

JULIANA REGINA CHAMLIAN ZUCARE PENNO

**O polimorfismo de um único nucleotídeo rs17619600
no gene *HTR2B* modula a suscetibilidade ao
diabetes mellitus gestacional**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo
Corrêa Giannella

Coorientadora: Profa. Dra. Rossana Pulcineli
Vieira Francisco

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Penno, Juliana Regina Chamlian Zucare

O polimorfismo de um único nucleotídeo rs17619600
no gene HTR2B modula a suscetibilidade ao diabetes
mellitus gestacional / Juliana Regina Chamlian
Zucare Penno. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa
Giannella.

Coorientadora: Rossana Pulcineli Vieira
Francisco.

Descritores: 1.Diabetes gestacional 2.Células-
beta 3.Polimorfismo de nucleotídeo único 4.Gravidez
5.Serotonina 6.Proteína humana HTR2B

USP/FM/DBD-284/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese

À **minha mãe**, que sempre me apoiou em tudo;

Ao meu esposo e amor da minha vida, **Luiz Fernando**,
que acreditou nos meus sonhos e me deu
suporte emocional em todos os momentos;

Aos meus filhos **Guilherme, Henrique e Mariana**,
que são minha inspiração diária.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que participaram da pesquisa.

À minha orientadora Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella (Dra. Malu), agradeço por ter acreditado no meu sonho e me apoiado nessa jornada. Muito obrigada por ter aguentado todas as minhas inseguranças, minhas três gestações, a pandemia ... você sempre com palavras de calma e apoio, mostrando que conseguiríamos fazer tudo, sempre tão positiva, mostrando os caminhos que muitas vezes eu não conseguia ver. Obrigada por ser tão compreensiva e paciente com as minhas ansiedades.

Agradeço à minha coorientadora, Rossana Pulcineli Vieira Francisco, por acreditar no nosso projeto, por me abrir as portas da Obstetrícia, por me acolher tão bem, quantos ensinamentos nessa área ao longo desses anos.

Agradeço ao acolhimento que recebi da Obstetrícia, começando pela Lucinda Cristina Pereira, com a sua infinita gentileza, sempre tão disponível e pronta a ajudar. A enfermeira Ana Maria Sousa, com seu enorme sorriso me ajudou nas coletas dos pacientes, não conseguiria sem sua ajuda.

Agradeço aos residentes e preceptores da Obstetrícia que acompanhavam os atendimentos das pacientes do estudo.

Ao grupo de Endocrinopatias: Tatiana Zaccara, Rafaela Alkimin, Rodrigo Codarin, Cristine Paganoti e Fernanda Mikami, vocês me faziam sentir parte da equipe.

Tatiana Zaccara e Rafaela Alkimin, obrigada pela ajuda e amizade, quantas risadas, quantas tardes de ambulatório, quantos cafés... vocês são um presente que esta tese me trouxe.

As minhas amigas obstetras (Vivian Stocchero, Eleonora Fonseca, Fernanda Nastri, Karen Hettfleisch) que me confiaram suas pacientes, o que me encantou pela obstetrícia e me fez querer entender mais sobre o Diabetes Gestacional. Obrigada!

À minha amiga Vivian Stocchero, pela amizade e por cuidar de mim nas três gestações ocorridas durante esta tese.

Agradeço à equipe do LIM 25, em especial a Maria Auxiliadora (*In memoriam*) e a Ana Mercedes, que me ensinou toda a parte de bancada, sempre tão paciente comigo e que foi fundamental para meu aprendizado e para esta tese.

Agradeço à minha amiga Daniele Pereira dos Santos Bezerra, Dani, muito obrigada por todo seu apoio, todas as explicações e cálculos, você foi fundamental, todas as aulas sobre os SNPs e suas sondas ... tantas ajudas, você sempre tão solícita. Muito obrigada! Não seria possível sem você.

Agradeço aos Malunos, por toda a parceria e cumplicidade: Ricardo Perez, Tatiana Pelaes, Marcos Tadashi, Sharon Admoni, Beatriz Monteiro, Thiago Patente. Ao Gustavo Daher, por me dar todas as dicas e orientações finais.

Agradeço às minhas amigas de residência e preceptoria Leila Suemi, Manuela Rocha Braz e Helena Nicolielo, por toda a parceria e amizade.

Agradeço à minha família, que sempre acreditou no meu potencial e por todo o suporte emocional e todo apoio ao longo da minha formação.

Obrigada aos meus irmãos Fernanda e Luis e à minha sogra Rosangela, família que sempre me apoia e me incentiva.

Agradeço às minhas tias Rosane e Regina Chamlian, que são minha inspiração, exemplos de estudo e carreira acadêmica. A Tia Rosane me acolheu como filha, durante toda a minha formação. Muito obrigada! Te amo demais!!

Agradeço a Josefa e a Diana que cuidam tão bem de nós, o que me permitiu poder me dedicar a esta tese com mais tranquilidade.

Agradeço aos meus pais, meu pai Antônio que não pode estar aqui neste momento, mas que sempre foi tão orgulhoso de mim. Obrigada à minha mãe Roseli, que me apoiou desde pequena em meu sonho de ser médica e em todos os meus desafios e nas minhas conquistas.

Ao meu marido Luiz Fernando, que me apoia em tudo, sempre tão carinhoso e dedicado, que me acalma em todos os momentos, que me completa e me traz o equilíbrio. Quantas tabelas de Excel, quantos comandos no *word* você teve que me ensinar a fazer à noite... Amor, muito obrigada, não teria conseguido sem você, ao seu lado sou uma pessoa melhor, você torna os meus dias mais completos e felizes. Te amo infinito!

Aos meus filhos Guilherme, Henrique e Mariana, que nasceram enquanto eu fazia esta tese. Meus amores, vocês são a minha inspiração, vocês me ensinaram a ter o equilíbrio, saber priorizar, com vocês eu conheci a minha melhor versão. Amo vocês!

“O prazer mais nobre é a alegria do entendimento”.

Leonardo da Vinci

NORMALIZAÇÃO

Essa tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Araújo, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a Ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
Lista de Símbolos.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Figuras.....	xviii
Resumo.....	xix
<i>Abstract</i>	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes mellitus gestacional.....	2
1.2 Hormônio lactogênio placentário e prolactina	6
1.3 Serotonina.....	8
1.4 <i>Forehead Box protein M1 (FOXM1)</i>	10
1.5 <i>Menin</i>	11
1.6 <i>Forkhead Box D3 (FOXD3)</i>	12
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Primário.....	18
2.2 Secundário.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Casuística	20
3.1.1 Critérios de inclusão	22
3.1.2 Critérios de exclusão	23
3.1.3 Definição de DMG	23
3.2 Coleta de dados clínicos e laboratoriais	24
3.3 Extração de DNA e genotipagem.....	26
3.4 Polimorfismos de um único nucleotídeo	28
3.4.1 <i>PRLR</i>	28
3.4.2 <i>HTR2B</i>	29
3.4.3 <i>FOXM1</i>	30
3.4.4 <i>FOXD3</i>	30

3.4.5 <i>MEN1</i>	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Características das participantes	37
5.2 Associação dos SNPs como DMG.....	41
5.2.1 <i>PRLR</i>	42
5.2.2 <i>HTR2B</i>	43
5.2.3 <i>FOXM1</i>	47
5.2.4 <i>FOXD3</i>	50
5.2.5 <i>MEN1</i>	51
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Achados clínicos e laboratoriais.....	53
6.2 Polimorfismos	56
7 CONCLUSÕES	62
8 ANEXOS	64
Anexo 1 - Aprovação da CAPPesq.....	64
Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido do Grupo Controle	68
Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido do Grupo DMG	72
Anexo 4 - Características clínicas e bioquímicas das participantes com diabetes mellitus gestacional agrupadas de acordo com o método diagnóstico.....	76
Anexo 5 - Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) pós-parto das participantes com diabetes mellitus gestacional (DMG) divididas de acordo com o método diagnóstico (glicemia de jejum ou TTOG)	77
Anexo 6 - Manuscrito submetido a publicação	78
Anexo 7 - STROBE referente a manuscrito submetido a publicação.....	92
9 REFERÊNCIAS.....	96

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HP	5-hidroxitriptofano
5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
AIG	Adequado para a idade gestacional
AKT2	<i>Thymoma viral protooncogene 2</i>
BCL6	<i>BCL6 transcription repressor</i>
CD	Modelo co-dominante
CDKN1	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CDKAL1	<i>Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1</i>
CDK4	<i>Cyclin dependent kinase 4</i>
c-SRC	<i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
DDC	Enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
DHEG	Doença hipertensiva específica da gestação
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DMG	Diabetes mellitus gestacional
dNTP	Desoxinucleotídeos
dUTP	Desoxiuridina fosfato
DUM	Data da última menstruação

EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
eQTL	<i>Expression quantitative trait loci</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
EUA	Estados Unidos da América
FOXD3	<i>Foarkhead box D3</i>
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GH	Hormônio do crescimento
GIG	Grande para a idade gestacional
GCK	Glicoquinase
GCKR	Regulador da glicoquinase
GJA	Glicemia de jejum alterada
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina A1c
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HNF1 α	Fator hepatocítico nuclear 1 α
HNF4 α	Fator hepatocítico nuclear 4 α
HPL	Hormônio lactogênio placentário
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTR1D	Receptor de 5-hidroxitriptamina 1D
HTR2B	Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B
HTR3A	Receptor de 5-hidroxitriptamina 3A
IADPSG	<i>International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups</i>
IC	Intervalo de Confiança
IGF2BP2	<i>Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2</i>

IMC	Índice de massa corpórea
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
TGD	Tolerância à glicose diminuída
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
KCNJ11	<i>Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11</i>
MAF	Frequência do alelo raro
MAF β	<i>MAF bZIP transcription factor</i>
MEV	Mudança de estilo de vida
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTNR1B	Receptor de melatonina 1B
NEM1	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1
NGSP-EUA	<i>National Glyco Hemoglobin Standardization Program</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PPARG	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
RD	Modelo recessivo dominante
RN	Recém-nascido
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
STAT5	<i>Signal transducers and activators of transcription 5</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGD	Tolerância à glicose diminuída

TPH1	Triptofano hidroxilase tipo 1
TPH2	Triptofano hidroxilase tipo 2
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
TCF7L2	<i>Transcription fator 7- like 2</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTR	<i>Untranslated region</i>

SÍMBOLOS

%	por cento
=	igual a
<	menor que
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
®	marca registrada
cm	centímetro
dL	decilitro
g	gramas
kg	quilogramas
L	litro
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
miliQ	marca de sistemas de purificação de água para aplicações laboratoriais
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
mmol	milimol
UI	unidades internacionais
μL	microlitro

TABELAS

Tabela 1	Polimorfismos de um único nucleotídeo já associados ao diabetes mellitus gestacional	5
Tabela 2	Resumo dos efeitos dos genes abordados no presente trabalho sobre a proliferação de células beta	15
Tabela 3	Tamanho da amostra avaliada para cada polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) estudado.....	28
Tabela 4	Características clínicas e bioquímicas das participantes com e sem diabetes mellitus gestacional (DMG)	37
Tabela 5	Características clínicas e bioquímicas das participantes com diabetes mellitus gestacional agrupadas de acordo com o uso ou não de insulina	39
Tabela 6	Frequência dos alelos raros (MAFs) e análise do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EWH) dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) estudados	41
Tabela 7	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs9292578 no gene <i>PRLR</i> de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)....	42
Tabela 8	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs9292578 no gene <i>PRLR</i> de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional.....	42
Tabela 9	Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene <i>HTR2B</i> de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)	44
Tabela 10	Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene <i>HTR2B</i> de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional.....	45
Tabela 11	Frequência do haplótipo TACC no gene <i>HTR2B</i> de acordo com a presença de diabetes mellitus gestacional (DMG)	46
Tabela 12	Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene <i>FOXM1</i> de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)	48

Tabela 13	Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene <i>FOXM1</i> de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional.....	49
Tabela 14	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs6588025 no gene <i>FOXD3</i> de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)....	50
Tabela 15	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs6588025 no gene <i>FOXD3</i> de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional.....	50
Tabela 16	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs624975 no gene <i>MEN1</i> de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)....	51
Tabela 17	Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs624975 no gene <i>MEN1</i> de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional.....	51

FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos de produção de serotonina em células beta de roedores durante a gestação.	9
Figura 2.	Modelo proposto para explicar a participação do FOXD3 na proliferação das células beta.	14
Figura 3 -	Prolactina (PRL) age via receptor de prolactina (PRLR) e controla expressão de fatores de transcrição e a proliferação celular.	15
Figura 4 -	Fluxograma do estudo	21
Figura 5 -	Padrão de expressão gênica associado a cada um dos genótipos do polimorfismo de um único nucleotídeo rs17619600 no gene <i>HTR2B</i> em diferentes tecidos	59

RESUMO

Penno JRCZ. *O polimorfismo de um único nucleotídeo rs17619600 no gene HTR2B modula a suscetibilidade ao diabetes mellitus gestacional* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: Na gestação, o aumento da resistência insulínica materna é compensado por hiperplasia e hiperfuncionalidade das células-beta pancreáticas maternas, de forma a manter a homeostase glicêmica. Alterações nestes mecanismos compensatórios estão associadas ao Diabetes mellitus gestacional (DMG). O hormônio lactogênio placentário (HPL), a prolactina (PRL) e a serotonina foram identificados como participantes da expansão de células-beta maternas; fatores de transcrição, como o FOXM1 (*forehead Box protein M1*), reguladores transcricionais, como o FOXD3 (*Forkhead box D3*) e reguladores do ciclo celular, como a *menin 1*, são considerados importantes sinais intracelulares responsáveis por esse efeito. Dada a importância destes fatores para a adaptação das células-beta que ocorre na gestação e a escassez de estudo em humanos, este estudo teve o objetivo de avaliar se polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes relacionados à proliferação de células beta: *PRLR* (codifica o receptor da prolactina); *HTR2B* (codifica o receptor 2B de serotonina); *FOXM1*; *FOXD3* e *MEN1*, podem influenciar o risco para desenvolvimento de DMG. **Material e métodos:** Este foi um estudo caso-controle, no qual dados clínicos e laboratoriais foram coletados de 453 pacientes com DMG e 443 gestantes que não apresentaram DMG. A genotipagem de SNPs nos genes *PRLR*, *HTR2B*, *FOXM1*, *FOXD3* e *MEN1* foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real. **Resultados:** O SNP rs17619600 no gene *HTR2B* conferiu risco aumentado para DMG nos modelos codominante (*odds ratio* [OR] =2,15; intervalo de confiança [IC] 95% 1,53-3,09; $P < 0,0001$) e raro dominante (OR de 2,32; IC 1,61-3,37; $P < 0,0001$). Não foram encontradas associações dos SNPs com o uso de insulina, ganho de peso materno, peso do recém-nascido ou resultado do teste de tolerância oral à glicose pós-parto alterado. **Conclusão:** A presença do alelo C no SNP rs17619600 no gene *HTR2B* conferiu risco para DMG na população estudada.

Descritores: Diabetes gestacional; Células-beta; Polimorfismo de nucleotídeo único; Gravidez; Serotonina; Proteína humana HTR2B.

ABSTRACT

Penno JRCA. *HTR2B* variant rs17619600 increases the risk of gestational diabetes mellitus [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Introduction: In order to maintain glycemic homeostasis during pregnancy, the increase in maternal insulin resistance is compensated by hyperplasia and increased function of maternal pancreatic beta cells. Failure in this compensatory mechanism is associated with gestational diabetes mellitus (GDM). The placental lactogenic hormone (HPL), prolactin (PRL) and serotonin have been associated with the expansion of maternal beta cells; transcription factors, such as FOXM1 (Forehead Box protein M1), transcriptional regulators, such as FOXD3 (Forkhead box D3) and cell cycle regulators, such as menin 1, are considered important intracellular signals responsible for the proliferation of such cells. Given the importance of these factors for the pregnancy adaptation of beta cells and the absence of studies in humans, we hypothesized that genetic variation (single nucleotide polymorphisms [SNPs]) in the genes related to the proliferation of beta cells: *PRLR* (encodes the prolactin receptor); *HTR2B* (encodes the serotonin 2B receptor); *FOXM1*; *FOXD3* and *MEN1*, could influence the risk of gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods:** This was a case-control study, clinical and laboratory data were collected from 453 patients with GDM and 443 pregnant women who did not have GDM. SNPs in the genes *PRLR*, *HTR2B*, *FOXM1*, *FOXD3* and *MEN1* were genotyped by real-time polymerase chain reaction. **Results:** The SNP rs17619600 in the *HTR2B* gene conferred an increased risk for GDM in the codominant (odds ratio [OR] = 2.15; 95% confidence interval [CI] 1.53-3.09; $P < 0.0001$) and rare dominant (OR 2.32; CI 1.61 - 3.37; $P < 0.0001$) models. The SNPs were not associated with insulin use, maternal weight gain, offspring birth weight or glycemic change in the pos partum tolerance test. **Conclusion:** The presence of the C allele in the SNP rs17619600 in *HTR2B* gene is associated with increased risk for GDM in a population of Brazilian subjects.

