilidade de causar alteração

fenotípica. Não foi encontrada descrição desta mutação na literatura (38). Esta variação não foi encontrada no banco de dados ExAC.

Referente à mutação 48377 encontrada em dois pacientes, localizada no exon 6, que desencadeou com troca da base citosina por timina; foi descrita pelo mutationtaster como deletéria e causadora de doença. A mudança da base citosina por timina gerou a mudança do aminoácido tirosina por um codão de terminação (mutação nonsense), afetando as características da proteína trasncrita. Conforme o banco de dados ExAC, este alelo apresenta frequência de 0,009053. A referência dessa variação é rs144723656 e a referência do transcrito no Genbank é NM_000162 (39) (40) (41). No banco de dados HGMD (The Human Gene Mutation Database) esta mutação está descrita com a referência CM004359 e já foi refereciada na literatura como Y215X e relacionada a importante reduçao na atividade da glucoquinase (42) (43).

Quanto à casuística materna e neonatal conforme alterações encontradas no sequenciamento de DNA.

As gestantes em que foram identificadas com os polimorfismos g.44708C>T e g.8450C>T quando comparadas com as pacientes sem polimorfismo, não apresentaram P-valor com significância estatística referente à avaliação das variáveis idade materna, IMC materno, idade gestacional na resolução da gravidez, e peso ao nascimento; e nem mesmo em relação aos níveis de hemoglobina glicosilada, que foram discretamente mais elevados no primeiro grupo. Entretanto, salienta-se que o número limitado de pacientes acometidos com os polimorfismos g.44708C>T no exon 6, e g.8450C>T na região promotora, e com a mutação g.48377C>T, identificada no exon 6, no gene da glucoquinase; foi fator prejudicial para a análise entre as variáveis e verificação de interferência estatística.

Em relação à dose diária de insulina prévia à resolução, foi identificado P-valor de 0,0478 com presença de relevância estatística, entretanto o número de pacientes acometidas foi novamente restrito, inclusive apenas uma pacientes fez uso de insulinoterapia no grupo do polimorfismo g.8450C>T, o que poderia ter interferido nestas avaliações.

Referente à paciente portadora da mutação g.48377C>T no exon 6, diagnóstica de MODY-GCK, foram identificados valores de medianas das variáveis idade materna e IMC materno com valores abaixo da mediana do grupo de pacientes não acometidas por esta mutação. Conforme descrição na literatura esta paciente corresponderia ao rastreio de pacientes MODY GCK entre pacientes DMG utilizando IMC < 30 kg/m e valores de glicemia de jejum ≥ 5,5 mmol/L, com sensibilidade de 82%, especificidade de 95% e número necessário a tratar de 6.5 (23). Foi observado ainda que esta paciente apresentou valores de hemoglobina glicosilada abaixo da mediana dos resultados apresentados nas pacientes não acometidas, indicando bom controle glicêmico durante a gestação. Relata-se que os valores de hemoglobina glicosilada não

discriminam adequadamente pacientes com DMG de pacientes com MODY GCK (44).

O recém-nascido dessa paciente pesou 4160 gramas, sendo superior ao da mediana das gestantes que não apresentaram mutação cuja mediana foi de 3360g (percentil 25 de 3099g e percentil 25 de 3869g). Ressalta-se que 16,5% da casuística de neonatos pesaram entre 4000 e 4500 gramas (Tabela 11). Lamentavelmente, a amostra de cordão umbilical desse recém-nascido não foi coletada e por consequência não foi realizado sequenciamento genético deste paciente. Entretanto, pressupõe-se que este apresente-se sem alterações referente ao gene da glucoquinase. De acordo com a literatura, em fetos não acometidos de gestantes com alterações no gene da glucoquinase, o platô hiperglicêmico materno decorrente do ajuste superior à normalidade da glicemia materna provoca hiperglicemia fetal com consequente macrossomia fetal. Quando os fetos também são acometidos por alterações no gene da glucoquinase, apresentam o mesmo ajuste homeostático elevado para a glicose que suas mães, sendo a hiperglicemia materna interpretada pelo organismo como normal, o que acarreta em uma não interferência no peso ao nascimento (23).

