



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**



**IMPACTO DO PESO PRÉ-GESTACIONAL E DOS  
POLIMORFISMOS MATERNO-NEONATAL DOS GENES  
FTO (rs9939609) E MC4R (rs17782313) NO PERFIL  
INFLAMATÓRIO DA MÃE, DA PLACENTA E NAS  
CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E  
BIOQUÍMICAS DO NEONATO**

**Defesa de tese**

**SIMONE FÁTIMA GOMES DE OLIVEIRA**

Orientador (a): Jacqueline I. Alvarez Leite

Belo Horizonte

2021

**SIMONE FÁTIMA GOMES DE OLIVEIRA**

**IMPACTO DO PESO PRÉ-GESTACIONAL E DOS  
POLIMORFISMOS MATERNO-NEONATAL DOS GENES  
FTO (rs9939609) E MC4R (rs17782313) NO PERFIL  
INFLAMATÓRIO DA MÃE, DA PLACENTA E NAS  
CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E  
BIOQUÍMICAS DO NEONATO**

**Orientador: Dr. Jacqueline I. Alvarez  
Leite**

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

**UFMG**

**Belo Horizonte**

**Novembro/ 2021**

043

Oliveira, Simone Fátima Gomes de.

Associação do estado nutricional materno com polimorfismos dos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) nos parâmetros antropométricos e inflamatórios materno-neonatal [manuscrito] / Simone Fátima Gomes de Oliveira. – 2021.

125 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Jacqueline I. Alvarez Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Gravidez. 3. Obesidade. 4. Desenvolvimento Fetal. 5. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. I. Leite, Jacqueline Isaura Alvarez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE SIMONE FÁTIMA GOMES DE OLIVEIRA.** Aos dezesseis dias do mês de dezembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Associação do estado nutricional materno com polimorfismos dos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) nos parâmetros antropométricos e inflamatórios materno-neonatal ", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Miriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Carla Barbosa Nonino (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto), aprovada; Dra. Sylvia do Carmo Castro Franceschini (Universidade Federal de Viçosa), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2021.

Dra. Miriam Chaves Schultz (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dra. Carla Barbosa Nonino (USP - Ribeirão Preto)

Dra. Sylvia do Carmo Castro Franceschini (UFV)

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais que além de me darem o dom da vida, abriram caminhos e abdicaram a inúmeros sonhos para que eu realizasse os meus.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus! Eu jamais teria força e coragem para enfrentar todos os obstáculos que vivenciei se não tivesse fé e ajuda DELE.

Depois aos meus pais, Vanda e Benedito, que além de me darem a vida, sempre me apoiaram, incentivaram e abriram “mão” inúmeras vezes dos sonhos deles para realizar no meu. Minha eterna gratidão e amor incondicional por vocês!

Ao meu marido, Sérgio Fernando, que além de me dar muito amor, carinho e compreensão, soube entender meus momentos difíceis e de ausência e além disso, oferecer ajuda nesses momentos. Não o bastante, me incentivou para dar continuidade ao doutorado inúmeras vezes; não deixou eu desistir. Sim! Pensei em desistir mais de uma vez, mas ele foi minha maior âncora e facilitador desse processo.

À minha orientadora, Jacqueline I. Alvarez Leite, uma mulher forte, íntegra e profissional que sempre esteve com uma luz para me direcionar. Muito obrigado por acreditar em mim e permitir a realização de mais esse sonho. Serei sempre grata!!!

Às minhas ICs, Brenda e Camila. Duas meninas-mulher que desde que entraram no meu projeto e na minha vida, compraram as dificuldades do processo, arregaçaram as mangas e foram meu braço direito, esquerdo, minhas âncoras. Muito obrigado, vocês foram meu maior presente!!!

A todos os Labinianos pela receptividade, companhia e força nos momentos difíceis. Muito obrigado! Especialmente à Elândia e ao Wesley que além da força científica, foram meus amigos, me ofereceram apoio, me escutaram, acalmaram meu coração quando mais precisei e não mediram esforços para me ajudar. Minha eterna gratidão! Sem vocês eu jamais seria capaz!

À professora Jaqueline Braga por todo seu ensinamento e receptividade no início do nosso projeto. Foi você que me levou à primeira maternidade, me abriu as portas e me ensinou a fazer as primeiras coletas. Muito obrigado!

À toda a equipe das maternidades Sophia Feldman, Risoleta Neves e especialmente ao Hospital Queluz de Minas (local de maior número de coletas).

Ao obstetra Dr. Ivar (do Hospital Queluz de Minas) que me recebeu com tanto carinho e respeito e foi o intermediador junto às pacientes dele.

Ao laboratório Vila Rica, especialmente a Adriana, que cedeu seu espaço equipamentos para eu centrifugar minhas amostras de sangue.

Aos meus colaboradores do projeto por toda ajuda dispensada.

À professora Edna e sua aluna Maura, pela ajuda na análise estatística e disponibilidade.

Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de pesquisa.

Aos professores do departamento de Bioquímica e Imunologia que com o trabalho de cada um, desenvolvem e mantêm o prestígio e respeito desse programa de pós graduação.

À UFMG que me deu a oportunidade de concluir esse trabalho.

Finalmente agradeço as mães que participaram do meu projeto e ainda permitiram que eu estivesse com seus filhos nos primeiros momentos de vida deles. Sem vocês esse trabalho jamais seria realizado. Muito obrigado!

*A todos que, mesmo sem saber a importância dos gestos e palavras, contribuíram para a conclusão deste trabalho e da realização deste sonho.*



## RESUMO

**Objetivos:** A obesidade é um fator de risco para complicações materno-fetais. Crianças nascidas de mães obesas apresentam maior risco de desenvolver a obesidade, além de outras doenças metabólicas, visto que alterações metabólicas, perfil inflamatório e genotípico ligam o estado nutricional materno à função placentária e, conseqüentemente ao desenvolvimento do neonato. Os SNPs FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) são associados consistentemente à obesidade e alterações fisiológicas que culminem a essa enfermidade. Entretanto, poucos estudos examinam o perfil metabólico e inflamatório materno em associação desse polimorfismo no desfecho gestacional tanto materno quanto neonatal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características bioquímicas, inflamatórias e genéticas de gestantes com sobrepeso e obesidade pré-gestacional e sua influência nos parâmetros antropométricos e metabólicos materno e neonatal.

**Metodologia:** Trata-se de um estudo transversal, com uma amostra de 165 pares de mãe-filho, estratificadas em três grupos de acordo com o IMC pré-gestacional (Eutróficas, Sobrepeso e Obesidade). No momento do parto, foram coletadas amostras de sangue periférico materno e imediatamente após o parto, sangue do cordão umbilical, fragmentos de tecido placentário, de cordão umbilical, tecido adiposo e swab bucal. Dos prontuários e do cartão das gestantes foram retiradas informações antropométricas do neonato e da gestante, respectivamente. As adipocinas foram analisadas pelo método ELISA, a genotipagem do FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) foi avaliada pelo PCR em tempo real. Para a detecção das diferenças significativas foi utilizado os teste ANOVA ou Kruskal Wallis para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste qui-quadrado e para as correlações usou-se os teste Spearman ou Pearson. O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para determinar o efeito das variáveis analisadas e a presença dos polimorfismos. O nível de significância adotado para os teste foi de  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** A obesidade materna foi caracterizada por resistência à insulina, em função de maior hiperglicemia e HOMA-IR nessas mães. E ainda, quando comparadas com as mães eutróficas, as com obesidade apresentaram elevadas concentrações circulantes de IL-6, TNF e resistina e no tecido adiposo, observamos maiores concentrações de leptina, TNF, IL-6 e IL-10. Também identificamos nos compartimentos placentários, tanto na face materna quanto na face fetal maiores concentrações de leptina TNF, e IL-10. E somente na face materna elevadas concentrações de IL-6 menores de adiponectina. Ainda no ambiente placentário, vimos que a placenta das mães com obesidade apresentavam maior retenção de IL-6 e TNF quando comparadas às mães eutróficas. Vimos também que os filhos das mães com obesidade não diferenciaram nas medidas antropométricas mas apresentaram maior glicemia capilar que os das mães eutróficas e que o sangue do cordão umbilical desses neonatos apresentava maiores concentrações de leptina, TNF, IL-10 e menores de adiponectina. A presença dos alelo de risco para FTO (rs9939609) demonstrou ser mais frequente nas mães com obesidade e aquelas portadoras do alelo de risco apresentavam maior peso pré-gestacional e IMC pré-gestacional. Além disso, vimos que o alelo de risco contribuiu para maiores concentrações de resistina, IL-6 e TNF no soro periférico materno. Entretanto, não vimos interferência desse polimorfismo tanto materno quanto neonatal nas características neonatais. Por outro lado, o SNP MC4R materno (rs17782313) não demonstrou efeito sobre as características maternas mas demonstrou reduzir o peso ao nascer dos filhos da mães que possuíam o alelo de risco. Enquanto que o SNP neonatal também não demonstrou efeito nas características do próprio neonato.

**Conclusão:** A obesidade materna é caracterizada por uma resistência à insulina associada um perfil genético, pró-inflamatório sistêmico e local, que afeta o ambiente placentário, contribuindo para alterações bioquímicas neonatais como hiperglicemia.

**Palavras-chave:** Gestação, obesidade, *FTO* (rs9939609), *MC4R* (rs17782313); programação fetal

## ABSTRACT

**Objectives:** Obesity is a risk factor for maternal-fetal complications. Children born to obese mothers are at greater risk of developing obesity, in addition to other metabolic diseases, since metabolic changes, inflammatory and genotypic profiles link maternal nutritional status to placental function and, consequently, to the development of the neonate. The FTO (rs9939609) and MC4R (rs17782313) SNPs are consistently associated with obesity and physiological changes that lead to this disease. However, few studies have examined the maternal metabolic and inflammatory profile in association with this polymorphism in both maternal and neonatal gestational outcomes. Thus, the objective of this study was to evaluate the biochemical, inflammatory and genetic characteristics of overweight and pre-gestational obese pregnant women and their influence on maternal and neonatal anthropometric and metabolic parameters.

**Methodology:** This is a cross-sectional study, with a sample of 165 mother-child pairs, stratified into three groups according to pre-gestational BMI (Eutrophic, Overweight and Obesity). At the time of delivery, samples of maternal peripheral blood and immediately after delivery, umbilical cord blood, placental tissue fragments, umbilical cord tissue, adipose tissue and buccal swab were collected. Anthropometric information on the neonate and the pregnant woman was taken from the medical records and the pregnant women's card, respectively. Adipokines were analyzed by ELISA method, FTO (rs9939609) and MC4R (rs17782313) genotyping was evaluated by real-time PCR. To detect significant differences, the ANOVA or Kruskal Wallis test was used for parametric and non-parametric data, respectively. For categorical variables, the chi-square test was used and for correlations, the Spearman or Pearson test was used. The multiple logistic regression model was used to determine the effect of the variables analyzed and the presence of polymorphisms. The significance level adopted for the tests was  $p \leq 0.05$ .

**Results:** Maternal obesity was characterized by insulin resistance, due to higher hyperglycemia and HOMA-IR in these mothers. And yet, when compared with eutrophic mothers, those with obesity had high circulating concentrations of IL-6, TNF and resistin and in adipose tissue, we observed higher concentrations of leptin, TNF, IL-6 and IL-10. We also identified higher concentrations of leptin TNF and IL-10 in the placental compartments, both on the maternal and fetal sides. And only on the maternal face high concentrations of IL-6 lower than adiponectin. Still in the placental environment, we saw that the placenta of obese mothers had greater retention of IL-6 and TNF when compared to eutrophic mothers. We also saw that the children of obese mothers did not differ in anthropometric measurements but had higher capillary glycemia than those of eutrophic mothers and that the umbilical cord blood of these neonates had higher concentrations of leptin, TNF, IL-10 and lower concentrations of adiponectin. The presence of the risk allele for FTO (rs9939609) was shown to be more frequent in obese mothers and those with the risk allele had higher pre-gestational weight and pre-gestational BMI. Furthermore, we saw that the risk allele contributed to higher concentrations of resistin, IL-6 and TNF in maternal peripheral serum. However, we did not see interference of this polymorphism, both maternal and neonatal, in neonatal characteristics. On the other hand, the maternal MC4R SNP (rs17782313) showed no effect on maternal characteristics but was shown to reduce the birth weight of children born to mothers who had the risk allele. While the neonatal SNP also showed no effect on the characteristics of the neonate itself.

**Conclusion:** Maternal obesity is characterized by insulin resistance associated with a genetic, systemic and local pro-inflammatory profile, which affects the placental environment, contributing to neonatal biochemical changes such as hyperglycemia.

**Keywords:** Pregnancy, obesity, FTO (rs9939609), MC4R (rs17782313); fetal programming

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Representação esquemática da placenta a termo .....	<b>28</b>
<b>FIGURA 2:</b> Representação esquemática da sinciociotrofoblasto com receptores de ácidos graxos contribuindo para o transporte de ácidos graxos via placentária .....	<b>29</b>
<b>FIGURA 3:</b> Homeostase energética mediada por MC4R .....	<b>43</b>
<b>FIGURA 4:</b> Fluxograma das perdas de segmento das gestantes eutróficas e com sobrepeso/obesidade .....	<b>50</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1:</b> <i>Primers</i> utilizados para o RT-qPCR.....	<b>52</b>
--	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Ganho de peso recomendado de acordo com o IMC pré-gestacional.....	<b>51</b>
<b>TABELA 2:</b> Distribuição de gestantes com sobrepeso e obesidade do grupo GSO.....	<b>61</b>
<b>TABELA 3:</b> Características antropométricas e antecedentes obstétricos materno.....	<b>69</b>
<b>TABELA 4:</b> Antecedentes obstétricos materno .....	<b>72</b>
<b>TABELA 5:</b> Concentração de adipocinas inflamatórias e insulina no soro periférico materno de mães eutróficas e obesas no momento do parto .....	<b>73</b>
<b>TABELA 6:</b> Concentrações de adipocinas inflamatórias e insulina no tecido adiposo de mães eutróficas e obesas .....	<b>74</b>
<b>TABELA 7:</b> Concentrações de citocinas inflamatórias e insulina no tecido placentário de mães eutróficas e obesas .....	<b>75</b>
<b>TABELA 8:</b> Correlação entre as adipocinas e insulina do soro periférico materno e as adipocinas e insulina do tecido adiposo e placentário .....	<b>76</b>
<b>TABELA 9:</b> Correlação entre as variáveis maternas e as adipocinas e insulina nas diferentes amostras maternas .....	<b>76</b>
<b>TABELA 10:</b> Efeito dos polimorfismos materno/neonatal de FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) nas variáveis antropométricas e bioquímicas neonatal .....	<b>78</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AIG	Adequado para a idade gestacional
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AgRp	Peptídeo relacionado a agouti
COEP	Comitê de ética em pesquisa
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated</i>
GE	Gestantes eutróficas
GIG	Grande para a idade gestacional
GLUT-4	Transportador de glicose do tipo 4
GO	Grupo obesidade
GS	Grupo Sobrepeso
GTP	Ganho de peso total
HOMA-IR	Avaliação do modelo homeostático
IKK $\beta$	Inibidor da k $\beta$ quinase
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK1	<i>Jun terminal 1</i>
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica nutricional
MUAC	Área muscular do braço
MC4R	<i>Melacortin 4 receptor</i>
NF-KB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NPY	Neuropeptídeo Y

OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Perímetro abdominal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMCs	Células mononucleadas do sangue
PC	Perímetro cefálico
PCR	Proteína C reativa
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PPAR- $\gamma$	Proliferadores de peroxissoma gama
RN	Recém-nascido
POMC	Pró-opiomelanocortina
PT	Perímetro torácico
SNP	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento $\beta$
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
OMS	Organização Mundial de Saúde
RI	Resistência à insulina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Obesidade: Epidemiologia e consequências na gestação.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Fisiopatologia da gestação e consequências da obesidade.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Tecido adiposo.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Placenta: interface materno-fetal.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Obesidade materna e estado inflamatório subclínico.....</b>	<b>31</b>
2.5.1 Leptina.....	32
2.5.2 TNF.....	34
2.5.3 IL-6.....	34
2.5.4 Resistina.....	35
2.5.5 Adiponectina.....	36
2.5.6 IL-10.....	37
<b>2.6 SNPs .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7 Genes FTO (rs9939609).....</b>	<b>38</b>
<b>2.8 O impacto do SNP FTO (rs9939609) no binômio mãe-filho.....</b>	<b>41</b>
<b>2.9 Gene MC4R (Melacortin Receptor 4).....</b>	<b>42</b>
<b>2.10 O impacto do SNP MC4R (rs17782313) no binômio mãe-filho.....</b>	<b>44</b>

<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>46</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>47</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Delineamento experimental.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Critérios de elegibilidade e de exclusão.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Seleção e recrutamento.....</b>	<b>49</b>
<b>5.4 Capacitação da equipe de coleta e controle de qualidade das amostras.....</b>	<b>50</b>
<b>5.5 Composição dos grupos de estudo.....</b>	<b>50</b>
<b>5.6 .Variáveis de estudo.....</b>	<b>51</b>
<b>5.7 Dados do prontuário e sociodemográfico.....</b>	<b>52</b>
<b>5.8 Amostras biológicas.....</b>	<b>53</b>
<b>5.8.1 Amostras de sangue periférico materno e cordão umbilical.....</b>	<b>53</b>
<b>5.8.2 Tecido placentário.....</b>	<b>54</b>
<b>5.8.3 Tecido adiposo.....</b>	<b>54</b>
<b>5.8.4 Cordão umbilical.....</b>	<b>55</b>
<b>5.9 Análises bioquímicas e imunológicas.....</b>	<b>55</b>
5.9.1 Dosagem das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatória, glicemia e insulina.....	55
5.9.2 Análise dos polimorfismos genéticos.....	56
<b>5.10 Genotipagem do polimorfismo do gene FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313).....</b>	<b>59</b>
<b>5.11Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>

<b>6.1 Características antropométricas e antecedentes obstétricos maternos.....</b>	<b>61</b>
<b>6.2 Análise bioquímica materna.....</b>	<b>61</b>
<b>6.3 Análise do perfil inflamatório sistêmico.....</b>	<b>62</b>
<b>6.4 Análise de adipocinas no tecido adiposo materno.....</b>	<b>64</b>
<b>6.5 Análise de adipocinas no tecido placentário.....</b>	<b>66</b>
<b>6.6 Análise de citocinas no sangue do cordão umbilical.....</b>	<b>69</b>
<b>6.7 Características neonatais.....</b>	<b>71</b>
<b>6.8 Frequência genotípica dos polimorfismos materno.....</b>	<b>72</b>
<b>6.9 Associação dos SNPs dos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) materno com IMC pré-gestacional, perfil bioquímico e inflamatório materno.....</b>	<b>73</b>
<b>6.10 Frequência genotípica dos polimorfismos neonatais.....</b>	<b>76</b>
<b>6.11 Impacto dos SNPs dos genes FTO e MC4R materno/neonatal nas variáveis Antropométricas e glicemia neonatal.....</b>	<b>76</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>10. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>117</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A prevalência do excesso de peso tem aumentado nas últimas décadas de forma constante em todos os grupos etários e sociais, configurando-se na atualidade como um dos problemas prioritários de saúde pública. Essa epidemia mundial de obesidade, leva a um aumento correspondente no número de mulheres que entram na gravidez com Índice de Massa Corporal (IMC) elevado e as coloca nas categorias de sobrepeso ou obesidade. Entre as mulheres em idade fértil, até 70% estão com sobrepeso ou obesidade e até 40% são obesas em todo o mundo (1). Aqui no Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008–2009 constatou tendência de aumento da prevalência de obesidade na população adulta de 20 a 75 anos. Os valores encontrados foram maiores entre as mulheres (16,9%) do que entre os homens (12,4%).

O período gestacional é caracterizado por diversas alterações anatômicas, fisiológicas, endócrinas e imunológicas que contribuem positivamente para a adaptação e desenvolvimento do feto (2, 3). Entretanto, tais alterações, se associadas a fatores de risco, como a obesidade, por exemplo, podem predispor tanto a mãe quanto o concepto, à morbimortalidade materno-fetal (2, 4, 5).

A obesidade materna tem sido associada a uma série de resultados adversos na saúde materno-fetal a curto prazo, incluindo diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, inflamação subclínica, hiperglicemia fetal e macrosomia, por exemplo (6-8). Além disso, evidências sugerem que a obesidade materna e o Ganho de Peso Gestacional Total (GPT) quando excessivo podem influenciar negativamente na saúde do neonato a longo prazo por meio da programação metabólica, predispondo a obesidade, problemas comportamentais e cognitivos desde a infância até a idade adulta.

O ambiente intrauterino é um importante determinante do estado de saúde do neonato, bem como determinante do peso ao nascer, da composição corporal e do desenvolvimento metabólico subsequente (9). A placenta é o principal órgão que compõe o ambiente intrauterino, responsável por modular o desenvolvimento do feto e servir de interface entre o binômio mãe-feto, permitindo a troca de nutrientes, gases e hormônios (10). Dessa forma, alterações desfavoráveis na função placentária não apenas desempenham um papel crítico no desenvolvimento de complicações na gravidez, mas também podem estar envolvidas na ligação entre a obesidade materna e os riscos à saúde do neonato (11).

As adipocinas maternas, como a IL-6 (interleucina), o TNF (fator de necrose tumoral), a resistina, a leptina e a adiponectina, ligam o estado nutricional materno e o metabolismo

do tecido adiposo à função placentária, modulando o transporte de nutrientes placentários. Assim, o fornecimento de nutrientes ao feto é regulado por uma interação complexa, incluindo sinalização de insulina, perfil de citocinas e responsividade à insulina, sinais esses, por vezes opostos, que regulam a função placentária e podem contribuir para a diversidade de desfechos à curto e longo prazo observados em gestantes obesas e nos seus descendentes (4, 6).

Do ponto de vista genotípico, os genes FTO (*fat mass and obesity-associated*), na variação rs9939609 e MC4R (*melanocortin 4 receptor*) na variação rs17782313 são SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) associados à obesidade (3, 12, 13), que tem sido relacionados a alterações antropométricas materno e neonatal e alterações fisiológicas de controle da ingestão alimentar e gasto energético, respectivamente (12, 14).

Assim, a obesidade materna associada a variações genotípicas, metabólicas e inflamatórias (6), pode impactar no ambiente intrauterino com conseqüentes alterações como hiperglicemia, hiperinsulinemia, aumento de citocinas pró-inflamatórias sistemicamente e local, além de desregulação de hormônios metabólicos (6, 15), causando impacto na saúde materno-fetal. Essas e outras alterações estabelece a relação entre a obesidade materna e o impacto negativo que ela pode provocar no ambiente intrauterino, indicando que a obesidade pode ser programada no útero (2).

Dessa forma, a prática de avaliar o impacto do perfil inflamatório materno e a presença de alguns SNPs pode ser importante ferramenta para o diagnóstico e até mesmo para a prevenção da obesidade se forem avaliados nas gestantes e nos recém-nascidos com susceptibilidade genética aumentada para a obesidade (3, 16).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade: Epidemiologia e diagnóstico na gestação

Nos últimos anos, a incidência de obesidade tem aumentado significativamente, caracterizando-a como uma epidemia global (17). Até 2030 os números podem chegar a um total de 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 1,12 bilhões com obesidade (18), tornando assim um problema de saúde pública mundial. Em 2014, a OMS (Organização Mundial de Saúde) estimou que mais de 1,9 bilhões de pessoas com idade  $\geq 18$  anos apresentavam  $\text{IMC} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  (sobrepeso), correspondendo a 39% da população adulta no mundo, destes 13% apresentavam  $\text{IMC} \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$  (obesidade) (WHO, 2016). A região das Américas foi a que apresentou a maior prevalência de excesso de peso (61%, destes 27% de obesidade) e a região sudeste da Ásia a mais baixa (22%, destes 5% de obesidade) (WHO, 2014).

No Brasil, 24,4% da obesidade é representada pelas mulheres (IBGE, 2015) e, especialmente na idade fértil, mulheres entre 20 e 39 anos, representam cerca de 37% da população total de obesidade feminina (19). De acordo com as estimativas da OMS em 2014, 40% das mulheres e 38% dos homens apresentavam excesso de peso, destes 15% das mulheres e 11% dos homens eram obesos (WHO, 2014). De acordo com dados epidemiológicos de 186 países, o IMC médio em homens aumentou de  $21,7 \text{ kg/m}^2$  em 1975 para  $24,2 \text{ kg/m}^2$  em 2014, e em mulheres de  $22,1 \text{ kg/m}^2$  em 1975 para  $24,4 \text{ kg/m}^2$  em 2014. A prevalência de obesidade aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014 nos homens e de 6,4% a 14,9% em mulheres (20). Como consequência disso, o número de mulheres em idade reprodutiva classificadas como sobrepeso/obesidade também aumentou; tanto que 1 em cada 5 mulheres estão obesas na gravidez. Isso aumenta o risco de morbidade e mortalidade materno-fetal (21). Fato este que é particularmente preocupante, uma vez que estudos apontam a associação da obesidade gestacional com efeitos adversos maternos, fetais e infantis a curto e longo prazo (2, 3, 22, 23).

Considerada uma doença multifatorial, de origem complexa, resultante da interação entre fatores genéticos, fisiológicos, metabólicos e ambientais, a obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo (24). Embora existam vários métodos mais precisos para quantificar a obesidade, o IMC é mais comumente usado devido a sua simplicidade e rapidez. Este índice é classificado pela OMS em seis categorias para indivíduos adultos, com base nas tendências gerais da relação entre o IMC e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ou taxas de mortalidade (WHO, 2000):  $<18,5 \text{ kg/m}^2$



= baixo peso; 18,5 – 24,9 kg/m<sup>2</sup> = peso normal; 25,0 – 29,9 kg/m<sup>2</sup> = sobrepeso; 30,0 – 34,9 kg/m<sup>2</sup> = obesidade grau I; 35,0 – 39,9 kg/m<sup>2</sup> = obesidade grau II e  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> = obesidade grau III (25).

Para gestantes, de forma geral, a obtenção de estimativas da composição corporal durante a gestação adota recomendações do ganho de peso total segundo estado nutricional inicial da gestante (26) e classifica o estado nutricional de acordo com categorias de IMC por semana gestacional (27).

## **2.2 Fisiopatologia da gestação e consequências da obesidade**

A gestação é um fenômeno fisiológico, caracterizado por alterações anatômicas, fisiológicas, endócrinas, imunológicas e metabólicas que contribuem positivamente para a adaptação e desenvolvimento do feto. Entretanto, trata-se de uma condição de modificações aceleradas que se associadas a fatores de risco como a obesidade, pode predispor tanto a mãe quanto ao feto a condições de risco a curto e longo prazo (28, 29).

Uma adaptação metabólica importante é a sensibilidade à insulina (30). No início da gestação, a sensibilidade à insulina é aumentada, promovendo maior captação de glicose em preparação para as demandas de energia fetoplacentária. No entanto, à medida que a gravidez progride, uma onda de hormônios locais e placentários, incluindo estrogênio, progesterona, leptina, cortisol, lactogênio placentário e hormônio de crescimento placentário promovem um estado de resistência à insulina (RI) (28) com uma redução de cerca de 50-60% na sensibilidade dela (30).

Como resultado, a glicose no sangue é ligeiramente elevada e a glicose é prontamente transportada pela placenta para alimentar o crescimento fetal. Este estado leve de resistência à insulina também promove a produção de glicose endógena e a quebra dos estoques de gordura, resultando em um aumento adicional nas concentrações de glicose no sangue e ácidos graxos livres (28, 30, 31). A diminuição da sensibilidade à insulina é melhor caracterizada por um defeito pós-receptor, resultado da diminuição da capacidade da insulina em provocar a mobilização de GLUT-4 do interior da célula para a superfície celular (31, 32). Isso pode ser devido a alterações nos níveis plasmáticos de um ou mais hormônios relacionados à gravidez como por exemplo a ação da adiponectina (32).

O sobrepeso e a obesidade maternos são tipicamente associados à redução da sensibilidade à insulina e risco materno aumentado de desenvolver diabetes mellitus gestacional. Mesmo quando o diabetes gestacional não se desenvolve, a sensibilidade à

insulina e tolerância à glicose são frequentemente maiores em comparação com mulheres eutróficas, o que se traduz em elevadas concentrações de glicose materna e adipocinas inflamatórias, expondo o feto a um ambiente hiperglicêmico (33) e pró-inflamatório.

A relação causal da obesidade materna com a resistência à insulina também acontece por meio das adipocinas, derivadas do tecido adiposo ou da placenta, com funções pleiotrópicas e que exercem forte influência metabólica nas condições fisiológicas durante a gravidez. Um número crescente de estudos sugere que várias adipocinas, incluindo adiponectina, leptina, resistina e TNF (34, 35) são desreguladas na obesidade e podem contribuir para alterações na homeostase de glicose (36).

Dessa forma, a exposição do feto a um suprimento elevado de nutrientes e citocinas inflamatórias durante períodos críticos do desenvolvimento resulta em alterações permanentes na estrutura e função dos principais sistemas envolvidos na regulação do balanço energético e controle metabólico materno-fetal e essas alterações predis põem o feto ao desenvolvimento da obesidade e doenças crônicas associadas (6), indicando que a obesidade pode ser programada no útero (2).

### **2.3 Tecido adiposo**

O tecido adiposo é um órgão complexo e multifuncional com implicações autócrinas, parácrinas e endócrinas (37), composto por pré-adipócitos, adipócitos maduros, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos e células do sistema imune (38). Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol (39) e por este motivo, por décadas, o tecido adiposo era considerado apenas um mero estocador de energia, um protetor mecânico e/ou um regulador da temperatura corporal. Entretanto, está bem definido atualmente o seu papel como um órgão endócrino, capaz de secretar numerosas proteínas, denominadas de adipocinas, que estão envolvidas na regulação do apetite, no metabolismo de glicose, de lipídeos, nas funções inflamatórias e imunes, entre outras funções fisiológicas importantes (39-41).

As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, além de função hormonal e metabólica, também têm atividade pró e anti-inflamatória. A expressão desregulada dessas adipocinas causadas pelo excesso de adiposidade tem sido relacionada ao desenvolvimento de RI, Diabetes *Mellitus* do Tipo 2 (DM2) e aumento no risco de doenças cardiovasculares, todos característicos da obesidade (35, 42, 43).

A expansão desordenada do tecido adiposo, caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, com conseqüente irrigação sanguínea deficiente, ocasiona a

hipóxia do tecido (44, 45). O rápido crescimento da camada de gordura por meio do aumento das células existentes, alto grau de infiltração de macrófagos, desenvolvimento limitado dos vasos e fibrose maciça contribuem para a inflamação nesse tecido (46, 47). Assim, inicia-se um processo inflamatório subclínico e vicioso, já que a ativação e recrutamento de outras células inflamatórias aumentam a necrose do tecido, causando elevação do recrutamento de macrófagos para o tecido (48).