Descriptors: Diabetes, gestational; Beta cells; Polymorphism, single nucleotide; Pregnancy; Serotonin; HTR2B protein, human.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

O Diabetes mellitus gestacional (DMG) é definido como hiperglicemia materna diagnosticada na gestação, na ausência de critérios para diagnóstico de diabetes mellitus (DM). Segundo os critérios do *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG), o diagnóstico de DMG é feito por glicemia de jejum ≥ 92 mg/dL ou por teste de tolerância oral à glicose (TTOG) com 75 gramas de glicose realizado entre 24 e 28 semanas de gestação com pelo menos um valor alterado (glicemia de jejum ≥ 92 mg/dL e/ou, após 1h ≥ 180 mg/dL e/ou após 2h ≥ 153 mg/dL) ⁽¹⁾.

O DMG ocorre em 10-18% das gestações ^(2, 3); idade materna avançada, sobrepeso e obesidade, tabagismo, história prévia de DMG ou história familiar de DM tipo 2 (DM2) são fatores de risco reconhecidos para essa condição clínica ⁽⁴⁾. No curto prazo, o DMG está associado à morbidade materno-fetal, pré-eclâmpsia, polidrâmnio, macrossomia fetal, parto cirúrgico, icterícia e hipoglicemia neonatal ⁽⁵⁾. Além disso, o DMG confere risco aumentado de obesidade e de DM2 para a gestante e para o filho de mãe diabética ⁽⁶⁾.

Durante a gestação, a necessidade energética do feto impõe mudanças ao metabolismo materno. O aumento da resistência insulínica

materna mantém o fluxo de nutrientes necessário para o crescimento fetal. Isso ocorre em virtude da secreção de hormônio lactogênio placentário (HLP), cortisol e hormônio do crescimento (GH) pela placenta ⁽⁷⁾.

O HLP é capaz de provocar alterações e gerar modificações nos receptores de insulina. As seguintes variações moleculares parecem estar relacionadas à diminuição da captação de glicose pelos tecidos periféricos: 1) alterações moleculares na subunidade beta do receptor de insulina, 2) diminuição da fosforilação em tirosina cinase e 3) remodelamento do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) e da fosfatidilinositol 3 cinase ⁽⁸⁾. Na gestação normal, um mecanismo compensatório frente ao aumento da resistência à insulina é o aumento da função das células-beta pancreáticas para manter a normoglicemia ⁽⁷⁾.

Em dois estudos realizados em humanos, foi demonstrado aumento da massa de células beta entre 1,4 e 2 vezes na gestação; esse aumento é alcançado por expansão hipertrófica, proliferação e, possivelmente, neogênese a partir de células precursoras, associadas a uma redução da taxa de apoptose ⁽⁹⁻¹¹⁾.

O DMG resulta do aumento insuficiente da secreção de insulina compensatória e da massa de células beta pancreáticas ⁽¹²⁾. Estudos recentes mostraram concentrações de insulina basal e de peptídeo C menores em mulheres com DMG quando comparadas com gestantes sem DMG. As concentrações de insulina basal e de peptídeo C em mulheres com DMG são semelhantes àsquelas de não gestantes e de mulheres no pós-parto, o que sugere que exista uma inabilidade do pâncreas em responder

ao aumento da demanda metabólica da gestação nas mulheres que desenvolvem DMG ⁽¹³⁾.

Na gestação, as mudanças adaptativas das células-beta ocorrem antes mesmo do início da resistência insulínica. O estudo de genes envolvidos nestas mudanças antecipatórias é fundamental para a compreensão desses eventos e, conseqüentemente, para a compreensão da etiopatogenia do DMG ⁽¹⁴⁾. Apesar de mecanismos celulares envolvidos na expansão de células-beta maternas serem muito estudados em roedores, existem poucos estudos em humanos ⁽¹⁰⁾.

A maioria dos estudos genéticos realizados em pacientes com DMG foram estudos de genes candidatos que já foram associados ao DM2, sendo os mais estudados aqueles relacionados à função das células beta e à secreção de insulina ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Essa abordagem suporta a noção de continuidade entre DMG e DM2. A Tabela 1 mostra exemplos de variantes genéticas que foram associadas ao aumento de risco de DMG em humanos.

Tabela 1 - Polimorfismos de um único nucleotídeo já associados ao diabetes mellitus gestacional

Gene	Variante	Atuação	Referências
<i>TCF7L2</i>	<i>rs7903146</i> <i>rs5030952</i> <i>rs12255372</i> <i>rs4506565</i>	Função de célula β	(17-21)
<i>MTNR1B</i>	<i>rs10830963</i> <i>rs1387153</i>	Função de célula β	(17, 18, 22)
<i>GCK</i>	<i>rs1799884</i>	Função de célula β	(14, 17, 23)
<i>KCNJ11</i>	<i>rs5219</i>	Função de célula β	(17)
<i>CDKAL1</i>	<i>rs7754840</i> <i>rs7756992</i>	Função de célula β	(17, 22-24)
<i>IGF2BP2</i>	<i>rs4402926</i>	Função de célula β	(17)
<i>PPARG</i>	<i>rs1801282</i>	Ação da insulina	(18)
<i>IRS1</i>	<i>rs1801278</i>	Ação da insulina	(17)

FONTE: Adaptado de Chiefari *et al.* (16).

TCF7L2: *Transcription fator 7-like2*; *MTNR1B*: Receptor da melatonina 1B; *GCK*: Glicoquinase; *KCNJ11*: *Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*; *CDKAL1*: *Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1*; *IGF2BP2*: *Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2*; *PPARG*: Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; *IRS1*: Substrato 1 do receptor de insulina

Vários estudos em roedores já analisaram o padrão de expressão gênica das ilhotas durante a gestação, focando no período entre o 13° e o 15° dia da gestação, quando ocorre a proliferação máxima das células beta pancreáticas maternas. A expressão de centenas de genes foi identificada como alterada nas ilhotas das roedoras prenhas, mostrando o envolvimento de um amplo espectro de processos celulares, tais como metabolismo, crescimento, morte, secreção de insulina, desenvolvimento e interação celular (18, 19).

O HLP, a prolactina (PRL), a serotonina e a *menin 1* também foram identificados como participantes da expansão de células beta maternas em

modelos animais ⁽²⁰⁾. Mutação em genes que codificam alguns fatores de transcrição com papel na adaptação de células beta, como o FOXD3, HNF1a, FOXM1 e HNF4a já foram associadas ao DMG ^(18, 21).

1.2 HORMÔNIO LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO E PROLACTINA

O HLP é um hormônio polipeptídeo secretado apenas durante a gestação pelo sinciciotrofoblasto; assemelha-se estruturalmente com a PRL e com o GH e liga-se ao receptor de PRL (PRLR), que é expresso nas células beta maternas. Quando o HLP se liga ao PRLR, diferentemente da PRL, ele utiliza o sítio de ligação ao zinco (*Zn²⁺-binding site*) ⁽²²⁾.

O PRLR pertence à superfamília de receptores de citocinas classe 1, que também inclui o receptor de GH. Quando o ligante se liga, o receptor é fosforilado pela *janus kinase 2* (JAK2), o que permite o recrutamento e a fosforilação do *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), que então migra para o núcleo, onde vai regular a expressão de genes-alvo ⁽²³⁾.

As concentrações de HLP e de PRL aumentam no período crucial para a adaptação das células beta durante gestação ^(10, 12); esses fatores são os que têm sua participação mais bem estudada ⁽²⁴⁾.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram os efeitos da PRL e do HLP sobre as células beta e mostraram claramente que esses hormônios aumentam a secreção de insulina e a proliferação celular, assim como a

sobrevida e a massa de células beta, e diminuem o limiar para secreção de insulina estimulada por glicose ⁽²⁵⁻²⁹⁾.

O gene que codifica o PRLR é reconhecido como necessário para as mudanças das células beta; sua hiperexpressão foi relatada em estudos de análise de expressão gênica em roedoras prenhas ^(18, 24). Roedoras prenhas com deleção do gene *PRLR* nas células beta não apresentam proliferação dessas células na gestação ⁽³⁰⁾.

Roedores com haploinsuficiência de *PRLR* apresentaram menores concentrações de insulina, tolerância à glicose diminuída, diminuição da liberação de insulina estimulada por glicose e maior glicemia pós-prandial, quando comparados com roedores prenhas controle ⁽¹²⁾.

Um estudo recente realizado em gestantes mostrou aumento de 2,36 vezes no risco para DMG na presença dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) rs10068521 e rs9292578 no *PRLR* ⁽³¹⁾.

Várias proteínas da via de sinalização do PRLR contribuem para a proliferação das células beta durante a gestação, tais como os fatores de transcrição FOXM1 (*Forehead Box protein M1*) e MAF β (*MAF bZIP transcription factor*), a osteoprotegerina e a *menin 1*; reguladores da transcrição, como FOXD3 (*Foarkhead box D3*); além de ciclinas, ciclinas dependente de cinases, inibidores do ciclo celular e o próprio PRLR ^(21, 30, 32-36).

1.3 SEROTONINA

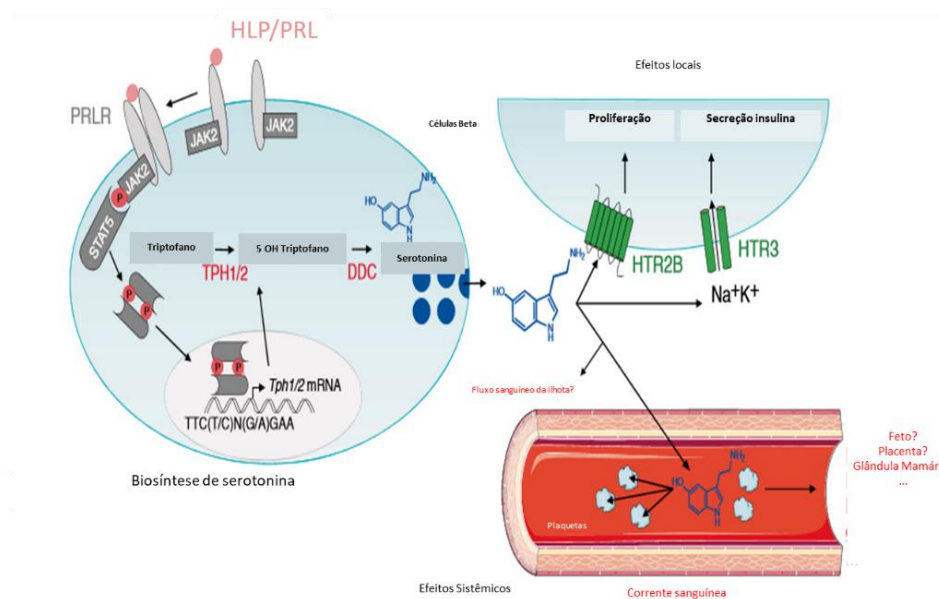
A serotonina (ou 5-hidroxitriptamina [5-HT]) é uma monoamina produzida em duas etapas. O L-triptofano é hidroxilado pelas enzimas triptofano hidroxilase 1 e 2 (TPH1/2); o produto desta reação, o 5-hidroxitriptofano (5-HP), é posteriormente descarboxilado pela enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (DDC) em 5-HT. A enzima TPH é a enzima passo limitante desta reação ⁽³⁷⁾.

Entre os genes mais expressos nas células beta de roedoras prenhas, estão os genes que codificam as duas isoformas da enzima TPH, a TPH1 e a TPH2. As células beta têm toda a maquinaria necessária para produzir, armazenar e estocar 5-HT (Figura 1). Durante a gestação, o conteúdo de 5-HT na ilhota é maior do que em outras áreas do corpo, indicando que esta variabilidade de produção pode ser uma forma fisiológica de regulação. Esses achados sugerem que a 5-HT desempenhe funções importantes na ilhota durante a gestação ⁽³⁸⁾.

Diversos estudos têm associado a 5-HT com crescimento e diferenciação celular ^(18, 39, 40). A PRL aumenta a expressão de TPH1 e a produção de 5-HT em ilhotas de roedores *in vitro*, sugerindo que a 5-HT possa agir na via de sinalização dos lactogênios após a ligação ao PRLR, cujo efeito final é o aumento da proliferação das células beta maternas ⁽⁴¹⁾.

A inibição da síntese de 5-HT por meio de dieta restrita em triptofano ou por inibição da TPH1 impede a expansão e proliferação das células beta

na gestação em roedores, levando a uma redução da tolerância à glicose, sem afetar a sensibilidade à insulina ⁽³²⁾. Há, ainda, estudos que sugerem que a interferência na via de sinalização da 5-HT com drogas ou dieta restrita em triptofano pode aumentar o risco de DMG ⁽⁴¹⁾.



FONTE: Adaptado de Goyvaerts et al.⁽⁴¹⁾.

HTR2B: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B; HTR3: Receptor de 5-hidroxitriptamina 3; JAK2: *Janus kinase 2*; STAT5: *Signal transducer and activator of transcription 5*

Figura 1 - Mecanismos de produção de serotonina em células beta de roedores durante a gestação. A prolactina (PRL) e o hormônio lactogênio placentário (HLP) estimulam a transcrição dos genes que codificam as enzimas triptofano hidroxilase 1 e 2 (TPH1/TPH2), resultando em síntese de serotonina nas células beta. A serotonina secretada pode agir localmente em outra células beta, através dos receptores de serotonina HTR2B e HTR3, ou pode regular o fluxo sanguíneo da ilhota

Os receptores de serotonina são classificados em sete diferentes famílias (receptor de serotonina 1-7 [HTR1-7]), alguns com diferentes subtipos. Todos os receptores são ligados à proteína G, com exceção dos

receptores de serotonina 3 (HTR3A e HTR3B), que são ligados a canais de cálcio ⁽⁴²⁾.

Existe uma variação na expressão dos receptores de serotonina durante a gestação de roedores; enquanto a expressão do receptor de 5-hidroxitriptamina 2B (HTR2B) aumenta, a expressão do receptor de 5-hidroxitriptamina 1D (HTR1D) diminui e esse padrão está associado a proliferação de células beta pancreáticas ⁽³²⁾.

O bloqueio da sinalização do HTR2B nas ilhotas de roedoras prenhas impede a expansão das células beta e causa tolerância à glicose diminuída ⁽³²⁾. Esse receptor já foi localizado em células beta humanas e, em estudos *in vitro*, sua ativação associou-se com a secreção de insulina estimulada por glicose ⁽⁴³⁾.

1.4 FOREHEAD BOX PROTEIN M1 (FOXM1)

O FOXM1 é um fator de transcrição que está altamente expresso em situações de proliferação celular, como nas células do pâncreas endócrino durante a vida embrionária e neonatal e durante a regeneração hepática ⁽¹⁰⁾.

A expressão do RNA mensageiro (mRNA) desse fator de transcrição está aumentada no período de maior proliferação das células beta de roedores prenhas (15,5 dias da gestação) e retorna aos valores basais no pós-parto. Ratas prenhas com deleção pancreática do gene *FoxM1* apresentam uma diminuição na replicação e na massa das células beta

quando comparadas às ratas prenhas controle, levando à importante redução da tolerância à glicose na gestação ⁽³⁵⁾.

O HLP e a PRL induzem a expressão do FOXM1 em ilhotas isoladas *in vitro* e a inativação deste fator de transcrição impede a proliferação das células beta mediada por esses hormônios, indicando que o FOXM1 tem importante envolvimento na adaptação das células beta que ocorre na gestação ⁽³⁵⁾. Esse fator de transcrição também está envolvido na proliferação das células beta que ocorre em outras situações, como na obesidade e na sobrecarga de glicose. Em um trabalho realizado com ilhotas de indivíduos obesos, sugeriu-se que o FOXM1 desempenha importante papel na expansão das células beta que ocorre para compensar a resistência à insulina, já que a expressão de seu mRNA nesta população foi 7,4 vezes maior do que a expressão observada em ilhotas de indivíduos não obesos ⁽⁴⁴⁾.

Células beta de roedores *knockout* para o *FoxM1* apresentam maior expressão de *menin 1*; o aumento da expressão da *menin 1* está associado ao DMG ⁽³³⁾.

1.5 MENIN

A *menin 1*, codificada pelo gene *MEN1*, é uma proteína supressora tumoral que tem sido implicada na regulação da proliferação celular durante a gestação; ela regula a transcrição gênica, promovendo metilação de

histonas. Na ilhota, a *menin 1* mantém a expressão de inibidores de ciclinas cinases, como p18 e p27, que são bloqueadoras da proliferação celular. Na gestação, a *menin 1* é pouco expressa nas células beta, e quando sua expressão é mantida mais elevada durante a gestação, ocorre diminuição da proliferação dessas células e hiperglicemia materna. A análise dos mecanismos envolvidos na redução da expressão da *menin 1* durante a gestação mostrou que, em roedores, os hormônios lactogênicos estimulam a fosforilação e o acúmulo nuclear de STAT5, que induz a expressão de BCL6, uma proteína que reprime a transcrição do *Men1*, o gene que codifica a *menin 1* ⁽³³⁾.

Em roedores *knockouts* heterozigotos para o gene que codifica o PRLR, a expressão de *menin 1* durante a gestação apresenta uma redução de 20%, em comparação à redução de 50% observada nos animais selvagens. Assim, durante a gestação, acredita-se que a redução da expressão da *menin 1* induzida pela ativação do PRLR pelos hormônios lactogênicos também contribua para o aumento a massa de células beta ⁽³⁴⁾.