Os neonatos que apresentaram os polimorfismos g.44708C>T no exon 6 e g.8450C>T na região promotora, e a mutação g.48377C>T, no exon 6 do gene da glucoquinase não apresentaram significância estatística em relação às pacientes não acometidas ao avaliar-se peso ao nascimento e Índice de Apgar no primeiro e quinto minutos; e o único desfecho apresentado foi Síndrome do Desconforto Respiratório em dois recém-nascidos; indicando que apesar da alteração genotípica, não houve implicação clínica nem desfechos fetais e neonatais adversos.

Conclusões

Os dados obtidos e analisados no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- A realização de uma seleção de pacientes com base nos critérios fenotípicos do MODY GCK (diabetes não insulino dependente com identificação em idades precoces ou em exames de rastreamento, com hiperglicemia leve e crônica, sem complicações referentes à hiperglicemia e com presença de familiares com diabetes) permite maior chance de diagnóstico de alterações no gene da glucoquinase.
- A seleção de pacientes inicialmente diagnosticadas com DMG utilizando IMC e valores de glicemia de jejum, é efetivo em indicar pacientes para realização de sequenciamento de DNA a fim de identificar MODY GCK.
- Gestantes com diagnóstico de MODY GCK beneficiam-se do tratamento a fim de atingir controle glicêmico adequado ao contrário de pacientes com MODY GCK fora do período gestacional.
- Fetos não acometidos por alterações no gene da glucoquinase de gestantes com MODY GCK beneficiam-se do adequado controle glicêmico materno.

- Considerando-se o pressuposto de que um neonato tem o risco de 50% de herdar uma mutação no gene da glucoquinase e que a identificação dessas alterações é oportuna para o binômio materno-fetal já que propicia melhor manejo do perfil glicêmico durante a gestação e durante o seguimento pós-natal, com baixa taxa de complicações durante seu curso clínico; evidencia-se que a realização de fluxogramas diagnósticos é eficaz na correta classificação do diabete mellitus, resultando em intervenções profiláticas e terapêuticas, e interferindo beneficamente na evolução natural da doença em gestantes e seus neonatos.

Referências

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med [Internet]. 1998:539–53.

2. Behrman, Richard E.; Kliegman, Robert M,; Jenson HB. Nelson Textbook of Pediatrics: 16th Edition. 2003.

3. Calderon IMP, Kerche LTRL, Damasceno DC, Rudge MVC. Diabetes and pregnancy: An update of the problem. Annu Rev Biomed Sci. 2007;9:1–11.

4. WHO. Definisi,diagnosis dan klasifikasi diabetes. 1999.

5. American Diabetes Association. Diabetes Mellitus and other categories of description of Diabetes. 2004;27:5–10.

6. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2009;32(SUPPL. 1).

7. Thanabalasingham G, Owen KR. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). BMJ. 2011;343(oct19_3):d6044.

8. Chakera AJ, Spyer G, Vincent N, Ellard S, Hattersley AT, Dunne FP. The 0.1% of the population with glucokinase monogenic diabetes can be recognized by clinical characteristics in pregnancy: the Atlantic Diabetes in Pregnancy cohort. Diabetes Care. 2014;37(5):1230–6.

9. Malecki MT, Mlynarski W. Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease. Diabetes Obes Metab. 2008;10(8):607–16.

10. Colom C, Corcoy R. Maturity onset diabetes of the young and pregnancy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010;24(4):605–15.

11. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. Med Clin North Am [Internet]. 2015 Jan;99(1):1–16.

12. Ismail-Beigi F. Pathogenesis and glycemic management of type 2 diabetes mellitus: a physiological approach. Arch Iran Med [Internet]. 2012;15(4):239–46.

13. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KGMM. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. Diabet Med. 2002 Sep;19(9):708–23.

14. Ministério da Saúde. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada - manual técnico. Série A. Normas e Manuais Técnicos\rSérie Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos - Caderno nº 5. 2005. 158 p.