Macrófagos do tecido adiposo são classificados em dois principais tipos de acordo com marcadores de superfície. Macrófagos do tipo M1 ou classicamente ativados, geralmente apresentam perfil de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta). Em contraste, macrófagos do tipo M2, ou alternativamente ativados, dependendo do contexto, expressam fatores anti-inflamatórios, envolvidos no reparo tecidual, como IL-10 (interleucina 10), TGF- $\beta$  (fator de transformação de crescimento  $\beta$ ), dentre outras. A obesidade é caracterizada pela presença desses macrófagos, caracterizadas por redução na produção de citocinas anti-inflamatórias e aumento nas pró-inflamatórias (41, 49). Tal condição é crucial para o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes e diversas complicações relacionadas à obesidade (4). Estudos como o de Fujisaka *et al.* (2009) demonstraram o envolvimento da quantidade de macrófagos M1 e da razão M1/M2 no desenvolvimento de resistência à insulina (50).

Os macrófagos estão entre as primeiras células a infiltrarem no tecido adiposo, e embora seja vital na imunidade inata e adaptativa, a resposta imune é o resultado das interações entre diferentes tipos celulares (51). Fatores solúveis secretados por leucócitos influenciam reciprocamente a atividade de adipócitos, bem como de células endócrinas e musculares, o que por sua vez interfere nos níveis de nutrientes (particularmente a glicose), insulina e outras adipocinas (4).

Tanto os adipócitos quanto o subconjunto de M1, são importantes fontes de adipocinas que ativam vias inflamatórias que terminam na ativação da *quinase Jun-terminal 1* (JNK1) e inibidor da  $\kappa\beta$  quinase (IKK $\beta$ ), que resultam em produtos dos quais alteram a sinalização a jusante do receptor de insulina (IRS) e podem causar resistência à insulina. Ativação dessas quinases na obesidade destaca a relação entrelaçada de vias metabólicas e imunes; JNK e IKK são as mesmas quinases que são ativadas na resposta imune inata, mediada por sinalização do tipo *Toll-like* (TLR) estimulada por lipopolissacarídeo, peptidoglicano, de cadeia dupla RNA e outros produtos microbianos (51).

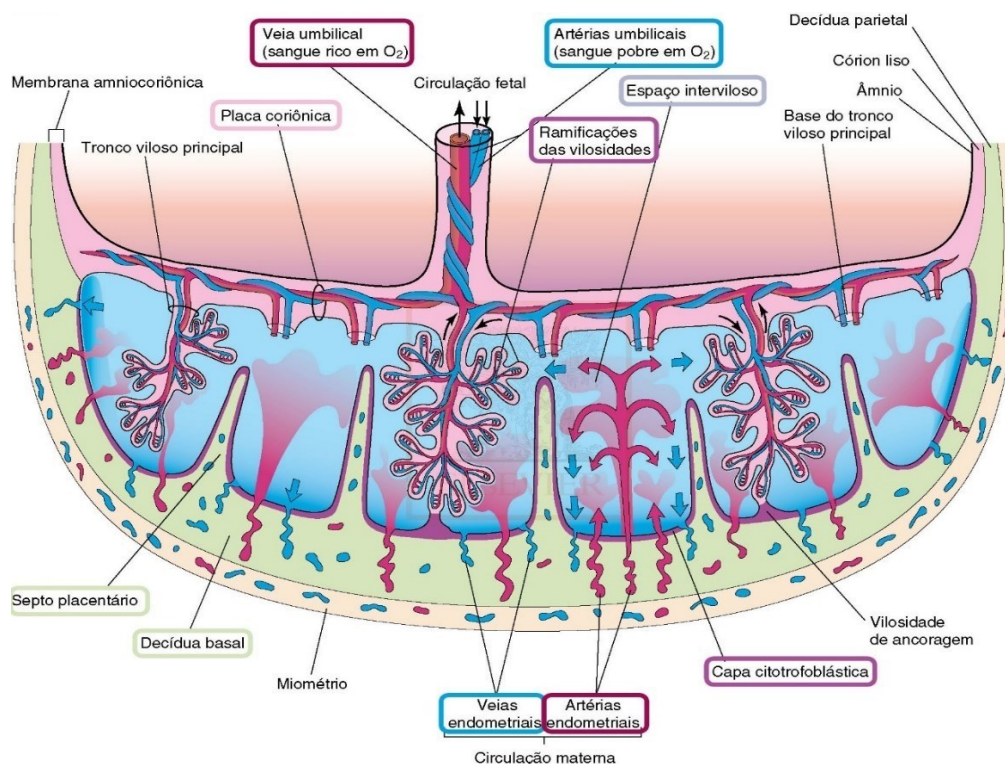
Tudo isso contribui para rede metabólica sensível a interações complexas. Assim, as células T reguladoras, células T efectoras CD8+, Células T CD4+, células T natural killer, células B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos presentes no tecido adiposo também têm sido implicados na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade (48, 51) e, no geral, a inflamação do tecido adiposo na obesidade demonstra que o sistema imunológico e o metabolismo são altamente integrados (52).

#### **2.4 Placenta: Interface materno-fetal**

A placenta é um órgão complexo, desenvolvido especialmente durante a gestação, que permite ao embrião sobreviver dentro do ambiente intrauterino uma vez que tem como função nutrir o feto em desenvolvimento (53). Anatomicamente, a placenta é um órgão plano e oval que apresenta duas faces, sendo uma face materna, constituída pela decídua basal, derivada do endométrio e outra face fetal, constituída pela placa coriônica e pelo cordão umbilical, originados do saco coriônico. Além de fornecer ao feto nutrientes e oxigênio, a placenta realiza muitas outras tarefas vitais como por exemplo proteção ao feto do ataque imune materno, além de cumprir funções excretora, endócrina, catabólica e abortiva (53, 54).

A placenta exibe características hemodinâmicas especiais, a começar pela particularidade de apresentar dois suprimentos de sangue, o materno e o fetal. As duas faces, materna e fetal, delimitam o espaço interviloso, que contém o sangue materno e é dividido por septos, em lobos que se comunicam entre si. Os vasos sanguíneos da circulação fetal se estendem da placa coriônica para dentro destes lobos por meio de vilosidades-tronco principais, que se ramificam em vilosidades terminais (Figura 1). Dessa forma, a circulação placentária materna e fetal desenvolvem-se de maneira independente e uma circulação feto-placentária completa só é estabelecida em torno do início da sexta semana pós-concepção. No entanto, acredita-se que a troca de nutrientes e gases só comece no final do primeiro trimestre (54).

O início da formação da placenta se dá assim que o óvulo é fecundado na trompa e chega a cavidade uterina na forma de mórula que rapidamente se transforma em blastocisto. Após a implantação, o trofotoderma do blastocisto prolifera rapidamente e gera o trofoblasto, o tipo celular único da placenta que posteriormente se diferencia em duas sub-populações principais: sincitiotrofoblasto, epitélio multinucleado das vilosidades responsáveis pela produção de hormônios e troca de nutrientes, e células



trofoblásticas extravilosas, que ancoram a placenta à decídua materna e transformam as artérias espirais maternas (54).

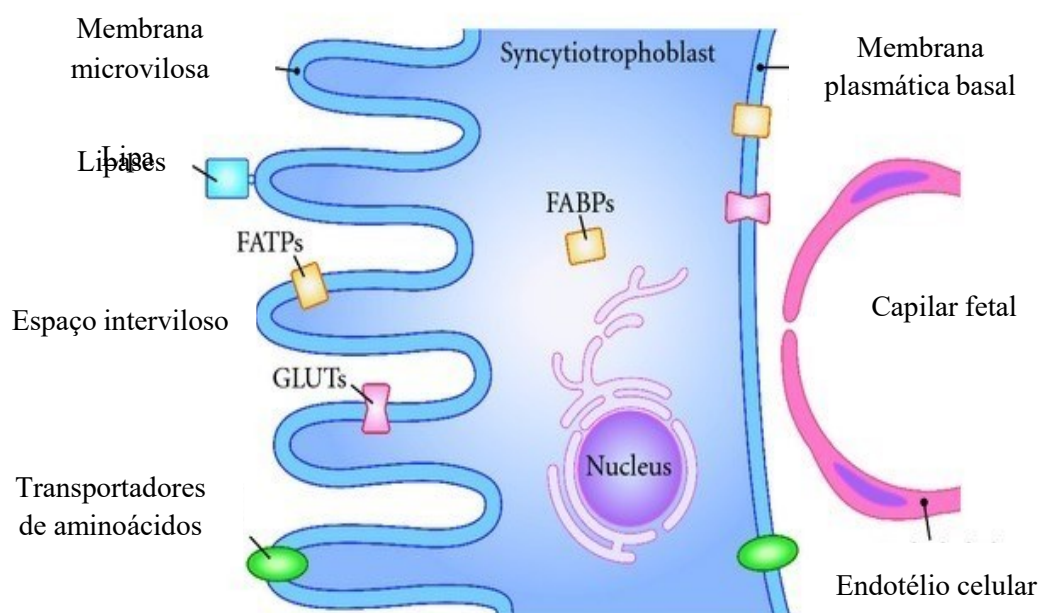
Enquanto os cordões trofoblásticos dos blastocistos estão ligando-se ao útero, capilares sanguíneos crescem nos cordões do sistema vascular do embrião em formação.

**Figura 1: Representação esquemática da placenta a termo.** Adaptado de Moore, Persaude e Torchia (2013).

Em torno do 16º dia após a fertilização, o sangue começa a ser bombeado pelo coração do próprio embrião. Simultaneamente, sinusoides sanguíneos supridos de sangue materno desenvolvem-se em torno das partes externas dos cordões trofoblásticos. As células trofoblásticas enviam cada vez mais projeções, que se tornam vilosidades placentárias nas quais crescem capilares fetais. Assim, as vilosidades carregando sangue fetal são envolvidas por sinusoides que contêm sangue materno (54).

O sangue fetal flui através de duas artérias umbilicais para os capilares das vilosidades e finalmente volta para o feto através de uma única veia umbilical. O sangue materno flui das artérias uterinas para os sinusoides maternos que circundam as vilosidades e em seguida volta para as veias uterinas da mãe (54).

A capacidade da placenta em transportar nutrientes e outras substâncias como água, gases, hormônios e eletrólitos por difusão simples faz com que a fisiologia deste órgão esteja diretamente associado ao crescimento fetal. Alguns nutrientes como a glicose e os ácidos graxos (AG) que também atravessam a placenta por meio de mecanismo passivo, precisam majoritariamente de transportadores específicos para que alcancem a circulação fetal (Figura 2) (11, 55). Assim, mudanças na expressão e na atividade desses transportadores estão implicadas em casos de crescimento fetal restrito e excessivo, e podem representar um mecanismo de controle pelo qual a taxa de crescimento fetal tenta corresponder à disponibilidade de nutrientes na circulação materna (11, 56).



**Figura 2: Representação esquemática do sincitiotrofoblasto com receptores de ácidos graxos contribuindo para o transporte dos ácidos graxos via placentária.**

FATPs: Proteínas transportadoras de ácidos graxos; FABPs: Proteínas de ligação de ácidos graxos; GLUTs: Transportadores de glicose. Adaptado de Lager and Powell (2012).

Visto a importância da função placentária para o desenvolvimento fetal, é factível notar que uma disfunção na placenta pode restringir o crescimento fetal, limitando o suprimento ou disponibilizando excessivamente os nutrientes. Dessa forma, recém nascidos grandes para a idade gestacional (GIG), de mães com obesidade (57) ou com ganho de peso excessivo durante a gravidez, têm maior adiposidade em comparação com

recém-nascidos filhos de mães que ganharam a quantidade adequada de peso (58). Ainda, placentas de mulheres obesas são significativamente mais pesadas no momento do parto além de correlacionarem com o GPT, peso ao nascer e massa gorda neonatal (59).

Além da função transplacentária, a placenta é um órgão endócrino, capaz de secretar hormônios com ação autócrina e parácrina, ou seja, na circulação materna e na fetal, respectivamente (60). Alterações na oferta de nutrientes maternos, citocinas e concentração de hormônios, como aqueles encontrados em complicações comuns da gravidez, podem levar a modificações na função de transporte placentário e subsequentemente ter efeitos no crescimento fetal. Sinais de disponibilidade reduzida de nutrientes maternos (por exemplo, baixa insulina e leptina, alta adiponectina) levam a uma redução geral na entrega de nutrientes ao feto e ao crescimento fetal lento, enquanto sinais maternos de excesso de nutrientes (como alta insulina e leptina, baixa adiponectina) estimulam o fornecimento de nutrientes e aceleram o crescimento fetal (55).

Está bem estabelecido que o estado imunológico desempenha um papel fundamental nas funções placentárias durante a gravidez; portanto, um desequilíbrio sistêmico e tecidual das citocinas inflamatórias, característica da obesidade pode contribuir para o agravamento da resistência à insulina materna, influenciar no desenvolvimento da placenta e, conseqüentemente, no transporte placentário de nutrientes (61). Essas alterações são observadas quando há elevação das concentrações circulantes de quimiocinas e de citocinas pró-inflamatórias na placenta. Entretanto, estudos demonstraram que o aumento desses mediadores inflamatórios na placenta também pode ser secundário à infiltração de macrófagos maternos, que são elevados na circulação de mães com obesidade e conhecidos por secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF. Alternativamente, estímulos inflamatórios, como endotoxinas, dieta hiperlipídica, espécies reativas de oxigênio e oxidação de lipídios e esteroides podem ativar diretamente vias inflamatórias que levam à produção local de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo também para alterações no transporte placentário de nutrientes e, conseqüentemente, no desenvolvimento fetal (62).

A glicose é a principal fonte de energia para o feto e para a placenta e, portanto, deve estar prontamente disponível em todos os momentos. Por este motivo, a insulina não é necessária para o transporte placentário de glicose. Em vez disso, o transporte ocorre via transportador 1 (GLUT1) e transportador 3 (GLUT3) de glicose, altamente expressos na placenta que permitem a captação de glicose por meio de difusão (61). A placenta

também expressa o receptor de insulina que permite que a sinalização da insulina influencie o metabolismo placentário da glicose (31).

A receptividade da placenta à captação de glicose significa que ela é particularmente sensível à hiperglicemia materna. A glicose é transferida passivamente de um ambiente de alto gradiente de concentração para um baixo gradiente que é a circulação fetal. Isso resulta em maior suprimento e exposição fetal à glicose e contribui diretamente para a hiperglicemia e hiperinsulinemia fetal (31).

O aumento das concentrações de insulina fetal, por sua vez, resultam em aumento da captação de glicose e aminoácidos em tecidos sensíveis à insulina, em particular, o tecido adiposo, levando ao supercrescimento fetal e acúmulo excessivo de massa gorda, fato frequentemente observado em bebês de mães diabéticas e obesas, o que tem sido também associado a um maior risco de obesidade na vida adulta (61).

O impacto da obesidade materna também é explorado no transporte de aminoácidos pela placenta e já foi demonstrando que em mulheres obesas há uma redução da atividade e expressão de SNAT4 em comparação com mulheres eutróficas (11) e aumento da expressão de transportadores de ácidos graxos como FATP2 (63). Assim, alterações na expressão de transportadores de nutrientes da placenta já é descrito em mulheres obesas. Na verdade, o peso fetal ao nascer é positivamente correlacionado com a expressão da proteína GLUT1 placentária em pacientes obesos em comparação com pacientes com peso saudável (61).

Estudos histológicos da placenta também mostram que a obesidade materna está associada a hiperplasia do músculo liso nas paredes dos vasos da placenta, imaturidade da árvore vilosa placentária (62), além de alterações na densidade dos vasos e angiogênese não ramificada (64).

Dessa forma, alterações nos transportadores de nutrientes, mudanças no perfil inflamatório e alterações morfológicas da placenta são demonstrados como um mecanismo de controle pelo qual a taxa de crescimento fetal é combinada com o disponibilidade de nutrientes da circulação materna; restringindo o crescimento quando a nutrição é limitada e acelerando quando os nutrientes estão em excesso (11).

## **2.5 Obesidade materna e estado inflamatório subclínico**

A gestação tem sido considerada um “estado de imunossupressão”, no qual o sistema imunológico enfraquecido é necessário para permitir que o feto, cujos antígenos



diferem dos maternos por conta do material genético paterno, se desenvolva (65). Para compensar a diminuição da imunidade adaptativa, que poderia aumentar a susceptibilidade a agentes infecciosos, a placenta produz uma variedade de citocinas e hormônios imunomodulatórios, que provocam inflamação sistêmica controlada e de reduzido grau, além de atuarem nas adaptações metabólicas e fisiológicas características deste período (54).

O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é crucial para manutenção da gestação saudável e alcance de desfechos obstétricos positivos desejáveis (2, 66). Citocinas como adiponectina, leptina (2, 15), IL-6, TNF e IL-10 têm grande relevância em eventos relacionados tanto à gestação (67, 68) quanto à obesidade (69). Por este motivo, entender como elas atuam na obesidade materna faz-se necessário.

### 2.5.1 Leptina

A leptina é um hormônio da saciedade secretado principalmente pelos adipócitos em resposta aos estoques de tecido adiposo. Atua principalmente nos neurônios dentro do núcleo arqueado do hipotálamo para diminuir o apetite e aumentar o gasto de energia. Especificamente, a leptina inibe o neuropeptídeo Y (NPY), estimuladores do apetite e peptídeo relacionado a agouti (AgRP), e ativa o polipeptídeo anorexigênico pró-opiomelanocortina (POMC) (31). A leptina tem também efeitos diretos em tecidos periféricos, nomeadamente nas células  $\beta$  pancreáticas, no músculo e no fígado, reduzindo os níveis lipídicos intracelulares e aumentando assim a sensibilidade à insulina. No músculo, estimula a oxidação de ácidos graxos, o que também aumenta a sensibilidade à insulina, sendo que algumas destas ações são parcialmente mediadas pela ativação simpática central de receptores adrenérgicos (70). Entretanto, em indivíduos obesos, sua função anoréxica é reduzida em função de um mecanismo de resistência à ação deste hormônio. Dessa forma, a leptina é associada à massa de gordura corporal, de forma que seu teor no plasma se correlaciona positivamente com o IMC (15), assim como sua secreção pelo tecido adiposo (71).

Como parte das adaptações metabólicas na gravidez, as concentrações de leptina e de insulina aumentam na circulação materna durante a gravidez. Efeitos centrais da leptina e insulina, no entanto, são invertidos durante a gravidez e já está bem documentado que a gestação induz a insensibilidade à leptina e à insulina no cérebro, particularmente no hipotálamo, com o objetivo de aumentar a disponibilização de nutrientes materno-fetal

(72). No momento do parto, já foi demonstrado que concentrações materna de leptina são significativamente maiores nas mães cujos recém-nascidos tinham desconforto respiratório, macrossomia, baixo índice de Apgar (73), maior adiposidade (74), possivelmente pelo aumento do transporte placentário de nutrientes induzido por tal (31).

Não somente o tecido adiposo, mas placenta humana também produz e secreta leptina. A leptina placentária é secretada na circulação fetal em quantidades mínimas (cerca de 5%) e a maioria é secretada na circulação materna, tornando assim a placenta uma fonte importante de leptina materna durante a gravidez. Dessa forma, sua concentração aumenta significativamente, independentemente do IMC e diminui rapidamente após o parto (75-77). A placenta apresenta também os receptores para a leptina, por meio dos quais o hormônio é capaz de participar da regulação do crescimento desse próprio órgão, da angiogênese e também da transferência placentária de nutrientes (78).

Em gestações que envolvem situação de obesidade, alguns fatores estimulam a produção exacerbada de leptina pela placenta, como os teores aumentados de TNF e IL-6 (79) e a hipóxia do tecido placentário (6). O aumento da excreção desta adipocina sistemicamente e pela placenta está associado à insuficiência placentária e, possivelmente, ao estresse fetal contribuindo para desvios do desenvolvimento neonatal (77) como neonatos grande para a idade gestacional (15).

Até o momento é reconhecido que os níveis de leptina fetal são independentes da secreção materna ou placentária e são mais correlacionado com o peso ao nascer e a massa gorda fetal, do que com leptina materna. Foi relatado que embriões humanos (6 a 10 semanas) expressam RNAm de leptina em pré-adipócitos, o que sugere que tecido adiposo pode produzir leptina quando os pré-adipócitos se diferenciam e começam a acumular gordura. No mesmo sentido, foi relatado que o tecido adiposo branco fetal (20 a 38 semanas de gestação) expressa e secreta leptina (77). Dessa forma, podemos observar que a exposição intrauterina à leptina no contexto de obesidade materna influencia em processos metabólicos além do crescimento fetal e aumento de gordura materno-fetal.

### 2.5.2 TNF

O TNF é secretado no tecido adiposo por macrófagos residentes e, durante o período gestacional, também é secretado na placenta. Trata-se de uma proteína de sinalização celular, envolvida na regulação da proliferação, diferenciação, apoptose, além de atuar no metabolismo lipídico e coagulação. Durante a gestação, é normal que as concentrações placentárias de TNF aumentem, uma vez que essa citocina exerce ação essencial na

implantação, diferenciação e *turnover* dos trofoblastos, contribuindo para angiogênese e crescimento placentário (6), além de estimular o sistema A de transporte de aminoácidos na placenta (80).

A este respeito, já foi descrito que o transporte placentário de nutrientes pode ser alterado nas situações de aumento da inflamação (62). Segundo Lager et al. (2012), a adição de IL-6, mas não de TNF, em cultura primária humana de trofoblastos, aumenta o acúmulo de ácidos graxos (55). De outro modo, Araújo et al. (2013) demonstraram que a captação dos ácidos graxos araquidônico e docosahexaenóico (DHA) aumenta em torno de 25%, quando as células placentárias são expostas ao TNF e a insulina (81). No contexto de obesidade, Challier et al. (2008) encontraram maior teor de TNF e IL-6 na placenta de obesas, quando comparadas as de mulheres eutróficas (82).

Em gestantes obesas, concentrações aumentadas de TNF estão associadas à resistência à insulina e ainda podem ser preditoras para desfechos obstétricos adversos (83, 84). O TNF pode também exercer efeito inibitório na secreção da insulina e na captação da glicose regulada pela insulina, contribuindo assim para a hiperglicemia sustentada (85). Dados relativos aos teores de TNF no plasma do cordão umbilical ainda são escassos. Aye e colaboradores (2014) avaliaram a correlação entre o IMC materno e o conteúdo de TNF no plasma do cordão umbilical e não encontraram valores estatisticamente significativos (86).

### 2.5.3 IL-6

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada no tecido adiposo, que está envolvida em múltiplos processos fisiológicos incluindo inflamação, lesão tecidual e defesa do hospedeiro. Concentrações aumentadas de IL-6 estão positivamente correlacionadas com a obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina (87). Enquanto que a perda de peso leva a reduções significativas nas concentrações plasmáticas e do tecido adiposo (88). Entre os mecanismos relacionados com a resistência à insulina observada em situações de IL-6 elevada, parecem estar o aumento dos ácidos graxos livres circulantes e a redução da secreção de adiponectina (88).

Durante a gestação, mulheres obesas apresentam maiores concentrações de IL-6 quando comparadas com aquelas de IMC normal (89). E por consequência, IL-6, assim como TNF, são capazes de estimular o sistema A de transporte placentário, aumentando

a oferta de nutrientes e contribuindo para a deposição excessiva de gordura nos neonatos nascidos de mães obesas (55, 63, 80).

#### 2.5.4 Resistina

A resistina humana é predominantemente produzida por células mononucleares do sangue (PBMCs), macrófagos e células da medula óssea (90, 91). Em humanos, a resistina mostrou induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão nos quadros de inflamação e disfunção endotelial. Dada a forte relação entre inflamação e metabolismo, há evidências crescentes que sugerem um papel da resistina humana nos processos patológicos de doenças metabólicas, incluindo obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (90).

No entanto, a importância da resistina nos seres humanos ainda não está clara, dado que os resultados dos estudos realizados são controversos em relação às concentrações plasmáticas de resistina e a sensibilidade à insulina (92, 93). Ainda assim, já foi relatada uma associação positiva entre a concentração plasmática de resistina e marcadores de obesidade, de insulinoresistência e de inflamação (94), como por exemplo, tendo um papel estimulador na síntese de IL-6 e TNF (95). Entretanto, a resistina parece estar correlacionada com a resistência à insulina como consequência da própria obesidade, e não como um fator causal independente (96).

A produção de resistina pela placenta e suas concentrações nesse tecido e no plasma estão aumentadas ao longo da gravidez, com valores máximos no terceiro trimestre (71, 97). A resistina parece ter um papel importante na regulação das adipocinas na diabetes gestacional, no metabolismo materno e no crescimento fetal, uma vez que a sua secreção pela placenta é estimulada pela insulina (71, 98). O aumento nas concentrações plasmáticas desta adipocina parece contribuir para a diminuição da sensibilidade à insulina na segunda metade da gravidez, assim como para a hiperglicemia pós-prandial (91, 97, 98).

Relação entre o IMC e concentração plasmática de resistina durante a gravidez ainda não foi encontrada (98). Mas um estudo recente de Floeck et al. (2021), demonstrou que a resistina e TNF materno são fatores determinantes para as concentrações de resistina no sangue do cordão umbilical, sugerindo que há um transporte transplacentário de resistina para a circulação fetal (99).

Em estudos de cultivos de células, a secreção de resistina por CBMCs foi aumentada em resposta ao aumento da glicose e em células trofoblásticas de placenta humana a exposição à resistina diminuiu a expressão do coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), demonstrando que a biogênese mitocondrial e produção de ATP foram afetados pela presença dessa citocina na placenta (90).

### 2.5.5 Adiponectina

Paradoxalmente, a adiponectina, hormônio também secretado no tecido adiposo, é inversamente correlacionada com a resistência à insulina e desempenha um papel crucial na regulação de respostas imune (reduz as concentrações circulantes de TNF e proteína C reativa – PCR) e na regulação do metabolismo energético (6). Em contraste com a leptina, há uma associação mais forte da adiponectina com a resistência à insulina do que com a adiposidade (31). Entretanto, estudos demonstram correlação negativa entre a concentração plasmática de adiponectina e o IMC, uma vez que concentrações de adiponectina estão significativamente diminuídas em indivíduos obesos (61, 100, 101) e aumentam com a perda de peso (102, 103).

A adiponectina aumenta a sinalização da insulina e a oxidação de ácidos graxos, e inibe a gliconeogênese. Ele faz isso ativando a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) dentro das células sensíveis à insulina, o que facilita a ação do IRS-1 e ativação da transcrição fator receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ) no fígado. Além disso, a adiponectina estimula a secreção de insulina, regulando positivamente a expressão do gene da insulina e exocitose dos grânulos de insulina a partir de células  $\beta$  (31).

A adiponectina se relaciona inversamente também com o TNF. Este efeito é bidirecional, pois as alterações primárias nas concentrações de adiponectina podem influenciar o TNF e vice-versa. TNF inibe a expressão e secreção de adiponectina de adipócitos humanos em culturas de células e a deficiência de adiponectina leva a alta expressão de RNAm de TNF no tecido adiposo e elevada concentração plasmática (104).

Durante a gestação, mulheres eutróficas têm maiores concentrações de adiponectina em comparação com mulheres obesas (80), e concentrações maternas de adiponectina são inversamente correlacionados com o crescimento fetal, associando-a ao desenvolvimento fetal por meio de alterações metabólicas e da função placentária (10, 80).

A adiponectina e os seus receptores (ADIPR1 e ADIPR2) já foram encontrados na placenta humana e sua secreção regulada por várias citocinas incluindo o TNF, IL-6 e a leptina (105). Também já foi demonstrada uma correlação positiva entre expressão placentária da leptina e da adiponectina, o que sugere uma relação entre as duas adipocinas na placenta (106). No estudo de Nogueira et al. (2019), a obesidade materna foi associada à regulação negativa de ambos os sistemas leptina/adiponectina na placenta a termo, demonstrando a perda dos efeitos benéficos dessas duas adipocinas no desenvolvimento placentário em resposta a um ambiente materno prejudicial (61).

O fato é que tanto a leptina quanto a adiponectina, têm alta relevância na adiposidade e crescimento fetal e estudos relacionam suas concentrações no sangue do cordão às trajetórias de crescimento a curto e longo prazo. Portanto, filhos de mães com obesidade pré-gestacional, podem apresentar maior susceptibilidade para desenvolver alterações metabólicas mais tarde na vida, incluindo a própria obesidade (77).

#### 2.5.6 IL-10

A IL-10 é uma adipocina relacionada com o controle da transdução de sinal de adipocinas pró-inflamatórias. É expressa também nos adipócitos e cria um ambiente anti-inflamatório no tecido adiposo em condições fisiológicas. Diferentes células da placenta, incluindo trofoblastos, podem produzir esta citocina (107). IL-10 inibe a produção de TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e, por outro lado, aumenta os níveis de outras citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$  (108). Com isso, a IL-10 está envolvida na manutenção da gestação, uma vez que atua como supressora da imunidade materna, contribuindo para a tolerância do aloenxerto fetal (107, 109). Contudo, alterações na expressão de IL-10 durante a gestação estão associadas a desfechos obstétricos adversos, como associação ao parto prematuro (67).

Assim, já foi descrito que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, não acompanhado por elevação dos teores de IL-10, está associado ao aborto espontâneo, à pré-eclâmpsia e ao nascimento pré-termo (67). Adicionalmente, apesar de ser amplamente aceito que as respostas inflamatórias sistêmicas e placentárias, associadas à gestação, sejam exacerbadas pela obesidade (62), não existe consenso a respeito da capacidade das concentrações de IL-10 se ajustarem a ponto de contrabalançar o aumento na produção de citocinas inflamatórias na obesidade gestacional (43).

Em suma, conforme relato anteriormente, citocinas um desequilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no contexto de obesidade materna pode desencadear alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas e local impactando na função placentária e no transporte de nutrientes com impacto no desenvolvimento e saúde neonatal. Dessa forma, adipocinas maternas são críticas moléculas de sinalização que ligam o estado nutricional materno aos nutrientes transportados pela placenta, que por sua vez, impactam no desenvolvimento de órgãos fetais e alteram os padrões de crescimento intrauterino (6).

## **2.6 SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo único)**

Os SNPs correspondem a alteração de uma única base na sequência do DNA (A, C, G, ou T) em um determinado local cromossômico (locus). Eles representam 90% dos polimorfismos genéticos e são o tipo mais comum de variação genética em seres humanos e ocorrem em média uma vez em cada 100- 300 pares de bases.

Ao longo dos últimos anos, milhões de polimorfismos em genes humanos foram validados no SNP database (dbSNP – banco de dados incorporado ao National Center for Biotechnology - NCBI). Cada SNP depositado no dbSNP tem um registro particular indicado como #rs (refSNP) seguido de um número definido pela ordem de depósito no banco. Estes avanços na descoberta de um número expressivo de SNPs contribuíram para considerável aumento do número de publicações científicas, na tentativa de associar estes polimorfismos a doenças ou à suscetibilidade a estas.

Entre os vários genes estudados em associação com a obesidade, destacam-se os genes FTO (rs9939609), MC4R (rs17782313), conhecidos por codificar proteínas envolvidas na regulação do balanço energético. É concebível que essas variantes genéticas envolvidas na susceptibilidade da obesidade possam desempenhar papel importante na regulação do peso e do consumo alimentar durante a gestação. Contudo, são escassos ainda estudos que abordam os efeitos da genética sobre os desfechos gestacionais e neonatais.