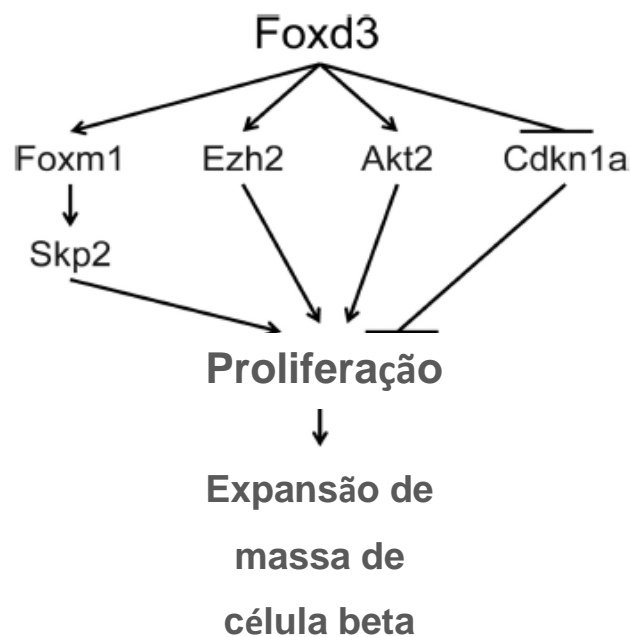
1.6 FORKHEAD BOX D3 (FOXD3)

O FOXD3 é um regulador transcricional *forkhead*, crítico para a auto-renovação de múltiplas células progenitoras; ele é expresso no pâncreas embrionário e nas células beta do pâncreas adulto humano e de roedores, sugerindo uma função conservada entre as espécies de mamíferos. O FOXD3 é necessário para a auto renovação das células beta e para a sua

expansão durante a gestação. Roedores com deleção pancreática do *Foxd3* apresentam tolerância à glicose diminuída e redução da proliferação, do tamanho e da massa das células beta durante a gestação. Além disso, vários genes conhecidos por regular a proliferação celular (entre eles, o FOXM1) estão desregulados em ilhotas isoladas de roedores com a deleção pancreática do gene que codifica o FOXD3, o que sugere que essa proteína possa estar na origem das várias vias críticas para a expansão das células beta *in vivo* ⁽²¹⁾.

O SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) é um alvo do FOXM1 e está hipoexpresso em animais com deleção pancreática do gene que codifica o FOXD3, sugerindo que a via do FOXM1 esteja afetada nestes animais. O CDKN1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) é um inibidor de CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) e, quando ativado, causa parada do ciclo celular em G1. O CDKN1 está hiperexpresso nos animais com deleção do gene *Foxd3*, o que pode restringir a proliferação das células beta pancreáticas desses animais ⁽⁴⁵⁾. A proteína EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) é uma histona metiltransferase necessária para regular a transcrição e atividade do *FoxM1*; a EZH2 está hipoexpressa nesses animais, especialmente nas prenhas, e esta hipoexpressão inibe a proliferação de células beta ⁽²¹⁾. A deleção pancreática específica do gene *Ezh2* resulta em diminuição da proliferação de células beta e hiperglicemia ⁽⁴⁶⁾. A AKT2 (*thymoma viral protooncogene 2*) está hiporregulada nos animais com deleção pancreática do gene *Foxd3*; a mutação composta dos genes *Akt1* e *Akt2* resulta em defeito de proliferação das células beta. Acredita-se que, como AKT2 e

EZH2 estão hipoexpressas durante a gestação de animais com deleção pancreática do *Foxd3*, elas contribuem para o defeito de proliferação de células beta verificado nestes animais ^(21, 47) (Figura 3) ⁽²¹⁾.



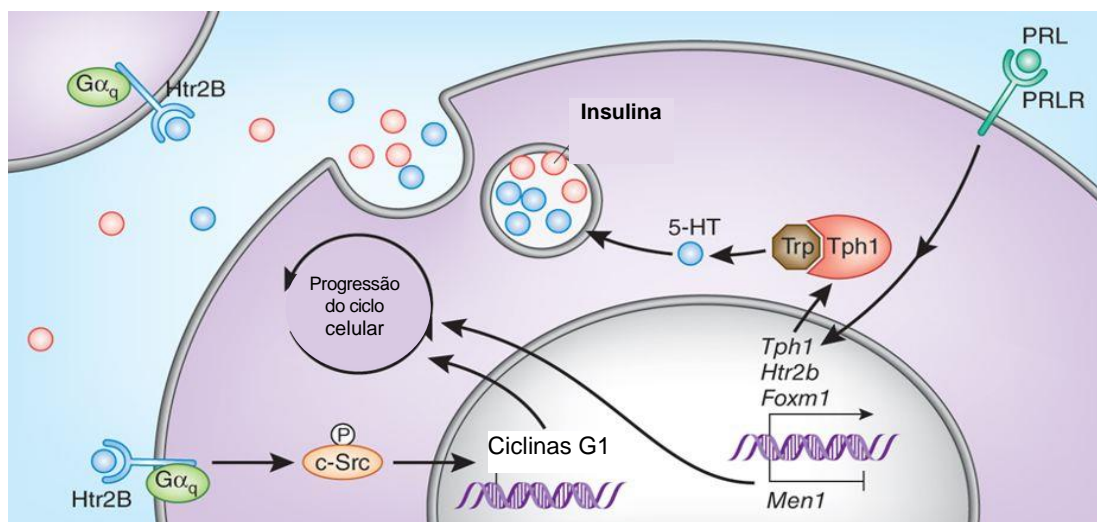
FONTE: Adaptado de Plank *et al.* ⁽²¹⁾

AKT: *Thymoma viral protooncogene 2*; CDKN1a: *Cyclin-dependent kinase inhibitor*; EZH2: *Enhancer of zeste homolog 2*; FOXD3: *Forkhead box D3*; FOXM1: *Forkhead box M1*; SKP2: *S-phase kinase-associated protein 2*.

Figura 2 - Modelo proposto para explicar a participação do FOXD3 na proliferação das células beta

A Figura 3 e a Tabela 2 resumam os principais mecanismos envolvidos na proliferação das células beta na gestação. A ativação do PRLR modula a expressão de fatores de transcrição, como o FOXM1 (que tem sua expressão aumentada) e a *menin 1* (que tem sua expressão diminuída). A ativação do PRLR também aumenta a expressão de genes que codificam proteínas da via serotoninérgica, como a TPH1 e o HTR2B. O

aumento da expressão da enzima TPH1 estimula a conversão de triptofano em 5-HT, que é secretada pelas células beta, juntamente com a insulina. Uma vez liberada, a 5-HT ativa o receptor HTR2B na superfície das células beta, de forma autócrina e parácrina, levando à fosforilação de c-Src, a qual aumenta a expressão das ciclinas G1, que estimulam a progressão do ciclo celular, juntamente com a menor expressão da *menin 1* ⁽⁴⁸⁾.



Adaptado de Georgia & Bhushan, 2010 ⁽⁴⁸⁾.

Figura 3 - Prolactina (PRL) age via receptor de prolactina (PRLR) e controla expressão de fatores de transcrição e a proliferação celular

Tabela 2 - Resumo dos efeitos dos genes abordados no presente trabalho sobre a proliferação de células beta

EFEITO ESTIMULATÓRIO	EFEITO INIBITÓRIO
<i>PRLR</i>	<i>MEN1</i>
<i>HTR2B</i>	
<i>FOXM1</i>	
<i>FOXD3</i>	

HTR2B: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B; *FOXD3*: Forkhead box D3; *FOXM1*: Forkhead box M1; *MEN1*: Menin 1; PRLR: Receptor da prolactina.

Apesar dos mecanismos celulares envolvidos na expansão das células beta durante a gestação serem muito estudados em roedores, existem poucos estudos em seres humanos. Dada a importância dos fatores descritos para a adaptação das células beta que ocorre na gestação, levantamos a hipótese que variantes nos genes que codificam o PRLR, o HTR2B, o FOXM1, o FOXD3 e a *menin 1* podem influenciar o risco para desenvolvimento de DMG.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 PRIMÁRIO

Avaliar a associação entre DMG e SNPs nos seguintes genes envolvidos na proliferação das células beta pancreáticas durante a gestação:

- *PRLR*
- *HTR2B*
- *FOXM1*
- *FOXD3*
- *MEN1*.

2.2 SECUNDÁRIOS

Avaliar a associação dos SNPs estudados com a gravidade do DMG, expressa pelas seguintes variáveis:

- Uso de insulina
- Valores de glicemia
- Peso do recém-nascido
- Alterações no TTOG realizado no pós-parto

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Esse é um estudo caso-controle que identificou inicialmente 1.130 gestantes elegíveis para participação no estudo; 90 recusaram a participação e 36 foram excluídas conforme os critérios de exclusão definidos. Das 1.004 gestantes então recrutadas, 108 perderam o seguimento, resultando no número final de 896 gestantes. Após avaliação diagnóstica para DMG, 453 gestantes tiveram diagnóstico de DMG em gestação pregressa ou na gestação atual e foram acompanhadas no Ambulatório de Endocrinopatias da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP); 443 gestantes não apresentaram DMG, e foram acompanhadas na Liga de Pré-natal da FMUSP e no Ambulatório de Baixo Risco da Clínica Obstétrica do HCFMUSP (Figura 4).

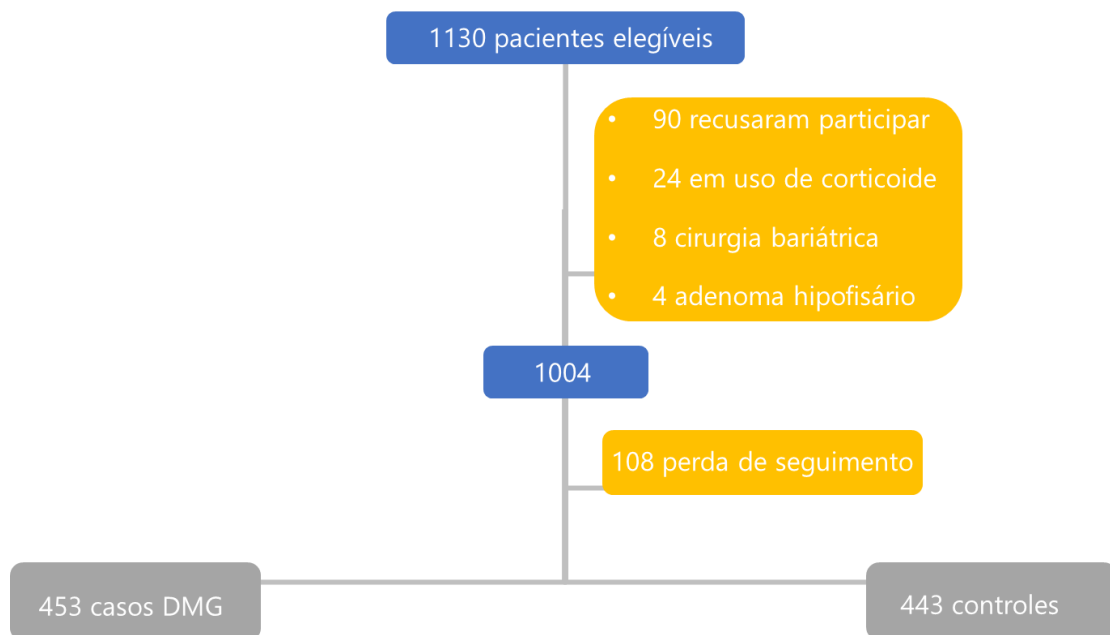


Figura 4 - Fluxograma do estudo

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP e à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq parecer 777.904 de 03/09/2014 (Anexo 1).

Após esclarecimento dos objetivos e aspectos práticos da pesquisa, as participantes aceitaram participar deste estudo após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 2 e 3). As participantes foram informadas que poderiam sair do estudo em qualquer momento que desejassem.

3.1.1 Critérios de inclusão

Ambos os grupos:

- Gestação única;
- Ausência de adenoma hipofisário;
- Nunca ter sido submetida à cirurgia bariátrica;
- Anuência em participar da pesquisa e assinar o TCLE aprovado pela CAPPesq.

Grupo DMG:

- Diagnóstico de DMG em gestação índice (gestação na qual foi feito o diagnóstico de DMG) (de acordo com a definição descrita no item 3.1.3);
- Não ter feito uso de corticoide antes do diagnóstico de DMG.

Grupo Controle:

- Ausência de história de DMG em gestação prévia;
- Ausência de diagnóstico de DMG durante a gestação índice (de acordo com a definição descrita no item 3.1.3).

3.1.2 Critérios de exclusão

- DM ou alteração de glicemia conhecida antes da gestação índice;
- Não realização de TTOG quando a glicemia de jejum do primeiro trimestre foi normal (< 92 mg/dL) por náusea ou outras razões;
- Perda de seguimento.

3.1.3 Definição de DMG

Na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, o diagnóstico de DMG é feito de acordo com os critério propostos pelo IADPSG: glicemia de jejum ≥ 92 mg/dL ou TTOG com 75 g de glicose realizado entre 24-28 semanas de gestação com pelo menos um valor alterado (glicemia de jejum ≥ 92 mg/dL e/ou 1h ≥ 180 mg/dL e/ou 2h ≥ 153 mg/dL) ⁽¹⁾.

Após concordarem em participar do estudo, as gestantes tiveram a coleta de sangue realizada e seguiram protocolo pré-natal assistencial padrão da Instituição. Segundo esse protocolo, as gestantes que têm o diagnóstico de DMG fazem acompanhamento pré-natal com obstetra, nutricionista e enfermagem e realizam aferição da glicemia capilar quatro vezes ao dia. O objetivo do controle glicêmico é obter menos de 30% das medições alteradas ou menos de 20% das medições alteradas quando há repercussão fetal (percentil acima de 70 ou Índice de Líquido amniótico [ILA] aumentado [>18 cm]). Os seguintes valores da glicemia capilar foram considerados normais:

- Jejum < 95 mg/dL;

- Uma hora pós-prandial < 140 mg/dL;
- Duas horas pós-prandial < 120 mg/dL.

Para as pacientes que não atingem o percentual de 70 a 80% das glicemias capilares abaixo dos valores esperados apenas com dieta, prescreve-se insulina e controle de glicemia capilar seis vezes ao dia para o ajuste das doses de insulina ^(49, 50).

Após o parto, as pacientes foram orientadas a retornarem a partir de seis semanas para realização de novo TTOG com 75 g de glicose e avaliação do estado glicêmico ⁽⁴⁹⁾. No pós-parto, os valores de glicemia do TTOG com 75 g considerados normais foram glicemia de jejum ≤ 99 mg/dL e 2 horas após a sobrecarga ≤ 140 mg/dL; considerou-se glicemia jejum alterada (GJA) valores de glicemia de jejum > 99 mg/dL e < 126 mg/dL. Considerou-se tolerância à glicose diminuída (TGD) valores de glicemia 2 horas após a sobrecarga > 140 mg/dL e < 200 mg/dL. Os casos de GJA e de TGD formam, em conjunto, o grupo considerado “pré-diabético” (pré-DM). O diagnóstico de DM2 foi feito em presença de glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e de glicemia 2 horas após a sobrecarga ≥ 200 mg/dL ⁽⁵¹⁾.

3.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados da gestação foram coletados a partir do prontuário do serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas e do prontuário eletrônico do

Setor de Endocrinopatias e Gravidez e da anamnese realizada no momento da inclusão da gestante no estudo. Os seguintes dados foram coletados:

- Dados pessoais, hábitos e vícios, antecedentes familiares;
- Dados antropométricos (peso e altura), índice de massa corpórea (IMC) pré-gestacional.

Somente no grupo DMG, os seguintes dados foram coletados:

- Controle glicêmico ao longo da gestação, necessidade ou não de uso de insulina para controle glicêmico adequado, dose de insulina por kg de peso ao final da gestação.

Os resultados dos exames laboratoriais foram consultados no sistema HCMED. Os exames e respectivos métodos utilizados na análise foram:

- Glicemia no jejum e no TTOG: método enzimático hexoquinase.

Os dados do parto e do recém-nascido (RN):

- Via do parto;
- Dados antropométricos do RN;
- Necessidade de unidade de terapia intensiva (UTI);
- Presença ou não de hipoglicemia neonatal.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de cada uma das participantes para a extração de DNA genômico de leucócitos, que foi realizada pelo método de *salting out*, conforme previamente descrito ⁽⁵²⁾. O *pellet* final de DNA foi ressuspendido em 50 – 200 µL de H₂O miliQ® estéril e incubado a 37°C durante 15 minutos. O DNA assim obtido ficou armazenado a temperatura de -20° C.

Os SNPs selecionados cobrem aproximadamente 95% da variabilidade genética comum de cada um dos genes candidatos e têm frequência do alelo raro (MAF) de, pelo menos, 10%. Essas premissas não foram consideradas para o gene *PRLR*, no qual foram avaliados dois SNPs previamente associados com DMG ⁽³¹⁾ e para o gene *FOXD3*, no qual há apenas um SNP até o momento identificado:

- *PRLR*: rs10068521 e rs9292578;
- *HTR2B*: rs765458, rs10187149, rs17619600, rs4973377, rs10194776;
- *FOXM1*: rs2074985, rs2302257, rs2072360, rs3829865, rs7309114;
- *FOXD3*: rs6588025;
- *MEN1*: rs624975, rs559566.