15. Unger J. Management of

diabetes in pregnancy, childhood, and adolescence. Prim Care. Elsevier; 2007 Dec 1 [cited 2016 May 26];34(4):809–43, vii.
16. Moisés ECD. Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment. Sobrevia L, editor. InTech; 2013.
17. Ministério da Saúde do Brasil. Pré-natal e puerpério - atenção qualificada e humanizada - Manual técnico.
18. Negrato CA, Montenegro RM, Mattar R, Zajdenverg L, Francisco RP V, Pereira BG, et al. Dysglycemias in pregnancy: from diagnosis to treatment. Brazilian consensus statement. Diabetol Metab Syndr. BioMed Central; 2010;2(1):27.
19. Diabetes G. John B . O ' Sullivan : A Pioneer in the Study of Gestational Diabetes. 1954;943–4.
20. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, et al. 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.
21. Christine E, Moisés D. Multidisciplinary Care of Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus : Non-Pharmacological Strategies to Improve Maternal and Perinatal Outcomes. 2009;
22. Coutinho WF, Silva Júnior WS. Diabetes Care in Brazil. Ann Glob Heal. Elsevier; 2015 Jan 1;81(6):735–41.
23. Jovanovic L, Savas H, Mehta M, Trujillo A, Pettitt DJ. Frequent monitoring of A1C during pregnancy as a treatment tool to guide therapy. Diabetes Care. 2011;34(1):53–4.
24. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. J Am Diet Assoc. 2004104(2):255–75.
25. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia. 2008;51(4):546–53.
26. Nascer no Brasil - Inquérito nacional sobre parto e nascimento. doi: http://www6.ensp.fiocruz.br/nascerbrasil/
27. Theme Filha MM, Ayers S, Da Gama SGN, Leal MDC. Factors associated with postpartum depressive symptomatology in Brazil: The Birth in Brazil National Research Study, 2011/2012. J Affect Disord. Elsevier; 2016;194:159–67.
28. Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. Ann Nutr Metab. Karger Publishers; 2015;66 Suppl 2(Suppl. 2):14–20.
29. Kennelly MA, McAuliffe FM. Prediction and Prevention of Gestational Diabetes: an update of recent literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016;202:92–8.
30. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. Diabetes Care. 2007;30(8):2070–6.
31. Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, et al. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. Diabetes Care. 2012;35(4):780–6.
32. Ryckman KK, Spracklen CN, Smith CJ, Robinson JG, Saftlas

AF. Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. BJOG. 2015;122(5):643–51.
33. Diabetes & Metabolism - Présentation - EM consulte.doi: http://www.em-consulte.com/article/276425/pdf/maternal-outcome-of-gestational-diabetes-mellitus
34. Griffiths RJ, Vinall PS, Stickland MH, Wales JK. Haemoglobin A1c levels in normal and diabetic pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1987 Mar;24(3):195–200.
35. Jovanovic L, Savas H, Mehta M, Trujillo A, Pettitt DJ. Frequent monitoring of A1C during pregnancy as a treatment tool to guide therapy. Diabetes Care. 2011;34(1):53–4.
36. Kelley KW, Carroll DG, Meyer A. A review of current treatment strategies for gestational diabetes mellitus. Drugs Context [Internet]. 2015;4:212282.
37. Vambergue A, Fajardy I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. World J Diabetes. 2011 Nov 1;2(11):196–203.
38. Mitanchez D, Yzydorczyk C, Siddeek B, Boubred F, Benahmed M, Simeoni U. The offspring of the diabetic mother – Short- and long-term implications. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2015;29(2):256–69.
39. Rossi AC, Mullin P, Prefumo F. Prevention, management, and outcomes of macrosomia: a systematic review of literature and meta-analysis. Obstet Gynecol Surv. 2013;68(10):702–9.
40. Lipscomb KR, Gregory K, Shaw K. The outcome of macrosomic infants weighing at least 4500 grams: Los Angeles County + University of Southern California experience. Obstet Gynecol [Internet]. 1995;85(4):558–64.
41. Cheng YW, Sparks TN, Laros RK, Nicholson JM, Caughey AB. Impending macrosomia: will induction of labour modify the risk of caesarean delivery? BJOG. 2012;119(4):402–9.
42. Friesen CD, Miller AM, Rayburn WF. Influence of spontaneous or induced labor on delivering the macrosomic fetus. Am J Perinatol. 1995;12(1):63–6.
43. Maresh M. Diabetes in pregnancy. Curr Opin Obs Gynecol. Elsevier Ltd; 2001;13(2):103–7.