## **2.7 Gene FTO (Fat mass and obesity associated)**

O FTO é um gene com nove exons e mais de 400 Kb localizado no braço longo (q) do cromossomo 16 na posição 12.1, sendo responsável pela codificação de uma proteína

de 505 aminoácidos (110), que tem como atividade a desmetilação do ácido nucleico dependente da 2-oxaglutarato, cujo principal substrato é N<sup>6</sup>-metiladenina que está envolvida no reparo de DNA e RNA (111).

É expresso em diversos tecidos do corpo, como tecido adiposo, pâncreas, tecido muscular, placenta (112) e principalmente no cérebro, incluindo o hipocampo e o hipotálamo, que são regiões implicadas na regulação da ingestão de alimentos e no gasto energético (111, 113).

A ligação entre o gene *FTO* e a obesidade foi demonstrada no estudo de Jiao *et al.* (2016), realizado *in vitro*, que observou em células *knockdown* para *FTO* a supressão da proliferação dos adipócitos, com menor produção de ATP celular e menores gotas lipídicas intracelulares em comparação com os controles e que, ainda, essas células apresentaram supressão significativa da expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR $\gamma$ ) e transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e inibição da fosforilação de Akt. Em contraste, a superexpressão de *FTO* teve o efeito oposto na proliferação, potencial de membrana mitocondrial, geração de ATP, diferenciação *in vitro*, fosforilação de Akt e expressão de PPAR $\gamma$  e GLUT4. Contudo, a proliferação e diferenciação de células do tecido adiposo 3T3-L1 são reguladas pelo gene *FTO* através de múltiplos mecanismos (114), fato que associa este gene à obesidade.

A variabilidade nucleotídica constituída pela presença ora de uma timina (T), ora de uma adenina (A) na posição 53820527 no primeiro intron do gene *FTO*, evidencia um SNP, cujo número de acesso no dbSNP (NCBI, 2014) é rs9939609. Esta variação (rs9939609) é a mais estudada e largamente associada ao ganho de massa gordurosa e à obesidade (111, 115).

O alelo "A" do gene *FTO* está diretamente relacionado a um maior acúmulo de gordura corporal, principalmente quando se apresenta em homozigose. A variante "A" do polimorfismo rs9939609 do gene *FTO* possui efeito sobre o ganho de peso, induzindo uma diminuição da sensibilidade da insulina cerebrocortical, afetando o apetite, a escolha de macronutrientes (proteína/carboidrato) e a ingestão dietética em idade precoce (116, 117).

Tem sido descrito que cada alelo de risco aumenta o IMC em 0.40-0.66 kg/m<sup>2</sup> ou em 1.3-2.1 kg no peso corporal para uma pessoa de 1.80 metros de altura (118). Em homozigose, os alelos de risco (AA) promovem um aumento de 3-4 kg e induzem um aumento de 1.67 vezes no risco de desenvolverem obesidade quando comparados àqueles que não têm os alelos de risco (TT) (118). Crianças e adolescentes apresentam um



aumento de 1,27 a 1,35 de serem obesas ou com sobrepeso para cada alelo de risco adicional (119). Ramos e colaboradores, desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar a associação da presença do polimorfismo *FTO* (rs9939609) com a obesidade em indivíduos brasileiros de baixa renda e eles observaram que a presença do alelo de risco A no gene *FTO* (rs9939609) foi associada ao fenótipo da obesidade quando comparada à população com IMC abaixo de 30 kg/m<sup>2</sup> (eutróficos e sobrepeso), concluindo que a presença desse alelo contribuiu para a obesidade nessa população (120).

Além das associações com a adiposidade, outros estudos demonstraram que os indivíduos portadores do alelo A do SNP *FTO* (rs9939609) estão associados ao maior consumo global de energia quando comparados com os de genótipo TT (121) e ainda estão associados à redução do sentimento de plenitude e saciedade (122) e redução do gasto energético de repouso e maior relação leptina/massa gorda (123). Indivíduos portando o genótipo AA ingerem até 1231 kJ (294 kcal) a mais quando comparados aos indivíduos portando o genótipo TT/AT (113).

Embora os mecanismos pelos quais o SNP *FTO* (rs9939609) predisõem o indivíduo à obesidade permaneçam pouco esclarecidos, o estudo de Karra *et al.* (2013), demonstrou que pacientes obesos com homozigose para o alelo A do SNP *FTO* (rs9939609) apresentam concentrações circulantes desreguladas do hormônio orexígeno acil-grelina e, por meio de ressonância magnética funcional, demonstrou que esses indivíduos apresentaram divergência marcante na responsividade neural a estímulos alimentares dentro de regiões cerebrais ligadas a recompensa e controle comportamental em comparação com sujeitos TT e que, por sua vez, isto pode justificar as preferências alimentares que levam esses pacientes à obesidade (124).

Ainda, a variante rs9939609 foi associada ao risco de diabetes tipo 2, insuficiência cardíaca, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral isquêmico, hipertensão arterial, dislipidemia, síndrome metabólica e mortalidade. A variante rs9939609 também foi associada ao aumento de diversos parâmetros, como: dos níveis de glicose e insulina em jejum; níveis de glicose pelo TOTG-2h; hemoglobina glicada; pressão arterial; níveis de triglicérides, colesterol total e frações; enzimas hepáticas; e marcadores inflamatórios. Grande parte dessas associações são mediadas pelo efeito do *FTO* no IMC (125).

## 2.8 O impacto do SNP *FTO* (rs9939609) no binômio mãe-filho

A influência dos fatores de risco materno durante a gravidez na saúde fetal e infantil tem sido explorada. Por isso, identificar os fatores que predisõem a mãe ao desenvolvimento da obesidade e suas repercussões na saúde infantil torna-se um grande desafio. Sabendo disso, o determinismo genético materno é um dos fatores que pode influenciar diretamente no peso ao nascer e contribuir para a susceptibilidade ao desenvolvimento a curto e longo prazo da obesidade nos descendentes (3, 12, 16).

Para tanto, a variante genética do SNP no gene *FTO* (rs9939609) está associada ao maior peso e IMC pré-gestacional (126) e ainda, a homozigose para o alelo A do SNP *FTO* (rs9939609) faz com que as gestantes fiquem aproximadamente 9kg mais pesadas durante a gravidez quando comparadas com aquelas com alelos TT/AT (127). Também foi observado que o alelo A do *FTO* (rs9939609) foi associado a uma redução de -6,5% na porcentagem de energia da proteína e positivamente associado à porcentagem de energia dos carboidratos antes gravidez e com um aumento de 13,3% na ingestão total de energia durante a gravidez (128).

No estudo de Starling *et al.* (2015), cada aumento de 1kg/m<sup>2</sup> no IMC materno foi associado ao aumento da massa gordurosa neonatal (129) e recém-nascidos portadores de alelos de risco AA/AT, treze dias após o nascimento, apresentavam maior ganho de massa gorda quando comparados com aqueles com alelos TT (16). Já no estudo de Marginean *et al.* (2016), recém-nascidos de mães portadoras de alelo de risco A apresentavam menor IMC e menor área muscular do braço do que recém-nascidos de mães com genótipo TT (12).

Essa divergência de resultados pode ser justificada pelo estudo de Sóvio *et al.* (2011) que demonstrou que crianças portadoras de alelos de risco para o SNP *FTO* (rs9939609) apresentavam IMC mais baixo na infância, recuperação mais precoce da adiposidade e maior IMC mais tarde na infância, demonstrando que adiposidade muda durante o tempo e que crianças acima de 5 anos, que apresentam o alelos de risco, são associadas a um IMC superior (130). Por outro lado, um estudo de 2017 revelou que a amamentação exclusiva na infância, durante cinco meses ou mais, age antagonizando o efeito do alelo de risco da variante aos 15 anos de idade (131).

Em consequência da presença dos efeitos do polimorfismo de *FTO* (rs9939609) nas mães, o estudo de Bassols *et al.* (2010) demonstrou que a expressão placentária do SNP *FTO* (rs9939609) associa-se com o aumento do peso de ambos, placenta e feto (112). Por

outro lado, a presença dos alelos de risco para FTO (rs9939609) e a expressão de FTO placentária foi estudado por Barton et al. (2016) que demonstrou neste estudo que a variação em FTO (rs9939609) nos neonatos está associado à velocidade do crescimento fetal e do perímetro cefálico e que o genótipo FTO (rs9939609) não foi associado à expressão de FTO placentária, mas a expressão mais alta de FTO placentário foi independentemente associada com maior tamanho fetal e maior expressão de transportador de aminoácidos pela placenta (14).

Além das alterações antropométricas materna e neonatais nos estudos anteriores, a variação FTO (rs9939609), no estudo de Gesteiros et al. (2016) demonstrou que neonatos de mães AA + AT apresentaram menor glicemia, insulina e resistência à insulina na avaliação do modelo homeostático (HOMA-IR), demonstrando que os alelos maternos afetam significativamente no metabolismo de glicose dos neonatos (16).

## **2.9 Gene MC4R (Melacortin receptor 4)**

O MC4R é um gene exônico com mais de 188 Kb localizado no braço longo (q) do cromossomo 22 com 1.666 pares de bases (3). Ele representa a forma mais comum de obesidade monogênica humana, afetando 0,2-5,8% dos indivíduos com obesidade grave (132, 133). Além disso, o GWAS evidenciou que a variação comum no MC4R, cujo número de acesso no dbSNP (NCBI, 2014) é rs17782313, contribui para a susceptibilidade da obesidade na população, e foi o segundo gene identificado de susceptibilidade à obesidade poligênica (134, 135).

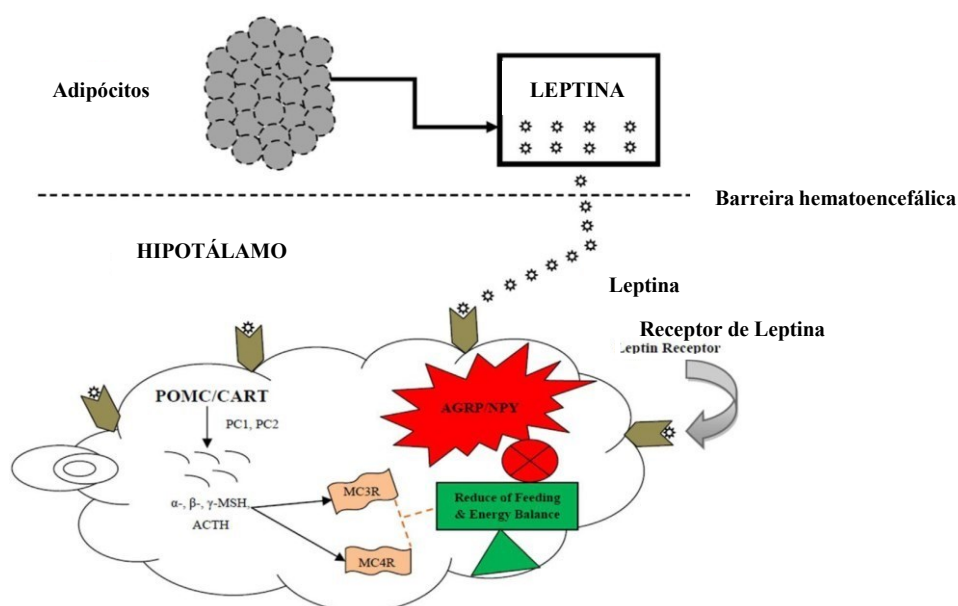
A variação rs17782313 do gene MC4R corresponde a substituição da timina (T) por citosina (C). Esta variante apresenta papel importante no controle do apetite e na homeostase energética e, conseqüentemente, é de grande relevância para o fenótipo de excesso de peso corporal (18, 132, 136). Neste sentido, o polimorfismo MC4R (rs17782313) tem sido fortemente associado com a obesidade e com maior IMC em adultos e crianças (135, 137, 138).

O MC4R (rs17782313) é um receptor ligado à proteína G amplamente expresso no hipotálamo e no sistema nervoso central e faz parte da via da melacortina, implicado na homeostase energética, no metabolismo de glicose, de lipídios e no controle da ingestão alimentar (135).

O núcleo arqueado (ARC) constitui-se, dentro do hipotálamo, numa área maior de integração entre os diversos sinais oriundos da periferia e do tronco cerebral,

determinando ações que visam adequar o balanço energético do organismo. Quando o indivíduo está em estado alimentado, sinais hormonais circulantes como leptina e insulina, atravessam a barreira hematoencefálica e são encaminhados ao ARC com o intuito de inibir a produção de dois potentes orexígenos: NPY e a AgRP, visto que são estimuladores da ingestão alimentar. Enquanto essa via orexígena é inibida os mesmos sinais de leptina e insulina circulante é capaz de ativar outra subpopulação neuronal expressa, antagonista dos efeitos de NPY e AgRP; POMC e Transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART) com papel anoréxico (Figura 3). A ligação dos receptores de leptina e insulina à POMC, faz com que subprodutos como o  $\alpha$ -melanócito hormônio estimulante ( $\alpha$ -MSH) sejam expressos e atuem em receptores de melanocortina (especialmente o tipo 4—MC4R) induzindo perda de apetite. (139).

Dessa forma, a homeostase energética envolve o uso de produtos químicos e sinais neuronais no corpo humano para manter a quantidade de fluxo de energia e regular a ingestão de energia (136). É o equilíbrio entre o consumo de energia e o gasto energético. Assim, estudos demonstram que a variação no gene de MC4R (rs17782313) interfere tanto na ingestão de alimentos quanto o gasto de energia (140-142).



**Figura 3: Homeostase energética mediada por MC4R.** Os adipócitos secretam leptina, que atravessa a barreira hematoencefálica e se liga aos receptores de leptina no hipotálamo. A leptina induz a expressão de POMC/CART e as enzimas PC1 e PC2 clivam a POMC em pequenos peptídeos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -MSH e ACTH. Essas moléculas sinalizadoras ativam o MC3R e o MC4R, que, por sua vez, ajuda na redução do comportamento alimentar e no controle homeostase energética da energia. Na mesma via, o receptor de leptina inibe a expressão de AGRP / NPY via MC3R e MC4R, o que leva ao controle da alimentação e regulação do peso.

Adaptado de: Singh *et al.* (2017).

Sendo assim, MC4R (rs17782313) têm sido associado com a obesidade multifatorial (142, 143). Estimativas genômicas sugerem que a variação mais comum do MC4R (rs17782313) é responsável pelo aumento de 20% do IMC (141), assim como um estudo com 580 crianças com idade entre 8-13 anos que associou o alelo de risco para o SNP MC4R (rs17782313) com a obesidade (144). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que a associação do SNP em MC4R (rs17782313) nos parâmetros relacionados à obesidade fortalecem-se com a idade pois foi observado que na infância as menores dobras cutâneas foram encontradas naquelas sem o alelo de risco e que na idade adulta a maior probabilidade de desenvolver obesidade e síndrome metabólica foi naqueles que apresentavam o genótipo CT/CC (145).

### **2.10 O impacto do SNP MC4R (rs17782313) no binômio mãe-filho**

Como demonstrado anteriormente, a via do MC4R modula o consumo alimentar e a homeostasia energética e qualquer variação na expressão ou funcionalidade deste receptor pode predispor o indivíduo à obesidade. Visto que a obesidade pode ser programada no ambiente intrauterino, o estudo de Cordeiro *et al.* (2017) demonstra que a alimentação obesogênica materna de camundongos durante o período perinatal é capaz de programar o desenvolvimento da obesidade na prole com envolvimento do sistema MC4R (146). Corroborando, Nguyen *et al.* (2017) demonstrou que os filhos de mães alimentadas com dieta rica em gordura apresentam aumento significativo do peso corporal, da adiposidade, intolerância à glicose e nível de triglicérides no plasma no momento do desmame (147).

Em humanos, associação positiva significativa foi encontrada entre a presença de MC4R (rs17782313) e o percentual de energia ingerida a partir de lipídeos em mulheres grávidas (148) enquanto que uma redução de -7,6% no percentual de energia da proteína, e positivamente associado com a porcentagem de energia de ultra alimentos processados (128). E em um outro estudo com crianças de 6 anos de idade, foi relatado a associação da presença de MC4R (rs17782313) com o IMC dessas crianças (149).

Embora existam estudos em humanos que demonstrem associação do SNP MC4R (rs17782313) com a hiperfagia, adiposidade e maior susceptibilidade para o desenvolvimento da obesidade na mãe e nas crianças independentemente, poucos estudos fazem associação desta variante com a programação metabólica fetal e, por conseguinte, com o aparecimento da obesidade nos descendentes. O primeiro estudo encontrado, que buscou associar o ganho de peso gestacional excessivo e o peso pré-gestacional com a

presença do alelo de risco do SNP MC4R (rs17782313), não observou associação entre essas variáveis (3). Entretanto, mais tarde, a presença do alelo C foi associado com maior risco sobrepeso pré-gestacional nas mães e os filhos que apresentavam também o alelo de risco tiveram valores mais altos de circunferência do braço, indicando maior adiposidade neonatal (150)

### **3. JUSTIFICATIVA**

Muitos estudos examinam o efeito da obesidade materna no perfil inflamatório sistêmico e suas repercussões materno-fetais, mas poucos investigaram num mesmo estudo os fatores genéticos que predispõe a obesidade e as consequências inflamatórias nos diferentes compartimentos materno-fetais com impacto na programação fetal. Dessa forma, na prática clínica, esse estudo pode contribuir para a prevenção da obesidade desde a gestação, minimizando o risco de susceptibilidade aumentada nos descendentes em função da desordem metabólica instalada na obesidade materna.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da obesidade pré-gestacional materna associada ao perfil inflamatório e ao polimorfismos genéticos de *FTO* (rs9939609) e *MC4R* (rs17782313) e suas possíveis repercussões no ambiente placentário e nas condições fetais no momento do nascimento.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar os mediadores bioquímicos (insulina, glicemia e HOMA-IR) acordo com IMC pré-gestacional materno;
- Avaliar e comparar a secreção de adipocinas (TNF, IL-6, leptina, resistina, adiponectina e IL-10) no sangue periférico materno, no tecido adiposo, nos tecidos placentários (face materna e face fetal) e no sangue do cordão umbilical de acordo com o IMC pré-gestacional materno;
- Avaliar e comparar a variação das concentrações de citocina nas faces maternas e fetais de acordo com o IMC pré-gestacional materno;
- Determinar a frequência alélica e genotípica das variantes *FTO* (rs9939609) e *MC4R* (rs17782313) nas mães e nos seus respectivos filhos;
- Estimar os efeitos brutos e ajustados das variantes *FTO* (rs9939609) e *MC4R* (rs17782313) materno como preditoras do estado nutricional pré-gestacional;
- Estimar os efeitos das variantes *FTO* (rs9939609) e *MC4R* (rs17782313) materno como preditoras das características antropométricas e bioquímicas neonatais;
- Estimar os efeitos das variantes *FTO* (rs9939609) e *MC4R* (rs17782313) neonatais como preditoras das características antropométricas e bioquímicas neonatais.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/ UFMG) em 08/04/2018 (parecer número CAAE 82125417.0.0000.5149) (ANEXO I), pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital Sofia Feldman, pelo Comitê de ética do Hospital Risoleta Tolentino Neves, ambos localizados em Belo Horizonte e pela diretoria do hospital Queluz de Minas, em Conselheiro Lafaiete - MG.

### 5.1 Delineamento experimental

Trata-se de um estudo transversal com 165 pares de mãe-filho, coletadas nos hospitais Risoleta Tolentino Neves, Hospital Sofia Feldman, ambos em Belo Horizonte - MG e hospital Queluz de Minas, localizado em Conselheiro Lafaiete - MG. O período de coleta de dados foi de 12/04/2018 a 02/02/2020. A execução do projeto correspondeu à coleta de dados em um único momento, durante o parto, especificamente as mães eletivas para o parto cesárea.

**Cálculo do tamanho amostral:** O tamanho amostral foi definido por conveniência, uma vez que a dificuldade de encontrar pacientes grávidas obesas sem intercorrências metabólicas como diabetes gestacional e pré-eclâmpsia dificultou nossas coletas.

### 5.2 Critérios de elegibilidade e de exclusão

Para serem consideradas elegíveis, as mulheres e RNs deveriam atender aos seguintes critérios:

#### **Mães:**

- Ter entre 18 e 38 anos;
- Não apresentar doenças crônicas não transmissíveis, exceto obesidade;
- Não apresentar gestação gemelar;
- Não apresentar doenças infecciosas e parasitárias;
- Não ser tabagista, não fazer uso de bebidas alcóolicas ou qualquer outra droga psicoativa;
- Apresentar IMC pré-gestacional maior ou igual a 18,5 kg/m<sup>2</sup>;
- Ser eletiva para parto cesárea;
- Não está em uso de medicamentos anti-inflamatórios;
- Apresentar dados completos no cartão de pré-natal ou prontuário hospitalar

**Recém-nascidos:**

- A termo (com idade gestacional entre 38-42 semanas);
- Livres de más formações congênitas e genéticas;
- Com peso ao nascer  $\geq 2.500\text{g}$ ;
- Apresentar dados completos no prontuário hospitalar.

**5.3 Seleção e recrutamento**

A captação/recrutamento das gestantes para o estudo ocorreu inicialmente nos hospitais Risoleta Neves e Sofia Feldman (as primeiras 15 amostras do estudo). Posteriormente, as coletas foram destinadas ao Hospital Queluz de Minas em Conselheiro Lafaiete – MG. Devido ao fato das nossas gestantes serem eletivas para o parto cesárea, nos hospitais Risoleta Neves e Sofia Feldman esse tipo de parto, na maioria das vezes, não encaixava nos nossos critérios de inclusão, uma vez que, parto cesárea nesses hospitais acontecem somente por questões de risco ao binômio mãe-filho. Em função disso, o recrutamento das gestantes foi destinado ao hospital Queluz de Minas em Conselheiro Lafaiete, uma vez que, a cidade que recebe gestantes de cerca de 15 cidades ao entorno que não possuem maternidade.

Visando subsidiar análises sobre potenciais vieses de seleção, em um primeiro momento foi realizada a consulta dos prontuários das gestantes admitidas nos hospitais para o parto cesárea. Aquelas que se enquadravam nos critérios de elegibilidade, previamente estabelecidos na linha de base do estudo foram convidadas a participar do projeto. Na condição da participante aceitar, antes de entrar para a sala de cirurgia e sem efeito de anestésicos, a gestante era informada sobre as propostas do projeto e convidada a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) no qual as gestantes permitiam a coleta de dados do prontuário e cartão pré-natal, além das amostras de sangue periférico, *swab* bucal, fragmentos do tecido adiposo subcutâneo (durante o procedimento), fragmentos do tecido placentário, (10 minutos após o parto, no máximo) e sangue do cordão umbilical. Quanto às amostras dos RNs, foram coletados os dados do prontuário e *swab* bucal. (APÊNDICE I).

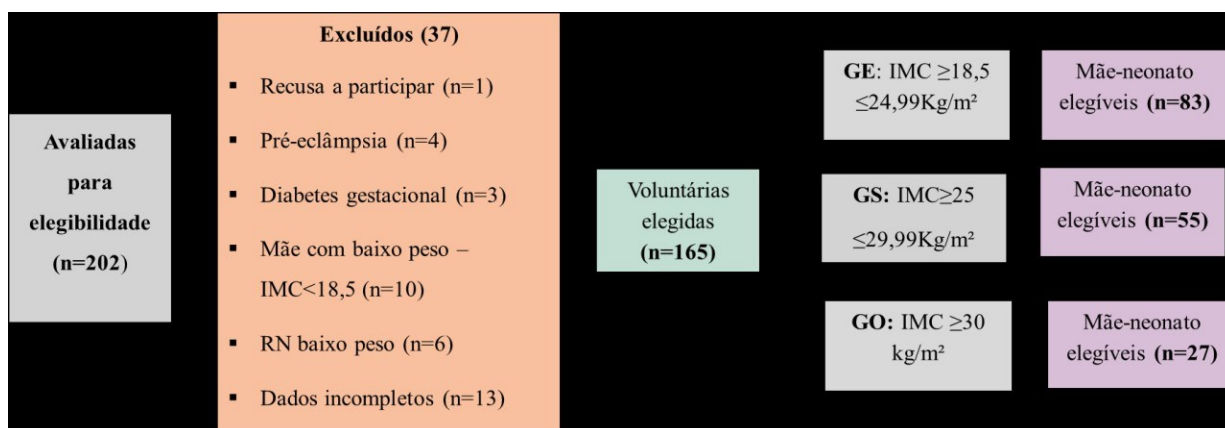
Do total de 202 mulheres convidadas a participar do estudo, 37 (18,3%) não atenderam aos critérios e elegibilidade e exclusão, após a assinatura do TCLE (Figura 4).

#### 5.4 Capacitação da equipe de coleta e controle de qualidade das amostras

A coleta de dados foi realizada pela estudante responsável pelo projeto, devidamente capacitada, mediante treinamento prático no Hospital Risoleta Neves sob orientação de uma professora/obstetra, Dra. Jaqueline Braga, durante o período de fevereiro a abril de 2018. Estratégias de controle da qualidade e consistência das amostras foram adotadas mediante a elaboração de manuais e protocolos para a coleta. Foi realizado um estudo piloto no período de abril de 2018 a abril de 2019, com o objetivo de testar os protocolos elaborados para a coleta das amostras e propor e executar modificações e aperfeiçoar as técnicas caso fosse necessário.

#### 5.5 Composição dos grupos de estudo

Inicialmente foram elegíveis 165 pares de mãe-filho, estratificadas de acordo com o IMC pré-gestacional. A classificação do estado nutricional das mulheres obedeceu ao recomendado pela OMS (WHO, 2000) (Tabela 1). Dentre as quais, 83 apresentavam o diagnóstico de eutrofia (grupo GE), 55 de sobrepeso (grupo SB) e 27 de obesidade (grupo GO) (IOM, 2009). (Figura 4)



**Figura 4: Fluxograma das perdas de segmento e elegibilidade das gestantes de acordo com o grupo de estudo**

O ganho de peso gestacional total foi obtido pela diferença entre o último peso registrado em prontuário e o peso pré-gestacional informado no cartão a gestante. As mulheres foram classificadas de acordo com as categorias de ganho de peso (insuficiente,

adequado e excessivo) com base nas recomendações do *Institute of Medicine* (IOM, 2009), descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Ganho de peso recomendado de acordo com o IMC materno pré-gestacional

<b>Estado nutricional antes da gestação</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Ganho de peso durante a gestação (kg)</b>	<b>Ganho de peso por semana no 2° e 3° trimestre (kg)</b>
<b>Baixo peso</b>	<18,5	12,5 – 18,0	0,5
<b>Eutrofia</b>	18,5 – 24,9	11,0 – 16,0	0,4
<b>Sobrepeso</b>	25,0 – 29,0	7,0 – 11,5	0,3
<b>Obesidade</b>	≥30,0	5,0 – 9,0	0,2

Fonte: *Institute of Medicine* (IOM, 2009)

Para a avaliação antropométrica dos recém-nascidos, foi utilizado parâmetros como IMC neonatal, adotados pela OMS (2009) e o Índice Ponderal de Roher (151), além dos dados antropométricos como peso, comprimento e circunferências, todos retirados do prontuário do RN.

### 5.6 Variáveis do estudo

A seleção das variáveis para compor os modelos finais de análise se deu com base na plausibilidade biológica da associação entre o estado nutricional e os polimorfismos genéticos. No Quadro 1 são apresentadas as variáveis de estudo e os locais onde foram extraídas. Sendo as independentes, IMC pré-gestacional e os polimorfismos FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313).

**Quadro 1: Variáveis de estudo**

<b>Amostras</b>	<b>Variável de estudo: materna</b>	<b>Variável de estudo: neonatal</b>
<b>Cartão pré-natal ou prontuário hospitalar</b>	IMC pré-gestacional	Sexo
	Ganho de peso gestacional	Peso ao nascer
	Idade materna	Comprimento
	Idade gestacional	IMC neonatal
	Paridade	Índice Ponderal
	IMC gestacional	Perímetro cefálico
		Perímetro torácico
		Perímetro abdominal
		Glicemia capilar
<b>Swab bucal</b>	FTO (rs9939609)	FTO (rs9939609)
	MC4R (rs17782313)	MC4R (rs17782313)
<b>Soro periférico</b>	Glicemia de jejum	
	Insulina de jejum	
	HOMA-IR	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Soro Periférico materno,</b></li> <li>▪ <b>Tecido adiposo,</b></li> <li>▪ <b>Placenta parte materna</b></li> <li>▪ <b>Parte fetal</b></li> </ul>	Adiponectina	
	Leptina	
	TNF	
	IL-6	
	IL-10	
	Resistina	
<b>Soro do cordão umbilical</b>		Adiponectina
		Leptina
		TNF
		IL-6
		IL-10

### **5.7 Dados sociodemográficos e condições obstétricas**

Dos prontuários e cartão pré-natal das parturientes foram coletadas informações a respeito do acompanhamento pré-natal, das condições obstétricas e intercorrências.

As variáveis relacionadas a este tópico e avaliadas no presente estudo foram: idade (anos), altura (metros), paridade (número de filhos), peso pré-gestacional (quilograma),

peso ao final da gestação (quilograma), ganho de peso gestacional total (quilograma), idade gestacional (semanas), intercorrências e uso de medicamentos.

Logo após o parto foram coletados nos prontuários os registros dos dados referentes ao RN: sexo, peso ao nascer (quilogramas), comprimento (centímetros), perímetro cefálico (PC) (centímetros), perímetro torácico (PT) (centímetros), perímetro abdominal (PA) (centímetros), índice de Apgar e glicemia de jejum (mg/dL). Informações sociodemográficas também foram obtidas das gestantes incluídas nos grupos, incluindo, informações relativas ao número de gestações, partos, abortos ou natimortos anteriores (APÊNDICE II).

## **5.8 Amostras biológicas**

Conforme os protocolos para parto cesárea pré-estabelecido nos hospitais de estudo, todas as gestantes recebiam orientação para comparecer em jejum no dia do parto.

### ***5.8.1 Amostras de sangue periférico materno e de cordão umbilical***

A coleta de amostra de sangue materno foi realizada por punção venosa periférica, utilizando materiais descartáveis. A coleta foi realizada por profissional da área de enfermagem dentro do bloco cirúrgico antes da mãe ser anestesiada para o procedimento.

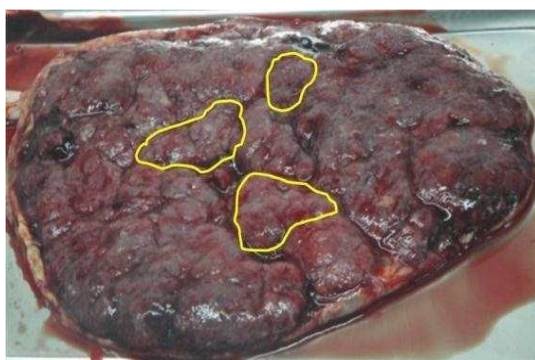
As amostras de sangue do cordão umbilical foi realizado por punção venosa, utilizando materiais descartáveis. A coleta foi realizada pela profissional responsável pelo estudo, imediatamente após a dequitação da placenta.