A partir do DNA extraído, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), para detecção das variantes alélicas de cada SNP. Para preparação da PCR, foram utilizados os seguintes reagentes: *TaqMan Genotyping Master Mix* (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo *AmpliTaq Gold DNA polymerase*, dNTPs sem dUTP, referência passiva e mistura de componentes otimizados) e *TaqMan SNP Genotyping Assays* (contendo duas sequências de *primers* específicos para amplificar o polimorfismo de interesse; e duas sondas alelo-específicas *TaqMan MGB*, para detectar os alelos do polimorfismo de interesse) (Applied Biosystems, CA, EUA). A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem das duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é marcada com o *Reporter VIC*, e a sonda do alelo 2 é marcada com o *Reporter FAM*, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação.

As análises foram realizadas em blocos de 550 amostras; como esse trabalho teve caráter exploratório para alguns SNPs, por uma questão de custo, a análise não foi completa para os SNPs que não demonstraram diferença significativa após a análise parcial. A Tabela 3 mostra quais SNPs foram analisados na amostra completa e quais foram analisados apenas parcialmente. Na amostra completa, foram avaliadas 443 gestantes sem DMG e 453 com DMG; na amostra parcial, foram avaliadas 272 gestantes sem DMG e 274 com DMG.

Tabela 3 - Tamanho da amostra avaliada para cada polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) estudado

Gene	SNP	n 896	n 546
<i>PRLR</i>	rs10068521		x
	rs9292578	x	
	rs765458	x	
<i>HTR2B</i>	rs10187149	x	
	rs17619600	x	
	rs4973377	x	
	rs10194776	x	
<i>FOXM1</i>	rs2074985		x
	rs2302257	x	
	rs2072360		x
	rs3829865	x	
<i>FOX03</i>	rs7309114		x
	rs6588025		x
<i>MEN1</i>	rs624975		x
	rs559566		x

HTR2B: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B; *FOXD3*: *Forkhead box D3*; *FOXM1*: *Forkhead box M1*; *MEN1*: *Menin 1*; *PRLR*: Receptor da prolactina.

3.4 POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLETÍDEO

3.4.1 *PRLR*

Este gene está situado no situado no braço curto do cromossomo 5. O SNP rs10068521 está localizado na região 5' não traduzida (5'UTR) e o SNP rs9292578 está localizado na região promotora do gene. Ambos SNPs aumentaram o risco de DMG em 2,36 vezes na população chilena, em estudo que utilizou informações de um banco de dados de um único hospital

e comparou os dados de 96 gestantes controles (glicemia de jejum de primeiro trimestre e TTGO entre 24 e 28 semanas de gestação normais) com 96 gestantes com DMG (diagnóstico por glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL ou glicemia ≥ 140 mg/dL 2 horas após a sobrecarga com 75 g de glicose). Observou-se que os dois SNPs estavam em desequilíbrio de ligação e eram transmitidos juntos nos casos de DMG; como eles estão localizados em uma região não codificadora do gene do PRLR, os autores acreditam que o mecanismo mais provável de aumento de risco de DMG seja por efeitos na modulação da eficiência da transcrição do gene *PRLR* ⁽³¹⁾.

3.4.2 *HTR2B*

Esse gene está situado no braço curto do cromossomo 2. Os SNPs rs765458 e rs10187149 estão localizados na região 5'UTR. Existem quatro publicações com o SNP rs765458, apenas uma delas relacionada ao DMG (sem mostrar associação) ⁽⁵³⁾; as demais são em comportamento depressivo suicida, uma delas mostrando associação ^(54, 55). Não há publicações com o SNP rs10187149.

Os SNPS rs17619600, rs4973377 e rs10194776 são variantes intrônicas. Existem duas publicações com o SNP rs17619600, uma que mostra associação com traço de personalidade por busca de diversão ⁽⁵⁶⁾ e uma que não mostrou associação com DMG ⁽⁵³⁾. Existem três publicações com o SNP rs4973377 analisando a resposta à duloxetina em pacientes depressivos ⁽⁵⁴⁾, dependência de cocaína ⁽⁵⁷⁾ e traço de personalidade por

busca de diversão ⁽⁵⁶⁾ e quatro publicações com o SNP rs10194776, duas em traço de personalidade ^(56, 58), uma em enxaqueca ⁽⁵⁹⁾ e uma em espectro autista (60).

3.4.3 *FOXM1*

Esse gene está situado no braço curto do cromossomo 12. Os SNPs rs2074985, rs2302257 e rs3829865 são variantes intrônicas e o SNP rs2072360 está localizado no exon 8. Somente existe uma publicação com o SNP rs2074985 relacionada à câncer de mama ⁽⁶¹⁾ e uma com o rs2302257 relacionado à câncer do ovário ⁽⁶²⁾; não existem publicações com o rs3829865 e com o rs2072360.

O SNP rs7309114 está localizado após a 3'UTR do gene *FOXM1*, já no gene *TEX52*. Não existem publicações abordando o rs7309114.

3.4.4 *FOXD3*

Este gene está situado no braço curto do cromossomo 1. O SNP rs6588025 está localizado na região 3'UTR, e não existem estudos associando-o com quaisquer doenças.

3.4.5 *MEN1*

Este gene está situado no braço curto do cromossomo 11. O SNP rs624975 é uma variante intrônica e o SNP rs559566 está em uma região entre os genes *MEN1* e *SF1*. Existem duas publicações com o SNP rs624975, relacionadas com adenoma pituitário ⁽⁶³⁾ e com neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (NEM1) ⁽⁶⁴⁾.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas estão expressas como mediana e intervalos interquartílicos 25-75% e as variáveis categóricas estão expressas como número de casos e porcentagem de indivíduos afetados.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é um princípio que afirma que a variação genética em uma população permanecerá estável de uma geração para outra, prevendo que a frequência do genótipo e dos alelos permanecerá constante, pois está em equilíbrio na população. Nas avaliações de SNPs em genes candidatos, avalia-se se as frequências são diferentes das esperadas pelo EHW, pois, se esse for o caso, o SNP não poderá ser testado quanto a sua associação com a condição clínica ⁽⁶⁵⁾.

O EHW foi determinado usando-se a frequência dos alelos no teste do qui quadrado (χ^2) de Pearson ao nível de significância de 0,05 e SNPs que falharam neste teste não foram avaliados nas análises de prevalência.

Para a comparação das medianas das variáveis contínuas relativas às características entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney para amostras independentes. O teste do χ^2 de Pearson foi utilizado para comparar a frequência dos SNPs entre os grupos com e sem DMG e as diferenças entre as variáveis categóricas dos grupos com e sem DMG.

Os SNPs foram avaliados no modelo raro dominante (RD), no qual a presença do alelo raro em heterozigose já explica o fenótipo, ou no modelo codominante (CD), no qual o efeito do alelo é gradual (característica aditiva).

Devido à característica exploratória do presente estudo, optou-se pela análise nos dois modelos.

A magnitude do risco conferido pelos SNPs foi estimada usando *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para estimar a OR ajustada para potenciais fatores de confusão (idade na data da última menstruação [DUM], IMC prévio e ganho de peso durante a gestação), uma análise de regressão logística binária foi realizada com esses fatores como covariáveis no modelo de regressão. A correção para múltiplas comparações devido aos múltiplos SNPs testados foi feita pela correção de Bonferroni para cada um dos genes, dividindo-se 0,05 pelo número de SNPs de cada gene. Desta forma, para os genes *HTR2B* e *FOXM1*, foram considerados significantes valores de $P < 0,01$ (bicaudal).

O presente estudo teve caráter exploratório, e por isso, utilizou-se uma amostra de conveniência, na qual buscou-se a inclusão do maior número de participantes possíveis. O cálculo do poder foi realizado *a posteriori* usando a calculadora *GAS Power Calculator (Genetic Association Study power calculator)* ⁽⁶⁶⁾. O poder do estudo foi >90% (100% e 99,7%, respectivamente) para detectar associações do SNP rs17619600 no gene *HTR2B* com DMG nos modelos codominante e dominante, respectivamente.

A análise dos haplótipos foi realizada utilizando-se o *software* disponível online SHEsis. Todos os haplótipos com frequência <0,03 foram ignorados para a análise. Para a avaliação das diferentes combinações, utilizou-se o teste χ^2 de Pearson, sendo considerado significativo um valor de $P < 0,05$ ⁽⁶⁷⁾.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PARTICIPANTES

As características clínicas e bioquímicas das 443 participantes sem DMG e das 453 com DMG estão mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas e bioquímicas das participantes com e sem diabetes mellitus gestacional (DMG)

	Sem DMG	Com DMG	Valor de <i>P</i>
N	443	453	
Idade na DUM	29,1 (24,4 – 33,4)	33,2 (28,8 – 37,1)	<0,0001
Etnia (brancas, %)	85	85	0,94
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	24,7 (21,8 – 28,1)	28,2 (24,8 – 32,9)	<0,0001
Ganho de Peso (kg)	12,0 (8,7 – 15,2)	9,0 (5,0 – 13,3)	<0,0001
Hipotireoidismo (%)	15,8	19,4	0,29
Asma (%)	3,5	2,4	0,46
Pré-eclampsia (%)	8,4	8,5	0,76
HAS (%)	7,5	23,8	<0,0001
Antecedente familiar de DM (%)	49	58	<0,0001
Tabagismo declarado (%)	9,1	7,9	0,30
Uso de medicações (%)	27,6	51,3	<0,0001
Uso de insulina (%)	-	18,7	-
Glicemia jejum (mg/dL)	78 (74 – 82)	92 (83 – 97)	<0,0001
Tipo de Parto (cesariana %)	48	60	0,001
Número de Gestações	1,55 ± 0,49	1,72 ± 0,45	<0,0001
Peso do RN (g)	3.240 (2.897-3.542)	3.210 (2.780-3.512)	0,04
RN GIG (%)	8	9	
RN PIG (%)	10	13	0,44
RN AIG (%)	82	78	

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartilico, exceto número de gestações, que está expresso em média ± desvio padrão. AIG: adequado para idade gestacional; DUM: data da última menstruação; GIG: grande para idade gestacional; HAS: hipertensão arterial sistêmica; IMC: índice de massa corpórea; PIG: pequeno para idade gestacional; RN: recém-nascido. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Observa-se que, em comparação ao grupo sem DMG, as participantes com DMG eram mais velhas (33,2 [28,8 – 37,1] vs. 29,1 [24,4 – 33,4] anos), tinham um maior número de gestações prévias ($1,72 \pm 0,45$ vs. $1,55 \pm 0,49$), apresentavam um maior IMC pré-gestacional (28,2 [24,8 – 32,9] vs. 24,7 [21,8 – 28,1] kg/m²) e maior frequência de antecedentes familiares de DM (58 vs. 49%). Na avaliação da etnia segundo critério de cor autorreferida, 85% das mulheres em ambos os grupos eram brancas.

As participantes com DMG apresentaram menor ganho de peso durante a gestação (9,0 [5,0 – 13,3] vs. 12,0 [8,7 – 15,2] kg), maior frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) (23,8 vs. 7,5 %), maior frequência de uso de medicações (51,3 vs. 27,6%) e maior glicemia de jejum (92 [83 – 97] vs. 78 [74 – 82] mg/dL) em comparação às participantes sem DMG. O parto cesáreo foi mais frequente no grupo com DMG (60 vs. 48%). Entre as participantes com DMG, 18,7% fizeram uso de insulina. A Tabela 5 mostra as características clínicas e bioquímicas das participantes com DMG divididas de acordo com o uso ou não de insulina.

Tabela 5 - Características clínicas e bioquímicas das participantes com diabetes mellitus gestacional agrupadas de acordo com o uso ou não de insulina

	Sem Insulina	Com Insulina	Valor de P
N	365	84	
Idade DUM	33,2 (28,7 – 37,1)	33,8 (30,1 – 37,2)	0,28
Etnia (brancas, %)	84	88	0,48
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	27,4 (24,2 – 31,6)	31,6 (27,8 – 36,4)	<0,0001
Ganho de Peso (kg)	9,0 (5,0 – 13,0)	8,3 (6,0 – 14,0)	0,52
Hipotireoidismo (%)	21	13	0,12
Asma (%)	2,5	2,5	0,98
Pré-eclampsia (%)	9	6	0,51
HAS (%)	23	28	0,36
Antecedente familiar de DM (%)	55,8	66,7	0,18
Tabagismo declarado (%)	6,8	7,1	0,92
Uso de medicações (%)	49,3	59,5	0,09
Glicemia jejum (mg/dL)	92 (82 – 96)	98 (92 – 105)	<0,0001
Glicemia no TTOG (mg/dL)			
0	89 (81 – 94)	98 (92 – 108)	<0,0001
Tempos (min)			
60	163 (142 – 184)	186 (153 – 203)	0,005
120	154 (126 – 167)	152 (129 – 200)	0,24
Tipo de Parto (Cesariana, %)	59	66	0,27
Número de Gestações	1,70 ± 0,46	1,78 ± 0,41	0,14
Peso do RN (g)	3.200 (2.767-3.502)	3.335 (2.900-3.600)	0,06
RN GIG (%)	8	11	
RN PIG (%)	16	4	0,0073
RN AIG, %)	76	85	
TTOG alterado (pós-parto)(%)	14,5	34,5	0,0003
TTGO pós-parto (normal/pré-DM/DM %)	85,5/14,0/0,5	65,5/31,0/3,5	0,0056

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartilico, exceto número de gestações, que está expresso em média ± desvio padrão. AIG: adequado para idade gestacional; DM: Diabetes mellitus; DUM: data da última menstruação; GIG: grande para idade gestacional; HAS: hipertensão arterial sistêmica; IMC: índice de massa corpórea; PIG: pequeno para idade gestacional; RN: recém-nascido; TTOG: teste de tolerância oral à glicose. $P \leq 0,05$ foi considerado significante.

O grupo de participantes com DMG que usou insulina tinha um maior IMC pré-gestacional (31,6 [27,8 – 36,4] vs. 27,4 [24,2 – 31,6] kg/m²), maiores valores de glicemia de jejum (98 [92 – 105] vs. 92 [82 – 96] mg/dL) e de glicemia nos tempos 0 (98 [92 – 108] vs. 89 [81 – 94] mg/dL) e 60 minutos (186 [153 – 203] vs. 163 [142 – 184] mg/dL) do TTOG em comparação com as participantes com DMG que não usaram insulina.

No protocolo de acompanhamento, todas as pacientes com DMG são encaminhadas para realização de TTOG a partir de seis semanas após o parto. No presente estudo 69% das participantes realizaram o TTOG pós-parto. Uma maior frequência de TTOG alterado no período pós-parto foi observada no grupo que usou em relação ao grupo que não usou insulina (34,5 vs. 14,5%). A proporção de RN pequenos para a idade gestacional (PIGs) foi menor nas participantes que usaram insulina (16 vs. 4%), enquanto as proporções de RN grandes para a idade gestacional (GIGs) e de RN adequados para a idade gestacional (AIGs) foram maiores nas participantes que usaram insulina (11 vs. 8% e 85 vs. 76%, respectivamente).

O diagnóstico foi feito por GJA em 57% das participantes com DMG (nestas não foi realizado o TTOG) e por alteração no TTOG realizado entre 24 e 28 semanas em 43% das participantes. Quando as participantes com diagnóstico por GJA foram comparadas com aquelas com diagnóstico por TTOG, observa-se que as primeiras têm o IMC pré-gestacional maior (29,3 [25,6 – 34,8] vs. 26,6 [23,6 – 30,8] kg/m²), fizeram mais uso de insulina e tiveram maior frequência de alteração no TTOG pós-parto (42 vs. 15%) (Tabela e Figura mostradas nos Anexo 4 e 5, respectivamente).

5.2 ASSOCIAÇÃO DOS SNPs COM DMG

As MAFs de cada um dos SNPs, bem como o resultado da análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estão mostrados na Tabela 6. Os SNPs cuja distribuição dos genótipos não respeitou o EHW não foram analisados. O SNP rs4973377 no gene *HTR2B* não foi avaliado, pois somente um genótipo foi encontrado na população estudada.

Tabela 6 - Frequência dos alelos raros (MAFs) e análise do Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) estudados

Gene	SNP	Genótipo	Alelo ANCESTRAL	EHW	Valor de P	Frequência do alelo raro	Frequência do alelo raro em outras populações
<i>PRLR</i>	rs10068521	[C/G]	G	Não	0,01	0,073	3% a 9%
<i>PRLR</i>	rs9292578	[A/C]	C	Sim	0,43	0,071	3% a 9%
<i>HTR2B</i>	rs765458	[A/G]	A	Sim	0,19	0,474	39% a 48%
<i>HTR2B</i>	rs10187149	[A/C]	A	Sim	0,38	0,422	40% a 46%
<i>HTR2B</i>	rs17619600	[C/T]	T	Sim	0,08	0,156	9% a 13%
<i>HTR2B</i>	rs4973377	[A/G]	A	-	-	0	7% a 14%
<i>HTR2B</i>	rs10194776	[C/T]	T	Sim	0,88	0,602	40% a 49%
<i>FOXM1</i>	rs2074985	[G/A]	T	Não	0,02	0,49	23% a 48%
<i>FOXM1</i>	rs2302257	[C/G]	C	Sim	0,57	0,174	15% a 23%
<i>FOXM1</i>	rs2072360	[C/T]	T	Sim	0,86	0,223	19% a 35%
<i>FOXM1</i>	rs3829865	[C/T]	T	Sim	0,22	0,132	13% a 28%
<i>FOXM1</i>	rs7309114	[A/G]	A	Sim	0,08	0,309	19% a 42%
<i>FOXD3</i>	rs6588025	[C/T]	T	Sim	0,55	0,227	18% a 37%
<i>MEN1</i>	rs624975	[C/T]	C	Sim	0,24	0,139	8% a 30%
<i>MEN1</i>	rs559566	[A/G]	G	Não	0,03	0,535	30% a 44%

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *FOXM1*: Forehead Box protein M1, *FOXD3*: Forkhead Box D3; *HTR2B*: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B; *MEN1*: *menin 1*; *PRLR*: Receptor de prolactina. SNPs cuja distribuição dos genótipos não respeitou o EHW estão mostrados em vermelho.

5.2.1 PRLR

A análise do SNP rs10068521 não foi realizada, pois este SNP não se encontra em EHW. Não houve associação entre o SNP rs9292578 e DMG (Tabela 7) ou o uso de insulina (Tabela 8).

Tabela 7 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs9292578 no gene *PRLR* de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)

SNP	Sem DMG	Com DMG	OR (IC 95%)	Valor de P
N	443	453		
PRLR				
rs9292578			1,16 (0,82 – 1,87)	0,53 (CD)
CC	0,879	0,848	1,29 (0,49 – 1,43)	0,52 (RD)
CA	0,114	0,144		
AA	0,007	0,008		
MAF	0,064	0,080		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Tabela 8 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs9292578 no gene *PRLR* de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional

SNP	Sem Insulina	Com Insulina	OR (IC 95%)	Valor de P
N	363	84		
PRLR				
rs9292578				
CC	0,842	0,875	0,94 (0,33 – 1,87)	0,89 (CD)
CA	0,153	0,104	0,79 (0,50 – 3,68)	0,62 (RD)
AA	0,005	0,021		
MAF	0,081	0,073		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

5.2.2 HTR2B

A análise do SNP rs4973377 não foi realizada, pois um único genótipo foi observado na população estudada.

Não houve associação dos SNPs rs10187149, rs10194776 e rs765458 com DMG (Tabela 9) ou com o uso de insulina (Tabela 10).

O SNP rs17619600 associou-se ao DMG, com o alelo C conferindo risco tanto no modelo raro dominante (OR de 2,32; IC 1,61- 3,37; $P < 0,0001$) quanto no modelo codominante (OR de 2,15; IC 1,53 – 3,09; $P < 0,0001$) (Tabela 9). Esse SNP não conferiu risco para o uso de insulina (Tabela 10).

Tabela 9 - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *HTR2B* de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)

SNP	Sem DMG	Com DMG	OR (IC 95%)	Valor de P
<i>HTR2B</i>	443	453		
rs765458				
AA	0,248	0,239	0,90 (0,64 – 1,27)	0,55 (RD)
AG	0,542	0,518	1,02 (0,82 – 1,27)	0,82 (CD)
GG	0,210	0,243		
MAF	0,481	0,502		
rs10187149				
AA	0,324	0,338		
AC	0,509	0,498	0,94 (0,77 – 1,45)	0,70 (RD)
CC	0,167	0,164	0,92 (0,74 – 1,14)	0,46 (CD)
MAF	0,422	0,413		
rs10194776				
TT	0,277	0,279		
TC	0,526	0,495	0,99 (0,79 – 1,52)	0,57 (RD)
CC	0,197	0,226	0,96 (0,78 – 1,19)	0,74 (CD)
MAF	0,479	0,473		
rs17619600				
TT	0,839	0,614	2,32 (1,61 – 3,37)	<0,0001 (RD)
TC	0,149	0,329	2,15 (1,53 – 3,09)	<0,0001 (CD)
CC	0,012	0,057		
MAF	0,087	0,223		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Tabela 10 - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *HTR2B* de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional

SNP	Sem Insulina	Com Insulina	OR (IC 95%)	Valor de P
<i>HTR2B</i>	363	84		
rs765458				
AA	0,261	0,155	1,27 (0,87 – 1,25)	0,20 (CD)
AG	0,490	0,619	1,86 (0,95 – 3,63)	0,05 (RD)
GG	0,248	0,226		
MAF	0,493	0,535		
rs10187149				
AA	0,335	0,361	0,80 (0,68 – 2,06)	0,25 (CD)
AC	0,486	0,530	0,89 (0,73 – 2,13)	0,41 (RD)
CC	0,179	0,109		
MAF	0,421	0,373		
MAF	0,214	0,255		
rs10194776				
TT	0,289	0,250	0,88 (0,61 – 1,27)	0,50 (CD)
TC	0,477	0,560	0,82 (0,40 – 1,31)	0,31 (RD)
CC	0,234	0,190		
MAF	0,472	0,470		
rs17619600				
TT	0,622	0,575	1,39 (0,83 – 2,32)	0,20 (CD)
TC	0,327	0,340	1,30 (0,45 – 2,25)	0,33 (RD)
CC	0,051	0,085		
MAF	0,214	0,255		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Na avaliação da associação entre haplótipos no gene *HTR2B* e a presença de DMG realizada pelo *software* disponível *online* SHEsis (67), os SNPs selecionados foram colocados na seguinte ordem para análise: rs10194776, rs765458, rs10187149 e rs17619600. A combinação do haplótipo TACC, que contém o alelo raro C do rs17619600, associou-se a um maior risco de DMG, conforme mostrado na Tabela 11 (o número total de portadores do haplótipo foi de 83).

Tabela 11 - Frequência do haplótipo TACC no gene *HTR2B* de acordo com a presença de diabetes mellitus gestacional (DMG)

	DMG	Sem DMG	OR (IC 95%)	P
N	453	443		
TACC	99 (0,113)	60 (0,072)	1,709 (1,22-2,39)	0,001

Sequência dos polimorfismos de um único nucleotídeo: rs10194776, rs765458, rs10187149 e rs17619600. Resultados expressos em número absoluto (cada portador com dois haplótipos) e frequência relativa à população em questão. IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*.

5.2.3 FOXM1

A análise do SNP rs2074985 não foi realizada, pois este SNP não se encontra em EHW na população estudada.

Não houve associação entre os SNPs rs2302257, rs2072360, rs3829865 e rs7309114 e DMG (Tabela 12) ou com o uso de insulina (Tabela 13).

Tabela 12 - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *FOXM1* de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)

SNP	Sem DMG	Com DMG	OR (IC 95%)	Valor de P
FOXM1	443	453		
rs2302257				
GG	0,676	0,683	1,07 (0,68 – 3,29)	0,80 (CD)
GC	0,299	0,276	1,10 (0,75 – 1,42)	0,78 (RD)
CC	0,025	0,041		
MAF	0,175	0,179		
rs2072360				
TT	0,594	0,607	0,94 (0,72 – 1,52)	0,75 (RD)
TC	0,349	0,353	0,91 (0,63 – 2,20)	0,59 (CD)
CC	0,057	0,040		
MAF	0,232	0,217		
rs3829865				
TT	0,724	0,774	0,76 (0,56 – 1,86)	0,10 (RD)
TC	0,263	0,212	0,57 (0,45 – 0,93)	0,08 (CD)
CC	0,013	0,014		
MAF	0,145	0,119		
rs7309114			1,15 (0,93 – 1,37)	0,29 (CD)
GG	0,507	0,476	1,11 (0,77 – 1,60)	0,57 (RD)
GA	0,399	0,396		
AA	0,094	0,128		
MAF	0,293	0,326		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Tabela 13 - Frequência genotípica dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *FOXM1* de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional

SNP	Sem Insulina	Com Insulina	OR (IC 95%)	Valor de P
N	363	84		
FOXM1				
rs2302257				
GG	0,698	0,622	1,13 (0,89 – 2,16)	0,63 (CD)
GC	0,254	0,378	1,40 (0,85 – 2,32)	0,15 (RD)
CC	0,048	0		
MAF	0,175	0,189		
rs2072360				
TT	0,619	0,551	1,12 (0,81 – 2,24)	0,69 (CD)
TC	0,341	0,408	1,22 (0,43 – 1,64)	0,58 (RD)
CC	0,040	0,041		
MAF	0,211	0,245		
rs3829865				
TT	0,783	0,723	1,11 (0,73 – 2,19)	0,71 (CD)
TC	0,203	0,265	1,22 (0,46 – 1,52)	0,51 (RD)
CC	0,014	0,012		
MAF	0,115	0,145		
rs7309114				
GG	0,482	0,449	1,18 (0,46 – 3,15)	0,72 (CD)
GA	0,384	0,449	1,13 (0,52 – 1,95)	0,99 (RD)
AA	0,134	0,102		
MAF	0,326	0,327		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Não se encontrou nenhuma associação significativa entre os haplótipos deste gene e a presença de DMG (dado não mostrado).

5.2.4 *FOXD3*

Não houve associação entre o SNP rs6588025 e DMG (Tabela 14) ou o uso de insulina (Tabela 15).

Tabela 14 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs6588025 no gene *FOXD3* de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)

SNP	Sem DMG	DMG	OR (IC 95%)	Valor de <i>P</i>
<i>FOXD3</i>	278	274		
rs6588025			0,88 (0,58 – 1,17)	0,44 (CD)
TT	0,588	0,620	0,90 (0,15 – 13,19)	0,59 (RD)
TC	0,339	0,339		
CC	0,073	0,041		
MAF	0,242	0,209		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Tabela 15 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs6588025 no gene *FOXD3* de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional

SNP	Sem Insulina	Com Insulina	OR (IC 95%)	Valor de <i>P</i>
<i>FOXD3</i>	224	49		
rs6588025				
TT	0,631	0,571	1,12 (0,89 – 2,04)	0,69 (CD)
TC	0,320	0,429	1,29 (0,35 – 1,36)	0,28 (RD)
CC	0,049	0		
MAF	0,209	0,214		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

5.2.5 *MEN1*

A análise do SNP rs559566 não foi realizada, pois ele não se encontra em EHW. Não houve associação entre o SNP rs624975 e DMG (Tabela 16) ou o uso de insulina (Tabela 17).

Tabela 16 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs624975 no gene *MEN1* de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (DMG)

SNP	Sem DMG	Com DMG	OR (IC 95%)	Valor de P
N	278	274		
<i>MEN1</i>				
rs624975			0,99 (0,70 – 1,44)	0,96 (CD)
CC	0,740	0,750	0,94 (0,38 – 12,22)	0,75 (RD)
CT	0,238	0,221		
TT	0,022	0,029		
MAF	0,141	0,139		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

Tabela 17 - Frequência genotípica do polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) rs624975 no gene *MEN1* de acordo com o uso ou não de insulina no grupo com diabetes mellitus gestacional

SNP	Sem Insulina	Com Insulina	OR (IC 95%)	Valor de P
<i>MEN1</i>				
	224	49		
rs624975				
CC	0,753	0,735	1,14 (0,93 – 2,26)	0,68 (CD)
CT	0,215	0,245	1,26 (0,39 – 1,71)	0,53 (RD)
TT	0,031	0,020		
MAF	0,139	0,143		

IC: Intervalo de confiança; MAF: Frequência do alelo raro; OR: *Odds ratio*. Análise realizada nos modelos co-dominante (CD) e raro dominante (RD) após ajuste para idade, índice de massa corpórea pré-gestacional e ganho de peso.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

O DMG ocorre em 10-18% das gestações e tem como fatores de risco idade materna avançada, sobrepeso e obesidade, história familiar de DM2, paridade, tabagismo, história prévia de DMG, inatividade física e síndrome dos ovários policísticos ⁽⁴⁾.

Na presente casuística, as participantes com DMG foram mais velhas, tinham maior paridade, apresentavam um maior IMC e maior frequência de antecedentes familiares de DM2 do que as participantes sem DMG. Esse perfil de mulheres com DMG também foi encontrado em outros estudos caso-controle ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾.

As participantes com DMG apresentaram maior frequência de HAS, o que já foi demonstrado em outros estudos ^(71, 72). Devido a essa maior prevalência de HAS, o grupo com DMG apresentou maior frequência de uso de medicamentos, em sua maioria, alfa-metildopa (dado não mostrado).

Os maiores valores de glicemia de jejum e de glicemias no TTOG no grupo com DMG era esperado, uma vez que o diagnóstico é baseado nos valores de glicemia ^(1, 51).

O menor ganho de peso observado nas participantes com DMG provavelmente deveu-se ao seguimento mais frequente dessas gestantes para a reavaliação das mudanças do estilo de vida, que se constituem no

principal tratamento do DMG (90% das participantes). O objetivo do tratamento não farmacológico é o controle glicêmico, avaliado por automonitorização da glicemia capilar, com alvos de jejum < 95 mg/dL, uma hora pós-prandial < 140 mg/dL ou duas horas pós-prandial < 120 mg/dL^(73, 74). Quando as gestantes não atingem 70% a 80% de controle glicêmico adequado após a orientação de mudança de estilo de vida, indica-se a introdução de insulina⁽⁵⁰⁾. A insulina é a primeira linha de terapia farmacológica na gestação; ela não atravessa a barreira placentária⁽⁷³⁻⁷⁶⁾. No presente estudo, 18,7% das participantes com DMG usaram insulina, o que está de acordo com dados da literatura^(73, 77).

Outro dado concordante com a literatura foi a maior frequência de partos cesáreas no grupo com DMG. O DM causa pior contratilidade miometrial e aumenta as taxas de parto cesárea⁽⁷⁸⁾. Existe uma maior frequência de cesariana em mulheres com DMG e estudos mostram que o DMG é fator de risco independente para parto cesárea⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾.

O grupo de participantes com DMG que precisou utilizar insulina apresentava maior IMC pré-gestacional e maiores valores de glicemia de jejum e de glicemia nos tempos 0 e 60 minutos do TTOG, conforme previamente mostrado⁽⁸²⁾. Esse grupo também apresentou maior frequência de TTOG alterado (pré-DM e DM) no período pós-parto que o grupo que não utilizou insulina. Esse achado não foi observado em duas revisões que não encontraram maior evolução para DM2 no grupo recebendo insulina^(83, 84). Mesmo quando realizamos a avaliação considerando pré-DM e DM separadamente, mantém-se a diferença significativa com o grupo que não

usou insulina. Esse achado provavelmente reflete o fato das pacientes que utilizaram insulina apresentarem maiores alterações prévias no metabolismo da glicose, conforme sugerido pelos valores mais elevados de glicemia de jejum e de glicemia aos 60 minutos do TTOG.

Quando avaliamos as gestantes com DMG de acordo com o método diagnóstico, por glicemia de jejum ou por TTOG, observamos que o primeiro grupo apresentou maior IMC pré-gestacional, maior frequência de uso de insulina, de RN GIGs e de alterações no TTOG pós parto; este dado é compatível com achados da literatura ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾, que mostram um perfil diferente deste subgrupo, apresentando maior gravidade e repercussão materno fetal, provavelmente associado a uma maior resistência hepática à insulina deste grupo ⁽⁷²⁾.

Observamos, ainda, diferenças na classificação do peso dos RN conforme a idade gestacional; o grupo das participantes com DMG e uso de insulina apresentou maior percentual de RN GIG e AIG e menor percentual de PIG. Esse dado, no entanto, não é concordante com a literatura ⁽⁸³⁾ que não mostrou diferenças. Esse pode ser um resultado falso-positivo relacionado ao reduzido número de participantes que usaram insulina no presente estudo (apenas 84 participantes).

6.2 POLIMORFISMOS

Os SNPs estudados foram escolhidos por estarem em genes que codificam proteínas associadas à expansão das células beta durante a gestação, o que os torna potenciais candidatos a participarem da susceptibilidade ao desenvolvimento do DMG.

O principal achado do presente estudo foi que a presença do alelo C no SNP rs17619600 do *HTR2B* conferiu aumento do risco de DMG na população avaliada. Complementarmente à análise do SNP isolado, no estudo de haplótipos, dentre as várias possibilidades de combinações existentes, um dos haplótipos, o TACC, que contém o alelo raro C do rs17619600, associou-se a um maior risco de DMG.

O *HTR2B* codifica o receptor de 5-HT ligado à proteína G. Acredita-se que a 5-HT seja crítica para a regulação da proliferação das células beta pancreáticas^(18, 88). Em roedoras prenhas, o HTR2B está hiperexpresso nas ilhotas no período de maior replicação das células beta; o seu bloqueio impede o aumento da massa dessas células e está associado ao DMG em roedores⁽³²⁾. Em ilhotas humanas, a ativação desse receptor está associada à secreção de insulina estimulada por glicose⁽³⁸⁾.