As amostras sanguíneas foram recolhidas em frascos estéreis, sem anticoagulante e conservadas em gelo. O material era transportado até um laboratório de análises clínicas (Vila Ricca) onde eram submetidas à centrifugação (3.500 rpm por 15 minutos) e, posteriormente, separado o sobrenadante (soro) em alíquotas de 500 µL. O material aliquoteado, foi armazenado num freezer -20°C neste mesmo laboratório até ser transferido para um freezer -80°C, localizado no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN) – ICB, UFMG) até a realização das análises correspondentes.

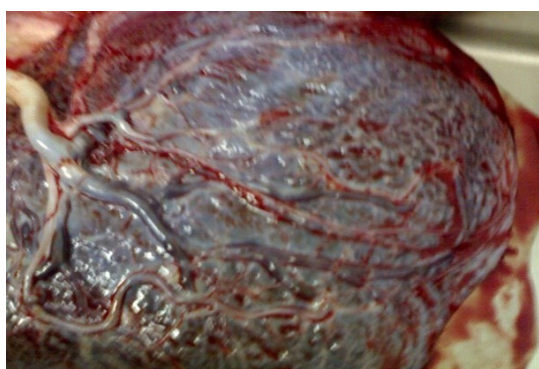
### 5.8.2 *Tecido placentário*

As amostras de tecido placentário, face materna e face fetal, foram obtidas imediatamente após o parto (10 minutos no máximo) em locais pré-selecionados, livres de hematomas, infartos visíveis, calcificações ou outros danos (Figura 5). Uma amostra de aproximadamente 3cm<sup>3</sup> de tecido placentário de cada face era obtida, lavada em solução tampão fosfato salina (*phosphate buffered saline*, PBS) gelada, de modo a remover a maior parte de sangue residual e, então, transferido para uma placa de petri, também contendo PBS, onde foi seccionado em 3 partes iguais com o auxílio de um bisturi e, posteriormente colocadas em papel absorvente estéril onde eram alocadas em criotubos para tais análises subsequentes:

- a) Histologia e Imunohistoquímica: Fragmento de 1cm<sup>3</sup> da face materna, região dos cotilédonos, foi armazenado em paraformaldeído 4% e, posteriormente, fixado em parafina para análise histológica e de imunohistoquímica.
- b) Proteínas: Fragmento de 1cm<sup>3</sup> foi colocado em gelo imediatamente após a coleta, transferida para um freezer -20°C até a transferência para o freezer -80°C para o desenvolvimento da técnica *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).



Face materna placentária, cotilédonos



Face placentária fetal

**Figura 5: Faces da placenta humana**

### 5.8.3 *Tecido adiposo*

No momento da cesárea foi extraído, pelo cirurgião obstetra, fragmentos do tecido adiposo subcutâneo abdominal materno. A retirada dos fragmentos foi realizada na região próxima ao corte cesárea em todas as pacientes. Após retirados, os fragmentos de tecido adiposo foram lavados, seccionados e acondicionados conforme o protocolo estabelecido para os fragmentos de tecido placentário.

#### **5.8.4 Cordão umbilical**

Três fragmentos do cordão umbilical foram adquiridas em cortes do tipo transversal (cerca de 5mm), posteriormente foram lavados e acondicionados conforme o protocolo estabelecido para os fragmentos de tecido placentário.

### **5.9 Análises bioquímicas e imunológicas**

#### **5.9.1 Dosagem das concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias, glicemia e insulina**

As concentrações de adiponectina, leptina, resistina, TNF, IL-6, IL-10 (pg/mL), insulina (pmol/mL) e glicemia de jejum (mg/dL) foram dosadas no soro periférico materno, enquanto que no soro do cordão umbilical foram dosadas as concentrações de adiponectina, leptina, TNF, IL-6 e IL-10.

O índice HOMA-IR foi calculado segundo a fórmula: glicemia de jejum (mg/dL) X insulina ( $\mu$ U/mL) / 405 (28).

Nos tecidos placentários e adiposo foram dosadas as concentrações das mesmas citocinas dosadas no sangue periférico materno, entretanto expressos em pg/ mg de PTN, segundo o método Lowry (152). A razão entre IL-6 e IL-10 e TNF e IL-10 foi calculada a partir dos resultados observados. Especificamente para o tecido placentário foi feita uma diluição das amostras na proporção de 1:50.

Para a realização das dosagens, as amostras dos tecidos foram limpas com PBS1x, pesada em balança analítica e homogeneizada com solução de extração de citocinas (BSA 0,05%; Aprotinina 0,02 $\mu$ L/mL; cloreto de benzetônio 0,05mg/mL, NaCl 0,023mg/mL; EDTA 0,37mg/mL; PMSF 0,02mg/mL, Tween 20 0,5 $\mu$ L/mL em PBS1x), centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi usado no ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA, com duração de três dias, foi feito com kits de anticorpos (R&D Systems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, no primeiro dia a placa de 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura e incubada em câmara úmida no escuro a 4°C por 24 horas. No segundo dia, após lavar a placa quatro vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi feito o bloqueio com PBS1x acrescido de albumina bovina a 1% (Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada duas vezes com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), as amostras foram adicionadas e foi feita incubação durante a noite em câmara úmida no escuro a 4°C. No terceiro dia, após lavar a placa quatro vezes



com PBS1x-Tween 20 0,1% (Sigma), foi acrescentado o anticorpo de detecção e feita incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro a 4°C; a placa foi lavada quatro vezes, foi acrescentada estreptovidina e feita incubação por 45 minutos. A placa foi novamente lavada por quatro vezes, foi então acrescentado o cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma), as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a reação foi parada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm.

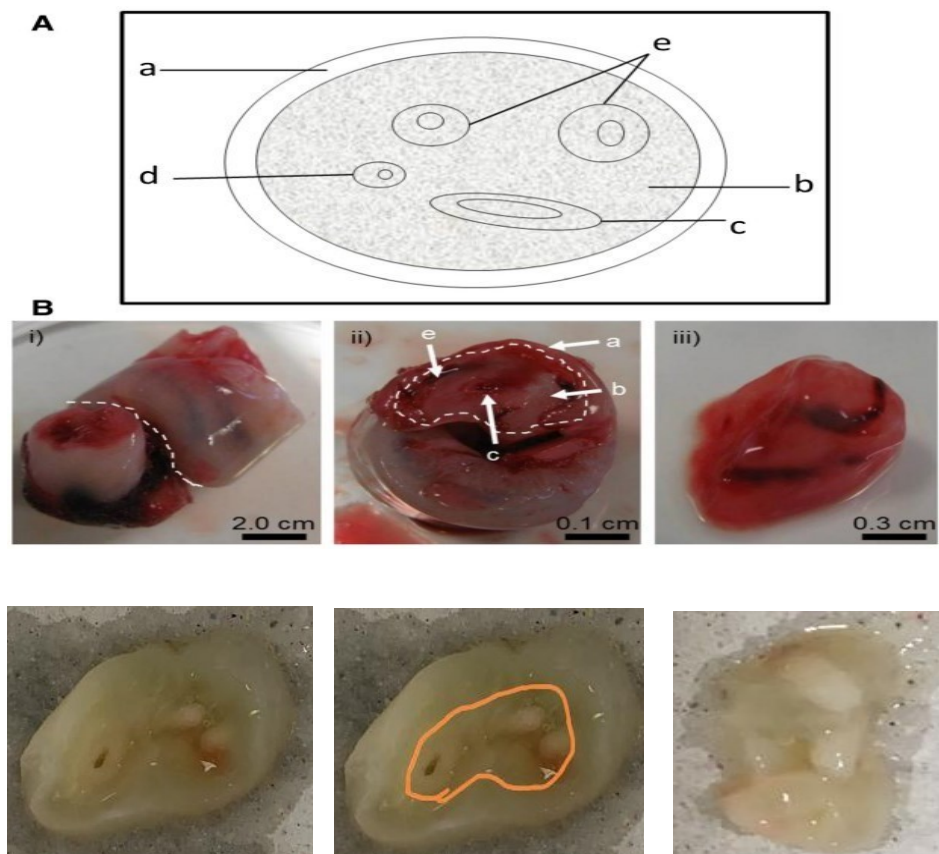
A sensibilidade dos kits foram: Adiponectina (75 – 4000 pg/mL); Leptina, resistina e insulina (31,3 – 2000 pg/mL); IL-6 (9,38 – 600 pg/mL); IL-10 (3,9 – 250 pg/mL) e TNF (7,8 – 500 pg/mL).

## **5.9.2 Análise dos polimorfismos genéticos**

### **5.9.2.1 Obtenção do DNA materno e neonatal**

Para obtenção do DNA a partir do *swab* bucal foram feitas as coletas em duplicata raspando a face interna das bochechas materna e do neonato com a escova citológica esterilizada (*swab*) em movimentos circulares (aproximadamente 30 vezes). As escovas tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos tipo eppendorfs de 1,5 ml contendo a solução TE (TRIS/EDTA, pH 7.2-7.4). As amostras foram armazenadas em geladeira até o momento da extração.

Quando não obtínhamos quantidades suficientes de DNA materno pelo *swab* bucal, usávamos fragmentos do tecido adiposo materno. E na condição de insuficiência de DNA neonatal, usamos fragmentos do cordão umbilical. Para isso, fizemos cortes específicos do cordão, de forma que somente amostra fetal fosse retirada (Figura 4). Essa técnica de extração de DNA fetal pelo cordão é demonstrada cientificamente no estudo de Rajatileka *et al.* (2013) (153) (Figura 5) e fizemos seguindo os protocolos estabelecido por eles que consiste em usar a geleia interna de Wharton com veia e artérias umbilicais para extração do DNA fetal (Figura 5).



**Figura 5: Isolamento de tecido do cordão umbilical para extração de DNA**

Extração de DNA a partir do tecido adiposo subcutâneo materno e cordão umbilical

Foi pesado 100mg de tecido seccionados em menores fragmentos e adicionado 500 $\mu$ l de tampão de lise celular (500 $\mu$ L de SE, 10 $\mu$ L de SDS e 30 $\mu$ L de proteinase K) para cada amostra. Posteriormente, as amostras foram vortexadas por 3 minutos e deixadas em *overnight* a 56°C. Os mesmos passos descritos acima no segundo dia no protocolo de extração de DNA de *swab* bucal foi realizado para extrair o DNA do tecido adiposo. A única diferença é que na etapa de transferência do sobrenadante precipitado por NaCL para os novos tubos, deve-se pipetar o sobrenadante rompendo a camada lipídica e evitando ao máximo transferir esse lipídeo para os novos tubos.

Para a extração de DNA fetal do cordão umbilical, foi pesado cerca de 50-100mg da geleia de Wharton com veia e artérias umbilicais e adicionado 500 $\mu$ l de tampão de lise celular (500 $\mu$ L de SE, 10 $\mu$ L de SDS e 30 $\mu$ L de proteinase K) para cada amostra. Posteriormente, as amostras foram vortexadas por 3 minutos e deixadas em *overnight* a

56°C no banho-maria. No dia seguinte, seguimos os mesmos passos descritos no segundo dia do protocolo de extração de DNA de *swab* bucal.

Para utilização no presente estudo, as amostras foram previamente quantificadas no Nanodrop e ajustadas para a concentração de 2,5 ng/μl por diluição em água milli-Q.

#### **5.10 Genotipagem do polimorfismo do gene FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313)**

Baseado na metodologia TAqMan™ SNP *Genotyping assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA), desenvolvida originalmente por Hampe e colaboradores (154), procedeu-se a discriminação alélica, tipificando o material genético amostral para os SNPs nos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313).

O ensaio comercial contém um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam um fragmento (aproximadamente 50 pb) onde está localizado o SNP, e um par de sondas alelos específicas. Uma das sondas é marcada com o fluoróforo FAM e a outra é marcada com o fluoróforo VIC. Os produtos obtidos a partir da amplificação das amostras de DNA foram concomitantemente acessados pelas sondas alelos específicas, e, assim, para cada ensaio foi possível definir o genótipo dos indivíduos em estudo.

A PCR foi realizada numa placa de 96- *Wells* (poços) num volume de 10μl de reação, utilizando 4,9 μl de DNA na concentração de 10ng; 5,0μl de TAqMan™ SNP *Genotyping assays master mix* e 0,1μl das sondas alélicas FAM/VIC dye. As reações foram conduzidas em placas de 96 poços e os parâmetros de ciclagem para o SNP em FTO (rs9939609) foram: 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1,5 minuto a 60°C (anelamento e extensão) em 60 ciclos com janela de leitura no anelamento e extensão. Para o SNP de MC4R (rs17782313) os parâmetros de ciclagem foram semelhantes ao do gene FTO (rs9939609) entretanto, a janela de leitura é realizada na desnaturação. O aparelho utilizado foi o ABI 7500 Fast Real Time PCR no qual a intensidade do fluoróforo em cada canaleta da placa foi detectada. O controle de qualidade da genotipagem incluía em cada placa de 96 canaletas, controles positivos e negativos além de 10% de genótipos duplicados para checar a acurácia da genotipagem. O sucesso da genotipagem foi de 99,5% e a acurácia determinada pela concordância entre as duplicatas foi de 100%. Para checar a concordância entre os genótipos de materiais extraídos de *swab* e cordão umbilical, utilizamos amostras de neonatos que tinham os dois materiais e verificamos 96,7% de concordância. Aqueles que não concordaram foram desprezados.

Para a identificação do genótipo de cada indivíduo, procedeu-se a identificação dos comprimentos de onda das fluorescências emitidas por cada amostra, discriminado dessa forma os alelos. Os alelos foram evidenciados pelos fluoróforos VIC e FAM. Fluóforos VIC (fluoresce na região vermelha do espectro visível) indicam alelos AA para o gene *FTO*. Enquanto FAM (fluoresce na região azul do espectro visível) indicando alelos TT. Já os fluoróforos VIC/FAM (fluoresce na região verde do espectro visível) e indicam os alelos AT. Para MC4R (rs17782313) fluóforos VIC (fluoresce na região vermelha do espectro visível) indicam alelos CC para o gene MC4R. Enquanto FAM (fluoresce na região azul do espectro visível) indicando alelos TT. Já os fluoróforos VIC/FAM (fluoresce na região verde do espectro visível) e indicam os alelos CT.

### **5.11 Análise estatística**

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos resultados. Para detecção de outliers, foram utilizados o teste de Grubbs (amostras que seguiram a normalidade) ou o teste Box-Plot (amostras não normais). Para avaliar diferenças entre os grupos de IMC pré-gestacional nas variáveis maternas e neonatais foi feito o teste Anova ou Kruskal-Wallis para amostras com distribuição normal ou não normal, respectivamente, seguido de pos-hoc Tukey. Para dados qualitativos foi usado os testes de Fisher ou Qui-quadrado. O efeito individual da presença ou não do alelo de risco de cada polimorfismo estudado foi investigado pelo teste de Mann Whitney definido a partir do teste de normalidade de Shapiro Wilk. Modelos de regressão linear e multinominal foram selecionadas a fim de determinar o efeito do IMC pré-gestacional e dos polimorfismos, respectivamente. Um nível de significância de 5% foi estabelecido. As análises foram feitas com o programa SPSS versão 13 para Windows. Os resultados foram apresentados em mediana com mínimo e máximo.

## 6. RESULTADOS

Foram elegíveis 165 pares de mãe-filho, sendo as mães estratificadas em três grupos de acordo com o IMC pré-gestacional: 83 pares de mãe-filho no grupo GE, 55 no grupo GS e 27 no grupo GO (Figura 3).

### 6.1 Características antropométricas e antecedentes obstétricos maternos

As características antropométricas e antecedentes obstétricos das gestantes elegíveis estão demonstradas na Tabela 2. Como esperado, as variáveis antropométricas discriminatórias dos grupos, peso pré-gestacional, peso gestacional, IMC pré-gestacional e gestacional foram significativamente diferentes entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ). Entre os grupos, a idade ( $p=0,3698$ ) e idade gestacional ( $p=0,2551$ ) não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, houve diferença significativa na paridade (números de filhos) de acordo com o estado nutricional, ou seja, mães eutróficas apresentam maior frequência de paridade na ordem 1 em relação às obesas que apresentam maior frequência na ordem 2 ou mais filhos ( $p=0,0410$ ). Quando analisado o ganho de peso total na gestação de acordo com o IMC pré-gestacional, observamos que as mães com sobrepeso apresentaram maior frequência de ganho de peso excessivo, além de serem as únicas que apresentaram ganho de peso total acima da recomendação pela IOM (1kg a mais que o recomendado).

**Tabela 2: Características antropométricas e obstétricas maternas**

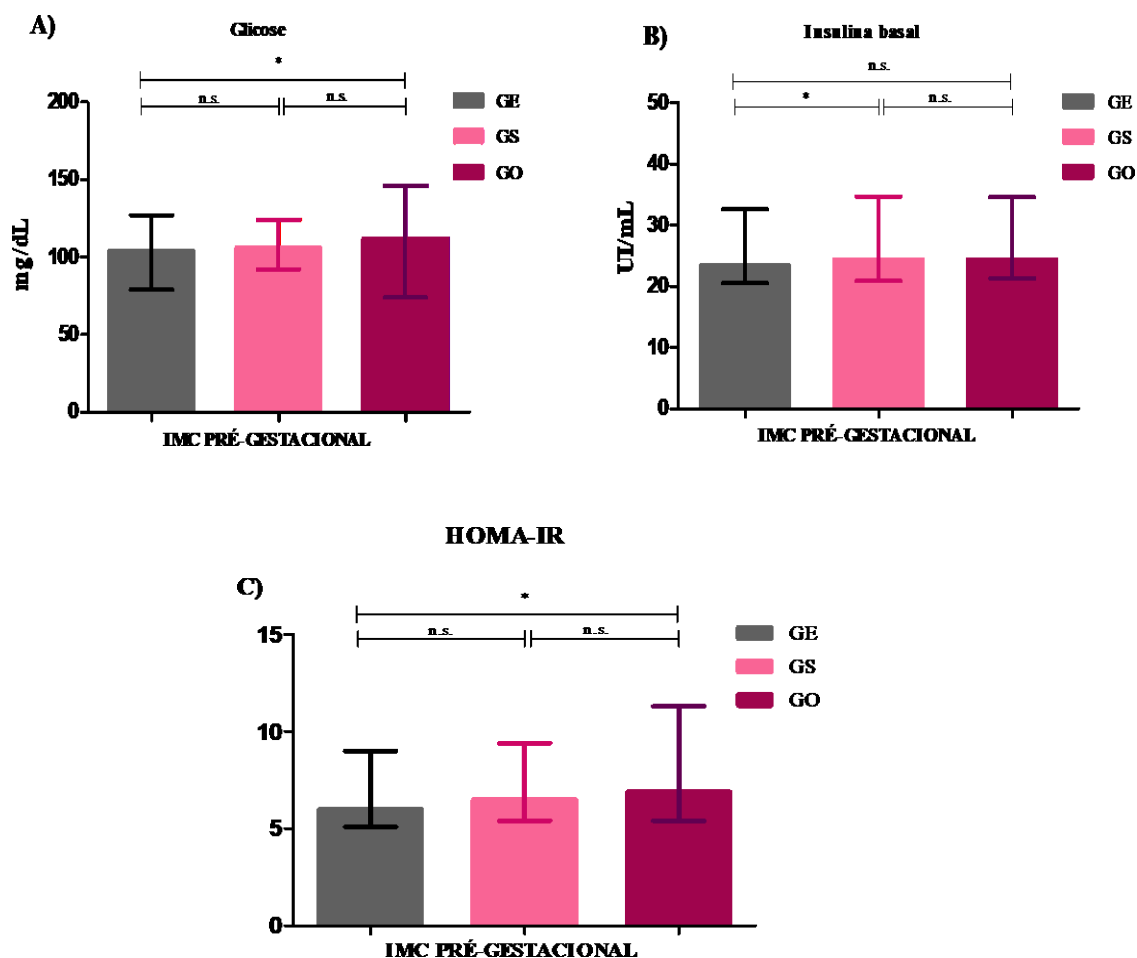
VARIÁVEIS	GE (n=83)	GS (n=55)	GO (n=27)	p valor <sup>1</sup>
<b>Idade</b> (anos)	27 (18 – 41)	28 (18 – 38)	28 (18 – 39)	0,3698
<b>Idade gestacional</b> (semanas)	39 (37 – 42)	39 (38 – 41)	39 (38 – 40)	0,2551
<b>Peso pré-gestacional</b> (kg)	57 (40 – 74)	72 (52 – 85)	89 (46 – 117)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IMC pré-gestacional</b> (kg/m <sup>2</sup> )	22,0 (18,5 - 24,9)	27,1 (25 - 29,1)	33,1 (30,3 – 50,6)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Peso gestacional</b> (kg)	68,7 (52,5 -102,0)	84,0 (70,0 – 102,5)	99,0 (62,8 – 132,0)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IMC gestacional</b> (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 (21,7 – 34,4)	32,0 (26,3 – 37,5)	37,9 (24,5 – 48,4)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Ganho de peso total</b> (kg)	12,5 (1 – 32,0)	12,5 (-2 – 25)	8,0 (-5 – 23,0)	<b>0,0460</b>
<b>Paridade</b> (n; %)				
<b>1 filho</b>	43(51,8%)	21(38,2%)	7(25,9%)	<b>0,0410<sup>2</sup></b>
<b>2 ou mais filhos</b>	40(48,2%)	34(61,8%)	20 (74,1%)	
<b>Ganho de peso total</b> (n; %)				
<b>Insuficiente</b>	28 (33,7%)	11 (20%)	9 (33,4%)	<b>&lt;0,0001<sup>2</sup></b>
<b>Adequado</b>	36 (43,4%)	12 (21,8%)	7 (40,7%)	
<b>Excessivo</b>	19 (22,9%)	<b>32 (58,2%)</b>	11 (40,7%)	

Dados apresentados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente<sup>1</sup>. Teste exato de Fisher para variáveis categóricas<sup>2</sup>. p≤0,05.

## 6.2 Análise bioquímica materna

Na avaliação do metabolismo glicídico, podemos perceber que a glicose materna do grupo GO apresenta-se elevada quando comparada às mães dos demais grupos (p=0,002). Para insulina, não houve diferença entre as concentrações de mães eutróficas e obesas. Entretanto, mães com sobrepeso apresentaram maiores concentrações séricas de insulina que as mães eutróficas (p=0,018). Quando analisamos o HOMA-IR, vimos que as mães com obesidade apresentaram maiores índices quando comparadas às mães eutróficas e com sobrepeso (p=0,039). Esses resultados tomados em conjunto, nos mostram que as mães obesas estão mais resistentes à insulina quando comparadas com os demais grupos e que a hiperinsulinemia visto no GS pode ser uma tentativa de normalização da glicemia em função do aumento da oferta de nutrientes gerado pelo

excesso de ganho de peso na gestação e pelo excesso de adiposidade antes do período gestacional (Figura 6).



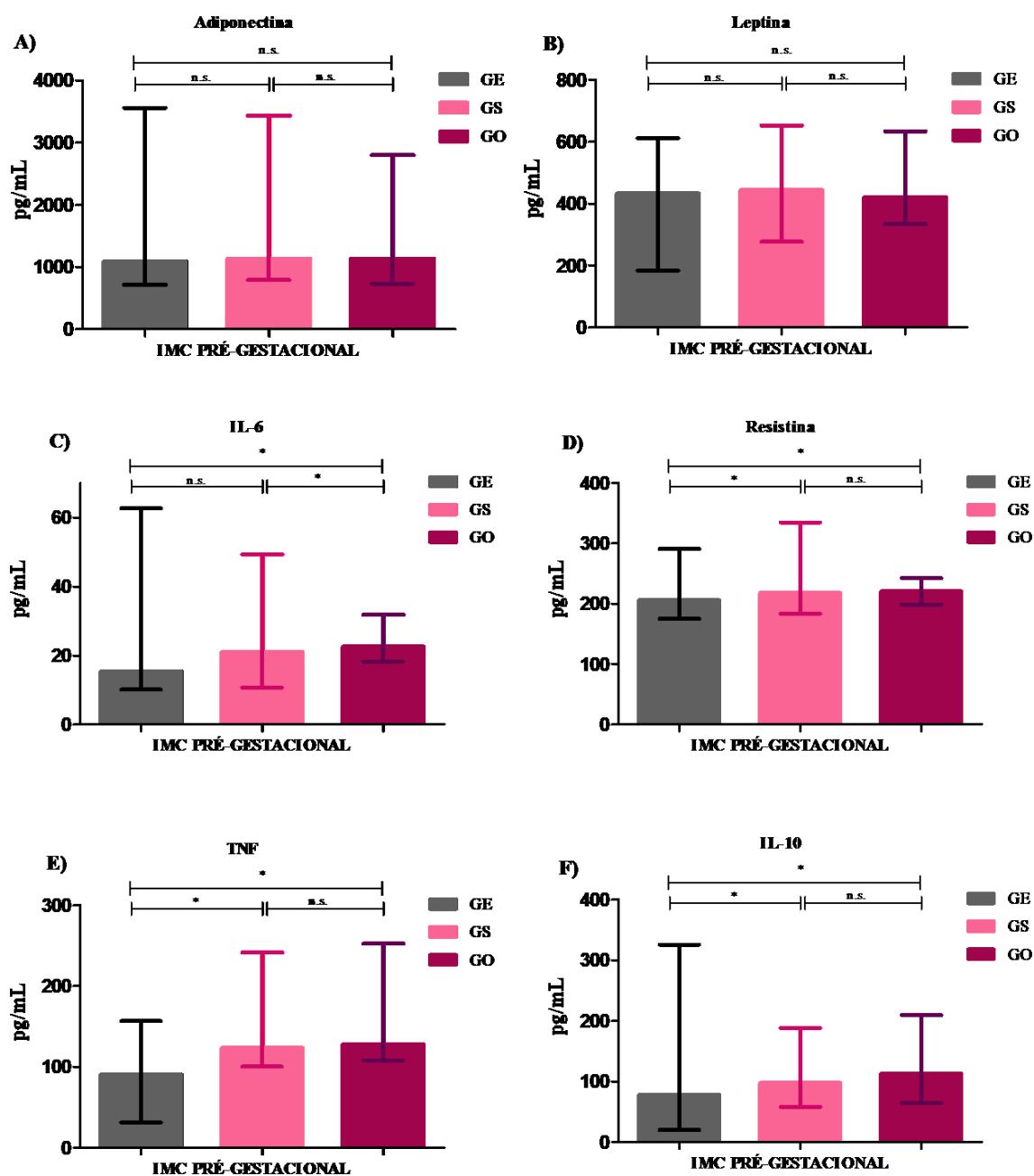
**Figura 6: Concentrações de glicemia, insulina e HOMA-IR materno**

(A) Glicose em jejum (B) Insulina em jejum (C) HOMA-IR. Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

### 6.3 Análise do perfil inflamatório sistêmico materno

A produção de adipocinas pró e anti-inflamatórias durante o período gestacional são cruciais para a adaptação e desenvolvimento do feto no ambiente intrauterino. Todavia, alterações metabólicas associadas ao excesso de gordura podem contribuir para mudanças no perfil de citocinas, favorecendo um ambiente materno-fetal pró-inflamatório (6). Resultados relativos às concentrações das citocinas TNF, IL-6, IL-10,

leptina, adiponectina e resistina dos grupos de estudo foram obtidos no soro periférico materno (Figura 7).



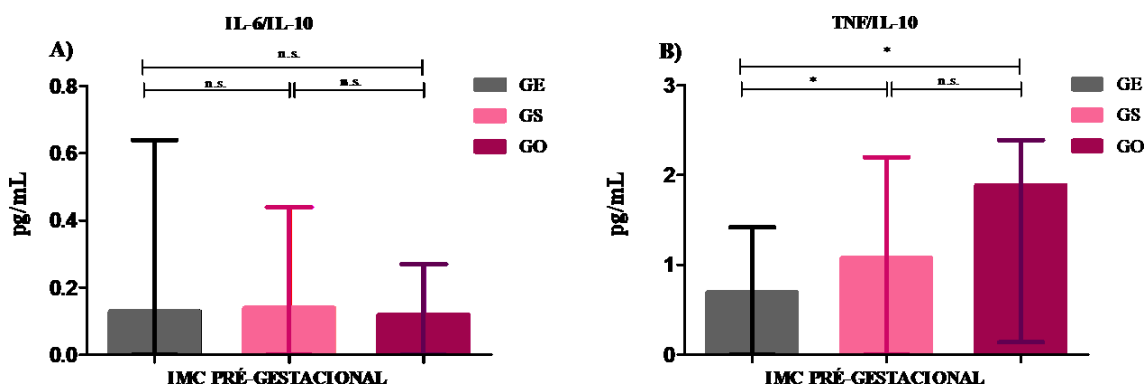
**Figura 7: Concentrações de citocinas inflamatórias no soro periférico materno**

(A) Adiponectina (B) Leptina (C) Interleucina 6 (D) Resistina (E) Fator de Necrose Tumoral (F) Interleucina 10. Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.



Em relação às citocinas pró-inflamatórias, foi evidenciado aumento de IL-6 ( $p=0,002$ ), TNF ( $p=0,001$ ), resistina ( $p=0,008$ ) e IL-10 ( $p=0,007$ ) circulantes nas mães com obesidade, em relação ao grupo controle (eutróficas). As mães com sobrepeso diferiram das eutróficas, apresentando maiores concentrações de TNF e resistina. Todavia, as concentrações séricas de leptina ( $p=0,1586$ ) e adiponectina ( $p=0,6050$ ) tiveram concentrações semelhantes entre os grupos.

Para avaliar a intensidade da ação e o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias avaliamos a relação IL6/IL-10 e TNF/IL-10. Não foram observadas diferenças estatísticas na razão IL6/IL-10 nos grupos ( $p=0,444$ ). Entretanto, a razão TNF/IL-10 revelou um perfil pró-inflamatório nos grupos sobrepeso ( $p=0,006$ ) e obesidade ( $p=0,026$ ) quando comparados com o grupo controle (Figura 8).