Os estudos pré-clínicos sugerem que a sinalização de serotonina tem um importante papel na liberação de insulina estimulada por glicose e na manutenção da homeostase glicêmica. Quando a sinalização de serotonina via hormônios lactogênicos está prejudicada, a proliferação de células beta

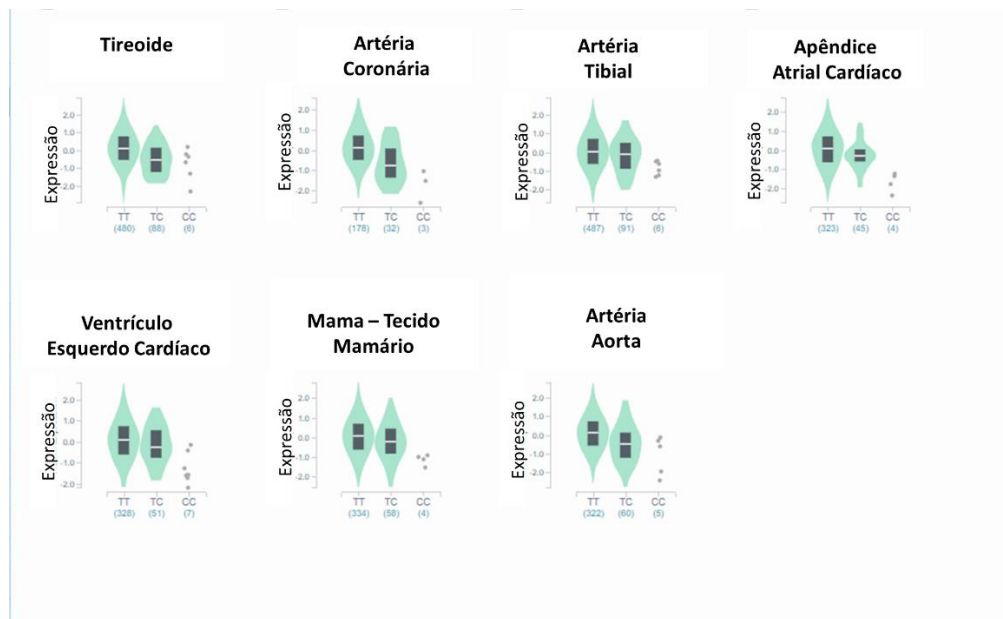
compensatória que ocorre na gestação e a secreção de insulina também são prejudicadas (14, 43, 89).

O único estudo que avaliou o SNP rs17619600 no *HTR2B* em seres humanos não encontrou associação com DMG, porém esse estudo comparou gestantes com DMG com não gestantes. Esse estudo caso-controle incluiu 869 mulheres com diagnóstico de DMG e as comparou com 632 indivíduos sem DM que procuraram avaliação para realização de *check-up* de rotina (343 mulheres e 289 homens). O SNP foi avaliado também em uma coorte populacional independente, dentro do Estudo de Epidemiologia do Genoma Coreano, composta por 8.842 coreanos. Nos indivíduos controles, não havia histórico gestacional, somente a informação de que não apresentavam DM (53). Portanto, o delineamento experimental desse estudo não nos parece adequado para avaliar se SNPs no *HTR2B* aumentam a suscetibilidade para o DMG.

Muitas vezes, não está claro como um SNP pode explicar uma determinada característica e a análise de eQTL (*expression quantitative trait loci*) pode ser interessante para aventar hipóteses. Um eQTL é um *locus* que explica uma fração da variação genética de um fenótipo de expressão gênica. Uma análise eQTL padrão envolve um teste de associação direta entre variantes genéticas e níveis de expressão gênica tipicamente medidos em dezenas ou centenas de indivíduos. Uma das principais vantagens do mapeamento de eQTL em estudos de associação genômica ampla é que ele permite a identificação de novos *loci* funcionais sem a necessidade de qualquer conhecimento prévio sobre regiões regulatórias específicas (90).

Desta forma, dizer que um determinado SNP é um eQTL significa que ele tem uma consequência funcional, modulando a expressão do gene por influenciar a sua taxa de transcrição – essa informação pode ajudar a desvendar os mecanismos pelos quais os SNPs estão associados a uma determinada condição clínica. Os SNPs que regulam a expressão de um ou mais genes próximos (até 1 megabase do sítio de início da transcrição) são chamados de cis-eQTL, enquanto os que regulam a expressão de genes distantes são chamados de trans-eQTL ⁽⁹¹⁾.

A pesquisa do SNP rs17619600 no gene *HTR2B* em bancos de dados de SNPs mostrou que ele tem potencial para ser funcional, pois apresenta efeito cis-eQTL em diferentes tecidos avaliados, quais sejam, tireoide, artéria tibial, artéria coronária, aorta, coração, ventrículo esquerdo e esôfago. Em todos esses tecidos, com exceção do esôfago, a presença do alelo C associou-se a uma menor expressão gênica ^(92, 93), como mostrado na Figura 5.



FONTE: Adaptado de <https://www.gtexportal.org> ⁽⁹²⁾

Figura 5 - Padrão de expressão gênica associado a cada um dos genótipos do polimorfismo de um único nucleotídeo rs17619600 no gene *HTR2B* em diferentes tecidos.

Diante desses achados, levantamos a hipótese de que o SNP rs17619600 pode modular a expressão do gene *HTR2B* nas células beta. Assim, em presença do alelo C, haveria uma menor expressão desse receptor, reduzindo a proliferação das células beta, que é tão necessária para a manutenção do equilíbrio glicêmico durante a gestação.

Os demais SNPs avaliados não apresentaram associação com o DMG. Apesar da presença do alelo C dos SNPs rs10068521 e rs9292578 no gene *PRLR* terem sido associadas ao DMG em um estudo chileno ⁽³¹⁾, este achado não foi reproduzido no presente estudo. Essa discordância poderia ser explicada por razões étnicas ou pela diferença no critério diagnóstico usada; no presente estudo, usamos o critério do IADPSG (GJA no primeiro trimestre ⁽⁸⁵⁾ ou pelo menos um valor de glicemia alterado no TTOG com 75

g de glicose [GJA \geq 92 mg/dL e/ou após 1h \geq 180 mg/dL e/ou após 2h \geq 153 mg/dL]) enquanto no estudo chileno foi usado o critério de glicemia de jejum \geq 126 mg/dL ou glicemia \geq 140 mg/dL 2 h após TTOG com 75 g de glicose. Essa diferença pode ter selecionado grupos diferentes para a avaliação. Alternativamente, é possível que o achado do estudo chileno seja um resultado falso-positivo, uma vez que a casuística era composta de apenas 96 participantes com DMG.

Considerando a possibilidade de um fenótipo diferente das pacientes com DMG que fizeram diagnóstico por glicemia de jejum, fizemos uma avaliação complementar de gravidade (uso de insulina) para todos os SNPs estudados neste subgrupo. Encontramos uma associação do rs2302257 no gene *FOXM1* com o uso de insulina, porém devido ao reduzido número de pacientes (10 no total) com um dos genótipos (CC), não consideramos essa associação relevante e estudos adicionais são necessários para confirmar esse achado. Há apenas uma publicação com esse SNP em câncer de ovário, não existem estudos funcionais com ele e também não há descrições de que seja um eQTL na plataforma do GTEX (<https://www.gtexportal.org/>) (92, 93).

Esse estudo tem a limitação de ter sido realizado em um hospital terciário, sendo que a maioria das pacientes apresentava outras comorbidades. O número reduzido de pacientes que fizeram uso de insulina, apenas 84 participantes, dificultou a avaliação da associação dos SNPs com a gravidade do DMG. Por ser uma condição clínica prevalente, o tamanho da

amostra também é uma limitação do estudo, embora seja maior do que as amostras incluídas em vários outros estudos já publicados ^(31, 94-97).

Dado o alarmante aumento de indivíduos com DM2 em todo mundo, estratégias que visam identificar pacientes com maior risco de DMG podem ser de grande benefício para a saúde pública, tendo em vista que estas pacientes têm maior risco de evoluir para DM2 e necessitam de mais cuidados durante a gestação e no período pós-parto.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A presença do alelo C no SNP rs17619600 no gene *HTR2B* conferiu aumento do risco de DMG na população estudada.

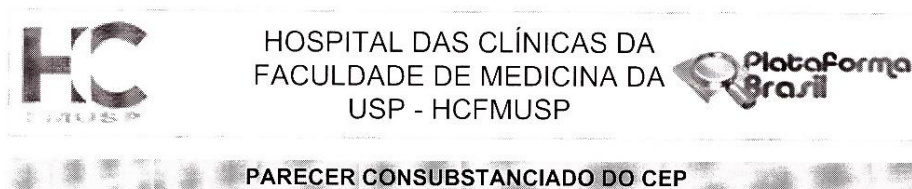
A presença do haplótipo TACC no gene *HTR2B*, composto por alelos do SNPs rs10194776, rs765458, rs10187149 e rs17619600, também conferiu aumento do risco de DMG na população estudada.

Os demais SNPs não conferiram suscetibilidade ao DMG. Nenhum dos SNPs estudados se associou à gravidade do DMG.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação da CAPPesq



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Associação entre Diabetes Mellitus Gestacional e Polimorfismos em Genes Envolvidos na Proliferação das Células Beta Pancreáticas Durante a Gestação

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31060714.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 777.904

Data da Relatoria: 03/09/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado que será realizado em colaboração com o Depto de Obstetria e Ginecologia da FMUSP e com o HU-USP. Serão avaliadas 300 pacientes que tiveram diagnóstico de Diabetes Mellitus Gestacional em gestação pregressa ou na gestação atual e que foram/são acompanhadas no Ambulatório de Endocrinopatias da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

(FMUSP) e em 300 gestantes que não apresentaram DMG, serão selecionadas na Liga de Pré Natal da FMUSP e no Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo. Essas pacientes serão avaliadas quanto à associação entre DMG e polimorfismos de um único nucleotídeo nos genes relacionados com a homeostase glicêmica com o objetivo de aumentar a compreensão a cerca dos mecanismos envolvidos nessa condição clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a associação de DMG com polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em alguns genes envolvidos na proliferação das células beta pancreáticas durante a gestação. Serão avaliados SNPs nos seguintes genes: PRLR, codifica o receptor da prolactina, HTR2B, codifica o receptor 2B de serotonina, FOXM1, FOXD3 e MEN1, que codifica a menin.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

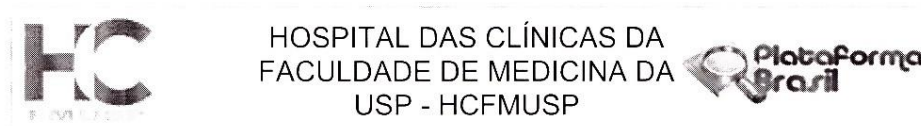
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 777.904

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora não haverá benefícios diretos às pacientes envolvidas, apenas para o conjunto da coletividade, ao se obter maior conhecimento científico sobre o tema.

Há baixo risco à saúde das pacientes, apenas os riscos da coleta de uma amostra de sangue periférico (desconforto da punção, formação de hematomas ou pequeno sangramento local).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é bastante interessante e promissor em termos de gerar conhecimentos adicionais sobre a etiologia da doença. Está apresentado de maneira clara e objetiva e condiz com um trabalho para obtenção de título de Doutor.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou os documentos modificados de acordo com as orientações dadas anteriormente.

Recomendações:

Não Há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto e demais documentos não apresentam nenhuma pendência ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

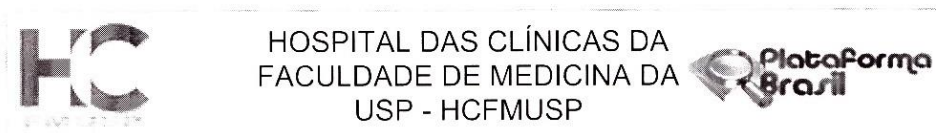
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 777.904

SAO PAULO, 03 de Setembro de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Estudo da Associação entre Diabetes Mellitus Gestacional e Polimorfismos em Genes Envolvidos na Proliferação das Células Beta Pancreáticas Durante a Gestação

PESQUISADOR : Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62926

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO x RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03/02/2014 a 09/05/2018

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

O diabetes mellito é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue). O diabetes pode ocorrer na gravidez e algumas mulheres tem um maior risco de desenvolver diabetes do que outras. Na gravidez se não for controlado adequadamente tem um risco de complicações: aumento do líquido amniótico; aumento do tamanho do feto (bebê); parto prematuro (nascer antes da hora) e do recém nascido ter hipoglicemia (açúcar baixo) nos primeiros dias de vida.

Neste estudo convidamos mulheres que não tiveram diabetes na gestação atual, por isso convidamos a Senhora a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar genes que possam estar relacionados ao desenvolvimento do diabetes na gravidez. A Senhora não teve diabetes na gestação e está sendo convidada para participar do grupo comparador (controle).

Caso a Senhora concorde em participar deste estudo, vamos colher uma amostra de 20 ml seu sangue de uma veia de seu braço, para a extração do material genético (DNA). Este material será usado no estudo dos genes potencialmente envolvidos na susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes mellito na gravidez. Este material genético será armazenado e utilizado neste projeto de pesquisa devidamente aprovado pelo Comitês de Ética em Pesquisa (CEP). Somente será realizada a coleta de sangue de uma veia de seu braço para a obtenção de material genético.

O único desconforto que a Sra. sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa de alterações do seu material genético. Os riscos deste procedimento são baixos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento do diabetes na gravidez. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes na gestação, com o objetivo de prevenir problemas para a mãe e para o recém-nascido.

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para a Sra, caso o Sra opte por não retirar o sangue.

Em qualquer etapa do estudo, a Sra terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 2661-8453. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP- Av. Prof. Lineu Prestes, 2.565 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - (11) 3091-9200 - E-mail: cep@hu.usp.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

A Sra tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sra. recebe no Hospital das Clínicas.

Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes na gestação. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

A Sra tem o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

A senhora tem a garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

A Sra entende que as informações assim como o sangue coletado e armazenado poderão ser usados no futuro para esclarecimento das causas de diabetes na gravidez.

Em relação ao armazenamento e guarda do material coletado mesmo após o fim da pesquisa, a Sra:

- () Autoriza o armazenamento e guarda do material após o fim da pesquisa
() Não autoriza o armazenamento e guarda do material após o fim da pesquisa.

Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras a Sra. foi questionada se gostaria de ser consultada para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e sua resposta foi (Se você respondeu Não autorizo no item 13, não precisa responder esta pergunta):

- () SIM. Eu quero ser consultada para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.
() NÃO. Eu dispensei a autorização para cada pesquisa e estou informada que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Grupo DMG**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA
- Estudo da Associação entre Diabetes Mellitus Gestacional e Polimorfismos em Genes Envolvidos na Proliferação das Células Beta Pancreáticas Durante a Gestação
- PESQUISADOR : Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella
- CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62926
- UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO x RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03/02/2014 a 09/05/2018

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

O diabetes mellito é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue). O diabetes pode ocorrer na gravidez e algumas mulheres tem um maior risco de desenvolver diabetes do que outras. Na gravidez se não for controlado adequadamente tem um risco de complicações: aumento do líquido amniótico; aumento do tamanho do feto (bebê); parto prematuro (nascer antes da hora) e do recém nascido ter hipoglicemia (açúcar baixo) nos primeiros dias de vida. Neste estudo convidamos tanto mulheres grávidas quanto não grávidas que tiveram diabetes na gestação atual ou anterior, por isso convidamos a Senhora a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar genes que possam estar relacionados ao desenvolvimento do diabetes na gravidez. A Senhora tem ou teve diabetes mellito na gestação, por isso está sendo convidada a fazer parte do estudo.

Caso a Senhora concorde em participar deste estudo, vamos colher uma amostra de 20 ml de seu sangue de uma veia de seu braço, para a extração do material genético (DNA). Este material será usado no estudo dos genes potencialmente envolvidos na susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes mellito na gravidez. Este material genético será armazenado e utilizado neste projeto de pesquisa devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Somente será realizada a coleta de sangue de uma veia de seu braço para a obtenção de material genético.

O único desconforto que a Sra. sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa de alterações do seu material genético. Os riscos deste procedimento são baixos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento do diabetes na gravidez. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes na gestação, com o objetivo de prevenir problemas para a mãe e para o recém-nascido.

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para a Sra, caso o Sra opte por não retirar o sangue.

Em qualquer etapa do estudo, a Sra terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 2661-8453. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq.admi@hc.fm.usp.br ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP- Av. Prof. Lineu Prestes, 2.565 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - (11) 3091-9200 - E-mail: cep@hu.usp.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

A Sra tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sra. recebe no Hospital das Clínicas.

Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes na gestação. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

A Sra tem o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

A senhora tem a garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

A Sra entende que as informações assim como o sangue coletado e armazenado poderão ser usados no futuro para esclarecimento das causas de diabetes na gravidez.

Em relação ao armazenamento e guarda do material coletado mesmo após o fim da pesquisa, a Sra:

Autoriza o armazenamento e guarda do material após o fim da pesquisa

Não autoriza o armazenamento e guarda do material após o fim da pesquisa.

Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras a Sra. foi questionada se gostaria de ser consultada para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e sua resposta foi (Se você respondeu Não autorizo no item 13, não precisa responder esta pergunta):

SIM. Eu quero ser consultada para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informada que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

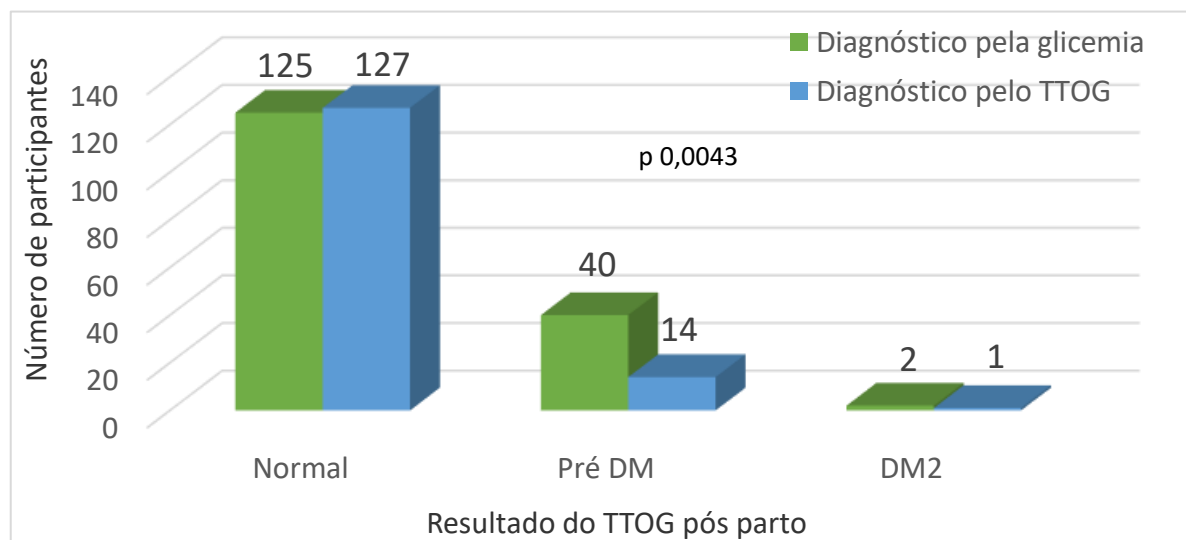
Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Anexo 4 - Características clínicas e bioquímicas das participantes com diabetes mellitus gestacional agrupadas de acordo com o método diagnóstico

	Glicemia jejum	TTOG 75g	Valor de P
N	257	196	
Idade na DUM	33 (29 – 37)	33 (29 – 36)	0,55
Etnia (brancas, %)	84	85	0,56
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	29,3 (25,6 – 34,8)	26,6 (23,6 – 30,8)	<0,0001
Ganho de Peso (kg)	8 (5 – 13)	9,5 (5,5 – 14)	0,08
Comorbidades (%)	66	60	0,50
Hipotireoidismo (%)	19,0	19,5	0,95
Asma (%)	1,5	3,5	0,22
DHEG (%)	7,8	9,7	0,48
HAS (%)	24,4	23,7	0,86
Antecedente familiar (%)	58	57	0,14
Tabagismo declarado (%)	7,4	6,6	0,74
Uso de medicações (%)	54	48	0,21
Uso de insulina (%)	25	10	<0,0001
Glicemia (mg/dL)	96 (93 -100)	81 (76 – 87)	<0,0001
Tipo de Parto (Cesária, %)	63	56	0,19
Número de Gestações (±DP)	1,72±0,44	1,70±0,45	0,58
Peso do recém-nascido (g)	3.240 (2.835 -3.530)	3.190 (2.760 – 3.510)	0,34

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartilico, exceto número de gestações, que está expresso em média ± desvio padrão. DHEG: Doença hipertensiva específica da gravidez; DUM: data da última menstruação; HAS: hipertensão arterial sistêmica; IMC: índice de massa corpórea; TTOG: teste de tolerância oral à glicose. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Anexo 5 - Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) pós parto das participantes com diabetes mellitus gestacional (DMG) divididas de acordo com o método diagnóstico (glicemia de jejum ou TTOG)



Anexo 6– Manuscrito submetido a publicação

Title: *HTR2B* variant rs17619600 increases the risk of gestational diabetes mellitus

Precis: The presence of the rare C allele in the single nucleotide polymorphism rs17619600 in the *HTR2B* gene increased the risk of gestational diabetes mellitus

Abstract

Objective: To evaluate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *HTR2B* gene influence the risk of developing gestational diabetes mellitus (GDM), given that serotonin (5-HT) signaling through HTR2B receptor is critical for beta cell proliferation during pregnancy.

Methods: This was a case-control study. Five SNPs in *HTR2B* were genotyped by real-time polymerase chain reaction in 453 women with GDM and in 443 pregnant women without GDM.

Results: The SNP rs17619600 conferred an increased risk for GDM both in the codominant (odds ratio [OR] 2.15; confidence interval [CI] 95% 1.53-3.09; $P < 0.0001$) and in the rare dominant models (OR 2.32; CI 1.61- 3.37; $P < 0.0001$). No associations were found between the SNPs and insulin use, maternal weight gain, newborn weight, or the result of postpartum oral glucose tolerance test.

Conclusions: The presence of the rare C allele in the SNP rs17619600 in the *HTR2B* gene increased the risk of GDM in the studied population.

Keywords: Single nucleotide polymorphisms, Serotonin, Beta-cells

Introduction

In order to maintain glycemic homeostasis during pregnancy, the increase in maternal insulin resistance is compensated by hyperplasia and increased function of maternal pancreatic beta-cells. The failure of this compensatory mechanism is associated with gestational diabetes mellitus (GDM)(1).

GDM occurs in 10-18% of all pregnancies (2-4) and it confers a higher risk of several pregnancy complications for both mother and newborn, such as cesarean delivery, polyhydramnios, preeclampsia, jaundice, macrosomia, and neonatal hypoglycemia. GDM is also considered a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2D), obesity and cardiovascular disease (5, 6).

Studies conducted *in vitro* and in rodent models have shown modified expression of many islet genes during pregnancy. Among the most significantly upregulated genes are the ones encoding the two isoforms of tryptophan hydroxylase (*Tph1* and *Tph2*), the rate-limiting enzyme of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) synthesis (7, 8). Beta-cells have the ability to synthesize, store and secrete 5-HT and islet 5-HT content increases during pregnancy (7-9), secondarily to stimulation of TPH1 and TPH2 expression in beta-cells. This process is dependent on placental lactogen (PL) acting through prolactin receptors (PRLR) (9); thus, 5-HT acts downstream of PL signaling to drive β -cell expansion (8, 10, 11).

5-HT receptors are classified into seven different families (HTR1–7), some of which contain different subtypes (12). In pregnant mice, the HTR2B expression closely matched the period of increased beta-cell proliferation (8, 13) and

blocking HTR2B signaling impaired beta-cell expansion, causing glucose intolerance (8).

Microarray and RNA sequencing analyses revealed transcripts of almost all 5-HT receptors in human islets (14, 15) and an *in vitro* study have shown that the activation of HTR2B promoted glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) not only in mouse, but also in human beta-cells, suggesting that 5-HT also stimulates insulin release through HTR2B (15).

Given the importance of the serotonergic system for the adaptation of beta-cells to the increased insulin demand during pregnancy, we hypothesized that genetic variation (single nucleotide polymorphisms [SNPs]) in the *HTR2B* gene could influence the risk of developing GDM.

Methods

Subjects

This was a case-control study that initially recruited 1,130 pregnant women between September 2014 and September 2017; 90 refused to participate and 36 were considered ineligible for not meeting the inclusion criteria. Of the 1,004 pregnant women then recruited, 108 were lost to follow-up, resulting in a final number of 896. After a diagnostic evaluation for GDM, women were classified into two study groups: 453 pregnant women that had GDM diagnosis in a prior pregnancy or in the current pregnancy and 443 pregnant women without the diagnosis of GDM. All pregnant women were followed-up at the Obstetric Clinic of a tertiary university hospital. The study was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki, in accordance with institutional ethics committees. After

signing informed consent, participants were evaluated for clinical and biochemical characteristics.

Clinical and biochemical variables were collected from the medical records. The weight gain during pregnancy was calculated as the difference between the weight (in kilograms) at the end of pregnancy and the weight at first consultation.

The inclusion criteria for women without GDM were: no prior GDM or other metabolic conditions, normal fasting plasma glucose (FPG) in the first trimester and normal 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) between 24- and 28-weeks gestational age. The inclusion criteria for women with GDM were: GDM diagnosis in the index pregnancy and no use of steroids before GDM diagnosis. GDM was defined by criteria proposed by the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG), based on first trimester FPG ≥ 92 mg/dL (5.1 mmol/L) or 2-h OGTT with 75 g of glucose performed between 24-28 weeks of gestation with at least one altered value (FPG ≥ 92 mg [5.1 mmol/L], 1-h plasma glucose ≥ 180 mg/dL [10.0 mmol/L] and 2-h plasma glucose ≥ 153 mg/dL [8.5 mmol/L]). Women with GDM who failed to reach 30% of the glycemic targets (FPG < 95 mg/dL, 1-h postprandial glucose < 140 mg/dL), after dietary and lifestyle modifications, were administered insulin. A 2-h OGTT was performed in the GDM group at 6 to 12 weeks postpartum, and the ADA diagnostic criteria for diabetes mellitus (DM) (16) were applied.

SNP genotyping

Deoxyribonucleic acid extraction from peripheral blood leukocytes was carried out by a salting-out procedure (17). SNPs were genotyped by real-time

polymerase chain reaction (StepOne Plus; Applied Biosystems, USA), using predesigned Human TaqMan Genotyping Assays 40X: C_2398885_30 (rs765458), C_30043265_10 (rs10187149), C_32997861_10 (rs17619600), C_27918443_10 (rs4973377), C_29863060_10 (rs10194776) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The five Tag SNPs cover approximately 95% of the genetic variability of the extended region of *HTR2B* gene and were selected using a pair wise approach, a $r^2 \geq .8$ and a minor allele frequency (MAF) of at least 0.1. The genotyping success rate was ~99% for all SNPs. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested; the distribution of genotypes was consistent with HWE for all SNPs, except rs4973377, which was not considered in the association analysis.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as median and 25-75% interquartile ranges, and categorical variables are expressed as number of cases and percentage of affected individuals. The Mann-Whitney test for independent samples was used to compare the medians of continuous variables related to the characteristics between the groups studied. Pearson's χ^2 test was used to compare the frequency of SNPs between the groups with and without GDM and the differences between the categorical variables of the groups with and without GDM.

The HWE was determined using the frequency of alleles in the Pearson's χ^2 test at a significance level of 0.05. The SNPs were evaluated in the rare dominant model and in the codominant model. The magnitude of the risk conferred by the SNPs was estimated using Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI). To estimate the OR adjusted for potential confounding

factors (age at last menstrual period [LMP], previous body mass index [BMI], and weight gain during pregnancy), a binary logistic regression analysis was performed with these factors as covariates in the regression model. The correction for multiple comparisons due to the multiple SNPs tested was made by Bonferroni's correction, dividing 0.05 by the number of SNPs of the *HTR2B* gene. Thus, a $P < 0.01$ (two-tailed) was considered significant.

This study was exploratory in nature. Thus, a convenience sample was used, in which we sought to include as many participants as possible. The power calculation was performed *a posteriori* using the *GAS Power Calculator* (Genetic Association Study power calculator) (16). The power of the study was $>90\%$ (100% and 99.7%, respectively) to detect associations of the SNP rs17619600 in the *HTR2B* gene with GDM in the codominant and rare dominant models.

Haplotype analysis was performed using the software available online SHEsis. All haplotypes with a frequency < 0.03 were ignored for analysis. For the evaluation of the different combinations, Pearson's χ^2 test was used, with a value of $P < 0.05$ being considered significant (17).

Results

The characteristics of the pregnant women with and without GDM are shown in Table 1. Compared to the group without GDM, women with GDM were older, had a higher number of previous pregnancies, a higher pre-pregnancy BMI with a higher frequency of family history of T2D. Women with GDM had less weight gain during pregnancy, higher frequency of hypertension and use of medications, and higher FPG compared to women without GDM. Cesarean

delivery was more frequent in women with GDM and the weight of newborns from women with GDM was lower than the weight of newborns from women without GDM. Among women with GDM, 18.7% used insulin.

The SNPs rs10187149, rs10194776 and rs765458 did not associate with GDM (Table 2). The minor allele C of SNP rs17619600 conferred an increased risk for GDM in the codominant model (OR 2.15; 95% CI 1.53-3.09; $P < 0.0001$) and in the rare dominant model (OR 2.32; CI 1.61 - 3.37; $P < 0.0001$). The SNPs were not associated with insulin use, maternal weight gain, newborn birth weight or glycemic change in the postpartum OGTT (data not shown).

In evaluating the association between haplotypes in the *HTR2B* gene and the presence of DMG, the selected SNPs were placed in the following order for analysis: rs10194776, rs765458, rs10187149 and rs17619600. The TACC haplotype, which contains the rare C allele of rs17619600, was associated with an increased risk of GDM, as shown in Table 3 (the total number of carriers of the haplotype was 83).

Discussion

The main finding of the present study was that the presence of the rare C allele in the *HTR2B* rs17619600 SNP conferred an increased risk of GDM in the population evaluated. In addition to the analysis of isolated SNP, the TACC haplotype, which contains the aforementioned allele, was associated with a higher risk of GDM.

HTR2B encodes a G α_q -coupled 5-HT receptor. 5-HT is believed to be critical in regulating pancreatic beta-cell proliferation (5, 7). In pregnant rodent

islets, there is an increase in the expression of *HTR2B* during the period of increased beta-cell replication; blocking the signaling of this receptor prevents the expansion of these cells and is associated with GDM (6). In human islets, the activation of this receptor is associated with GSIS (5, 18). Thus, 5-HT signaling through *HTR2B* plays an important role in the maintenance of glycemic homeostasis during pregnancy (13, 19 20).

The only study that evaluated the SNP rs17619600 in *HTR2B* found no association with GDM. However, this case-control study compared women with GDM with women aged 60 and older with no personal and family history of DM. This SNP was also not associated with weight gain during pregnancy, postpartum BMI, FPG, or fasting insulin concentration in women with GDM. Additionally, this variant did not associate with waist circumference and BMI in non-diabetic control subjects and in the independent population cohort from the Korean Genome Epidemiology Study, or with T2D in this same cohort (21).

No functional studies were performed with rs17619600, but according to the GTEx Consortium atlas, it has the potential to be functional, as it has a cis-expression quantitative trait loci (eQTL) effect, that is, it modulates gene expression by influencing its transcription rate (23). In 6 out of 7 tissues evaluated, the presence of the C allele was associated with a lower expression of the *HTR2B* gene.

Given these findings, we hypothesized that the SNP rs17619600 could modulate the expression of the *HTR2B* gene in beta-cells. Thus, in the presence of the rare C allele, there would be a lower expression of this receptor, which could reduce the proliferation of beta-cells, a necessary factor for the maintenance of glycemic homeostasis during pregnancy.

This study has the limitation of having been carried out in a tertiary hospital, in which a significant number of patients have other comorbidities. The small number of patients who used insulin, only 84 participants, made it difficult to assess the association of SNPs with GDM severity. As GDM is a prevalent clinical condition, the lack of replication in an independent population and the sample size are also limitations of the study, although the present series is larger than those included in several previously published studies (26-30).

Conclusion

The presence of the minor allele C of SNP rs17619600 in the *HTR2B* gene is associated with a higher risk of GDM in the studied population.

Tables

Table 1. Characteristics of women with and without gestational diabetes mellitus (GDM).

	Without GDM	With GDM	P-value
N	443	453	
Age (years)	29.1 (24.4 – 33.4)	33.2 (28.8 – 37.1)	<0.0001
White* (%)	85	85	0.94
Parity	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.4	<0.0001
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	24.7 (21.8 – 28.1)	28.2 (24.8 – 32.9)	<0.0001
Positive family history of T2D (%)	49	58	<0.0001
Weight gain during pregnancy (kg)	12.0 (8.7 – 15.2)	9.0 (5.0 – 13.3)	<0.0001
Preeclampsia (%)	8.4	8.5	0.76
Arterial hypertension (%)	7.5	23.8	<0.0001
Use of medicines (%)	28	51	<0.0001
Insulin treatment† (%)	-	18.7	-
Fasting plasma glucose (mg/dL)	78 (74 – 82)	92 (83 – 97)	<0.0001
Cesarean delivery (%)	48	60	0.001
Newborn birth weight (g)	3,240 (2,897-3,542)	3,210 (2,780-3,512)	0.04

Results expressed as median and interquartile range, except for parity (mean ± standard deviation); BMI: body mass index; T2D: type 2 diabetes mellitus. *Self-defined ethnicity. † Only the participants with GDM needed insulin. $P \leq 0.05$ was considered significant. The missing data (percentage) for each reported variable is as follows: age (0.77%), ethnicity (8.7%), parity (1.2%), BMI (18.8%), family history (0%), weight gain (4.5%), preeclampsia (0.33%), arterial hypertension (1.2%), use of medicines (1.4%), insulin treatment (0.5%), fasting plasma glucose (5.5%), type of delivery (16.4%), newborn birth weight (16.7%)

Table 2. Genotype frequencies of four single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *HTR2B* gene according to the status of gestational diabetes mellitus (GDM).

SNPs	Without GDM	With GDM	OR (CI 95%)	P value
<i>HTR2B</i>	443	453		
rs765458				
AA	0.248	0.239	0.90 (0.64 – 1.27)	0.55 (RD)
AG	0.542	0.518	1.02 (0.82 – 1.27)	0.82 (CD)
GG	0.210	0.243		
MAF	0.481	0.502		
rs10187149				
AA	0.324	0.338		
AC	0.509	0.498	0.94 (0.77 – 1.45)	0.70 (RD)
CC	0.167	0.164	0.92 (0.74 – 1.14)	0.46 (CD)
MAF	0.422	0.413		
rs10194776				
TT	0.277	0.279		
TC	0.526	0.495	0.99 (0.79 – 1.52)	0.57 (RD)
CC	0.197	0.226	0.96 (0.78 – 1.19)	0.74 (CD)
MAF	0.479	0.473		
rs17619600				
TT	0.839	0.614	2.32 (1.61 – 3.37)	<0.0001 (RD)
TC	0.149	0.329	2.15 (1.53 – 3.09)	<0.0001 (CD)
CC	0.012	0.057		
MAF	0.087	0.223		

CI: confidence interval; MAF: minor allele frequency; OR: odds ratio. Analyses were performed in the rare dominant (RD) and in the co-dominant (CD) models after adjustment for age, pre-gestational body mass index and weight gain.