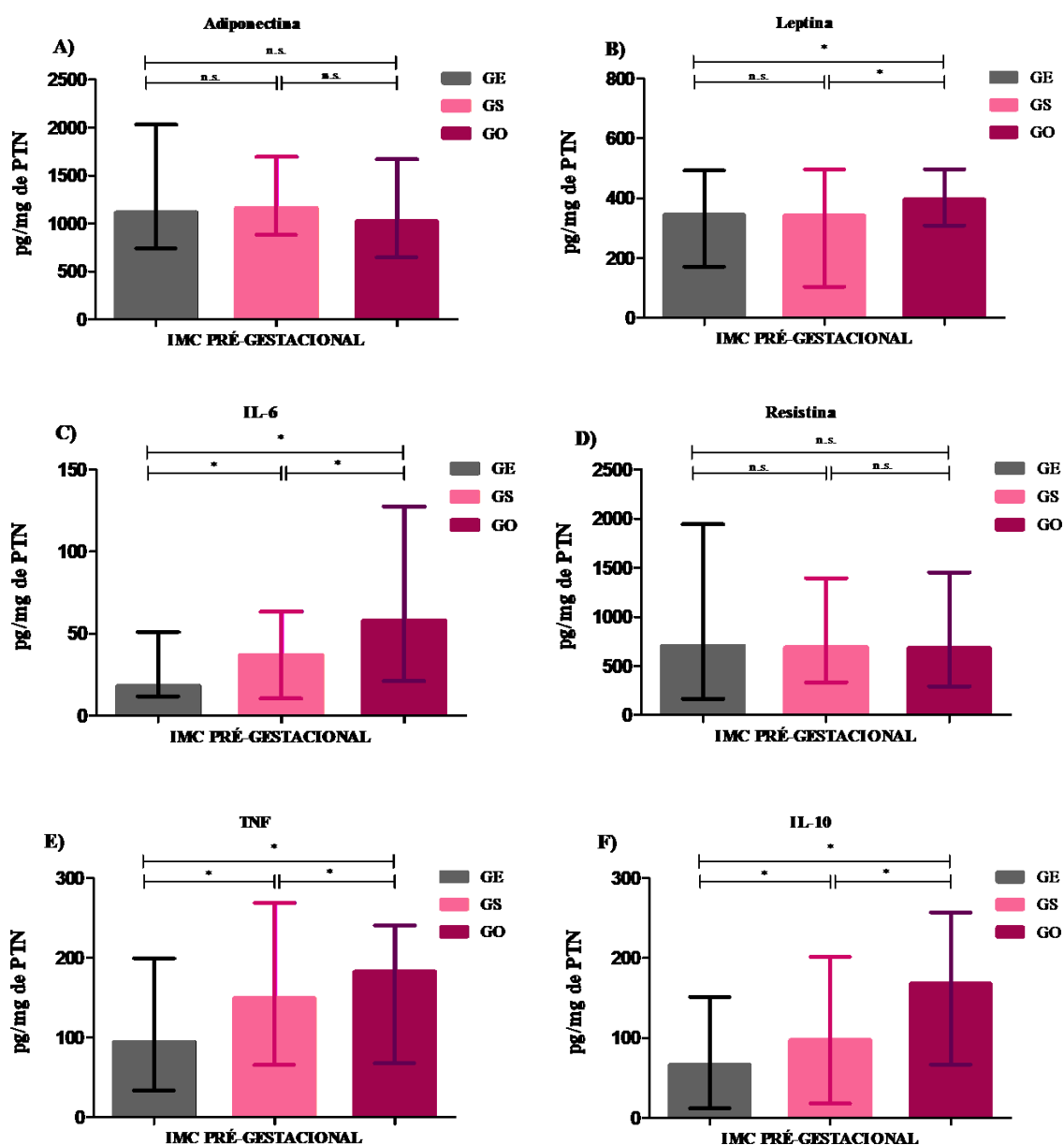
**Figura 8: Razão entre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro periférico materno.** Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \* $p\leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

#### 6.4 Análise de adipocinas no tecido adiposo materno

Visto a importância do tecido adiposo como um órgão endócrino com capacidade de atuar de maneira autócrina e parácrina e, conseqüentemente, impactar no metabolismo materno-fetal, as adipocinas também foram analisadas no tecido adiposo.

Foi observado concentrações semelhantes de adiponectina ( $p=0,204$ ) e resistina ( $p=0,924$ ) entre os grupos. Todavia, as concentrações de TNF ( $p\leq 0,001$ ), IL-6 ( $p\leq 0,001$ ) e IL-10 ( $p\leq 0,001$ ) apresentaram-se maiores no grupo sobrepeso e no grupo obesidade quando comparados com o grupo controle. Para leptina, não observamos diferença entre os grupos sobrepeso e eutrofia, mas vimos maiores concentrações de leptina no tecido

adiposo das mães obesas quando comparadas às mães eutróficas ( $p \leq 0,001$ ) e diferença entre as concentrações de mães com sobrepeso e obesidade ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 9).



**Figura 9: Concentrações de adipocinas no tecido adiposo**

(A) Adiponectina (B) Resistina (C) Leptina (D) Fator de Necrose Tumoral (E) Interleucina 6 (F) Interleucina 10. Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

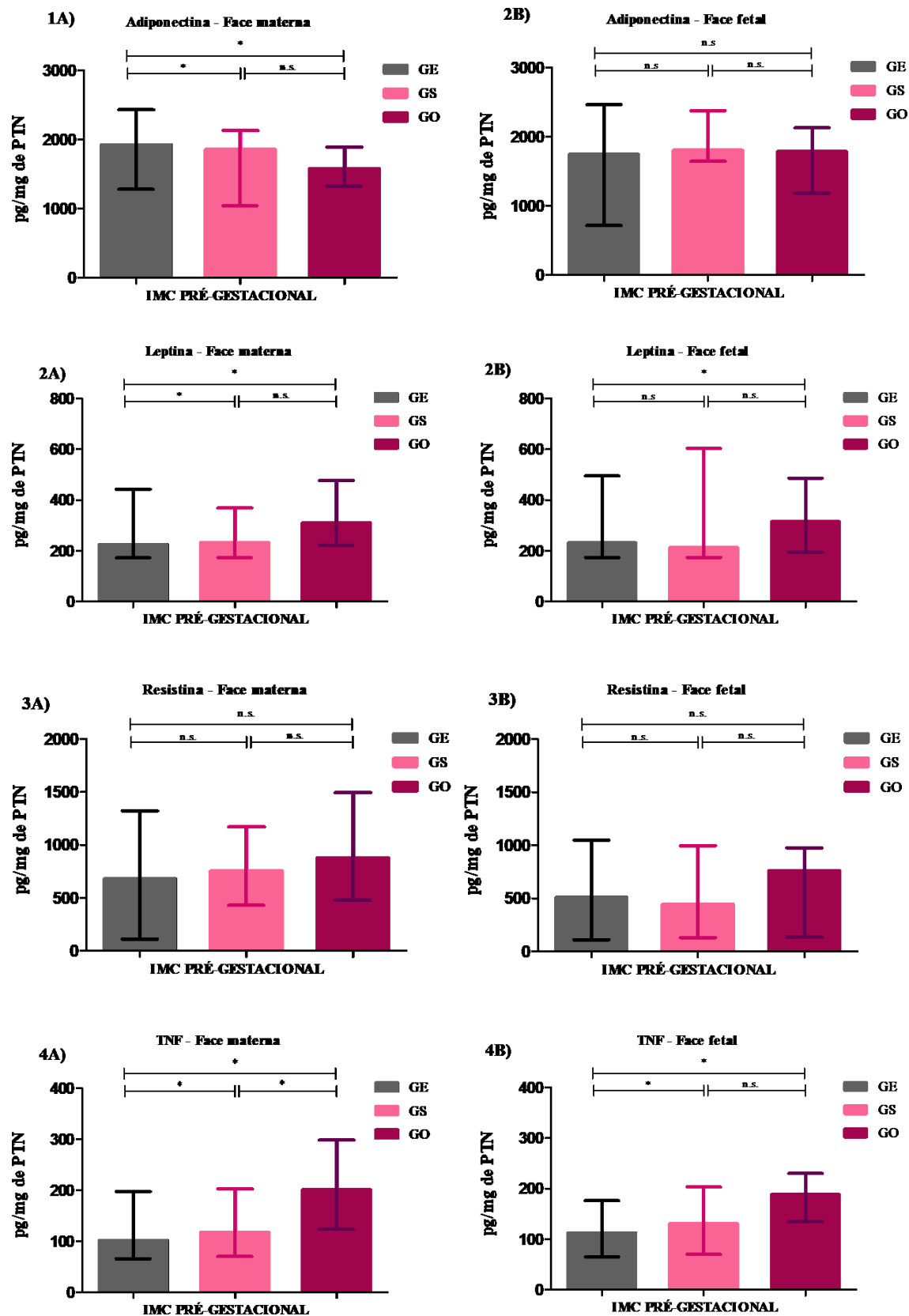
Esses resultados, tomados em conjunto, demonstram que o tecido adiposo das mães com sobrepeso e obesidade secretam maiores concentrações de adipocinas pró-inflamatória proporcionalmente ao IMC, ou seja, o grupo GS apresenta maiores concentrações que o grupo GE e o grupo GO maiores concentrações que GS e GE. Além disso, observamos o aumento de IL-10 tanto nas mães do grupo GS quanto nas do grupo GO, demonstrando que pode existir uma tentativa de controle da inflamação local.

### **6.5 Análise de adipocinas no tecido placentário**

Dado que a placenta é um órgão de interface materno-fetal e que é responsiva ao perfil sistêmico e tecidual materno, julgamos necessário avaliar a secreção de citocinas pela placenta. Avaliamos as concentrações de citocinas nas faces materno e fetal e observamos que na face materna da placenta de mães obesas houve maiores concentrações de leptina ( $p \leq 0,001$ ), IL-6 ( $p \leq 0,001$ ), TNF ( $p \leq 0,001$ ), IL-10 ( $p \leq 0,001$ ) e menores concentrações de adiponectina ( $p \leq 0,001$ ) quando comparadas aos grupos sobrepeso e eutrofia. Para resistina, as concentrações entre os grupos não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,277$ ) (Figura 10).

Esses resultados, tomados em conjunto com o perfil inflamatório sistêmico e no tecido adiposo das mães com obesidade, nos mostram que a parte materna da placenta também se apresenta inflamada, responsiva ao ambiente pró-inflamatório materno.

Na face fetal da placenta, as concentrações de adiponectina ( $p=0,4481$ ), resistina ( $p=0,06$ ) e IL-6 ( $p=0,661$ ) foram semelhantes entre os três grupos. Enquanto que no grupo com mães obesas as concentrações de TNF ( $p \leq 0,001$ ), leptina ( $p \leq 0,001$ ) e IL-10 ( $p \leq 0,001$ ) foram maiores quando comparadas aos grupos GE e GS, com exceção de leptina que não apresentou diferença entre a categoria eutrófica e a categoria sobrepeso ( $p=0,8720$ ) (Figura 10). Os dados brutos relativos às concentrações de citocinas nos compartimentos placentários estão demonstrados também em tabela no Apêndice III.



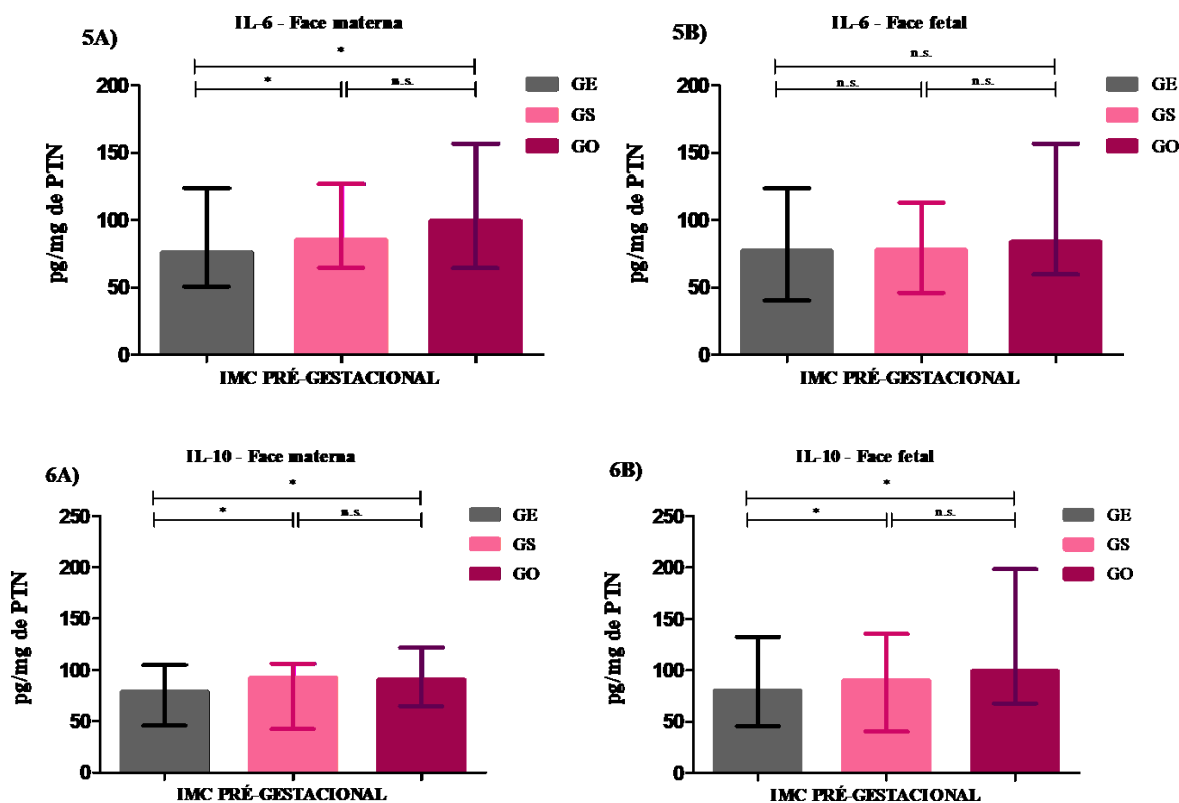


Figura 10: Concentrações de citocinas no tecido placentário – face materna (A) e face fetal (B).

1) Adiponectina (2) Leptina (3) Resistina (4) Fator de Necrose Tumoral (5) Interleucina 6 (6) Interleucina 10. Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

Esses dados nos mostram que há diferenças nas concentrações de citocinas entre as faces materna e fetal de acordo com o estado nutricional, ou seja, mesmo a parte fetal apresentando um perfil pró-inflamatório, algumas citocinas como adiponectina e IL-6 não apresentaram diferenças, mostrando-nos que a placenta pode atuar como um filtro na tentativa de modular a inflamação vinda do ambiente materno. Para verificarmos isso, analisamos a variação ( $\Delta$ ) das concentrações dessas citocinas da face materna em relação a face fetal com o objetivo de identificar o quanto dessas citocinas ficam retidas na placenta (Tabela 3).

**Tabela 3: Diferença da concentração de citocinas nos compartimentos placentários**

CITOCINAS (pg/mL)	$\Delta$ = concentração face materna – concentração face fetal			
	GE	GS	GO	p valor <sup>1</sup>
<b>Adiponectina</b>	285 (0 – 1650)	342,5 (75 – 1075)	268,0 (5 – 1372,5)	0,5196
<b>Leptina</b>	40 (1,8 – 280,4)	46,8 (1,8 – 382,7)	69,1 (0,4 – 163,2)	0,6454
<b>Resistina</b>	247,5 (2,5 – 788,5)	311,6 (2,5 – 648,8)	110,0 (7,5 – 557,5)	0,1034
<b>IL-6</b>	10,6 (1,1 – 58,5)	13,0 (0 – 52,7)	26,7 (2,8 – 70,9)	<b>0,010</b>
<b>IL-10</b>	11,8 (0,1 – 43,8)	18,3 (1,7 – 91,7)	20,1 (0,6 – 121,7)	0,1022
<b>TNF</b>	16,6 (1 – 49,7)	15,9 (0,8 – 90,1)	32,3 (3 – 130,8)	<b>0,0120</b>

Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

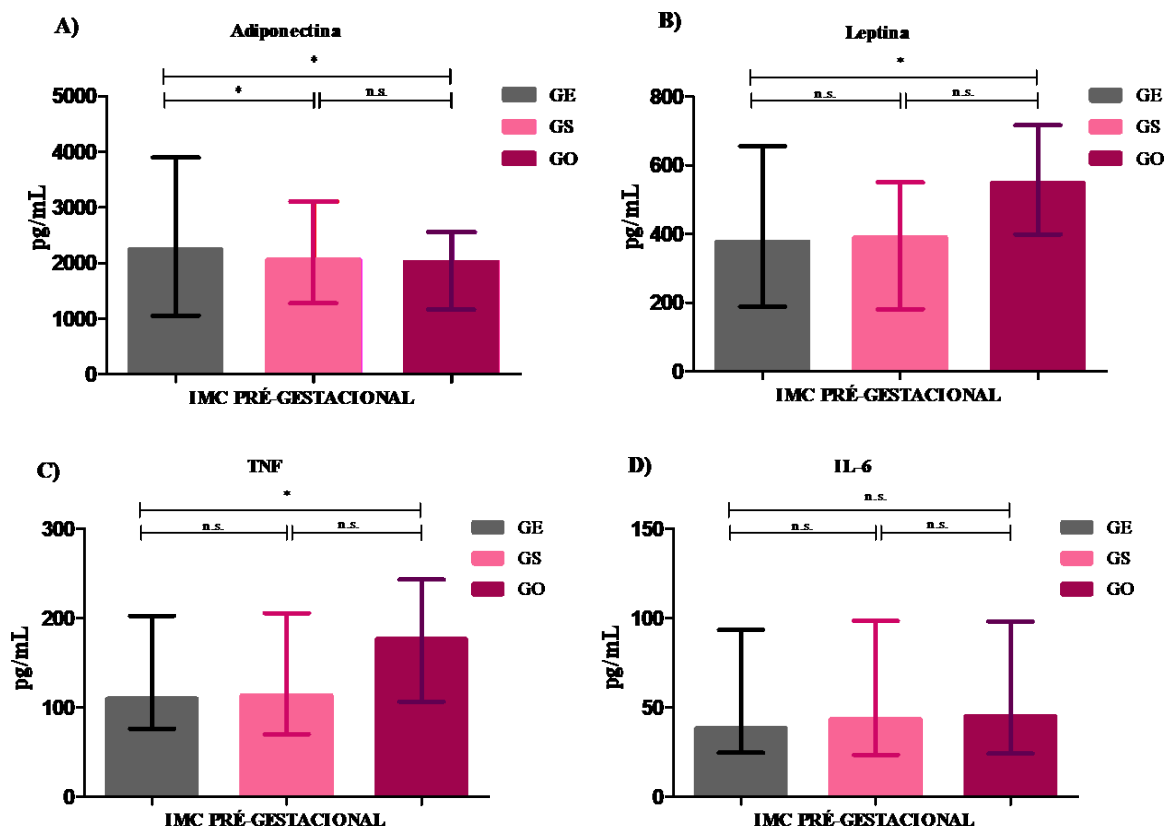
Interessantemente, observamos na tabela 3 que a diferença das concentrações de adiponectina, leptina, resistina e IL-10 no tecido placentário do lado fetal em relação ao materno foram similares entre as três categorias do estado nutricional. Entretanto, o grupo GO apresentou maior variação para as concentrações de TNF e IL-6 no tecido placentário. Esses resultados nos mostram que a placenta de mulheres obesas retém maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, ou seja, ficam mais inflamadas quando comparadas às das mulheres com sobrepeso e eutrofia e que essa retenção, poderia desencadear alterações fisiológicas que influenciariam no transporte de nutrientes, metabolismo e desenvolvimento do feto.

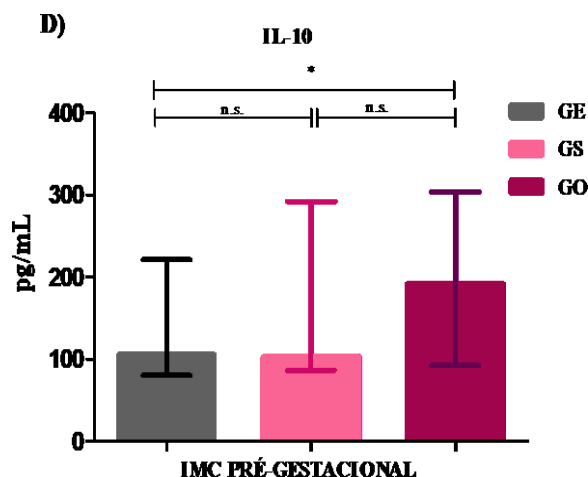
Dados relativos à análise de correlação entre IMC pré-gestacional e adipocinas no soro periférico materno e nos compartimentos placentários foram analisadas e estão demonstradas no Apêndice IV. Não apresentamos aqui uma vez que as correlações significativas são condizentes com as diferenças já encontradas entre os grupos.

## 6.6 Análise de citocinas no sangue do cordão umbilical

Resultados relativos às análises das concentrações das citocinas leptina, adiponectina, IL-6, TNF e IL-10 no plasma do sangue do cordão umbilical estão descritas na figura 11. Identificamos diferença no grupo de mães obesas que apresentaram maiores concentrações de leptina, TNF, IL-10 circulantes e menor concentração de adiponectina quando comparadas ao grupo GE. Dessa forma, podemos observar que há um perfil de

citocinas pró-inflamatórias circulando no sangue do cordão umbilical e uma tentativa de resolução dessa inflamação por meio do aumento de IL-10 circulante. Esses resultados, somados aos anteriores, nos evidenciam que a obesidade materna está associada a um perfil inflamatório sistêmico e tecidual (tecido adiposo), que atinge o ambiente intrauterino, uma vez que a placenta também apresenta um perfil pró-inflamatório, com maior retenção de TNF e IL-6. Além do ambiente materno e placentário apresentarem perfis inflamatórios, vimos que o sangue do cordão umbilical também é afetado pelo excesso de adiposidade. Dessa forma, buscamos analisar, o impacto do estado nutricional materno associado a esse perfil inflamatório nas características antropométricas e bioquímicas do neonato.





**Figura 11: Concentrações de citocinas no cordão umbilical**

(A) Adiponectina (B) Leptina (C) Fator de Necrose Tumoral (D) Interleucina 6 (E) Interleucina 10. Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. \* $p \leq 0,05$ ; n.s. - não significativo.

### 6.7 Características neonatais

A tabela 4, demonstra as características referentes aos neonatos logo após o parto. Observamos que não houve diferença para o peso ao nascer ( $p=0,459$ ), com média de 3,160 kg para os grupos GE e GS e 3,216 kg para o grupo GO. As médias de comprimento também foram semelhantes entre os grupos, 49 centímetros ( $p=0,944$ ). Ao passo que o IMC neonatal e o Índice Ponderal também foram semelhante entre os grupos, 13,1  $\text{kg/m}^2$  ( $p=0,497$ ), 2,7 ( $p=0,748$ ), respectivamente. Quanto às circunferências cefálica, torácica e abdominal também não vimos diferenças entre os grupos,  $p=0,351$ ,  $p=0,638$ ,  $p=0,787$ , respectivamente. A única diferença relevante do ponto de vista estatístico foi observado na glicemia capilar ( $p=0,03$ ) dos neonatos filhos da mães com obesidade os valores médios da glicemia estratificada pelo estado nutricional classificaram os recém-nascidos como normoglicêmicos. Entretanto, maiores médias de glicemia (52 mg/dL) foram observadas nos neonatos oriundos do grupo GO quando comparados com o grupo controle (47mg/dL). Esse resultado nos leva a pensar que o fato das mães com obesidade apresentarem um ambiente intrauterino pró-inflamatório pode ter contribuído para maior oferta de nutrientes para o feto, resultando em maiores concentrações da glicemia neonatal.

Dados relativos à correlação entre IMC pré-gestacional, variáveis antropométricas, glicemia capilar e adipocinas do cordão umbilical foram testadas. Todas as correlações



significativas estão demonstradas no Apêndice 4 e não achamos necessário apresentar aqui uma vez que são condizentes com as diferenças que encontramos entre os grupos.

Sabendo que a obesidade é uma doença multifatorial e que além do estilo de vida, a predisposição genética pode influenciar nos desfechos dessa comorbidade, inclusive predispondo a outras doenças como diabetes e hipertensão, buscamos analisar o impacto dos polimorfismos genéticos nos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) associados ao estado nutricional materno-neonatal.

**Tabela 4: Características neonatais**

Variável	GE (n=83)	GS (n=55)	GO (n=27)	p valor <sup>1</sup>
<b>Sexo</b>				
<b>Feminino</b>	36 (43,4%)	29 (52,7%)	13 (48,1%)	0,5617 <sup>2</sup>
<b>Masculino</b>	47 (56,6%)	26 (47,3%)	14 (51,9%)	
<b>Peso (kg)</b>	3,13 (2,5 -4,1)	3,16 (2,5 – 3,8)	3,26 (2,6 – 4,0)	0,459
<b>Comprimento (cm)</b>	49 (44 – 54)	49 (44 – 53)	49 (46 – 53)	0,944
<b>IMC neonatal (kg/m<sup>2</sup>)</b>	13,0 (10,1 – 15,5)	13,0 (10,7 – 17,4)	13,1 (11,0- 16,8)	0,497
<b>Apgar 1'</b>	9 (6 – 10)	9 (6 – 10)	9 (8-10)	0,728
<b>Apgar 5'</b>	10 (8 – 10)	9 (8 -10)	9 (10-10)	0,428
<b>Índice Ponderal (kg/mt)</b>	2,6 (2,0 – 3,4)	2,7 (2,2 – 3,8)	2,7 (2,2 – 3,4)	0,748
<b>Perímetro cefálico (cm)</b>	34 (29,0 – 39,5)	35 (30,0 – 39,0)	35 (31 – 38)	0,351
<b>Perímetro torácico (cm)</b>	33 (28 -39,0)	33 (29 – 36)	33 (24 – 36)	0,638
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	31,0 (26,0-38,5)	31,0 (25,0-36,0)	32 (27,0 – 36,0)	0,787
<b>Glicemia (mg/dL)*</b>	47 (27 – 62)	50 (28 – 64)	52,0 (36,0 – 64,0)	<b>0,030</b>

Dados em mediana - valor mínimo e máximo. Teste de Kruskal-Wallis ou Anova seguido do pos-hoc Tukey<sup>1</sup>. Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado para variáveis categóricas. p<0,05 \*Para glicemia n no grupo GE = 46; GS=29 e GO=27

## 6.8 Frequência genotípica dos polimorfismos materno

Das 145 mães genotipadas para o SNP MC4R (rs17782313), 64,1% eram TT, 28,9% eram CT e 6,89% eram CC. Para o SNP de FTO (rs9939609), das 147 mães genotipadas, 32,2% tinham genótipo TT, 46,9% eram AT e 20,4% eram AA. Os dados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do menor alelo (MAFs) observada neste

estudo foi de 0,440 para rs9939609 e 0,210 para rs17782313, bem próximo daquela encontrada no HapMap, 0,460 e 0,270, respectivamente.

Quando avaliamos a presença dos alelos de risco de acordo com o IMC, observamos que o grupo GO apresentava maior frequência de mães com alelo de risco para FTO (rs9939609) ( $p=0,001$ ), enquanto que a frequência do polimorfismo de MC4R (rs17782313) foi similar de acordo com o estado nutricional materno ( $p=0,261$ ).

**Tabela 5: Frequência genotípica dos polimorfismos de FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) materno**

Polimorfismo	Alelo	GE (n=69)	GS (n=49)	GO (n=27)	p valor
<b>MC4R</b> (rs17782313)	<b>TT</b>	47 (68,1%)	27 (55,1%)	19 (70,3%)	0,261
	<b>CT</b>	19 (27,5%)	17 (34,6%)	6 (22,2%)	
	<b>CC</b>	3 (4,34%)	5 (10,2%)	2 (7,4%)	
Polimorfismo	Alelo	GE (n=70)	GS (n=51)	GO (n=26)	p valor
<b>FTO</b> (rs9939609)	<b>TT</b>	48 (68,5%)	23 (45%)	5 (22,2%)	<b>0,001</b>
	<b>AT</b>	11 (15,7%)	19 (37,2%)	<b>11 (40,7%)</b>	
	<b>AA</b>	11 (15,7%)	9 (17,6%)	<b>10 (37,1%)</b>	

Teste exato de Fisher ou qui-quadrado para os genótipos e alelos.  $p \leq 0,05$ .

### **6.9 Associação dos SNPs dos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) materno com IMC pré-gestacional, perfil bioquímico e inflamatório materno**

Para avaliar se a presença do alelo de risco para esses SNPs diferenciava as medidas antropométricas e perfil inflamatório e metabólico materno, dividimos as mães pela presença (AT/AA; CT/CC) ou não (TT) dos alelos de risco para FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313), respectivamente.

Observamos que as mães com alelo de risco A para FTO (rs9939609) apresentavam maior peso e IMC pré-gestacional quando comparadas com aquelas que não apresentavam o alelo de risco (TT). Curiosamente, no grupo GE, mães portadoras do alelo de risco estariam com peso bem próximo ao limite de classificação para obesidade, enquanto que as mães sem o alelo de risco encontravam-se próximas à eutrofia. Entretanto, quando analisamos o ganho de peso total na gestação não vimos diferença para a presença do alelo de risco para FTO (rs9939609), ou seja, esse polimorfismo não impactou no ganho de peso gestacional.

Com relação aos dados bioquímicos, não encontramos diferença entre a presença ou não do alelo de risco nas variáveis glicemia ( $p=0,159$ ), insulina ( $p=0,503$ ) e HOMA-IR ( $p=0,407$ ).

Quanto ao perfil inflamatório sistêmico, vimos que as mães que têm o alelo de risco para FTO (rs9939609) apresentaram maiores concentrações de resistina ( $p=0,003$ ), IL-6 ( $p\leq 0,001$ ) e TNF ( $p=0,005$ ) quando comparadas às mães sem o alelo de risco. Em contrapartida, não observamos diferenças nas concentrações de adiponectina ( $p=0,249$ ), leptina ( $p=0,699$ ) e IL-10 ( $p=0,06$ ) (tabela 6).

Quanto ao SNP em MC4R (rs17782313), não observamos diferença entre a presença do alelo de risco C com alterações no perfil antropométrico, bioquímico e inflamatório materno (Tabela 7).

Em suma, podemos observar que a presença do alelo de risco no SNP em FTO (rs9939609) caracteriza esse grupo com maior peso e IMC pré-gestacional, além de apresentarem maior inflamação sistêmica, uma vez que concentrações de citocinas pró-inflamatórias estavam aumentadas, as mesmas vistas quando estratificamos as mães pelo IMC pré-gestacional.

**Tabela 6: Características antropométricas, bioquímicas e inflamatórias de acordo com o genótipo materno no SNP em FTO (rs9939609)**

<i>FTO</i> (rs9939609)	TT (n=76)	AT+AA (n=71)	P valor*
Peso pré-gestacional (kg)	73,7 (52,5 – 102,0)	85,2 (54,2 – 126,0)	<b>0,001</b>
IMC pré-gestacional (kg/m <sup>2</sup> )	23,4 (18,5–33,5)	29,0 (19–50,6)	<b>0,001</b>
Ganho de peso gestacional (kg)	14,0 (-2,0 – 25,0)	12,0 (-5,0 – 38,0)	0,360
Glicose de jejum (mg/dL)	108 (94 – 127,0)	103 (74 – 143,0)	0,159
Insulina (μIU/mL)	23,2 (20,5 – 32,4)	24,7 (21,1 – 34,7)	0,503
HOMA-IR	6,2 (5,7 – 9,4)	6,5 (5,2 – 11,3)	0,407
Leptina (pg/mL)	443 (183,4-643,6)	461,1 (277-653,6)	0,699
Adiponectina (pg/mL)	1079 (719,5–3434,5)	1182 (769,5-3557,0)	0,249
Resistina (pg/mL)	197 (179,8 – 295,7)	213,4 (194,3-288,9)	<b>0,003</b>
IL-6 (pg/mL)	14,9 (10,1 – 37,6)	21,8 (12,3 – 37,0)	<b>0,001</b>
TNF (pg/mL)	102,3 (66,3 – 187,9)	116,4 (67,9 – 220,6)	<b>0,005</b>
IL-10 (pg/mL)	75,7 (48,2 – 182,0)	83,2 (58,2 – 210,8)	0,060

Valores apresentados como mediana (mínimo- máximo). \*Valores significativamente diferentes após teste t de amostras independentes para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos.  $p\leq 0,05$ .