Table 3. Frequency of the haplotype TACC, comprised of four single-nucleotide polymorphisms in the *HTR2B* gene, according to the status of gestational diabetes mellitus (GDM).

	Without GDM	With GDM	OR (CI 95%)	P-value
N	443	453		
TACC	60 (0.072)	99 (0.113)	1.70 (1.22-2.39)	0.001

Sequence of single nucleotide polymorphisms: rs10194776, rs765458, rs10187149 and rs17619600.

Results expressed in absolute numbers (each carrier with two haplotypes) and relative frequency in the overall population. CI: Confidence Interval; OR: Odds ratio.

References

- Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 2009 Apr;150(4):1618-26.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cited; Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/gestational.html>]
- Huhn EA, Massaro N, Streckeisen S, Manegold-Brauer G, Schoetzau A, Schulzke SM, et al. Fourfold increase in prevalence of gestational diabetes mellitus after adoption of the new International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) criteria. *J Perinat Med* 2017 Apr 1;45(3):359-66.
- Brown FM, Wyckoff J. Application of One-Step IADPSG Versus Two-Step Diagnostic Criteria for Gestational Diabetes in the Real World: Impact on Health Services, Clinical Care, and Outcomes. *Curr Diab Rep* 2017 Aug 10;17(10):85.
- McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers* 2019 2019/07/11;5(1):47.
- Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, Brunetti A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *J Endocrinol Invest* 2017 Sep;40(9):899-909.
- Rieck S, White P, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Gao N, et al. The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Mol Endocrinol* 2009 Oct;23(10):1702-12.
- Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010 Jul;16(7):804-8.
- Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, et al. Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 2010 Dec;53(12):2589-99.
- Georgia S, Bhushan A. Pregnancy hormones boost beta cells via serotonin. *Nat Med. United States*; 2010. p. 756-7.
- Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. beta-Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab* 2016 Sep;18 Suppl 1:63-70.
- Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009;60:355-66.

13. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1992 Mar;130(3):1459-66.
14. Amisten S, Salehi A, Rorsman P, Jones PM, Persaud SJ. An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol Ther* 2013 Sep;139(3):359-91.
15. Bennet H, Mollet IG, Balhuizen A, Medina A, Nagorny C, Bagge A, et al. Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 2016 Apr;59(4):744-54.
16. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* 2021 Jan;44(Suppl 1):S15-s33.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16(3):1215.

Anexo 7 –STROBE referente a manuscrito submetido a publicação

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	3-4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	4
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	NA
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	5 and 7

Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	5
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	10 (potential bias recognized among the limitations)
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	7
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6-7
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	NA
		(c) Explain how missing data were addressed	11 (The missing data for each variable are presented in the footnote of Table 1)
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA

Continued on next page

Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	4
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	4
		(c) Consider use of a flow diagram	NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	Table 1
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	Table1 Footnote
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	NA
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	NA
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	Table 1
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	NA
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	Table 2
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	5
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	NA
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	8
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	10
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	9-10
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	10

Other information

Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	Source of funding in the Title page
---------	----	---	-------------------------------------

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Brown FM, Wyckoff J. Application of one-step IADPSG versus two-step diagnostic criteria for gestational diabetes in the real world: impact on health services, clinical care, and outcomes. *Curr Diab Rep.* 2017;17(10):85.
1. Weinert LS. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy: comment to the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. *Diabetes Care.* United States. 2010;33:e97; author reply e8.
2. *Centers for Disease Control and Prevention* 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/gestational.html>].
3. Huhn EA, Massaro N, Streckeisen S, Manegold-Brauer G, Schoetzau A, Schulzke SM, et al. Fourfold increase in prevalence of gestational diabetes mellitus after adoption of the new International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) criteria. *J Perinat Med.* 2017;45(3):359-66.
4. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers.* 2019;5(1):47.
5. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008;358(19):1991-2002.

6. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2009;373(9677):1773-9.
7. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(4):938-48.
8. Quintanilla Rodriguez BS, Mahdy H. Gestational diabetes. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2019.
9. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*. 2010;53(10):2167-76.
10. Ernst S, Demirci C, Valle S, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocana A. Mechanisms in the adaptation of maternal beta-cells during pregnancy. *Diabetes Manag (Lond)*. 2011;1(2):239-48.
11. Bonner-Weir S, Guo L, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Lysy PA, Weir GC, et al. Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. *Rev Diabet Stud*. 2012;9(4):407-16.
12. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*. 2009;150(4):1618-26.
13. Kenna LA, Olsen JA, Spelios MG, Radin MS, Akirav EM. beta-Cell death is decreased in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8(1):60.

14. Moyce BL, Dolinsky VW. Maternal beta-cell adaptations in pregnancy and placental signalling: implications for gestational diabetes. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3467.
15. Rosik J, Szostak B, Machaj F, Pawlik A. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus. *Ann Hum Genet.* 2020;84(2):114-24.
16. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, Brunetti A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(9):899-909.
17. Cao M, Zhang L, Chen T, Shi A, Xie K, Li Z, et al. Genetic susceptibility to gestational diabetes mellitus in a Chinese population. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:247.
18. Rieck S, White P, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Gao N, et al. The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Mol Endocrinol.* 2009;23(10):1702-12.
19. Layden BT, Durai V, Newman MV, Marinelarena AM, Ahn CW, Feng G, et al. Regulation of pancreatic islet gene expression in mouse islets by pregnancy. *J Endocrinol.* 2010;207(3):265-79.
20. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. beta-Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1:63-70.
21. Plank JL, Frist AY, LeGrone AW, Magnuson MA, Labosky PA. Loss of Foxd3 results in decreased beta-cell proliferation and glucose intolerance during pregnancy. *Endocrinology.* 2011;152(12):4589-600.
22. Lowman HB, Cunningham BC, Wells JA. Mutational analysis and protein engineering of receptor-binding determinants in human placental lactogen. *J Biol Chem.* 1991;266(17):10982-8.

23. Abramicheva PA, Smirnova OV. Prolactin receptor isoforms as the basis of tissue-specific action of prolactin in the norm and pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2019;84(4):329-45.
24. Banerjee RR. Piecing together the puzzle of pancreatic islet adaptation in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1411(1):120-39.
25. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 1992;130(3):1459-66.
26. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*. 2008;29(1):1-41.
27. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology*. 1996;137(5):1640-9.
28. Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol*. 2007;193(3):367-81.
29. Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem*. 2007;282(42):30707-17.
30. Banerjee RR, Cyphert HA, Walker EM, Chakravarthy H, Peiris H, Gu X, et al. Gestational diabetes mellitus from inactivation of prolactin receptor and MafB in islet beta-cells. *Diabetes*. 2016;65(8):2331-41.

31. Le TN, Elsea SH, Romero R, Chaiworapongsa T, Francis GL. Prolactin receptor gene polymorphisms are associated with gestational diabetes. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17(7):567-71.
32. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med*. 2010;16(7):804-8.
33. Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, et al. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*. 2007;318(5851):806-9.
34. Hughes E, Huang C. Participation of Akt, menin, and p21 in pregnancy-induced beta-cell proliferation. *Endocrinology*. 2011;152(3):847-55.
35. Zhang H, Zhang J, Pope CF, Crawford LA, Vasavada RC, Jagasia SM, et al. Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes*. 2010;59(1):143-52.
36. Pepin ME, Bickerton HH, Bethea M, Hunter CS, Wende AR, Banerjee RR. Prolactin receptor signaling regulates a pregnancy-specific transcriptional program in mouse islets. *Endocrinology*. 2019;160(5):1150-63.
37. Cataldo LR, Cortes VA, Galgani JE, Olmos PR, Santos JL. [Role of peripheral serotonin in the insulin secretion and glucose homeostasis]. *Nutr Hosp*. 2014;30(3):498-508.
38. Ohta Y, Kosaka Y, Kishimoto N, Wang J, Smith SB, Honig G, et al. Convergence of the insulin and serotonin programs in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*. 2011;60(12):3208-16.

39. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther.* 2008;31(3):187-99.
40. Sarrouilhe D, Mesnil M. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie.* 2019;161:46-50.
41. Goyvaerts L, Schraenen A, Schuit F. Serotonin competence of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia.* 2016;59(7):1356-63.
42. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009;60:355-66.
43. Bennet H, Mollet IG, Balhuizen A, Medina A, Nagorny C, Bagge A, et al. Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 2016;59(4):744-54.
44. Davis DB, Lavine JA, Suhonen JI, Krautkramer KA, Rabaglia ME, Sperger JM, et al. FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2010;24(9):1822-34.
45. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993;75(4):805-16.
46. Chen H, Gu X, Su IH, Bottino R, Contreras JL, Tarakhovsky A, et al. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes Dev.* 2009;23(8):975-85.
47. Chen WS, Peng XD, Wang Y, Xu PZ, Chen ML, Luo Y, et al. Leptin deficiency and beta-cell dysfunction underlie type 2 diabetes in compound Akt knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2009;29(11):3151-62.

48. Georgia S, Bhushan A. Pregnancy hormones boost beta cells via serotonin. *Nat Med. United States.* 2010;16(7):756-7.
49. Zugaib M, Bittar RE, Francisco RPV, editors. *Protocolos assistenciais, clínica obstétrica, FMUSP [5. ed.].* 5. ed. São Paulo, Brazil: Atheneu; 2016. 751 p.
50. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S200-s10.
51. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S15-s33.
52. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
53. Kwak SH, Park BL, Kim H, German MS, Go MJ, Jung HS, et al. Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(1):233-8.
54. Perlis RH, Fijal B, Adams DH, Sutton VK, Trivedi MH, Houston JP. Variation in catechol-O-methyltransferase is associated with duloxetine response in a clinical trial for major depressive disorder. *Biological Psychiatry.* 2009;65(9):785-91.
55. Fernández-Navarro P, Vaquero-Lorenzo C, Blasco-Fontecilla H, Díaz-Hernández M, Gratacòs M, Estivill X, et al. Genetic epistasis in female suicide attempters. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;38(2):294-301.

56. Zhu B, Chen C, Moyzis RK, Dong Q, Chen C, He Q, et al. Association between the HTR2B gene and the personality trait of fun seeking. *Personality and Individual Differences*. 2012;53(8):1029-33.
57. Lacoste J, Lamy S, Ramoz N, Ballon N, Jehel L, Maroteaux L, et al. A positive association between a polymorphism in the HTR2B gene and cocaine-crack in a French Afro-Caribbean population. *World J Biol Psychiatry*. 2020;21(10):784-9.
58. Tsuchimine S, Taniguchi T, Sugawara N, Kaneda A, Yasui-Furukori N. No association between a polymorphism in the serotonin receptor 2B (HTR2B) gene and personality traits in healthy Japanese subjects. *Neuropsychobiology*. 2013;68(1):59-62.
59. Corominas R, Sobrido MJ, Ribasés M, Cuenca-León E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, et al. Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153b(1):177-84.
60. Hervás A, Toma C, Romarís P, Ribasés M, Salgado M, Bayes M, et al. The involvement of serotonin polymorphisms in autistic spectrum symptomatology. *Psychiatr Genet*. 2014;24(4):158-63.
61. Wu J, Mamidi TKK, Zhang L, Hicks C. Deconvolution of the genomic and epigenomic interaction landscape of triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1692.
62. Moret NC. Interactions between SNPs from candidate gene pathways in association with epithelial ovarian cancer risk. *Ovarian Cancer: The Interplay of Lifestyle and Genes*. 2013:215.

63. Peculis R, Balcere I, Rovite V, Megnis K, Valtere A, Stukens J, et al. Polymorphisms in MEN1 and DRD2 genes are associated with the occurrence and characteristics of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(2):145-53.
64. Carvalho RA, Urtremari B, Jorge AAL, Santana LS, Quedas EPS, Sekiya T, et al. Germline mutation landscape of multiple endocrine neoplasia type 1 using full gene next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(6):391-407.
65. Stevens L, Dorn PL. 8 - Population genetics of Triatominae. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*. London: Elsevier; 2017. p. 169-96.
66. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-13.
67. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005;15(2):97-8.
68. Ye D, Fei Y, Ling Q, Xu W, Zhang Z, Shu J, et al. Polymorphisms in TCF7L2 gene are associated with gestational diabetes mellitus in Chinese Han population. *Sci Rep.* 2016;6:30686.
69. de Melo SF, Frigeri HR, dos Santos-Weiss IC, Rea RR, de Souza EM, Alberton D, et al. Polymorphisms in FTO and TCF7L2 genes of Euro-Brazilian women with gestational diabetes. *Clin Biochem.* 2015;48(16-17):1064-7.

70. Hu S, Yan J, You Y, Yang G, Zhou H, Li X, et al. Association of polymorphisms in STRA6 gene with gestational diabetes mellitus in a Chinese Han population. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(11):e14885.
71. Bryson CL, Ioannou GN, Rulyak SJ, Critchlow C. Association between gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension. *Am J Epidemiol*. 2003;158(12):1148-53.
72. Suhonen L, Teramo K. Hypertension and pre-eclampsia in women with gestational glucose intolerance. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1993;72(4):269-72.
73. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S165-s72.
74. ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*. 2018;131(2):e49-e64.
75. Szmuiłowicz ED, Josefson JL, Metzger BE. Gestational diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(3):479-93.
76. Brzozowska M, Bieniek E, Szosland K, Lewinski A. Gestational diabetes - is diet and insulin the only solution? *Neuro Endocrinol Lett*. 2017;38(5):311-5.
77. Egan AM, Dunne FP. Optimal management of gestational diabetes. *Br Med Bull*. 2019;131(1):97-108.
78. Al-Qahtani S, Heath A, Quenby S, Dawood F, Floyd R, Burdyga T, et al. Diabetes is associated with impairment of uterine contractility and high Caesarean section rate. *Diabetologia*. 2012;55(2):489-98.

-
79. Ehrenberg HM, Durnwald CP, Catalano P, Mercer BM. The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(3):969-74.
80. Naylor CD, Sermer M, Chen E, Sykora K. Cesarean delivery in relation to birth weight and gestational glucose tolerance: pathophysiology or practice style? Toronto Trihospital Gestational Diabetes Investigators. *JAMA.* 1996;275(15):1165-70.
81. Billionnet C, Mitanchez D, Weill A, Nizard J, Alla F, Hartemann A, et al. Gestational diabetes and adverse perinatal outcomes from 716,152 births in France in 2012. *Diabetologia.* 2017;60(4):636-44.
82. Scifres C, Feghali M, Althouse AD, Caritis S, Catov J. Adverse outcomes and potential targets for intervention in gestational diabetes and obesity. *Obstet Gynecol.* 2015;126(2):316-25.
83. Brown J, Grzeskowiak L, Williamson K, Downie MR, Crowther CA. Insulin for the treatment of women with gestational diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;11:Cd012037.
84. Martis R, Crowther CA, Shepherd E, Alsweiler J, Downie MR, Brown J. Treatments for women with gestational diabetes mellitus: an overview of Cochrane systematic reviews. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;8:Cd012327.
85. López Del Val T, Alcázar Lázaro V, García Lacalle C, Torres Moreno B, Castillo Carbajal G, Alameda Fernandez B. Fasting glucose in the first trimester: An initial approach to diagnosis of gestational diabetes. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2019;66(1):11-8.

-
86. Herrera K, Brustman L, Foroutan J, Scarpelli S, Murphy E, Francis A, et al. The importance of fasting blood glucose in screening for gestational diabetes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(7):825-8.
87. Papachatzopoulou E, Chatzakis C, Lambrinouadaki I, Panoulis K, Dinas K, Vlahos N, et al. Abnormal fasting, post-load or combined glucose values on oral glucose tolerance test and pregnancy outcomes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;161:108048.
88. Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, et al. Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia.* 2010;53(12):2589-99.
89. Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, et al. Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(48):19420-5.
90. Nica AC, Dermitzakis ET. Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1620):20120362.
91. Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan S, Dolan ME, Cox NJ. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS Genet.* 2010;6(4):e1000888.
92. Yang F, Gleason KJ, Wang J, Duan J, He X, Pierce BL, et al. CCmed: cross-condition mediation analysis for identifying robust trans-eQTLs and assessing their effects on human traits. *bioRxiv.* 2019:803106.
93. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science.* 2020;369(6509):1318.

94. Fatima SS, Jamil Z, Alam F, Malik HZ, Madhani SI, Ahmad MS, et al. Polymorphism of the renalase gene in gestational diabetes mellitus. *Endocrine*. 2017;55(1):124-9.
95. Siqueira TW, Araujo Júnior E, Mattar R, Daher S. Assessment of polymorphism of the VDR gene and serum vitamin D values in gestational diabetes mellitus. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2019;41(7):425-31.
96. Li C, Qiao B, Zhou Y, Qi W, Ma C, Zheng L. Association of estrogen receptor α gene polymorphism and its expression with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Obstet Invest*. 2020;85(1):26-33.
97. Costa CD, Teleginski A, Al-Lahham Y, Souza EM, Valdameri G, Alberton D, et al. Association of polymorphism rs17576 of the metalloproteinase 9 gene with gestational diabetes in Euro-Brazilian pregnant women. *Clin Lab*. 2018;64(4):645-9.