**Tabela 7: Características antropométricas, bioquímicas e inflamatórias de acordo com o genótipo materno SNP em MC4R (rs17782313)**

MC4R (rs17782313)	TT (n=93)	CT+CC (n=52)	P valor*
Peso pré-gestacional (kg)	65,0 (43,0 – 117,0)	67,0 (40,0 – 106,0)	0,818
IMC pré-gestacional (kg/m <sup>2</sup> )	24,9 (18,7 – 50,6)	25,6 (18,9 – 33,0)	0,642
Ganho de peso gestacional (kg)	12,0 (-5,0 – 38,0)	13,0 (-2,0 – 22,0)	0,466
Glicose de jejum (mg/dL)	105,5 (92,0 – 146,0)	108,0 (74,0 – 127,0)	0,837
Insulina (μIU/mL)	23,9 (21,1 – 32,6)	24,1 (20,5 – 34,8)	0,989
HOMA-IR	6,3 (5,2 – 11,3)	6,5 (5,3 – 9,40)	0,984
Leptina (pg/mL)	441,6 (277,0 – 573,4)	459,3 (262,5 – 653,6)	0,890
Adiponectina (pg/mL)	1054 (719,5 – 3434)	1184 (769,5 – 3392)	0,834
IL-6 (pg/mL)	16,2 (10,1 – 37,1)	18,1 (11,2 – 37,2)	0,251
TNF (pg/mL)	115,6 (67,9 – 220,6)	104,9 (73,2 – 200,9)	0,720
IL-10 (pg/mL)	78,2 (55,7 – 210,8)	80,7 (59,5 – 163,2)	0,355

Valores apresentados como mediana (mínimo- máximo). \*Valores significativamente diferentes após teste t de amostras independentes para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos.  $p \leq 0,05$ .

Depois de observarmos que havia maior frequência de alelo de risco para FTO (rs9939609) no grupo obesidade e que as mães que apresentavam esse alelo tinham maior IMC e peso pré-gestacional, fizemos uma regressão multinominal para avaliar o quanto a presença desse alelo poderia aumentar a chance de desenvolver sobrepeso ou obesidade, assim como ganho de peso excessivo durante a gestação. Nós observamos que as mães que apresentam o alelo de risco para FTO (rs9939609) apresentam cerca de 2 vezes mais chance de ter sobrepeso e 8 vezes mais de ter obesidade pré-gestacional, tendo como referência as mães eutróficas (tabela 8). Além disso, buscamos demonstrar o quanto o SNP pode contribuir no peso pré-gestacional e vimos que presença do alelo de risco (AT/AA) acrescenta 9,9 kg a mais no peso pré-gestacional quando se compara com as mães TT. No ajuste de modelos na regressão liner, usando a variável paridade, a cada 1 filho a mais, o peso pré-gestacional é maior em 2,2 kg (tabela 9).

O modelo de ganho de peso gestacional não apresentou diferenças. Vale citar que o MC4R (17782313) não apresentou significância no modelo e foi excluído pelo critério de significância de valor p superior a 0,05.

Tomados em conjunto, esses resultados nos demonstram que o SNP FTO (rs9939609) impacta na obesidade pré-gestacional, sendo capaz de aumentar a chance de obesidade em 8 vezes, com cerca de 9,9 kg a mais nas mães portadoras do alelo de risco no início da gestação. E ainda, vimos que a cada gestação, as mães têm cerca de 2,2 kg a mais.

**Tabela 8 - Modelo multinomial para classificação de IMC pré-gestacional**

		B	Erro	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Intervalo de Confiança para Exp(B)	
Classificação IMC pré								Limite inferior	Limite superior
Sobrepeso	Intercepto	-0,759	0,258	8,635	1	0,003			
	FTO (AT/AA)	0,991	0,380	6,786	1	<b>0,009</b>	2,694	1,278	5,677
Obesidade	Intercepto	-2,241	0,470	22,690	1	0,000			
	FTO (AT/AA)	2,150	0,559	14,794	1	<b>0,000</b>	8,583	2,870	25,666

a. A categoria de referência é: Eutróficas.

Ajuste Qui Quadrado (19,942; 2); valor p = 0,000; Porcentagem global de classificação: 51,7%

**Tabela 9 - Modelo de regressão linear da variável peso pré-gestacional (Kg)**

FTO (Rs9939609)		Coefficiente	t	sig	LI (95% IC)	LS (95% IC)
Modelo 1*	TT	63,24	37,757	0,000	59,93	66,55
	AT/AA	9,90	4,196	0,000	5,24	14,57
Modelo 2**	TT	58,883	21,805	<b>,000</b>	53,542	64,225
	AT/AA	9,806	4,204	<b>,000</b>	5,192	14,421
	Paridade	2,196	2,043	<b>,043</b>	,070	4,322

\*Significância modelo (p = 0,000); R2 ajustado = 11%; \*\* Significância modelo (p = 0,000); R2 ajustado = 13,1%

### 6.10 Frequência genotípica dos polimorfismos FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) neonatais

Dos 113 neonatos genotipados para o SNP MC4R (rs17782313), 58,4% eram TT, 35,3% eram CT e 6,19% eram CC. Para o SNP de FTO (rs9939609), dos 110 neonatos genotipados, 26,3% tinham genótipo TT, 57,0% eram AT e 21,8% eram AA. Os dados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do menor alelo (MAFs) observada neste estudo foi de 0,470 para rs9939609 e 0,280 para rs17782313, bem próximo daquela encontrada no HapMap, 0,460 e 0,270, respectivamente.

### 6.11 Impacto dos SNPs dos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) materno/neonatal nas variáveis antropométricas e glicemia neonatal

Recém-nascidos de mães portadoras do alelo de risco A do SNP FTO (rs9939609) (AT+AA) não apresentaram nenhum efeito significativo nas características antropométricas. Da mesma forma, o polimorfismo de FTO do recém-nascido não demonstrou efeito nas características neonatais. Esses resultados sugerem que o SNP

em FTO (rs9939609) seja ele materno ou neonatal não influencia nas características antropométricas e clínicas neonatais (tabela 10).

Quando analisamos a diferença da presença ou não do SNP MC4R (rs17782313) materno, observamos que recém-nascidos de mães portadoras do alelo de risco C (CT+CC) apresentam menor peso ao nascer ( $p=0,04$ ) quando comparados ao recém-nascidos de mães com o genótipo TT. Para as demais variáveis neonatais, não identificamos nenhuma diferença relacionada ao polimorfismo materno ou neonatal (tabela 10).

Analisamos também a interação dos polimorfismos materno e neonatal nas medidas antropométricas neonatais e não encontramos efeito. Em função disso, disponibilizamos no Apêndice IV os dados relativos a esse resultado.

**Tabela 10: Efeito dos polimorfismos materno/neonatal de FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) nas variáveis antropométricas e bioquímica neonatal**

	Polimorfismo materno					
	FTO (rs9939609)			MC4R(rs17782313)		
	TT (n=74)	AT/AA (n=61)	p valor	TT (n=81)	CT/CC (n=49)	p valor
<b>Peso (kg)</b>	3,15 (2,5 – 4,18)	3,2 (2,5 – 4,18)	0,821	3,23 (2,5 – 4,18)	3,1 (2,5 – 3,8)	<b>0,040</b>
<b>Comprimento (cm)</b>	49 (50 – 50)	49 (49 – 50)	0,522	49 (49 – 50)	49 (49 – 50)	0,159
<b>IMC neonatal (kg/m<sup>2</sup>)</b>	12,9 (10 – 15,5)	13,8 (10,6 – 17,4)	0,577	13,1 (10,1 – 17,4)	13,9 (10,6 – 15,5)	0,330
<b>Índice Ponderal (kg/mt)</b>	2,6 (2 – 3,4)	2,6 (2,2 – 3,8)	0,582	2,6 (2,0 – 3,8)	2,6 (2,2 – 3,5)	0,592
<b>Perímetro cefálico (cm)</b>	34 (31,0 – 39,5)	35 (32,0 – 39,0)	0,444	34 (31,0 – 39,0)	35 (30,0 – 39,5)	0,995
<b>Perímetro torácico (cm)</b>	33 (28 -39,0)	33 (24,0 – 36,0)	0,790	33 (24 -39,0)	33 (28,0 – 36,0)	0,238
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	31,0 (26,0-38,5)	31,0 (25,0-35,0)	0,318	31,5 (26,0-35)	31,0 (26-35,0)	0,122
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	49,5 (27 – 64,0)	50 (35 – 64,0)	0,421	49 (32 – 64)	50 (27 – 64)	0,617
	Polimorfismo neonatal					
	FTO (rs9939609)			MC4R(rs17782313)		
	TT (n=21)	AT/AA (n=65)	p valor	TT (n=42)	CT/CC (n=41)	p valor
<b>Peso (kg)</b>	3,15 (2,5 – 4,18)	3,2 (2,5 – 4,18)	0,797	3,1 (2,5 – 4,8)	3,1 (2,5 – 4,1)	0,793
<b>Comprimento (cm)</b>	49 (49 – 50)	49 (49 – 50)	0,712	49 (49 – 50)	49 (49 – 50)	0,894
<b>IMC neonatal (kg/m<sup>2</sup>)</b>	12,9 (10 – 15,5)	13,8 (10,6 – 17,4)	0,491	12,6 (10,1 – 15,2)	12,7 (10,6 – 15,0)	0,489
<b>Índice Ponderal (kg/mt)</b>	2,6 (2 – 3,4)	2,6 (2,2 – 3,8)	0,691	2,5 (2,0 – 3,1)	2,6 (2,2 – 3,1)	0,179
<b>Perímetro cefálico (cm)</b>	34 (30,0 – 39,0)	35 (32,0 – 39,5)	0,746	35 (32,0 – 39,0)	35 (32,0 – 39,0)	0,743
<b>Perímetro torácico (cm)</b>	33 (29 -39,0)	33 (29,0 – 36,0)	0,809	33 (30 -36,0)	33 (31,0 – 39,0)	0,245
<b>Perímetro abdominal (cm)</b>	32,0 (26,0-38,5)	31,0 (26,0-35,0)	0,989	31,5 (26,0-35)	32,0 (28-38,5)	0,351
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	49,5 (27 – 64,0)	50 (35 – 64,0)	0,561	48 (36 – 61)	47 (28 – 64)	0,661

Valores apresentados como mediana (mínimo- máximo). \*Valores significativamente diferentes após teste t de amostras independentes para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos.  $p \leq 0,05$ .

## 7 DISCUSSÃO

Nosso estudo tem quatro conclusões principais. Primeiro, foi demonstrado que a obesidade pré-gestacional promove um perfil pró-inflamatório sistêmico e local, incluindo as faces placentárias. Em segundo lugar, observamos que a inflamação intrauterina no contexto da obesidade aumenta a glicemia capilar dos descendentes. Em terceiro lugar, mulheres que apresentavam o alelo de risco para FTO (rs9939609), mas não para MC4R (17782313), apresentam maior chance de terem excesso de adiposidade e são mais pesadas no início da gestação, apresentando também um perfil pró-inflamatório sistêmico associado. Finalmente, não vimos interferência direta do SNP FTO (rs9939609) nas condições do neonato ao nascer, mas observamos que o SNP MC4R (17782313) materno diminui o peso ao nascer.

Investigamos os SNPs FTO (9939609) e o MC4R (17782313) no presente estudo porque eles demonstram estar fortemente associados às alterações do peso corporal em estudos anteriores (3, 126, 155). Sabemos que a experiência gestacional promove mudanças na composição corporal materna e iniciar a gestação associada à obesidade e a variantes genéticas que a predispõe, leva ao aumento do ganho de peso excessivo (156), a alterações metabólicas como resistência à insulina, inflamação subclínica e consequentemente a efeitos adversos no ambiente intrauterino com impacto no desenvolvimento fetal e pós-natal (6).

Diferentes estudos corroboram com os nossos dados e demonstram associação do peso e IMC pré-gestacional entre mulheres portadoras do SNP em FTO (rs9939609) (3, 126, 155) e ainda apontam que a presença do alelo de risco aumenta a chance de desenvolver sobrepeso e obesidade pré-gestacional (118).

Em nosso estudo, observamos que as mães que apresentavam o alelo de risco A (AT + AA) eram 9,9 kg mais pesadas que as mães TT e apresentavam 5,6 kg/m<sup>2</sup> a mais no IMC. Resultados semelhantes foi encontrado em um estudo brasileiro que demonstrou que a homozigose para o alelo de risco em FTO (rs9939609) aumentava em 8,9 kg o peso e 3,4 kg/m<sup>2</sup> no IMC pré-gestacional, sem estar associado ao ganho de peso gestacional (3). Em contraste, em um estudo com mulheres negras grávidas de baixa renda, os alelos de risco do FTO (rs9939609) não foram associados ao IMC pré-gestacional (157).

Quanto ao SNP em MC4R (rs17782313), assim como nosso estudo, outros também não encontraram associação com o peso pré-gestacional (3), IMC pré-gestacional (126) e ganho de peso gestacional excessivo (3). Por outro lado, no estudo de Marginean et al.



(2019), as mães que apresentavam o alelo de risco para MC4R (rs17782313) apresentavam maior risco de sobrepeso pré-gestacional quando comparadas com aquelas sem o alelo de risco (150).

É importante destacar que o grau de miscigenação no Brasil é muito alto e que diferentes populações estão expostas a diferentes influências ambientais e genéticas que podem interagir com as variantes genéticas. Portanto, nossos resultados são consistentes com investigações que indicam que o FTO (rs9939609) desempenha um papel fundamental nas mudanças dos fenótipos relacionados à adiposidade em populações em todo o mundo, inclusive no Brasil (3, 126); assim como que o MC4R (rs17782313) não associa com a adiposidade (3).

Os mecanismos subjacentes à relação fisiológica entre FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) e alterações de peso corporal ainda não estão claras. Sabe-se que FTO e MC4R são altamente expressos na região hipotalâmica (133, 158), uma área que é sabidamente envolvida na regulação do apetite. Já foi relatado o efeito do alelo de risco (A) de FTO (rs9939609) na ingestão de energia e na redução da saciedade (121), uma vez que foi associado às concentrações de grelina e leptina circulantes (124, 159).

Além desse mecanismo no consumo alimentar, o FTO (rs9939609) tem sido significativamente associado à inflamação (160), que está implicada na resistência à insulina (161, 162) e na obesidade (163), como visto em nosso estudo.

Curiosamente, não encontramos dados na literatura sobre a interferência do alelo de risco para FTO (rs9939609) nas concentrações séricas de citocinas inflamatórias na obesidade materna. E nossos resultados demonstram maiores concentrações de IL-6, TNF e resistina nas mães portadoras do alelo de risco. Nossos resultados podem ser explicados por outros estudos, fora do contexto da gestação, como o de Kin et al. (2016) que demonstrou associação positiva do SNP em FTO com concentrações sanguíneas de valina e com metabólitos de fosfatidilcolina também associados a resistência à insulina e a inflamação, respectivamente, uma vez que elevadas concentrações de PCR e resistina foram associadas (164). Sendo assim, variante FTO não apenas aumenta o tamanho dos adipócitos, mas também o estado inflamatório do tecido adiposo e por consequência a inflamação sistêmica, independentemente do grau de adiposidade. Além disso, deve-se considerar que o tecido adiposo é altamente heterogêneo. Assim, os locais que são mais sensíveis à infiltração de células imunes podem ser expandidos preferencialmente em portadores do alelo A (160). Recentemente, um estudo experimental demonstrou que o macrófago IRX3 residente no tecido adiposo promove a transcrição de citocinas pró-

inflamatórias e, assim, reprime a sinalização adrenérgica dos adipócitos, inibindo assim a lipólise e a termogênese e favorecendo à inflamação subclínica (165).

Sobrepeso e obesidade são resultados de uma interação complexa entre fatores genéticos e condições associadas ao estilo de vida e ao ambiente que têm efeitos aditivos e interativos. O ganho de peso médio global por ano após a primeira gravidez é de 0,90 kg e mulheres primíparas com obesidade pré-gestacional apresentam 0,60 kg a mais por paridade quando comparadas com mulheres eutróficas (166). Corroborando nossos resultados, vimos que as mães com obesidade apresentavam cerca de 2,2 kg a mais a cada gestação e que a paridade tem influência na obesidade em mulheres em idade fértil, com maior prevalência em mulheres que tem 2 ou mais filhos do que naquelas nulíparas e primíparas (167, 168).

O ganho de peso gestacional excessivo também aumenta definitivamente as taxas de obesidade na população em geral, sendo comprovado que leva à retenção de peso materno e a adiposidade excessiva em recém-nascido (169, 170). Alguns estudos também demonstram que mulheres com sobrepeso ou obesas são mais susceptíveis de exceder as recomendações de ganho de peso durante a gravidez do que outros grupos de IMC (171, 172), embora nossos resultados demonstrem que apenas o grupo de mulheres com sobrepeso pré-gestacional apresentou ganho de peso excessivo (1kg acima do recomendado). De toda forma, o sobrepeso e a obesidade pré-gestacional é associado a resultados adversos a longo prazo como síndromes hipertensivas, diabetes, macrossomia e sobrepeso e obesidade nos descendentes, enquanto o ganho de peso gestacional excessivo é associado a efeitos adversos a curto prazo como pré-eclâmpsia, diabetes gestacional e prematuridade (22).

Demonstramos em nosso estudo a associação da obesidade com a resistência à insulina, hiperglicemia materna e fetal (173). Ormazabal et al. (2018) também demonstrou que a obesidade central é associada à resistência à insulina. E Bano et al. (2021), demonstrou correlação entre o IMC e a resistência à insulina em 50% das mulheres obesas (163). Já Ott et al. (2018), não relatam que o sobrepeso/obesidade são determinantes das condições neonatais ao nascer, mas sugerem que a hiperglicemia materna no final da gestação parece ser crucial para determinar as concentrações de insulina e leptina no cordão umbilical e, conseqüentemente interferir no peso do neonato ao nascer (174) e desencadear alterações metabólicas como hiperglicemia fetal (175).

No entanto, distintos mecanismos moleculares pelos quais o excesso de gordura causa resistência à insulina (inflamação por lipotoxicidade, inibição da oxidação dos ácidos

graxos e glicose e secreção de adipocinas) têm sido associados ao desenvolvimento da resistência à insulina local e sistêmica (162). Dessa forma, gestantes obesas apresentam uma desregulação no metabolismo de glicose, desenvolvem grave resistência à insulina e apresentam um perfil inflamatório sistêmico e placentária, sugerindo modificações associadas das funções endócrinas e imunológicas (6, 176, 177).

Assim, observamos no grupo GS e GO um perfil pró-inflamatório, caracterizado principalmente por maiores concentrações de TNF, IL-6 e resistina em ambos os grupos. Já foi demonstrado que concentrações elevadas de TNF (62, 178, 179), IL-6 (4), leptina (62) e resistina (180) são correlacionados positivamente com a obesidade materna. Entretanto, há estudos que não encontraram este mesmo resultado para todos os marcadores inflamatórios (82, 181-183). Especificamente concentrações elevadas de TNF (6, 184) e IL-6 (185) na circulação materna já foram associados tanto com a obesidade materna quanto com a resistência à insulina, corroborando nossos resultados. Quanto à resistina, foi sugerido que ela é correlacionada com a RI como consequência da própria obesidade e não como uma resposta inflamatória dependente de um desses fatores, ou seja, a junção da obesidade e RI são determinantes para elevadas concentrações de resistina sistêmica (91), assim como observado em nosso estudo.

Adicionalmente, não encontramos diferenças entre os grupos para as concentrações séricas de adiponectina e leptina. Corroborando nossos resultados, alguns estudos também não observaram qualquer associação entre as concentrações plasmáticas de leptina (186) e adiponectina (180, 187, 188) com o IMC materno, enquanto outros mostraram que as concentrações maternas de leptina são mais altas em mulheres grávidas obesas ou com sobrepeso (72, 180, 187, 189) e que há uma relação inversa entre as concentrações plasmáticas de adiponectina e obesidade materna (190). É importante ressaltar que o perfil inflamatório sistêmico materno associado à obesidade não pode ser explicado somente pelas concentrações de citocinas no sangue materno, mas também pela produção dessas no tecido adiposo e na placenta (191, 192) bem como sua distribuição pela circulação materna e fetal (193).

Sendo assim, o tecido adiposo materno, que se expande muito na obesidade, é considerado fonte significativa de adipocinas local que são liberadas para a circulação materno-fetal (176). Já foi demonstrado que células estromais do tecido adiposo de mulheres obesas expressam 2,5 a 5 vezes mais citocinas como IL-6 e TNF em comparação com mulheres eutróficas (176). Nossos resultados corroboram esses estudos, uma vez que encontramos maiores concentrações de TNF, IL-6 e IL-10 no tecido adiposo das mães do

grupo GS e GO, assim como maiores concentrações de leptina nas mães do grupo GO. Esta inflamação sistêmica de baixo grau parece ser regulada pela secreção de TNF, IL-6 (179) e leptina (194) uma vez que a ativação do fator de transcrição NFκB desregula a biologia do tecido adiposo e desempenha um papel potencial em eventos inflamatórios, com conseqüente distúrbio na homeostase da glicose e utilização de ácidos graxos materno e fetal (179).

O aumento de IL-10 em mães com sobrepeso e obesidade vista em nosso estudo é descrito na literatura como um efeito contra regulatório, uma vez que o aumento de citocinas pró-inflamatórias não acompanhado por elevação das concentrações de IL-10, está associado ao aborto espontâneo, à pré-eclâmpsia e ao nascimento pré-termo (67).

Diferentemente de outros estudos, não vimos diferença nas concentrações de adiponectina no tecido adiposo materno entre os grupos. Entretanto, é relatado que há uma diminuição da adiponectina associada aos níveis basais e à sensibilidade à insulina durante a obesidade materna (41, 194). No tecido adiposo, a adiponectina medeia efeitos anti-inflamatórios suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (195). Dessa forma, concentrações semelhantes entre eutróficas e obesas podem ser explicadas por um mecanismo protetor independente do estado nutricional contra o aumento gradual da resistência à insulina (195, 196), uma tentativa contra regulatória da inflamação local e sistêmica, como vimos no tecido adiposo e no soro periférico materno em nosso estudo.

Contudo, a inflamação subclínica e RI resultantes da obesidade materna pode se estender para a interface placentária, levando a um ambiente pró-inflamatório intrauterino (193), devido ao acúmulo de linfócitos Treg uterinos, assim como a atividade das células NK e a produção de TNF (197-199), IL-6 e leptina (82, 200). Observamos que tanto na face materna quanto na face fetal da placenta de mães obesas, elevadas concentrações de TNF, leptina e IL-10 foram encontradas e que especificamente na face materna do grupo GO observamos maiores concentrações de IL-6 e menores de adiponectina, resultados condizentes com um perfil pró-inflamatório geral da placenta como descrito nos estudos acima.

Poucos estudos analisam a secreção de citocinas nos compartimentos placentários (face materna e face fetal). A maioria dos estudos sobre o impacto da obesidade materna no desenvolvimento placentário e fetal tem sido realizada em mulheres obesas com diabetes gestacional (201, 202). Um dos pontos fortes de nosso estudo são nossas amostras altamente caracterizada de mulheres obesas e que não sofrem de diabetes ou doença cardiovascular. Nossos resultados demonstram que elevadas concentrações de

leptina estavam presente tanto na face materna quanto na face fetal das mães com obesidade. Este achado sugere o papel da leptina como fator de crescimento na interface materno-fetal (6, 203) podendo se estender ao desenvolvimento fetal. Embora estudos não revelaram quaisquer alterações relacionadas ao IMC nos níveis de leptina placentária (204), Noguez et al (2019), demonstrou que nas placentas de mulheres obesas o receptor de leptina é menos expresso que no grupo de eutróficas (61). Nossos dados mostram que a alta concentração de leptina pode estar associada a baixa expressão do receptor como descrito e isso, provavelmente desregula os efeitos biológicos da leptina na placenta de mulheres obesas. Ainda, estudos anteriores revelaram o estabelecimento de resistência à leptina placentária em resposta a hiperleptinemia no contexto de obesidade (17, 77, 205), como vimos em nosso estudo no tecido adiposo.

Com relação à adiponectina, nós demonstramos que a face materna de mães obesas apresentou menores concentrações quando comparadas às eutróficas e sem diferenças na parte fetal. Curiosamente, a obesidade materna já foi associada com uma expressão mais baixa de RNAm de receptor de adiponectina (ADIPR1) no lado materno da placenta e menor expressão desse mesmo receptor em todo o tecido placentário (61). Dessa forma, nossos achados sugerem que essas diferenças nas concentrações podem ser de consequências funcionais pela regulação negativa dos sinais biológicos transmitidos pelos receptores de adiponectina na placenta de mulheres obesas.

Sobre as outras citocinas estudadas (TNF, IL-6, IL-10 e resistina) não encontramos estudos que demonstrassem as concentrações dessas nas faces placentárias, nem tão pouco a variação (retenção) delas entre as faces da placenta. Assim, nossos resultados abrem caminhos para novas pesquisas nessa área. Já foi demonstrado que a face materna é responsiva ao ambiente sistêmico materno (62, 64) e que a liberação de citocinas na face fetal é menor do que no lado materno (206). Ainda, foi demonstrado que concentrações de TNF mantêm-se inalteradas em situações com perfusão normal da placenta (206-208). Entretanto, sob estímulo de LPS, o tecido placentário a termo é mais responsivo, com maior liberação de TNF para a circulação fetal (206). Diante desses estudos, podemos sugerir que a inflamação subclínica característica da obesidade materna, processo inflamatório similar ao estímulo por LPS, evidentemente que resguardando as proporções, pode interferir nas concentrações das citocinas nas faces materna e fetal e, por este motivo, vimos maior responsividade na face materna que na fetal.

Sabendo que a obesidade materna resulta da interação de fatores genéticos e ambientais que culmina em um estado de inflamação metabólica subclínica que envolve vários órgãos, incluindo a placenta e, por consequência, altera o fluxo de adipocinas e nutrientes na interface fetal (209), observamos baixas concentrações de adiponectina e maiores de leptina, TNF e IL-10 no soro do cordão umbilical. Sugerimos que o estado inflamatório associado a obesidade materna pode modular a expressão gênica específica no sangue materno e no cordão umbilical (179), bem como transferir a inflamação da mãe para o feto (170).

Corroborando aos nossos resultados, genes de IL-6 e TNF foram mais expressos no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos filhos de mães com sobrepeso/obesidade quando comparados com os de mães com peso normal (179). Ainda, um estudo demonstrou que macrófagos neonatais do cordão umbilical de mulheres obesas, desenvolveram um fenótipo regulatório com elevadas concentrações de IL-10 e IL-4, em resposta a elevadas concentrações de TNF (210). E, diante desse contexto, também já foi relatado que a obesidade materna prediz elevadas concentrações de TNF, IL-6 e PCR no sangue do cordão umbilical (211).

Ainda, elevadas concentrações de leptina no cordão umbilical de crianças nascidas de mães obesas também já foi descrito (188, 189, 210, 212-214). E, embora relatamos baixas concentrações de adiponectina no cordão umbilical de filhos de mães obesas, outros estudos não encontraram diferenças nas concentração de adiponectina no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com peso normal, sobrepeso e mães obesas (187, 213, 215, 216). No entanto, o fato é que a menor expressão de adiponectina inibe a via de sinalização da insulina e o transporte de aminoácidos na placenta, o que afeta a transferência de nutrientes para o feto e, subsequentemente, altera o perfil inflamatório e metabólico do neonato (217), como visto em nosso estudo, um perfil pró-inflamatório sistêmico e local com maior glicemia capilar nos filhos das mães com obesidade.

Estudos experimentais mostraram que dietas obesogênicas induzem à resistência à insulina materna e aumentam as concentrações de glicose no sangue fetal, levando à acelerada maturação das células  $\beta$  pancreáticas e tolerância à glicose prejudicada na prole (6). Ainda, a hiperglicemia materna regula negativamente a expressão de GLUT 1 e também induz a translocação de GLUT 1 da membrana plasmática para o interior da célula, o que, portanto, torna menos moléculas desse transportador de glicose disponíveis para transporte e, consequentemente, maior oferta de glicose para o feto (56). Ainda, a

placenta é sensível à hiperglicemia materna e isso resulta em maior suprimento e exposição fetal à glicose (31). Dessa forma, uma vez que a resistência à insulina materna está associada ao fluxo de glicose para o feto e disfunção das células beta, a hiperglicemia materna leva à hiperglicemia fetal, o que corrobora com os nossos resultados (74, 218).

Embora as mulheres obesas possam dar à luz a neonatos com peso normal como visto em nosso estudo, um efeito de programação fetal pode revelar-se mais tarde na vida, especialmente se elevações na glicemia já são demonstradas (6). A partir disso, podemos sugerir que filhos de mães obesas são programados a resistência à insulina ao nascimento.

Alguns estudos anteriores encontraram que os filhos de mães obesas têm maior peso, massa gorda e acúmulo de gordura abdominal ao nascimento (219, 220), enquanto outros relatam restrição de crescimento intrauterino em filhos de mulheres com obesidade (221). Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas nas medidas antropométricas neonatais e essa diferença de resultados na literatura pode ser explicada pela eficiência da função placentária (222), assim como pela plasticidade (42).

Estudo já demonstrou que a eficiência placentária (um índice do desenvolvimento da unidade feto-placentária durante a gravidez) foi menor no grupo de obesas do que no grupo de eutróficas (223). Além disso, estudo recente mostrou que a obesidade materna é especificamente associada à maior adiposidade na prole, sem afetar o peso ao nascer (224). Ainda, a placenta pode adaptar a expressão dos transportadores a fim de equilibrar a demanda fetal de acordo com o fluxo excessivo de nutrientes da mãe no contexto da obesidade. Sabe-se que o transporte de nutriente placentário depende do tamanho da placenta, forma (superfície, área da zona de troca e espessura do tecido), nutriente capacidade / disponibilidade do transportador e fluxos de sangue útero e fetal da placenta (225).

De toda forma, é importante ressaltarmos que diferentes fatores podem justificar a amplitude dos resultados entre os estudos observados e os nossos resultados. São reconhecidos distintos fatores que podem modular o crescimento fetal, como produção de citocinas, distribuição de gordura corporal materna (180), dieta materna (226), perfil genético (89), disponibilidade de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento placentário (112). Assim, são esperadas variações interindividuais significativas destes fatores. Por este motivo, além da avaliação do perfil inflamatório em diferentes compartimentos materno-fetais, buscamos analisar os polimorfismos nos genes FTO (rs9939609) e MC4R (rs17782313) associados a obesidade.

Em nosso estudo, não encontramos influência do alelo de risco FTO (rs9939609) materno e neonatal para nas condições antropométricas e bioquímicas do neonato. Estudos anteriores encontraram que recém-nascidos de mães portadoras de alelo de risco A apresentavam menor IMC e menor área muscular do braço (12), assim como menor glicose, insulina e HOMA-IR (16) do que recém-nascidos de mães com genótipo TT. Também já foi demonstrado que recém-nascidos portadores de alelos de risco AA/AT, treze dias após o nascimento, apresentavam maior ganho de massa gorda quando comparados com aqueles com alelos TT (16).

Pode-se ressaltar que diferenças entre nossos resultados e os anteriores podem ser explicadas pela presença de fatores que podem interferir no desfecho gestacional independentemente do genótipo, como características das populações, etnia, condições socioeconômicas, idade, consumo alimentar (128, 227), atividade física (228), perfil inflamatório dentre outros. É sabido que a susceptibilidade individual para a obesidade é resultado de combinações de fatores comportamentais, ambientais e genéticos (229, 230). Dessa forma, já foi encontrado que a presença do alelo A de FTO rs9939609 em neonatos está associado a um IMC mais baixo, porém, mudanças ocorrem posteriormente e após os 5 anos, o mesmo alelo é associado a um maior IMC (130). Dessa forma, apesar de não termos visto impacto no peso ao nascer, ao longo dos anos, esses neonatos ainda podem desenvolver alterações antropométricas especialmente se fatores ambientais forem associados.

Estudos ainda são escassos quando se trata do impacto do alelo de risco materno para MC4R (17782313) nas características antropométricas neonatais e diferentemente dos nossos resultados que a presença do alelo de risco materno reduziu o peso do neonato ao nascer; um único estudo encontrado, não relatou resultado significativo do alelo materno nas características neonatais (150). Entretanto, os autores observaram valores mais altos de área muscular do braço em recém-nascidos com o genótipo do tipo selvagem para MC4R rs17782313 (150), enquanto no nosso estudo não encontramos efeito do alelo de risco neonatal.

O SNP em MC4R (rs17782313) exerce efeitos no metabolismo por meio do consumo alimentar (148, 170) e já foi demonstrado sua associação com a obesidade infantil e com a programação metabólica da obesidade em estudos experimentais (146). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que a associação do SNP em MC4R (rs17782313) nos parâmetros relacionados à obesidade fortalecem-se com a idade pois foi observado que na infância as menores dobras cutâneas foram encontradas naquelas



sem o alelo de risco e que na idade adulta a maior probabilidade de desenvolver obesidade e síndrome metabólica foi naqueles que apresentavam o genótipo CT/CC (145).

Apesar dos estudos não avaliarem o impacto do alelo de risco materno nesses estudos, nós identificamos que os filhos de mães com o alelo apresentavam menor peso ao nascer, nos fazendo supor que a presença desse alelo possa ser mais um dos fatores que possa interferir na programação fetal, com impacto no peso ao nascer. Ainda, embora o alelo neonatal não tenha demonstrado efeito sobre as características da criança, sabemos que o efeito desse polimorfismo pode ser ao longo da vida, especialmente após a introdução alimentar (145).

## 8 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o SNP no gene FTO (rs9939609), mas não no gene MC4R (rs17782313) foi associado ao peso e ao IMC pré-gestacional materno, assim como chances de sobrepeso e obesidade quando comparadas aquelas sem o alelo de risco. Em função dessas mães começarem a gestação com excesso de adiposidade, elas apresentam nesse percurso resistência à insulina, associada a um ambiente pró-inflamatório sistêmico e local que afeta o ambiente placentário e, conseqüentemente, impacta na programação metabólica do neonato, uma vez que vimos que os filhos das mães com obesidade apresentaram maiores concentrações de glicemia capilar.

No que tange as características neonatais, percebemos que o polimorfismo no gene MC4R (17782313) materno, mas não o FTO (rs9939609) foi associado com menor peso ao nascer enquanto que os SNPs neonatais não impactaram nas características neonatais no momento do parto.

Dessa forma, nosso estudo apontou o papel do polimorfismo FTO (rs9939609) e no risco de excesso de adiposidade pré-gestacional e do MC4R (17782313) e suas possíveis repercussões nas condições do neonato ao nascer.

## 8. REFERENCIAL TEÓRICO

A, B.; A, B.; N, M.; A, E. *et al.* Mechanisms of Adiponectin Action in Fertility: An Overview from Gametogenesis to Gestation in Humans and Animal Models in Normal and Pathological Conditions. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 7, 03/27/2019 2019.

A, B.; KM, S.; A, N.; NS, M. *et al.* Serum adiponectin levels in gestational diabetes mellitus. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, 20, n. 6, Nov-Dec 2016 2016.

A, E.; A, B.; M, R.; C, R. *et al.* Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 18, 09/09/2019 2019.

A, F.; N, F.; C, J.; MT, P. *et al.* Resistin in pregnancy: Analysis of determinants in pairs of umbilical cord blood and maternal serum. **Cytokine: X**, 3, n. 2, 06/04/2021 2021.

A, R.; A, S.; V, K.; V, L. *et al.* Associations of MC4R, LEP, and LEPR Polymorphisms with Obesity-Related Parameters in Childhood and Adulthood. **Genes**, 12, n. 6, 06/21/2021 2021.

A, R.; RS, T.; JM, T.; D, F. *et al.* Risk factors for excessive gestational weight gain in a healthy, nulliparous cohort. **Journal of obesity**, 2014, 2014 2014.

A, S.-M.; M, D.; K, D.; S, G. *et al.* TNF-alpha gene polymorphism and fetal Doppler velocimetry in intrauterine growth restriction. **Neuro endocrinology letters**, 29, n. 4, 2008 Aug 2008.

AL, H.; L, A.; L, C.; BL, H. *et al.* A variant in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) and variants near the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) do not influence dietary intake. **The Journal of nutrition**, 140, n. 4, 2010 Apr 2010.

ALMEIDA, S. M.; FURTADO, J. M.; MASCARENHAS, P.; FERRAZ, M. E. *et al.* Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2 polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children. **Endocrine**, 60, n. 3, p. 466-478, Jun 2018.

ARRIZABALAGA, M.; LARRARTE, E.; MARGARETO, J.; MALDONADO-MARTIN, S. *et al.* Preliminary findings on the influence of FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 polymorphisms on resting energy expenditure, leptin and thyrotropin levels in obese non-morbid premenopausal women. **J Physiol Biochem**, 70, n. 1, p. 255-262, Mar 2014.

ATALAH SAMUR, E.; CASTILLO L., C.; CASTRO SANTORO, R.; ALDEA P., A. Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. 1997 1997.

AVCI, M. E.; SANLIKAN, F.; CELIK, M.; AVCI, A. *et al.* Effects of maternal obesity on antenatal, perinatal and neonatal outcomes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, 28, n. 17, p. 2080-2083, 2015.

AYE, I. L.; LAGER, S.; RAMIREZ, V. I.; GACCIOLI, F. *et al.* Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. **Biol Reprod**, 90, n. 6, p. 129, Jun 2014.

AYE, I. L.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? **Placenta**, 34 Suppl, p. S40-45, Mar 2013.

AYERS, K. L.; GLICKSBERG, B. S.; GARFIELD, A. S.; LONGERICH, S. *et al.* Melanocortin 4 Receptor Pathway Dysfunction in Obesity: Patient Stratification Aimed at MC4R Agonist Treatment. **J Clin Endocrinol Metab**, 103, n. 7, p. 2601-2612, Jul 1 2018.

AZAIS, H.; LEROY, A.; GHESQUIERE, L.; DERUELLE, P. *et al.* Effects of adipokines and obesity on uterine contractility. **Cytokine Growth Factor Rev**, 34, p. 59-66, Apr 2017.

B, C.; S, P.; Y, K.; K, C. *et al.* Maternal obesity alters uterine NK activity through a functional KIR2DL1/S1 imbalance. **Immunology and cell biology**, 96, n. 8, 2018 Sep 2018.

B, H.; H, B.; S, M.; M, F.-T. *et al.* Is parity a risk factor for excessive weight gain during pregnancy and postpartum weight retention? A systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, 18, n. 7, 2017 Jul 2017.

BALDINI, G.; PHELAN, K. D. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. **J Endocrinol**, 241, n. 1, p. R1-r33, Apr 1 2019.

BARTON, S. J.; MOSQUERA, M.; CLEAL, J. K.; FULLER, A. S. *et al.* Relation of FTO gene variants to fetal growth trajectories: Findings from the Southampton Women's survey. **Placenta**, 38, p. 100-106, Feb 2016.

BASSOLS, J.; PRATS-PUIG, A.; VAZQUEZ-RUIZ, M.; GARCIA-GONZALEZ, M. M. *et al.* Placental FTO expression relates to fetal growth. **Int J Obes (Lond)**, 34, n. 9, p. 1365-1370, Sep 2010.

BE, M.; LP, L.; AR, D.; ER, T. *et al.* Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **The New England journal of medicine**, 358, n. 19, 05/08/2008 2008.

BRETT, K. E.; FERRARO, Z. M.; YOCKELL-LELIEVRE, J.; GRUSLIN, A. *et al.* Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. **Int J Mol Sci**, 15, n. 9, p. 16153-16185, Sep 12 2014.

BRIANA, D. D.; MALAMITSI-PUCHNER, A. Developmental origins of adult health and disease: The metabolic role of BDNF from early life to adulthood. **Metabolism**, 81, p. 45-51, Apr 2018.

C, A.-J.; KD, M. Obesity Epidemiology Worldwide. **Gastroenterology clinics of North America**, 45, n. 4, 2016 Dec 2016.

C, B.; E, T.; M, C.; C, M. *et al.* The role of obesity and gestational diabetes on placental size and fetal oxygenation. **Placenta**, 103, 01/01/2021 2021.

C, C.; X, X.; Y, Y. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. **PloS one**, 13, n. 8, 08/09/2018 2018.

C, C.-M.; CF, M.; KM, L.; S, N.-C. *et al.* Physical activity attenuates the effect of the FTO genotype on obesity traits in European adults: The Food4Me study. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 24, n. 4, 2016 Apr 2016.

C, K.; PHC, D. F.; MF, M. Association between FTO gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, 30, n. 5, 2018 Sep 2018.

C, M.; CO, M.; M, I.; LE, M. *et al.* MC4R and ENPP1 gene polymorphisms and their implication in maternal and neonatal risk for obesity. **Scientific reports**, 9, n. 1, 07/26/2019 2019.

C, P.; M, P.; CA, P.; AM, R. *et al.* Leptin as a key regulator of the adipose organ. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, 09/14/2021 2021.

C, P.; S, D.; B, J.; N, M. *et al.* Adiponectin as a Potential Biomarker for Pregnancy Disorders. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 3, 01/29/2021 2021.

C, R.; CO, M.; LE, M.; A, H. *et al.* Gestational obesity and subclinical inflammation: The pathway from simple assessment to complex outcome (STROBE-compliant article). **Medicine**, 100, n. 20, 05/21/2021 2021.

CALLEGARI, S. B. M.; UFTM, U. F. D. T. M.; RESENDE, E. A. M. R. D.; UFTM, U. F. D. T. M. *et al.* Obesidade e fatores de risco cardiometabólicos durante a gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 36, p. 449-455, 2021.

CARVALHO, E. A. D. A.; SIMÃO, M. T. J.; FONSECA, M. C.; ANDRADE, R. G. D. *et al.* Obesity: epidemiological aspects and prevention. 03/2013 2013.

CASTRO, N. P.; EUCLYDES, V. V.; SIMOES, F. A.; VAZ-DE-LIMA, L. R. *et al.* The Relationship between Maternal Plasma Leptin and Adiponectin Concentrations and Newborn Adiposity. **Nutrients**, 9, n. 3, Feb 23 2017.

CATALAN, V.; GOMEZ-AMBROSI, J.; RODRIGUEZ, A.; FRUHBECK, G. Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity. **Histol Histopathol**, 27, n. 12, p. 1515-1528, Dec 2012.

CECIL, J. E.; TAVENDALE, R.; WATT, P.; HETHERINGTON, M. M. *et al.* An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. **N Engl J Med**, 359, n. 24, p. 2558-2566, Dec 11 2008.

CM, F.; MC, P. R.; K, G.; T, U. *et al.* Adiposity-related inflammation: effects of pregnancy. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 21, n. 1, 2013 Jan 2013.

COLLABORATION, N. R. F. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet (London, England)**, 387, n. 10026, 04/02/2016 2016.

CORDERO, P.; LI, J.; NGUYEN, V.; POMBO, J. *et al.* Developmental Programming of Obesity and Liver Metabolism by Maternal Perinatal Nutrition Involves the Melanocortin System. **Nutrients**, 9, n. 9, Sep 20 2017.

D, A.; E, S.; R, R.-L.; L, M. *et al.* Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. **Molecular genetics and genomics : MGG**, 290, n. 4, 2015 Aug 2015.

DAHER, S.; MATTAR, R. Pregnancy: an immunological phenomenon? 2009 2009.

DC, C.; R, S.; MH, D. A. B. Obesity and weight change related to parity and breast-feeding among parous women in Brazil. **Public health nutrition**, 4, n. 4, 2001 Aug 2001.

DE LUIS, D. A.; ALLER, R.; IZAOLA, O.; PRIMO, D. *et al.* Association of the rs9939609 gene variant in FTO with insulin resistance, cardiovascular risk factor and serum adipokine levels in obese patients. **Nutr Hosp**, 33, n. 5, p. 573, Sep 20 2016.

DEN HOED, M.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; BOUWMAN, F. G.; MARIMAN, E. C. *et al.* Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. **Am J Clin Nutr**, 90, n. 5, p. 1426-1432, Nov 2009.

DESOYE, G.; GAUSTER, M.; WADSACK, C. Placental transport in pregnancy pathologies. **Am J Clin Nutr**, 94, n. 6 Suppl, p. 1896s-1902s, Dec 2011.

DJ, L.; JT, B.; AL, S.; DH, G. *et al.* Associations of maternal weight status prior and during pregnancy with neonatal cardiometabolic markers at birth: the Healthy Start study. **International journal of obesity (2005)**, 39, n. 10, 2015 Oct 2015.

DOUGKAS, A.; YAQOUB, P.; GIVENS, D. I.; REYNOLDS, C. K. *et al.* The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. **Br J Nutr**, 110, n. 6, p. 1151-1156, Sep 28 2013.

DRAKE, A. J.; REYNOLDS, R. M. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. **Reproduction**, 140, n. 3, p. 387-398, Sep 2010.

DUTTON, H.; BORENGASSER, S. J.; GAUDET, L. M.; BARBOUR, L. A. *et al.* Obesity in Pregnancy: Optimizing Outcomes for Mom and Baby. **Med Clin North Am**, 102, n. 1, p. 87-106, Jan 2018.

E, H.; P, L.; BM, S. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **The Journal of biological chemistry**, 271, n. 18, 05/03/1996 1996.

E, R.; J, Z.; N, M.; AP, B. *et al.* Gestational weight gain outside the Institute of Medicine recommendations and adverse pregnancy outcomes: analysis using individual participant data from randomised trials. **BMC pregnancy and childbirth**, 19, n. 1, 09/02/2019 2019.

E, S.; GM, B.; RL, S.; J, D. Gene expression of placental hormones regulating energy balance in small for gestational age neonates. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, 142, n. 1, 2009 Jan 2009.

EA, A.-G.; LA, F.; WKBA, O.; A, C. *et al.* The role of adiponectin in placentation and preeclampsia. **Cell biochemistry and function**, 38, n. 1, 2020 Jan 2020.

EE, K.; JS, F. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 89, n. 6, 2004 Jun 2004.

EE, Y.; C, B.; E, S.; MA, A. The Role of Umbilical Cord Blood Concentration of IGF-I, IGF-II, Leptin, Adiponectin, Ghrelin, Resistin, and Visfatin in Fetal Growth. **American journal of perinatology**, 36, n. 6, 2019 May 2019.

EL-WAKKAD, A.; HASSAN NEL, M.; SIBAIL, H.; EL-ZAYAT, S. R. Proinflammatory, anti-inflammatory cytokines and adiponkines in students with central obesity. **Cytokine**, 61, n. 2, p. 682-687, Feb 2013.

F, C.-Z.; V, A.-J.; G, S.-C.; P, C. *et al.* IL-10 expression in macrophages from neonates born from obese mothers is suppressed by IL-4 and LPS/INF $\gamma$ . **Journal of cellular physiology**, 232, n. 12, 2017 Dec 2017.

F, P.; R, M.; VM, S.; I, C. Maternal Low-Grade Chronic Inflammation and Intrauterine Programming of Health and Disease. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 4, 02/09/2021 2021.

FARIAS, D. R.; POSTON, L.; FRANCO-SENA, A. B.; MOURA DA SILVA, A. A. *et al.* Maternal lipids and leptin concentrations are associated with large-for-gestational-age births: a prospective cohort study. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 804, Apr 11 2017.



FAROOQI, I. S.; KEOGH, J. M.; YEO, G. S.; LANK, E. J. *et al.* Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. **N Engl J Med**, 348, n. 12, p. 1085-1095, Mar 20 2003.

FM, S.; DJ, F.; JE, R.; IA, G. *et al.* Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 92, n. 3, 2007 Mar 2007.

FRANCISQUELI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORREA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, n. 1, p. 81-89, 2015 2015.

FRAYLING, T. M.; TIMPSON, N. J.; WEEDON, M. N.; ZEGGINI, E. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, 316, n. 5826, p. 889-894, May 11 2007.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; BUKHARI, A.; IKUTANI, M. *et al.* Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. **Diabetes**, 58, n. 11, p. 2574-2582, Nov 2009.

G, F.; AM, C.; T, B.; F, R. *et al.* Leptin and paraoxonase activity in cord blood from obese mothers. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, 27, n. 13, 2014 Sep 2014.

G, F.; V, C.; A, R.; J, G.-A. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. **Adipocyte**, 7, n. 1, 01/02/2018 2018.

G, H.; A, A.; O, S.; E, S. *et al.* Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by term and preterm human placenta. **Journal of reproductive immunology**, 74, n. 1-2, 2007 Jun 2007.

GAILLARD, R.; DURMUS, B.; HOFMAN, A.; MACKENBACH, J. P. *et al.* Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. **Obesity (Silver Spring)**, 21, n. 5, p. 1046-1055, May 2013.

GAMBINO, Y. P.; MAYMO, J. L.; PEREZ PEREZ, A.; CALVO, J. C. *et al.* Elsevier Trophoblast Research Award lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen

functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *In: Placenta*. Netherlands: Copyright (c) 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved., 2012. v. 33 Suppl, p. S63-70.

GARCIA-SOLIS, P.; REYES-BASTIDAS, M.; FLORES, K.; GARCIA, O. P. *et al.* Fat mass obesity-associated (FTO) (rs9939609) and melanocortin 4 receptor (MC4R) (rs17782313) SNP are positively associated with obesity and blood pressure in Mexican school-aged children. **Br J Nutr**, p. 1-7, Nov 10 2016.

GESTEIRO, E.; SANCHEZ-MUNIZ, F. J.; ORTEGA-AZORIN, C.; GUILLEN, M. *et al.* Maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism affect insulin sensitivity markers and lipoprotein profile at birth in appropriate-for-gestational-age term neonates. **J Physiol Biochem**, 72, n. 2, p. 169-181, Jun 2016.

GL, W.; SV, S. Genetic instrumental variable studies of effects of prenatal risk factors. **Biodemography and social biology**, 59, n. 1, 2013 2013.

GOLLISCH, K. S.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N.; TOYODA, T. *et al.* Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 297, n. 2, p. E495-504, Aug 2009.

GRAFF, M.; NGWA, J. S.; WORKALEMAHU, T.; HOMUTH, G. *et al.* Genome-wide analysis of BMI in adolescents and young adults reveals additional insight into the effects of genetic loci over the life course. **Hum Mol Genet**, 22, n. 17, p. 3597-3607, Sep 1 2013.

GS, H.; NS, S.; BM, S. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, 259, n. 5091, 01/01/1993 1993.

H, L.; TO, K.; C, L.; J, Z. *et al.* Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. **Diabetologia**, 55, n. 4, 2012 Apr 2012.

H, M.; Y, O.; N, S.; K, H. *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature medicine**, 3, n. 9, 1997 Sep 1997.

H, W.; P, T. Endocrine functions of adipose tissue. **Annual review of pathology**, 2, 2007 2007.

HAMPE, J.; WOLLSTEIN, A.; LU, T.; FREVEL, H.-J. *et al.* An integrated system for high throughput TaqMan™ based SNP genotyping. **Bioinformatics**, 17, n. 7, p. 654-655, 2001.

HD, M.; AM, C.; LK, C.; DM, C. *et al.* Hormonal and metabolic factors associated with variations in insulin sensitivity in human pregnancy. **Diabetes care**, 33, n. 2, 2010 Feb 2010.

HOUDE, A. A.; LEGARE, C.; BIRON, S.; LESCELLEUR, O. *et al.* Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. **BMC Med Genet**, 16, p. 29, May 1 2015.

HOWELL, K. R.; POWELL, T. L. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. **Reproduction**, 153, n. 3, p. R97-r108, Mar 2017.

HULL, H. R.; THORNTON, J. C.; JI, Y.; PALEY, C. *et al.* Higher infant body fat with excessive gestational weight gain in overweight women. **Am J Obstet Gynecol**, 205, n. 3, p. 211.e211-217, Sep 2011.

HWANG, Y.-C.; FUJIMOTO, W. Y.; HAYASHI, T.; KAHN, S. E. *et al.* Increased Visceral Adipose Tissue Is an Independent Predictor for Future Development of Atherogenic Dyslipidemia. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2015-3246>, 2015-12-04 2015. research-article.

I, L.; JR, R.; FB, O.; F, G. *et al.* Body size at birth modifies the effect of fat mass and obesity associated (FTO) rs9939609 polymorphism on adiposity in adolescents: the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence (HELENA) study. **The British journal of nutrition**, 107, n. 10, 2012 May 2012.

IL, A.; S, L.; VI, R.; F, G. *et al.* Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. **Biology of reproduction**, 90, n. 6, 2014 Jun 2014.

J, C.; B, T.; E, K.; S, Z. *et al.* Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. **Diabetologia**, 49, n. 6, 2006 Jun 2006.

J, D.; E, M. Maternal obesity and developmental programming of neuropsychiatric disorders: An inflammatory hypothesis. **Brain and neuroscience advances**, 5, 04/08/2021 2021.

J, L.; JC, C.; M, G.-M.; M, C. *et al.* Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 86, n. 6, 2001 Jun 2001.

J, O.; AI, R.; M, G.-C.; R, L. *et al.* Influence of FTO variants on obesity, inflammation and cardiovascular disease risk biomarkers in Spanish children: a case-control multicentre study. **BMC medical genetics**, 14, 12/01/2013 2013.

J, Y.; D, W.; C, Z.; T, Y. *et al.* Macrophage IRX3 promotes diet-induced obesity and metabolic inflammation. **Nature immunology**, 22, n. 10, 2021 Oct 2021.

JC, C.; S, B.; T, B.; J, M. *et al.* Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, 29, n. 3, 2008 Mar 2008.

JE, R.; WR, F.; L, C.; AM, W. *et al.* Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 87, n. 9, 2002 Sep 2002.

JF, P.; JL, S.; PN, B.; CM, R. *et al.* The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **International journal of molecular sciences**, 19, n. 11, 10/26/2018 2018.

JIA, J. J.; ZHANG, X.; GE, C. R.; JOIS, M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. **Obes Rev**, 10, n. 5, p. 519-526, Sep 2009.

JIAO, Y.; ZHANG, J.; LU, L.; XU, J. *et al.* The Fto Gene Regulates the Proliferation and Differentiation of Pre-Adipocytes in Vitro. **Nutrients**, 8, n. 2, p. 102, Feb 19 2016.

JK, N.; S, M.-T.; R, R.; JP, K. *et al.* Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. **Journal of perinatal medicine**, 35, n. 6, 2007 2007.

JL, B.; R, R.-C.; R, C.-D. Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, 82, n. 12, 2003 Dec 2003.

JL, J.; DM, Z.; AW, R.; BE, M. Maternal leptin predicts adiposity of the neonate. **Hormone research in paediatrics**, 81, n. 1, 2014 2014.

JOSEFSON, J. L.; SIMONS, H.; ZEISS, D. M.; METZGER, B. E. Excessive gestational weight gain in the first trimester among women with normal glucose tolerance and resulting neonatal adiposity. **J Perinatol**, 36, n. 12, p. 1034-1038, Dec 2016.

JOSEFSON, J. L.; ZEISS, D. M.; RADEMAKER, A. W.; METZGER, B. E. Maternal leptin predicts adiposity of the neonate. **Horm Res Paediatr**, 81, n. 1, p. 13-19, 2014.

JP, K.; S, H.-D. M.; J, L.; JC, C. *et al.* TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. **Diabetes**, 51, n. 7, 2002 Jul 2002.

JR, A.; A, C.-B.; C, R.; E, K. *et al.* Gestational diabetes mellitus decreases placental uptake of long-chain polyunsaturated fatty acids: involvement of long-chain acyl-CoA synthetase. **The Journal of nutritional biochemistry**, 24, n. 10, 2013 Oct 2013.

JT, K.; B, B.; S, G.; G, B. *et al.* Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, 42, n. 1, 2003 Jul 2003.

K, E.; A, P.; C, D. P.; G, G. *et al.* Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. **JAMA**, 289, n. 14, 04/09/2003 2003.

K, G.; K, F.; M, A.; M, O. *et al.* Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review]. **Endocrine journal**, 64, n. 4, 04/29/2017 2017.

K, L.; A, M.; R, S.; WF, B. *et al.* Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 85, n. 11, 2000 Nov 2000.

K, Y.; L, L.; L, Z.; L, G. *et al.* Association between MC4R rs17782313 genotype and obesity: A meta-analysis. **Gene**, 733, 04/05/2020 2020.

KA, M.; D, O. N.; A, J.; FP, A. Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. **Diabetes/metabolism research and reviews**, 22, n. 2, Mar-Apr 2006 2006.

KALANTARI, N.; DOAEI, S.; KESHAVARZ-MOHAMMADI, N.; GHOLAMALIZADEH, M. *et al.* Review of studies on the fat mass and obesity-

associated (FTO) gene interactions with environmental factors affecting on obesity and its impact on lifestyle interventions. **ARYA Atheroscler**, 12, n. 6, p. 281-290, Nov 2016.

KARRA, E.; O'DALY, O. G.; CHOUDHURY, A. I.; YOUSSEIF, A. *et al.* A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *In: J Clin Invest*, 2013. v. 123, p. 3539-3551.

KHALILITEHRANI, A.; QORBANI, M.; HOSSEINI, S.; PISHVA, H. The association of MC4R rs17782313 polymorphism with dietary intake in Iranian adults. **Gene**, 563, n. 2, p. 125-129, Jun 01 2015.

KM, R.; AL, Y. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. 2009 2009.

KM, U.; DB, C.; J, T.; TM, W. *et al.* Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. **Diabetologia**, 48, n. 11, 2005 Nov 2005.

KRISHNAN, M.; THOMPSON, J. M. D.; MITCHELL, E. A.; MURPHY, R. *et al.* Analysis of association of gene variants with obesity traits in New Zealand European children at 6 years of age. **Mol Biosyst**, 13, n. 8, p. 1524-1533, Jul 25 2017.

KROLL, J. E.; SOUZA, S. J. D. Exploring the Complexity of Human Transcriptome. 2013-12-12 2013. text.

KUO, F. C.; HUANG, Y. H.; LIN, F. H.; HUNG, Y. J. *et al.* Circulating Soluble IL-6 Receptor Concentration and Visceral Adipocyte Size Are Related to Insulin Resistance in Taiwanese Adults with Morbid Obesity. **Metab Syndr Relat Disord**, 15, n. 4, p. 187-193, May 2017.

KURYSZKO, J.; SLAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Pol J Vet Sci**, 19, n. 2, p. 441-446, 2016.

L, B.; A, F.; TE, V.; ML, H. *et al.* Association of Maternal Prepregnancy Body Mass Index With Placental Histopathological Characteristics in Uncomplicated Term Pregnancies. **Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society**, 22, n. 1, Jan-Feb 2019 2019.

L, H.; P, T.; D, A.; P, F. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. **Clinical endocrinology**, 47, n. 1, 1997 Jul 1997.

LAGER, S.; JANSSON, T.; POWELL, T. L. Differential regulation of placental amino acid transport by saturated and unsaturated fatty acids. **Am J Physiol Cell Physiol**, 307, n. 8, p. C738-744, Oct 15 2014.

LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. **J Pregnancy**, 2012, p. 179827, 2012.

LAMAS, B.; GONCALVES-MENDES, N.; NACHAT-KAPPES, R.; ROSSARY, A. *et al.* Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells. **J Cell Physiol**, 228, n. 6, p. 1202-1209, Jun 2013.

LAWLOR, D. A.; FRASER, A.; MACDONALD-WALLIS, C.; NELSON, S. M. *et al.* Maternal and offspring adiposity-related genetic variants and gestational weight gain. **Am J Clin Nutr**, 94, n. 1, p. 149-155, Jul 2011.

LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY, M. L.; GONZALEZ-DOMINGUEZ, M. I.; ZAINA, S.; SABANERO, M. *et al.* Leptin and its Receptors in Human Placenta of Small, Adequate, and Large for Gestational Age Newborns. **Horm Metab Res**, 49, n. 5, p. 350-358, May 2017.

LEITE, M. C.; FRÓES, F. C. T. D. S. Obesidade : um enfoque na inflamação periférica e central. 2012 2012. Trabalho de conclusão de graduação.

LEKVA, T.; ROLAND, M. C. P.; MICHELSEN, A. E.; FRIIS, C. M. *et al.* Large Reduction in Adiponectin During Pregnancy Is Associated With Large-for-Gestational-Age Newborns. **J Clin Endocrinol Metab**, 102, n. 7, p. 2552-2559, Jul 1 2017.

LI, Y.; WANG, Y.; DING, X.; DUAN, B. *et al.* Serum Levels of TNF-alpha and IL-6 Are Associated With Pregnancy-Induced Hypertension. **Reprod Sci**, 23, n. 10, p. 1402-1408, Oct 2016.

LM, C.; K, P. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: effects of maternal body mass index. **Cytokine**, 70, n. 2, 2014 Dec 2014.

LOAIZA, S.; COUSTASSE, A.; URRUTIA-ROJAS, X.; ATALAH, E. Birth weight and obesity risk at first grade in a cohort of Chilean children. **Nutr Hosp**, 26, n. 1, p. 214-219, Jan-Feb 2011.

LOCKE, A. E.; KAHALI, B.; BERNDT, S. I.; JUSTICE, A. E. *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, 518, n. 7538, p. 197, 2015-02-11 2015. Research.

LOGAN, C. A.; BORNEMANN, R.; KOENIG, W.; REISTER, F. *et al.* Gestational Weight Gain and Fetal-Maternal Adiponectin, Leptin, and CRP: results of two birth cohorts studies. **Sci Rep**, 7, p. 41847, Feb 2 2017.

LOLMEDE, K.; DUFFAUT, C.; ZAKAROFF-GIRARD, A.; BOULOUMIE, A. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. **Diabetes Metab**, 37, n. 4, p. 283-290, Sep 2011.

LOOS, R. J.; LINDGREN, C. M.; LI, S.; WHEELER, E. *et al.* Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. **Nat Genet**, 40, n. 6, p. 768-775, Jun 2008.

LOOS, R. J. F.; YEO, G. S. H. The bigger picture of. **Nature Reviews Endocrinology**, 10, n. 1, p. 51, 2013-11-19 2013. Reviews.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, n. 1, p. 265-275, Nov 1951.

M, A.; J, Z.; M, H.; K, C. *et al.* Maternal characteristics associated with gestational weight gain in France: a population-based, nationally representative study. **BMJ open**, 11, n. 7, 07/02/2021 2021.

M, B.; I, N.; L, D.; U, S. *et al.* Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 174, n. 9, 05/01/2005 2005.

M, L.; E, K.; MF, H. Maternal/fetal determinants of insulin resistance in women during pregnancy and in offspring over life. **Current diabetes reports**, 13, n. 2, 2013 Apr 2013.

M, L.; K, Y.; M, P.; GE, R. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. **The Journal of endocrinology**, 186, n. 3, 2005 Sep 2005.



M, M.; S, F.; A, D.; E, N. GDM-complicated pregnancies: focus on adipokines. **Molecular biology reports**, 10/15/2021 2021.

M, S.-P.; S, E. Y. S.; G, E.-G.; S, N.-S. *et al.* Maternal and Fetal Lipid and Adipokine Profiles and Their Association with Obesity. **International journal of endocrinology**, 2016, 2016 2016.

M, Y.; N, B.; H, D.; C, O. *et al.* Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, 25, n. 4, 2009 Apr 2009.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G.; PENDER, S. L. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. **Scand J Immunol**, 51, n. 1, p. 2-9, Jan 2000.

MARGINEAN, C.; MARGINEAN, C. O.; IANCU, M.; MELIT, L. E. *et al.* The FTO rs9939609 and LEPR rs1137101 mothers-newborns gene polymorphisms and maternal fat mass index effects on anthropometric characteristics in newborns: A cross-sectional study on mothers-newborns gene polymorphisms-The FTO-LEPR Study (STROBE-compliant article). **Medicine (Baltimore)**, 95, n. 49, p. e5551, Dec 2016.

MARTINS, M. C.; TRUJILLO, J.; FARIAS, D. R.; STRUCHINER, C. J. *et al.* Association of the FTO (rs9939609) and MC4R (rs17782313) gene polymorphisms with maternal body weight during pregnancy. **Nutrition**, 32, n. 11-12, p. 1223-1230, Nov-Dec 2016.

MARTINS, M. C.; TRUJILLO, J.; FREITAS-VILELA, A. A.; FARIAS, D. R. *et al.* Associations between obesity candidate gene polymorphisms (fat mass and obesity-associated (FTO), melanocortin-4 receptor (MC4R), leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR)) and dietary intake in pregnant women. **Br J Nutr**, 120, n. 4, p. 454-463, Aug 2018.

MCGILLICK, E. V.; LOCK, M. C.; ORGEIG, S.; MORRISON, J. L. Maternal obesity mediated predisposition to respiratory complications at birth and in later life: understanding the implications of the obesogenic intrauterine environment. **Paediatr Respir Rev**, 21, p. 11-18, Jan 2017.

MENG, Y.; GROTH, S. W.; LI, D. The Association between Obesity-Risk Genes and Gestational Weight Gain Is Modified by Dietary Intake in African American Women. **J Nutr Metab**, 2018, p. 5080492, 2018.

MK, O.; S, L.; HR, H.; WM, B. *et al.* Relationship of circulating adipokines to body composition in pregnant women. **Adipocyte**, 4, n. 1, 10/30/2014 2014.

MOBINI, M.; MORTAZAVI, M.; NADI, S.; ZARE-BIDAKI, M. *et al.* Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. **Iran J Basic Med Sci**, 19, n. 2, p. 119-124, Feb 2016.

MORAN, L. J.; FRASER, L. M.; SUNDERNATHAN, T.; DEUSSEN, A. R. *et al.* The effect of an antenatal lifestyle intervention in overweight and obese women on circulating cardiometabolic and inflammatory biomarkers: secondary analyses from the LIMIT randomised trial. **BMC Med**, 15, n. 1, p. 32, Feb 14 2017.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V. *et al.* IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **Int Immunol**, 11, n. 5, p. 803-811, May 1999.

MS, J.; SM, W.; Q, Y.; C, C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. **British journal of pharmacology**, 165, n. 3, 2012 Feb 2012.

MT, C.; K, O.; HM, G.; JM, P. *et al.* Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, 18, n. 11, 2001 Nov 2001.

MUHLHAUSLER, B. S.; GUGUSHEFF, J. R.; ONG, Z. Y.; VITHAYATHIL, M. A. Pregnancy, obesity and insulin resistance: maternal overnutrition and the target windows of fetal development. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 15, n. 1, p. 25-36, Sep 2013.

NAKANDAKARE, P.; NICOLETTI, C. F.; NORONHA, N. Y.; NONINO, C. B. *et al.* Associations between obesity-related gene expression in maternal and cord blood and newborn adiposity: findings from the Araraquara Cohort study. **International Journal of Obesity**, 45, n. 9, p. 1958-1966, 2021-05-17 2021. OriginalPaper.

NC, D.; EF, G.; MB, W.; SE, M. *et al.* Maternal Obesity Affects Inflammatory and Iron Indices in Umbilical Cord Blood. **The Journal of pediatrics**, 172, 2016 May 2016.

NGUYEN, L. T.; SAAD, S.; TAN, Y.; POLLOCK, C. *et al.* Maternal high-fat diet induces metabolic stress response disorders in offspring hypothalamus. **J Mol Endocrinol**, 59, n. 1, p. 81-92, Jul 2017.

NM, W.; YY, W.; CE, P.; JA, M. *et al.* Modelling BMI trajectories in children for genetic association studies. **PloS one**, 8, n. 1, 2013 2013.

O'REILLY, J. R.; REYNOLDS, R. M. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 78, n. 1, p. 9-16, Jan 2013.

OH, J.; LEE, H.; PARK, D.; AHN, J. *et al.* Ginseng and Its Active Components Ginsenosides Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells by Regulating MMP-2 and MMP-9. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012, p. 265023, 2012.

P, K.; V, G.; E, F.; E, P. *et al.* Maternal weight status, cord blood leptin and fetal growth: a prospective mother-child cohort study (Rhea study). **Paediatric and perinatal epidemiology**, 27, n. 5, 2013 Sep 2013.

P, N.; E, D. S.; H, J.; P, B. *et al.* Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta. **Clinical epigenetics**, 11, n. 1, 02/07/2019 2019.

P, O. T.-G.; L, P.; J, M.; S, H. D. *et al.* Sex-specific effects of maternal anthropometrics on body composition at birth. **American journal of obstetrics and gynecology**, 211, n. 3, 2014 Sep 2014.

PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **J Obes**, 2013, p. 616193, 2013.

PC, T.; P, H.; K, P.; E, M. *et al.* Circulating adipokines and mRNA expression in adipose tissue and the placenta in women with gestational diabetes mellitus. **Peptides**, 101, 2018 Mar 2018.

PJ, T.; J, D.; G, B.-G. Systemic and placental leptin and its receptors in pregnancies associated with obesity. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 22, n. 2, 2015 Feb 2015.

PLITMAN MAYO, R. Advances in Human Placental Biomechanics. **Comput Struct Biotechnol J**, 16, p. 298-306, 2018.

PM, C.; K, S. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. **BMJ (Clinical research ed.)**, 356, 02/08/2017 2017.

PM, C.; L, P.; J, M.; S, H.-D. M. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. **Diabetes care**, 32, n. 6, 2009 Jun 2009.

PRADO, W. L. D.; UPE, R.; LOFRANO, M. C.; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, S. P. *et al.* Obesity and inflammatory adipokines: practical implications for exercise prescription. **Rev Bras Med Esporte**, 15, n. 5, p. 378-383, 10/2009 2009.

PRIYANKA, A.; NISHA, V. M.; ANUSREE, S. S.; RAGHU, K. G. Bilobalide attenuates hypoxia induced oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunctions in 3T3-L1 adipocytes via its antioxidant potential. **Free Radic Res**, 48, n. 10, p. 1206-1217, Oct 2014.

R, H.; AK, W.; A, W.; CE, E. *et al.* Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. **Human molecular genetics**, 19, n. 3, 02/01/2010 2010.

R, O.; JH, S.; A, L.; E, E. *et al.* Maternal overweight is not an independent risk factor for increased birth weight, leptin and insulin in newborns of gestational diabetic women: observations from the prospective 'EaCH' cohort study. **BMC pregnancy and childbirth**, 18, n. 1, 06/20/2018 2018.

RA, F.; MH, B. [Obesity in Brazilian women: association with parity and socioeconomic status]. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, 37, n. 4-5, 2015 May 2015.

RABIEPOOR, S.; ABEDI, M.; SABOORY, E.; KHALKHALI, H. R. Stress during pregnancy affected neonatal outcomes and changed cortisol and leptin levels both in mothers and newborns. **J Neonatal Perinatal Med**, Feb 4 2019.

RAJATILEKA, S.; LUYT, K.; EL-BOKLE, M.; WILLIAMS, M. *et al.* Isolation of human genomic DNA for genetic analysis from premature neonates: a comparison between newborn dried blood spots, whole blood and umbilical cord tissue. **BMC Genet**, 14, p. 105, Oct 29 2013.

RAMOS, A. V.; BASTOS-RODRIGUES, L.; RESENDE, B. A.; FRIEDMAN, E. *et al.* The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. **BMC Med Genet**, 13, p. 101, Nov 7 2012.

REYES-LAGOS, J. J.; PENA-CASTILLO, M. A.; ECHEVERRIA, J. C.; PEREZ-SANCHEZ, G. *et al.* Women Serum Concentrations of the IL-10 Family of Cytokines

and IFN-gamma Decrease from the Third Trimester of Pregnancy to Active Labor. **Neuroimmunomodulation**, 24, n. 3, p. 162-170, 2017.

ROSMOND, R.; CHAGNON, M.; BOUCHARD, C.; BJORNTORP, P. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. **Diabetologia**, 44, n. 10, p. 1335-1338, Oct 2001.

RT, K.; M, M.; ST, D.; B, W.-L. *et al.* Endogenous tumor necrosis factor alpha mediates enhanced apoptosis of cultured villous trophoblasts from intrauterine growth-restricted placentae. **Reproduction (Cambridge, England)**, 133, n. 1, 2007 Jan 2007.

S, B.; A, A.; M, A.; V, D. *et al.* Correlation of Insulin Resistance in Pregnancy with Obstetric Outcome. **Journal of obstetrics and gynaecology of India**, 71, n. 5, 2021 Oct 2021.

S, B.; M, H.; P, S.; JC, C. *et al.* Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 19, n. 3, 2011 Mar 2011.

S, J.; AM, T.; JB, T.; TJ, L. *et al.* Fetal circulating human resistin increases in diabetes during pregnancy and impairs placental mitochondrial biogenesis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, 26, n. 1, 08/06/2020 2020.

S, M.-T.; H, K.; C, P.; R, H. *et al.* Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, 27, n. 2, 2007 Feb 2007.

S, M.-T.; H, K.; C, P.; R, H. *et al.* Cord blood adiponectin in large-for-gestational age newborns. **American journal of obstetrics and gynecology**, 193, n. 3 Pt 2, 2005 Sep 2005.

S, M.-T.; R, R.; JP, K.; O, E. *et al.* Adiponectin multimers in maternal plasma. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, 21, n. 11, 2008 Nov 2008.

S, S.; NE, M.; I, M. Impact of pregravid obesity on maternal and fetal immunity: Fertile grounds for reprogramming. **Journal of leukocyte biology**, 106, n. 5, 2019 Nov 2019.

S, Y.; N, S.; H, I.; K, K. *et al.* Resistin is expressed in the human placenta. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 88, n. 3, 2003 Mar 2003.

SA, S.; MH, V.; C, G.; CM, R. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. **BioMed research international**, 2014, 2014 2014.

SCHANTON, M.; MAYMO, J. L.; PEREZ-PEREZ, A.; SANCHEZ-MARGALET, V. *et al.* Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. **Reproduction**, 155, n. 1, p. R1-r12, Jan 2018.

SINGH, A. J.; RAMSEY, S. A.; FILTZ, T. M.; KIOUSSI, C. Differential gene regulatory networks in development and disease. **Cell Mol Life Sci**, Oct 10 2017.

SINGH, R. K.; KUMAR, P.; MAHALINGAM, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **C R Biol**, 340, n. 2, p. 87-108, Feb 2017.

SL, O.; R, A.; A, W. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, 74, n. 1, 1995 Jan 1995.

SOVIO, U.; MOOK-KANAMORI, D. O.; WARRINGTON, N. M.; LAWRENCE, R. *et al.* Association between common variation at the FTO locus and changes in body mass index from infancy to late childhood: the complex nature of genetic association through growth and development. **PLoS Genet**, 7, n. 2, p. e1001307, Feb 2011.

SPEAKMAN, J. R. The 'Fat Mass and Obesity Related' (FTO) gene: Mechanisms of Impact on Obesity and Energy Balance. **Curr Obes Rep**, 4, n. 1, p. 73-91, Mar 2015.

STARLING, A. P.; BRINTON, J. T.; GLUECK, D. H.; SHAPIRO, A. L. *et al.* Associations of maternal BMI and gestational weight gain with neonatal adiposity in the Healthy Start study. **Am J Clin Nutr**, 101, n. 2, p. 302-309, Feb 2015.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest**, 121, n. 6, p. 2094-2101, Jun 2011.

T, F.; S, H.; R, M.; A, P. *et al.* The role of adiposity in cardiometabolic traits: a Mendelian randomization analysis. **PLoS medicine**, 10, n. 6, 2013 2013.

T, S.; G, H.; H, J.; P, K. *et al.* Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions. **Reproduction, fertility, and development**, 7, n. 6, 1995 1995.

TAO, Y. X. Mutations in melanocortin-4 receptor and human obesity. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 88, p. 173-204, 2009.

TARRADE, A.; PANCHENKO, P.; JUNIEN, C.; GABORY, A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. **J Exp Biol**, 218, n. Pt 1, p. 50-58, Jan 1 2015.

THAXTON, J. E.; SHARMA, S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, 63, n. 6, p. 482-491, Jun 2010.

TSCHRITTER, O.; PREISSEL, H.; YOKOYAMA, Y.; MACHICAO, F. *et al.* Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. **Diabetologia**, 50, n. 12, p. 2602-2603, Dec 2007.

UNAMUNO, X.; GOMEZ-AMBROSI, J.; RODRIGUEZ, A.; BECERRIL, S. *et al.* Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **Eur J Clin Invest**, 48, n. 9, p. e12997, Sep 2018.

V, A.-J.; A, J.; E, C.-M.; M, L. *et al.* Adipokines underlie the early origins of obesity and associated metabolic comorbidities in the offspring of women with pregestational obesity. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, 1866, n. 2, 02/01/2020 2020.

V, O.; S, N.; O, E.; C, A. *et al.* Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular diabetology**, 17, n. 1, 08/31/2018 2018.

V, V.; B, H.; K, H.; K, H. *et al.* Adiponectin and leptin trajectories in Mexican-American children from birth to 9 years of age. **PloS one**, 8, n. 10, 10/30/2013 2013.

WENSVEEN, F. M.; VALENTIC, S.; SESTAN, M.; TURK WENSVEEN, T. *et al.* The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **Eur J Immunol**, 45, n. 9, p. 2446-2456, Sep 2015.

WILLIAMS, C. B.; MACKENZIE, K. C.; GAHAGAN, S. The effect of maternal obesity on the offspring. **Clin Obstet Gynecol**, 57, n. 3, p. 508-515, Sep 2014.

Y, A.; S, K.; N, O.; M, T. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. **Biochemical and biophysical research communications**, 425, n. 3, 08/31/2012 2012.

Y, M.; YB, K.; OD, P.; LG, F. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, 415, n. 6869, 01/17/2002 2002.

Y, Y.; PM, C. Pregnancy and obesity. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, 36, n. 2, 2009 Jun 2009.

Y, Z.; Z, L.; M, T.; X, H. *et al.* The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the 'one-two punch' effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia. **Cellular & molecular immunology**, 15, n. 7, 2018 Jul 2018.

YY, W.; S, L.; L, B. The role of early life growth development, the FTO gene and exclusive breastfeeding on child BMI trajectories. **International journal of epidemiology**, 46, n. 5, 10/01/2017 2017.

Z, K. A.; DR, G.; SR, L. Pregnancy-induced adaptation of central sensitivity to leptin and insulin. **Molecular and cellular endocrinology**, 516, 10/01/2020 2020.

ZAK, P.; SOUCEK, M. Correlation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and interleukin 10 with blood pressure, risk of preeclampsia and low birth weight in gestational diabetes. **Physiol Res**, Mar 22 2019.

ZC, L.; AM, N.; E, D.; WD, F. *et al.* Maternal and fetal leptin, adiponectin levels and associations with fetal insulin sensitivity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 21, n. 1, 2013 Jan 2013.

ZHOU, Y.; HAMBLY, B. D.; MCLACHLAN, C. S. FTO associations with obesity and telomere length. *In: J Biomed Sci*, 2017. v. 24.



## **ANEXOS**

### **ANEXO I**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Associação de polimorfismos de genes de FTO (rs9939609), MC4R (rs17782313) e UCP-2 (rs659366) e adipocinas materna com parâmetros antropométricos e de desenvolvimento do recém-nascido

**Pesquisador:** JACQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 82125417.0.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.533.798

**Apresentação do Projeto:**

Segundo os autores do presente Projeto, "A obesidade materna tem sido associada a uma série de resultados adversos na saúde do feto, incluindo desregulação metabólica com consequente aumento dos níveis circulantes de citocinas inflamatórias, hormônios reguladores do metabolismo energético, problemas comportamentais, cognitivos e predisposição genética à obesidade, desde a infância até a idade adulta (5-7). As alterações metabólicas recorrentes durante a obesidade materna estão associadas à abundância do tecido adiposo materno. Sabe-se que o tecido adiposo é reconhecidamente um órgão endócrino metabolicamente ativo e responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como PCR (proteína C reativa), TNF (fator de necrose tumoral) e IL-6 (interleucina 6) e que tais marcadores inflamatórios exibem forte ligação com a obesidade, assim como com o metabolismo alterado da glicose e a resistência à insulina materna (8). A susceptibilidade para a obesidade é resultado da combinação de fatores genéticos, comportamentais e ambientais (2).

Os genes FTO (fat mass and obesity-associated), MC4R (melanocortin-4 receptor) e UCP-2 (proteína desacopladora 2), nas variações rs9939609, rs17782313 e rs659366, respectivamente, são polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) de genes obesogênicos associados à susceptibilidade genética para a obesidade (2, 11, 12). Durante a gestação, estudo demonstrou

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/N 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Processo: 2.533.798

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Março de 2018

---

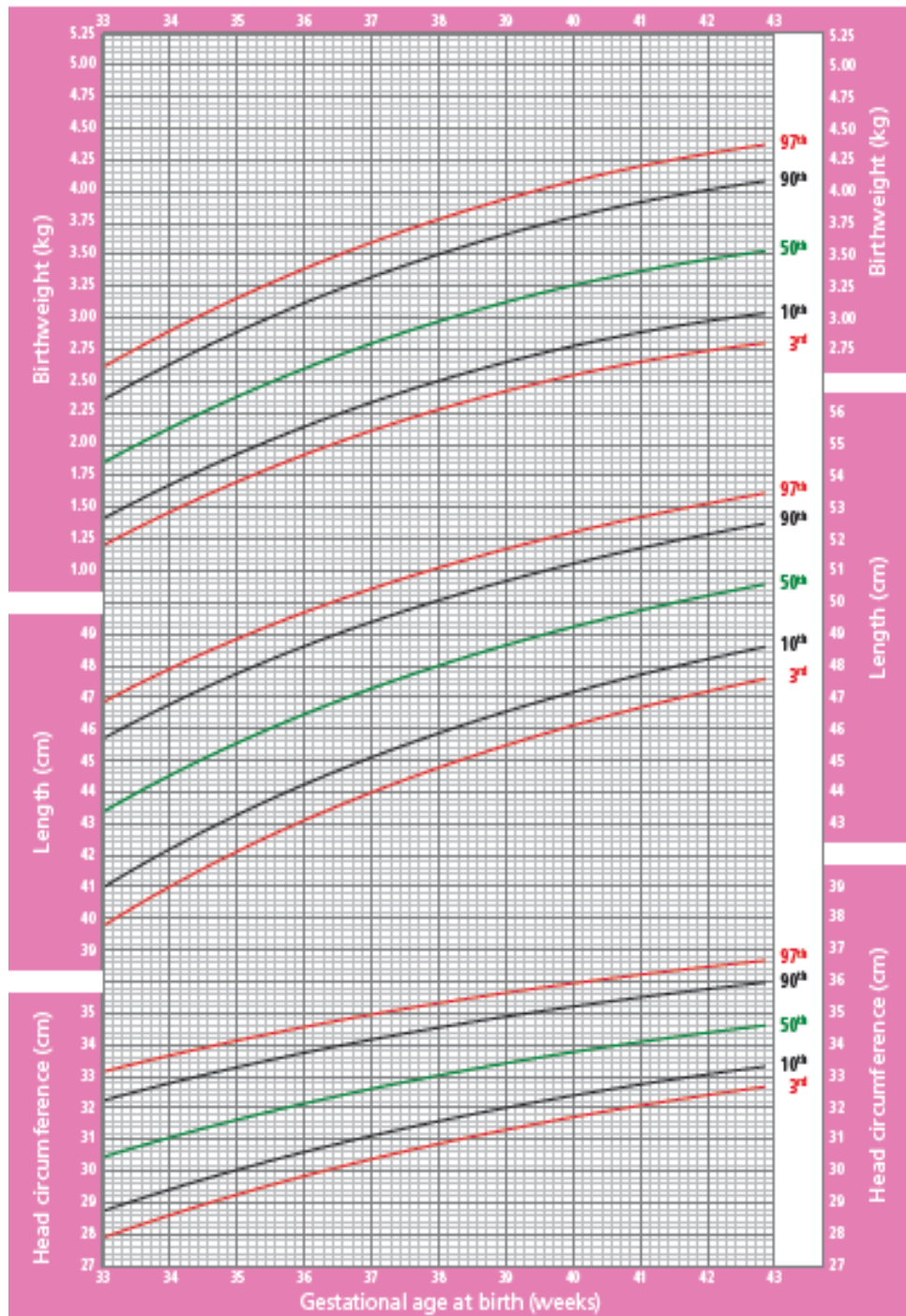
Assinado por:  
Vivian Resende  
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad S/N 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-001  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3408-4502 E-mail: [coape@corpq.ufmg.br](mailto:coape@corpq.ufmg.br)

ANEXO II



International Standards  
for Size at Birth (Girls)

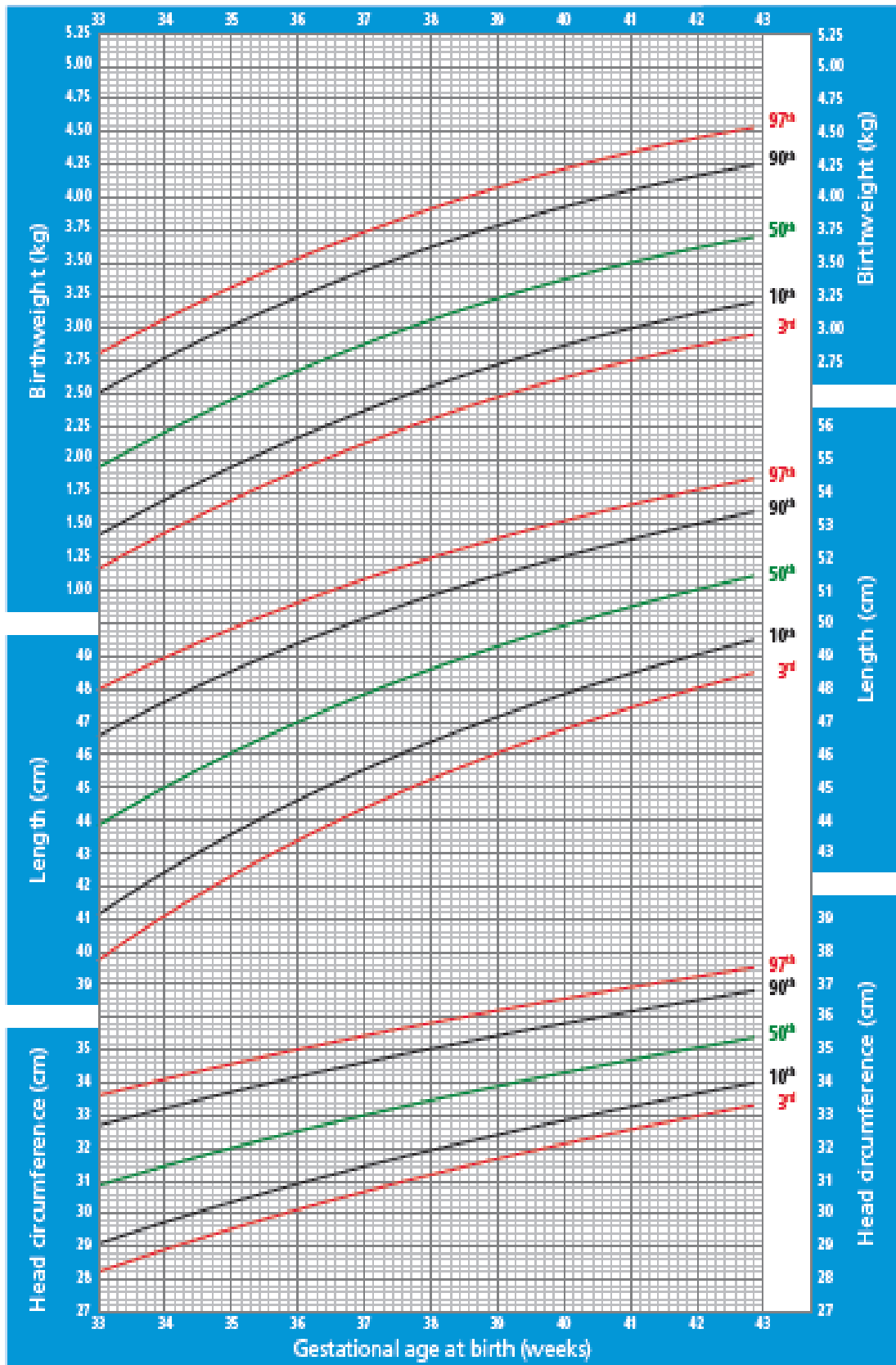


©University of Oxford

Ref: Villar J et al. Lancet 2014; 384: 857-868



# International Standards for Size at Birth (Boys)



**APÊNDICES****APÊNDICE I****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Associação de polimorfismos de genes de *FTO* (rs9939609), *MC4R* (rs17782313) e adipocinas materna com parâmetros antropométricos e de desenvolvimento do recém-nascido”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano do tipo 3mL de amostra de sangue periférico, sangue do cordão umbilical, 3 cm<sup>3</sup> de fragmentos do tecido adiposo, placentário e do cordão umbilical e saliva do seu bebê. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar, a sua amostra poderá ser usada em outros projetos de pesquisa futuros. Nesta pesquisa pretendemos desenvolver técnicas que resultem na investigação do impacto de polimorfismos (variação fenotípica) em genes envolvidos com obesidade, como o *FTO* (rs9939609), *MC4R* (rs17782313) nas medidas corporais (perfil antropométrico) e inflamatório de gestantes e suas possíveis repercussões no peso e Apgar (teste realizado pelo pediatra que consiste em 5 sinais objetivos do recém-nascido) dos recém-nascidos. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: usaremos a amostra biológica para obtenção de DNA por meio das técnicas de PCR, utilizaremos a técnica RT-qPCR para identificarmos os polimorfismos e o teste de ELISA para identificarmos os marcadores inflamatórios. A sua amostra será coletada e guardada em freezer -80°C. Ao fim do estudo, suas amostras serão devidamente descartadas, após serem esterilizadas. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos para a sua saúde e são apenas aqueles relacionados à coleta e material da rotina realizada no momento do parto. A coleta será feita pela equipe qualificada de obstetras (no caso do tecido adiposo). Para a coleta do seu sangue, poderá gerar hematomas no braço e minimizaremos isso com a ajuda de um profissional treinado para fazer a coleta e com compressas de água morna. Para a coleta do tecido adiposo, no momento da cesárea, a pele que foi aberta poderá apresentar um sangramento local que, caso ocorra, poderá ser controlado com cauterização local pelo obstetra (como é feito rotineiramente durante procedimentos cirúrgicos em geral) e para

a coleta da saliva do bebê poderá haver um pequeno desconforto no momento de passar a haste de algodão na boca do seu filho. A pesquisa contribuirá para esclarecer se tais variações (polimorfismos) nos genes envolvidos com obesidade e mediadores inflamatórios podem estar presentes em mães com sobrepeso/obesidade e conseqüentemente em seus filhos, desencadeando alterações permanentes no metabolismo da criança, no comportamento e na regulação do apetite, predispondo a obesidade, complicações metabólicas e comportamentais na vida adulta.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no **Biorrepositório**, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pela equipe da ou pelos pelo pesquisador deste estudo, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome nunca será divulgado e o seu material biológico só será usado com sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Bioquímica Nutricional e Aterosclerose da Universidade Federal de Minas Gerais, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos (ou até 10 (dez) anos) na sala do da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Associação de polimorfismos de genes de *FTO* (rs9939609), *MC4R* (rs17782313) e *UCP-2* (rs659366) e adipocinas materna com parâmetros

antropométricos e de desenvolvimento do recém-nascido”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. ( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante: \_\_\_\_\_

Data:

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome completo do Pesquisador Responsável: Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Endereço: Departamento de Bioquímica e Imunologia Nutricional / Contatos: (31) 3409-2629 / [jalvarezleite@gmail.com](mailto:jalvarezleite@gmail.com)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

Data:

Nome completo do Pesquisador: Simone Fátima Gomes de Oliveira

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31)9-99871393 E-mail: [Simone.monikita@hotmail.com](mailto:Simone.monikita@hotmail.com)

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_



## APÊNDICE II

**PROJETO: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE *FTO*  
(RS9939609), *MC4R* (RS17782313) E ADIPOCINAS MATERNA COM  
PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DE DESENVOLVIMENTO DO  
RECÉM-NASCIDO**

PARTICIPANTE:

<b>VARIÁVEL MATERNA</b>	
IDADE	
IDADE GESTACIONAL	
PESO PRÉ-GESTACIONAL	
ALTURA	
PESO GESTACIONAL (FINAL)	
PARIDADE	
ABORTO OU NATIMORTOS	
<b>VARIÁVEL NEONATAL</b>	
PESO	
COMPRIMENTO	
APGAR 1	
APGAR 5	
PERÍMETRO CEFÁLICO	
PERÍMETRO TORÁCICO	
PERÍMETRO ABDOMINAL	
GLICEMIA	
SEXO	

INTERCORRÊNCIAS:

MEDICAMENTOS: