

**EFEITO DO *Diabetes mellitus* GESTACIONAL NA
MODULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO
MITOCONDRIAL E SUAS IMPLICAÇÕES NA PREDISPOSIÇÃO DO
RECÉM-NASCIDO À OBESIDADE**

MARUHEN AMIR DATSCH SILVEIRA

**Botucatu – SP
2014**

Instituto de Biociências – Seção de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6148 fax 14 3815 3744 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO *Diabetes mellitus* gestacional NA MODULAÇÃO DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO MITOCONDRIAL E A
IMPLICAÇÃO NA PREDISPOSIÇÃO DO RECÉM-NASCIDO À
OBESIDADE

MESTRANDO: MARUHEN AMIR DATSCH SILVEIRA

ORIENTADORA: DAISY MARIA FÁVERO SALVADORI

CO-ORIENTADOR: JOÃO PAULO DE CASTRO MARCONDES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre pelo Programa de Pós- Graduação
em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu – SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silveira, Maruhen Amir Datsch.

Efeito do diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e suas implicações na predisposição do recém-nascido à obesidade / Maruhen Amir Datsch Silveira. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: João Paulo de Castro Marcondes

Capes: 20200005

1. Diabetes. 2. Diabetes na gravidez. 3. Expressão gênica. 4. Obesidade. 5. Recém-nascidos - Metabolismo.

Palavras-chave: Diabetes mellitus gestacional; Disfunção mitocondrial; Expressão gênica; Obesidade.

A minha mãe Marli Datsch, meu exemplo pra tudo! Se um dia puder ser 1% do que você é, já estarei 100% satisfeito! Eu te amo e te agradeço por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, presente em todos os momentos da minha vida, abençoando todos os meus passos e sempre me dando força e vontade para continuar.

Ao departamento de genética IBB/UNESP - Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas (Genética);

A CAPES/Cnpq por auxílio financeiro que possibilitou manter o laboratório em que fiz minha pesquisa;

A FAPESP pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro que financiou diretamente minha pesquisa;

Ao Dr. Moisés e sua equipe e ao Dr. Marcos Guazzeli e a equipe do hospital Unimed Botucatu, por auxiliarem em parte da nossa coleta;

Ao Dr. Wellerson Scarano e seus alunos, pelo ensinamento e ajuda em toda parte proteica do meu estudo, especialmente a Joyce e o Doi por me ensinarem a parte técnica do blot e extração proteica.

Ao Zé Eduardo da FMB pela análise estatística;

A Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, primeiramente por ter me recebido tão bem em seu laboratório a 3 anos atrás para um estágio, o que me rendeu não apenas o desenvolvimento deste trabalho, mas uma amizade e ensinamentos que contribuíram muito para meu desenvolvimento pessoal e profissional, e que com certeza levarei para vida inteira.

Ao meu co-orientador Dr. João Paulo de Castro Marcondes, por ter contribuído tanto na minha formação profissional e pessoal neste tempo que estive em Botucatu, pela paciência e amizade que tenho certeza que durará a vida inteira.

A todo pessoal do laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (OMICS) pela amizade e contribuição em meu trabalho, especialmente ao Renato, Juliana, Bruno, Jp, Joara, Elaine, Raphael e Nice.

Aos meus amigos de fora do laboratório, entre eles o Adauto, Júlio, Taka, Thiago, Nathan, Du Majolo, Zt, Medeiros, Alemão, João Pedro, Diegão, Birck, Raphinha, Japonês, Dal, Chico, Luiz Preussler e Adriano.

A minha família, especialmente minha mãe e meu pai, por terem me educado sempre com amor, carinho, respeito e tranquilidade; por todos os ensinamentos que moldaram minha personalidade e me fizeram ser o que sou hoje. Sem vocês não sou nada, muito obrigado por tudo!

A toda família da minha namorada Marcelli Vocci, por terem me recebido tão bem, me acolhendo nos momentos que mais precisei e me tornando parte da família também;

A minha namorada Marcelli, por estar presente todo o tempo nestes últimos dois anos, os quais foram os melhores da minha vida grande parte por estar ao seu lado, por me fazer querer ser mais como você, me aguentar mesmo estressado, me tratar sempre com amor e fazer da sua vida a nossa vida! Eu te amo!

"You must be the change you wish to see in the world (Gandhi)".

"Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ele vai gastar toda a sua vida acreditando que é estúpido (Matthew Kelly)".

"Getting lost will help you find yourself".

RESUMO

A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial, resultante de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. No entanto, o aumento acentuado de sua incidência, precocidade e severidade não foram ainda totalmente elucidados. Dentre os inúmeros fatores de risco, diversos achados sugerem, também, que estímulos estressores (p.ex. diabetes, alterações nutricionais) na vida intrauterina podem promover alterações genéticas e epigenéticas, predispondo ao desenvolvimento tardio de doenças e disfunções metabólicas, como a obesidade. Assim, o presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a possível relação entre o *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e a predisposição do recém-nascido para o desenvolvimento de obesidade na vida adulta. Para tanto, foram incluídos no estudo gestantes saudáveis e gestantes diagnosticadas com DMG e seus respectivos recém-nascidos. Adicionalmente, adultos obesos e eutróficos foram incluídos como população de referência (controle). Considerando a relação entre o diabetes e a obesidade com a disfunção mitocondrial, foi avaliado o perfil de expressão de gênica e proteica de SOD2 (superóxido desmutase 2), PPAR α (receptor ativador da proliferação de peroxissomos alfa) e PPARGC-1 β (receptor ativador da proliferação de peroxissomos gamma coativador 1 beta), relacionados ao metabolismo mitocondrial, em sangue do cordão umbilical e sangue periférico (população de referência), e o perfil de expressão gênica em células de placenta (faces materna e fetal). Primeiramente, nossos resultados demonstraram que indivíduos obesos apresentavam aumento da expressão gênica e proteica de SOD2, PPAR α e PPARGC-1 β no tecido sanguíneo quando comparados aos eutróficos ($p < 0,05$). No entanto, o mesmo não foi observado no tecido placentário (expressão gênica) e no sangue do cordão umbilical (expressão gênica e proteica) dos recém-nascidos das gestantes com DMG e seus recém-nascidos em relação ao grupo não diabético. Portanto, o DMG não foi fator promotor de alterações transcricionais nos genes *SOD2*, *PPAR α* e *PPARGC-1 β* , no tecido placentário materno e fetal e de alterações transcricionais e traducionais em células do sangue do cordão umbilical. Assim, pode-se concluir que os níveis de expressão gênica e proteica de SOD2, PPAR α e PPARGC-1 β apesar de se definiram como potenciais biomarcadores de obesidade no tecido sanguíneo de adultos, não são apropriados para identificar a predisposição do recém-nascido à obesidade em mães com ocorrência de DMG.

Palavras chave: Obesidade, *Diabetes mellitus* gestacional, expressão gênica, disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease involving complex interactions between genetic and environmental agents. However, the increased incidence, early onset and severity of this disease, are still not well understood. Several findings have demonstrated that *in utero* stressors (diabetes, cigarettes, and/or alcohol consumption, etc) can promote genetic and epigenetic changes predisposing to late development of diseases and metabolic disorders, such as obesity. The present study was designed to evaluate the possible relationship between gestational *Diabetes mellitus* (GDM) and newborn predisposition to obesity in later life. Healthy and GDM pregnant women and their respective newborns were included. Additionally, obese and eutrophic adults were recruited as reference population. Considering the relationship between diabetes and obesity with mitochondrial dysfunction, gene and protein related to mitochondrial metabolism (SOD2 (superoxide dismutase 2), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) and PPARGC-1 β (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator beta) were evaluated in cells from cord and peripheral blood (reference population), and in placenta cells (gene expression profile in maternal and fetal sides). Our results showed an increased gene and protein expression (SOD2, PPAR α and PPARGC-1 β) in peripheral blood from obese compared to eutrophic subjects ($p < 0.05$). However, the same result was not observed in the placental tissue (gene expression) and in umbilical cord blood cells (gene and protein expression) from GDM women and their respective newborn compared to the non diabetic group, i.e., GDM was not an effective agent to promote transcriptional changes in SOD2, PPAR α PPARGC-1 β in maternal and fetal sides of placenta, and transcriptional and translational changes in umbilical cord blood cells. In conclusion, SOD2, PPAR α and PPARGC-1 β gene and protein expression were confirmed as potential biomarkers of obesity on blood tissue, but were not linked to the newborn obesity predisposition in women with occurrence of DMG.

Keywords: Obesity, gestational *Diabetes mellitus*, gene expression, mitochondrial dysfunction.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais da obesidade	1
1.2 Aspectos genéticos e epigenéticos da obesidade	2
1.3 <i>Diabetes mellitus</i> , disfunção mitocondrial e obesidade	5
1.4 <i>Diabetes mellitus</i> gestacional, programação fetal e obesidade	8
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1 Casuística	12
3.2 Coleta e armazenamento das amostras biológicas	14
3.3 Extrações de ácidos nucleicos e proteínas	14
3.4 Expressão dos genes <i>SOD2</i> , <i>PPAR-α</i> e <i>PPARGC-1β</i> (qPCR-RT)	15
3.5 Expressão proteica por Western blot	16
3.6 Análise Estatística	17
4. Resultados	18
Figura 1	19
Tabela 1	20
Figura 2	21
Figura 3	21
Figura 4	22
Figura 5	22
Figura 6	23

Figura 7.....	23
5. Discussão.....	24
6. Conclusões.....	30
7. Referências Bibliográficas.....	31
8. Apêndices.....	43
Ficha para coleta de dados individuais (grupo com obesidade e eutróficos).....	44
Ficha para coleta de dados individuais (gestantes diabéticas e não-diabéticas e seus recém-nascidos).....	46
Termo de consentimento livre e esclarecido (grupo com obesidade e eutróficos).....	50
Termo de consentimento livre e esclarecido (gestantes diabéticas e não-diabéticas e seus recém-nascidos).....	55

LISTA DE SIGLAS

DMG: *Diabetes mellitus* gestacional;

SNC: Sistema nervoso central;

IMC: Índice de massa corporal;

GWAs: Genome-wide association studies;

RE: Retículo endoplasmático;

ERO: Espécie reativa de oxigênio;

ERN: Espécie reativa de nitrogênio;

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2

TTG-2h: Teste de tolerância à glicose de 2 horas;

DNAm: DNA mitocondrial;

HbA_{1c} %: Porcentagem de hemoglobina glicada;

5hmC: 5-hidroximetilcitosina;

5mC: 5-metilcitosina

GS: Gestante saudável.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da obesidade

A prevalência global da obesidade vem aumentando substancialmente nas últimas décadas¹. Para 2025, estima-se que o número de crianças com menos de cinco anos de idade, que sejam obesas ou apresentem sobrepeso, aumente para 70 milhões². Estima-se para 2048, que todo residente adulto dos Estados Unidos estará obeso ou com sobrepeso³. Esses dados são bastante preocupantes diante da associação existente entre obesidade e diversos distúrbios metabólicos, como a dislipidemia, a resistência à insulina e hiperglicemia, o aumento de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer⁴⁻⁷. Além disso, estima-se que cerca de 147 bilhões de dólares sejam gastos anualmente para o tratamento da obesidade apenas nas Américas⁸, o que torna essa disfunção um problema de saúde pública e um dos principais alvos de estudo.

A etiologia da obesidade é multifatorial, sendo decorrente de interações complexas entre fatores genéticos (mutações, modulação da expressão e polimorfismos gênicos) e ambientais (sedentarismo e hábitos alimentares inadequados)⁹⁻¹². A obesidade é uma doença crônica resultante de distúrbios nos mecanismos fisiológicos que regulam a ingestão de alimentos e o gasto energético e cujo balanço é um processo que envolve complexa interação entre os centros que regulam a saciedade no sistema nervoso central (SNC), especialmente o hipotálamo e o tecido adiposo^{13,14}. Além disso, alterações na homeostase mitocondrial resultam no comprometimento de diversos processos celulares que podem estar relacionados ao desenvolvimento de obesidade e de outras alterações metabólicas, como a resistência à insulina, o diabetes tipo 2, cardiomiopatias, dentre outras^{15,16}.

1.2 Aspectos genéticos e epigenéticos da obesidade

Embora haja influência de fatores ambientais, os fatores genéticos podem ser determinantes para o desenvolvimento de obesidade, afetando, por exemplo, o índice de massa corporal (IMC) e a suscetibilidade às comorbidades. Estima-se que a influência da herdabilidade no IMC varie entre 40% e 70%^(ref. 17). Em 2010, Speliotes *et al.*¹⁸ demonstraram que 32 *loci* gênicos estavam relacionados ao aumento do IMC. Recentemente, Tang *et al.*¹⁹ em um estudo de meta-análise, concluíram que de 18 polimorfismos de 16 genes frequentemente relacionados à obesidade, apenas dois polimorfismos, o *SH2B1* (rs7498665), relacionado a apoptose, e o *FAIM2* (rs7138803) à resistência à leptina e ao metabolismo energético, estão realmente associados positivamente a sobrepeso/obesidade. Diversos estudos demonstram, também, a associação entre a obesidade e alterações no padrão de expressão gênica. Lee *et al.*²⁰ observaram diferenças significativas entre o perfil de expressão gênica em adipócitos de obesos e não obesos em uma população de índios Pima, os quais possuem alta prevalência de obesidade e diabetes. Em 2009, Hindle *et al.*²¹ observaram, em sangue venoso de indivíduos obesos, a hiperexpressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e associaram este achado ao processo de resistência a insulina e à predisposição ao diabetes tipo 2. Além disso, esses autores identificaram a hiperexpressão de genes relacionados ao processo inflamatório (*TNF-α*, *STX7* e *HOXB6*) e a hipoexpressão de genes de metabolismo lipídico (*PPAR*, *TOP2B*, *STAG2* e *STAG3*). Mais recentemente, Hulsmans *et al.*²² reportaram que vias relacionadas à sinalização, crescimento, proliferação e morte celular também apresentavam-se diferencialmente reguladas em monócitos de indivíduos obesos.

Além dos aspectos genéticos, os eventos epigenéticos podem também desempenhar papel relevante no desenvolvimento da obesidade²³⁻²⁵. Esses consistem em modificações

químicas na base pirimídica citosina (metilação) ou nas proteínas histônicas (metilação, acetilação) que regulam o processo de transcrição de maneira integrada e dinâmica. A metilação e acetilação dos resíduos de lisina das proteínas histônicas e a metilação das ilhas CpG promovem a inibição da transcrição por atuarem direta e/ou indiretamente na acessibilidade ao DNA, por meio do remodelamento da cromatina, ou por impedir a ligação de uma proteína regulatória com o sítio alvo na molécula de DNA²⁶⁻²⁹. Adicionalmente, a oxidação da 5-metilcitosina, resultando na 5-hidroximetilcitosina (5hmC), também pode interferir na expressão gênica, como já foi demonstrado por Williams *et al.*³⁰ e observado em algumas neoplasias malignas³¹ e em doenças neurodegenerativas, como a doença de Huntington³² e Alzheimer³³. A família de enzimas TET, que contém três membros (TET 1, TET 2 e TET 3), realiza o controle da expressão gênica por meio do seu domínio CXXC, que é altamente conservado e contém sítios de ligação/interação com outras proteínas (como DNMT1, MBD1, MLL e KDM2A), sendo responsável pela conversão da 5-metilcitosina em 5hmC^{34,35}. Zhang *et al.*³⁶ demonstraram que a proteína TET1 humana liga-se a regiões de ilhas CpGs no DNA promovendo a hidroxilação da 5mc em 5hmc, regulando, positivamente, a transcrição gênica. Recentemente, Ge *et al.*³⁷, em um artigo de revisão, apresentaram resultados de diversos estudos realizados em modelo animal e em seres humanos, no qual evidenciam a existência de alterações epigenéticas promovidas pela hiperglicemia em embriões e oócitos e sugerem que essas alterações podem estar relacionadas ao desenvolvimento da obesidade e do diabetes tipo 2 na vida adulta. Da mesma forma, Su *et al.*³⁸, em uma revisão de dados provenientes de estudos da *Genome-Wide Association studies* (GWAs), associaram, positivamente, a metilação do gene *LY86* (*Lymphocyte Antigen 86* – envolvido na resposta imune inata) com o desenvolvimento de obesidade, a resistência à insulina e ao processo inflamatório. Avaliando o perfil de metilação global em 479 pacientes

(*Cardiogenesis Consortium*), Dick *et al.*³⁹ também observaram relação entre a metilação do gene *HIF3A* (*Hypoxia Inducible Factor 3, Alpha Subunit*) e IMC elevado. Esses autores demonstraram, também, que alterações nas vias dos fatores de transcrição envolvidos na resposta a baixas tensões de oxigênio e no processo de angiogênese podem ter ação importante para o aumento do IMC.

Além da metilação do DNA, alterações pós-traducionais, como a acetilação e a metilação de proteínas histônicas, também podem interferir no padrão de expressão gênica⁴⁰. Mikkelsen *et al.*⁴¹ sugerem que a acetilação na histona H3k27 está associada à ligação de fatores de transcrição em regiões promotoras de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Em estudo anterior, Aagaard-Tillery *et al.*⁴² demonstraram, em primatas (*Macaca fuscata*), que a dieta hipercalórica administrada durante a gestação pode alterar a estrutura da cromatina de neonatos por meio de modificações epigenéticas em proteínas histônicas. Além disso, esses autores associaram tais alterações ao desenvolvimento tardio de obesidade na prole dessas gestantes, sugerindo que eventos epigenéticos podem ter papel importante na programação fetal. Anteriormente, dois estudos epidemiológicos haviam evidenciado a relação entre o baixo peso do recém-nascido e o aumento da pressão sanguínea na vida adulta, predispondo ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Esses achados deram origem ao conceito de “programação fetal”, que relaciona a exposição a estímulos fora dos padrões fisiológicos (estímulos estressores) em períodos críticos do desenvolvimento fetal (p.ex. diabete, alterações nutricionais, compostos do cigarro etc) a risco aumentado para o aparecimento de certas doenças ou disfunções orgânicas, como problemas cardiovasculares e hipertensão^{43,44}. De fato, vários estudos têm associado modificações epigenéticas resultantes de eventos estressores *in utero* e no período pós-natal, ao risco aumentado para obesidade em algum período da vida⁴⁵⁻⁴⁷.

1.3 *Diabetes mellitus*, disfunção mitocondrial e obesidade

Diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina⁴⁸. O desenvolvimento do diabetes está intimamente associado ao desenvolvimento da obesidade, pois modificações nas vias do metabolismo lipídico e energético (mitocondrial) levam ao aumento do tecido adiposo e promovem resistência à insulina e alterações no metabolismo hepático, levando ao aumento dos níveis séricos de glicose, além de alterações fisiológicas hipotalâmicas relacionadas à saciedade^{49,50}. De fato, Arruda *et al.*⁵¹ demonstraram, em modelo animal, que a obesidade leva a alterações estruturais na mitocôndria e no retículo endoplasmático (RE) promovendo a reorganização de seus sítios de comunicação física e, com isso, o acúmulo de cálcio na mitocôndria, o qual compromete a capacidade oxidativa e promove o aumento da produção de ROS, stress celular, desregulação na ação da insulina no fígado e alterações no metabolismo da glicose.

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas envolvidas no metabolismo energético e na produção de energia por meio do processo de fosforilação oxidativa, resultando na produção de ATP, que é utilizado em diversas funções celulares primordiais, incluindo a proliferação celular, apoptose, homeostase intracelular de cálcio⁵². No entanto, o metabolismo mitocondrial pode promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, por sua vez, podem interagir com diversas macromoléculas (DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos e proteínas) e danificar organelas e componentes celulares⁵³. Alterações na homeostase mitocondrial no músculo estriado esquelético foram descritas em indivíduos obesos e em modelos animais de obesidade, sendo consideradas como precursoras do processo de resistência à insulina^{54,55}. Estudo conduzido em pacientes obesos diabéticos e não diabéticos

mostrou reduzido do número de mitocôndrias com consequente diminuição do conteúdo de DNA mitocondrial (DNAm_t) nos adipócitos dos obesos com diabetes e aumento nos não-diabéticos. Segundo Lindinger *et al.*⁵⁶, essas alterações refletem o processo de disfunção mitocondrial que pode ser parcialmente explicado como uma resposta ao quadro de resistência à insulina e/ou como mecanismo compensatório à obesidade. Vários são os fatores que podem levar à disfunção mitocondrial, dentre os quais alterações transcricionais, pós-transcricionais e traducionais de genes que participam direta ou indiretamente das vias do metabolismo mitocondrial, como, por exemplo, os fatores de transcrição *PPARs* e seu coativador *PPARGC-1 α* , além dos genes *SOD* e *Mnf2*^{57,58}.

O gene *SOD2* (superóxido dismutase 2) codifica uma enzima que atua na defesa antioxidante mitocondrial, sendo uma das responsáveis pela inativação do ânion superóxido por meio do processo de redução, tendo como resultado a produção de peróxido de hidrogênio e oxigênio⁵⁹. Madsen-Bouterse *et al.*⁶⁰, em estudo *in vitro* utilizando células endoteliais de retina de *Bos taurus* observaram que a hiperexpressão de *SOD2* atenuou as alterações promovidas pela hiperglicemia, diminuindo os níveis das lesões oxidativas no DNAm_t e restaurando o nível de expressão dos genes relacionados ao metabolismo mitocondrial (*GSH* e *OGG1*). O estudo realizado por Larsen *et al.*⁶¹, em biópsias de tecido muscular de pacientes diabéticos, mostrou que a diminuição dos níveis proteicos de *SOD2* e o aumento da atividade de proteínas associadas à cadeia transportadora de elétrons levavam à diminuição da capacidade antioxidante e ao aumento do metabolismo mitocondrial como mecanismos compensatórios à resistência a insulina. Mais recentemente, Liu *et al.*⁶² utilizando camundongos transgênicos, demonstraram que a expressão aumentada dos genes *SOD1* e *SOD2* poderia reduzir o efeito deletério promovido pela dieta obesogênica por meio da

redução do níveis de ROS e restauração da capacidade oxidativa mitocondrial, prevenindo, assim, o desenvolvimento de resistência a insulina.

Os produtos dos genes *PPARs* (*peroxisome proliferator-activated receptors*) são fatores de transcrição que pertencem à superfamília de receptores de hormônios nucleares que estão envolvidos na homeostase de energia. Fazem parte desse grupo de genes o *PPAR-α*, o *PPAR-γ* e o *PPAR-β/δ*. O *PPAR-α*, especialmente transcrito no fígado (hepatócitos), participa da biogênese mitocondrial e desempenha papel central no metabolismo de lipoproteínas, oxidação de ácidos graxos, resposta inflamatória e estresse oxidativo⁶³. Recentemente, Nicholas *et al.*⁶⁴ observaram que a obesidade materna promove, na prole, a diminuição da expressão dos genes *PPAR-α*, *PPARGC-1α* e *GCN5* no tecido hepático, alterando o metabolismo lipídico e contribuindo para o desenvolvimento futuro de obesidade e diabetes. Capobianco *et al.*⁶⁵ observaram diminuição dos níveis proteicos de *PPARα* e *PPARγ* em tecido placentário de gestantes com *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), o que poderia estar relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e alteração do transporte de lipoproteínas entre o organismo materno e o feto, interferindo, portanto, no desenvolvimento fetal.

Outros importantes determinantes do metabolismo mitocondrial são os *PPARγ* coativador-1α e β (*PPARGC-1α* e β), que estão relacionados à regulação de diversos genes envolvidos na biogênese e respiração mitocondrial, como, por exemplo, os genes *NRF1*, *NRF2*, *ERR-α/β/γ*, *CPT1*, *CPT2*⁶⁶⁻⁶⁹. Diferentemente do *PPARGC1-α*, o gene *PPARGC-1β* não tem sua expressão afetada por certos estímulos ambientais, como atividade física e o frio⁷⁰.

1.4 *Diabetes mellitus* gestacional, programação fetal e obesidade

Como citado anteriormente, dois estudos epidemiológicos deram origem ao conceito de “programação do desenvolvimento (*developmental programming*)”, referindo-se ao fato de que estímulos estressores podem promover alterações no feto que se refletirão em risco para o desenvolvimento tardio de certas doenças^{43,44}. A resposta fetal ao ambiente estressor está relacionada a alterações moleculares e fisiológicas que podem permanecer durante a vida adulta⁷¹⁻⁷³. Dentro desse contexto a hiperglicemia promovida pelo *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é considerada um dos fatores estressores que podem afetar o desenvolvimento fetal^{74,75}. O DMG é uma condição caracterizada pela intolerância à glicose manifestada durante o período gestacional^{76,77}. Estudos epidemiológicos longitudinais demonstram que o diabetes durante a gestação pode aumentar o risco do recém-nascido para o desenvolvimento de obesidade na infância e final da adolescência. Em 2003, Gillman *et al.*⁷⁴ observaram que o DMG está associado ao aumento do risco para sobrepeso na faixa entre 9 e 14 anos de idade e que este fato poderia ser parcialmente explicado pelo peso aumentado ao nascimento. Lawlor *et al.*⁷⁸ evidenciaram que o *Diabetes mellitus* maternal (diabetes tipo 1, 2 e gestacional) está associado ao IMC aumentado em indivíduos do sexo masculino aos 18 anos de idade, mas que esta associação é independente do IMC materno.

Dentre as consequências do DMG para o feto/recém-nascido incluem-se a macrosomia, a hipoglicemia, a síndrome do desconforto respiratório, o risco aumentado para o desenvolvimento da obesidade, a intolerância à glicose, o diabetes tipo 2 e complicações cardiovasculares^{75,79}. Além disso, em decorrência do DMG, o tecido placentário pode sofrer alterações estruturais e funcionais como o espessamento do estroma das vilosidades coriônicas, as quais podem estar relacionadas à macrosomia fetal⁸⁰. Outro fator relacionado à macrosomia dos recém-nascidos de mães com DMG é a hiperglicemia fetal, a qual promove

a hiperinsulinemia fetal, que, por sua vez, atua aumentando a síntese e armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos e, conseqüentemente, o aumento do tecido adiposo fetal⁸¹. De fato, Marseille-Tremblay *et al.*⁸² observaram aumento da expressão da proteína FAS (*fatty acid synthase*) em resposta ao aumento dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido placentário de pacientes diagnosticadas com DMG, demonstrando que o metabolismo placentário pode ser modulado por alterações no metabolismo materno e, subsequentemente, alterar o desenvolvimento do feto.

Wentzel *et al.*⁸³, utilizando modelo animal para indução de diabetes, observaram diminuição da expressão dos genes *MnSOD*, *CuZnSOD* e *GPx* em embriões que apresentavam alterações morfogênicas, sugerindo a defesa antioxidante como fator importante no desenvolvimento embrionário. A diminuição da defesa antioxidante também foi observada em prole oriunda de gestação sob condições de restrição protéica, e os mecanismos que levariam a essa diminuição estariam relacionados à hipoexpressão dos genes *MnSOD*, *CuZnSOD* e *HO-1* (hemeoxidase-1) em células do tecido pancreático, o que poderia ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento tardio de diabetes⁸⁴. Outros autores, utilizando modelos similares de indução de diabetes, observaram diminuição da expressão gênica e protéica de *PPAR- α* associadas ao aumento do acúmulo lipídico, produção de óxido nítrico e peroxidação lipídica no tecido placentário, hepático e pulmonar, dados estes que sugerem que o *PPAR- α* teria papel relevante no desenvolvimento fetal⁸⁵⁻⁸⁷. Embora os mecanismos moleculares que relacionam um ambiente intrauterino adverso ao desenvolvimento futuro de doenças sejam pouco conhecidos, há evidências que sugerem que alterações epigenéticas desempenhariam papel relevante nesse sentido⁸⁸. Embora as informações epigenéticas sejam herdáveis e reversíveis, há estudos que demonstram que fatores estressores *in utero* podem induzir alterações epigenéticas persistentes e, com isso, favorecer efeitos deletérios tardios ao

indivíduo. Burdge *et al.*⁹⁰, utilizando modelo animal de restrição de crescimento intrauterino (dieta hipoprotéica), observaram uma hipometilação da região promotora dos genes *GR* (receptor de glucocorticóide) e *PPAR-α* em células do tecido hepático, que podem refletir em alterações em vias relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico. Além disso, os autores verificaram que as alterações induzidas na prole F1 foram transmitidas à geração F2. Resultados similares foram obtidos por Lillycrop *et al.*⁹⁰ utilizando o mesmo modelo experimental, demonstrando que a hipometilação das ilhas CpG da região promotora do gene *PPAR-α* persistiam nos animais até a idade adulta.

Dois estudos realizados em indivíduos de uma mesma população demonstraram que aos 60 anos os filhos de mulheres submetidas à restrição alimentar no período gestacional apresentavam hipometilação de regiões do gene *IGF2* (*insulin growth fator 2*)⁹¹ e alterações no padrão de metilação de genes relacionados ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo energético (*INSIGF*, *LEP*, *IL10*, *MEG3*, *GNASAS*, *ABCA1*)⁹². Mais recentemente, Van Abeelen *et al.*⁹³ relataram que a restrição alimentar aguda durante o período pós-natal (infância ou adolescência) estaria relacionada ao aumento do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 durante a vida adulta.

Diante do exposto, pode-se sugerir que o *Diabetes mellitus* gestacional levaria a alterações no desenvolvimento fetal por meio de modificações genéticas, epigenéticas e traducionais e que estas poderiam estar relacionadas ao aumento do risco para o desenvolvimento futuro de obesidade.

2. OBJETIVOS

O presente estudo foi delineado com o objetivo de investigar se possíveis alterações transcricionais e traducionais estimuladas pelo DMG em genes relacionados ao metabolismo mitocondrial podem estar relacionadas à predisposição ou risco do recém-nascido para o desenvolvimento de obesidade na vida adulta. Para isso, foram investigados:

- o perfil de expressão gênica e proteica de *SOD2*, *PPAR-α* e *PPARGC-1β* no sangue do cordão umbilical de mães com DMG, de gestantes saudáveis e no sangue periférico de adultos obesos e eutróficos;
- o perfil de expressão gênica de *SOD2*, *PPAR-α* e *PPARGC-1β* em células do tecido placentário (faces fetal e materna);
- a existência de similaridades entre os padrões de expressão gênica em células sanguíneas dos recém-nascidos de mães com DMG e dos adultos obesos, a fim de identificar biomarcadores precoces de risco para a obesidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo 14489013.0.0000.5411). Todos os participantes (sujeitos do estudo) assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Foram coletadas amostras de tecido placentário de 19 gestantes (média de $32,42 \pm 5,19$ anos de idade) diagnosticadas com DMG (Grupo 1) e do sangue do cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos (Grupo 2), sendo 10 do sexo masculino e 9 do feminino; de 19 gestantes saudáveis ($31,19 \pm 6,46$ anos) e sem nenhum tipo de complicação durante a gravidez (Grupo 3) e de seus recém-nascidos (Grupo 4), pareados por sexo com aqueles do Grupo 2. Também foram coletadas amostras de sangue periférico de 15 indivíduos adultos obesos (média de idade de $30,26 \pm 4,73$ anos), 11 do sexo masculino e 8 do sexo feminino (Grupo 5) e de 19 adultos eutróficos (média de $28,52 \pm 3,92$ anos), pareados por sexo e idade com os obesos. O diagnóstico do DMG seguiu os critérios recomendados pela *American Diabetes Association*⁴⁸, com modificações propostas por Rudge *et al.*⁹⁴, a saber: foram utilizados dois testes diagnósticos, o teste de tolerância à glicose de 2 horas (TTG-2h) e o perfil glicêmico. O TTG-2h considera dentro da normalidade os níveis de glicose até 95 mg/dl em jejum, 180 mg/dl e 155 mg/dl, respectivamente 1 e 2 horas após do consumo de 75 gramas de dextrosol. Para a avaliação do perfil glicêmico, o limite máximo para os níveis de glicose foram de 90 mg/dl para a glicemia em jejum e 130 mg/dl no período pós-prandial. O DMG foi confirmado quando dois ou mais parâmetros do TTG-2h atingiram ou ultrapassaram os valores máximos, associados ou não a alterações no perfil glicêmico. Para todos os grupos

foram excluídos indivíduos que faziam uso regular de medicamentos (exceto mulheres com uso regular de anticoncepcional) e/ou possuíam doenças crônicas. No Grupo 6 (eutróficos) foram incluídos apenas indivíduos sem histórico familiar de doenças crônicas considerando-se, para isso, parentesco de 1º grau (pai, mãe e irmãos). As gestantes com DMG foram recrutadas na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e as saudáveis no Hospital Unimed de Botucatu; os indivíduos adultos obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) e eutróficos (IMC entre $18\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$) foram selecionados entre habitantes da cidade de Botucatu/SP. O IMC foi calculado dividindo-se o valor do peso corpóreo (quilogramas) pelo da altura (metros) ao quadrado⁹⁵.

Como fumantes, foram considerados os indivíduos que tivessem fumado pelo menos 100 cigarros durante a vida, ou que estivessem, no momento do recrutamento, fumando esporadicamente, ou todos os dias; como ex-fumantes foram considerados aqueles que haviam parado de fumar há pelo menos um ano antes da coleta da amostra⁹⁶. Para avaliação do consumo de álcool foi sujeitos do estudo foram classificado em três categorias: não consumidor, definido como nenhum consumo de álcool, ou o consumo social; consumo moderado, definido como o consumo de até 1 copo (aproximadamente 100 ml) de bebida alcoólica por dia, ou mais do que um copo nos finais de semana; consumo elevado, definido como o consumo de mais de 1 litro de bebida alcoólica leve (cerveja, vinho, ou cidra), ou 2 copos de bebida destilada (cachaça, vodka, ou uísque) por dia, por pelo menos 6 anos⁹⁷. Os indivíduos foram considerados "expostos a substâncias tóxicas" (pesticidas, solventes, exaustão de diesel, tinturas etc) caso relatassem história de exposição, ou exposição atual, por pelo menos 2 anos⁹⁷.

3.2 Coleta e armazenamento das amostras biológicas

Após o parto, a placenta foi coletada, colocada em solução salina 0,9% e removida a placa coriônica e as membranas adjacentes. Fragmentos de aproximadamente 0,5 cm³ da face materna (porção extra-vilosa) e da face fetal (porção vilosa) foram colocados em tubos para posterior extração de RNA total (tubos de 1,5 mL contendo *RNA Later*; Life Technologies, EUA) e de proteínas. Os tubos contendo os fragmentos para a extração de RNA permaneceram 24 horas em geladeira 4°C, para, então, ser removida a solução de *RNA Later* e serem armazenados em freezer a -80°C. Os procedimentos de coleta, processamento e acondicionamento em *RNA Later* das amostras de tecido placentário foram conduzidos em menos de 40 minutos. Os criotubos contendo os fragmentos destinados à extração proteica foram imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80 °C.

Foram também coletadas amostras de 9 mL de sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos e de sangue periférico dos indivíduos adultos obesos e eutróficos. Destas, 5 mL foram colocados em *PAXgene Blood RNA Tubes* (PreAnalytiX, Suíça) e destinados à extração de RNA total, e 4 mL foram coletados em tubo com EDTA e utilizados para a extração de DNA e de proteínas.

3.3 Extrações de RNA e proteínas

A extração de RNA total do tecido placentário (faces fetal e materna) foi realizada utilizando-se o *RNeasy® Mini kit* (Qiagen, EUA). As amostras de sangue acondicionadas nos tubos *Paxgene* foram processadas com o *Paxgene Blood RNA kit* (Qiagen, EUA) para a extração de RNA total. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo do fabricante. A extração proteica de fragmentos da placenta (faces materna e fetal) e do sangue (cordão umbilical e periférico) foi realizada no Laboratório de Desreguladores

Endócrinos e Carcinogênese, do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, sob a coordenação do Dr. Wellerson Rodrigo Scarano. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolo *in house* proposto por Knapp *et al.*⁹⁸, com poucas modificações. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA (Merck Millipore, EUA) a 4 °C (pH 7,4), com a adição de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, EUA) (1Mm de EDTA, 1Mm de PMSF, 1 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de leupeptina e 1 µg/mL de pepstatina) e deixadas em gelo por 1h e 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 20 min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para as etapas posteriores. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford⁹⁹, com modificações. As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE) e a qualidade e integridade verificada em gel de agarose a 1,5%; para as proteínas as avaliações de quantidade e qualidades foram realizadas em gel de poliacrilamida 4%-15%.

3.4 Expressão dos genes *SOD2*, *PPAR-α* e *PPARGC-1β* (qPCR-RT)

A avaliação da expressão dos genes *SOD2*, *PPAR-α* e *PPARGC-1β* foi realizada pela técnica de qPCR-RT. Resumidamente, após a extração de RNA total foi realizada a síntese de cDNA utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, EUA), conforme instruções do fabricante. As etapas da PCR foram realizadas em termociclador automático (ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System, Applied Biosystems), utilizando-se o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA), que é composto por um *PCR Master Mix* universal e uma sonda específica para cada gene, marcada com o fluorocromo FAM. A análise foi feita pelo método do CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$), que se fundamenta na fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que o $\Delta\Delta CT =$

média do Δ CT (grupo tratado) - média do Δ CT (grupo calibrador). O Δ CT é a diferença entre o CT do gene de interesse e o CT do gene endógeno¹⁰⁰.

Para a escolha do melhor controle endógeno foi utilizado o algoritmo geNorm. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o gene *ACTB* foi escolhido como gene endógeno. Para a preparação da PCR, utilizou-se o kit *Taqman Universal PCR Master Mix* com *primers* e sondas específicas para os genes *SOD2*, *PPAR- α* , *ACTB* e *PPARGC-1 β* , com volume final de 10 μ l. O protocolo utilizado para a PCR em tempo real (em placa óptica de 96 poços) foi de 2 minutos a 50°C (1x), desnaturação pré-PCR (1x) por 10 minutos a 95°C, desnaturação por 15 segundos a 95°C e anelamento *primer*/ação da Taq/captação de fluorescência da sonda por 1 minuto a 60°C (ciclo de 40x).

3.5 Expressão proteica por *Western blot*

A técnica de *Western blot* seguiu o protocolo proposto por Brandt *et al.*¹⁰¹, com modificações. Foi realizada a avaliação da expressão proteica de *SOD2*, *PPAR- α* e *PPARGC-1 β* em células do sangue do cordão umbilical de gestantes com DMG e saudáveis e de sangue periférico de adultos obesos e eutróficos. Resumidamente, um total de 70 μ g de extrato protéico foi separado em gel *Mini-protean TGC Precast* a 4%-15% (BioRad, EUA). Posteriormente, o extrato foi transferido para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em tampão de transferência (25 Mm de Tris-HCl, pH 8,3, 192 Mm de glicina, 20% de metanol) a 0,350 A a 4 °C por 1h 30min. O padrão de corrida das amostras foi mantido e confirmado pela coloração de *Ponceau S*. A seguir, as membranas de nitrocelulose foram tratadas com tampão de bloqueamento (1-5% de leite desnatado em TBS-T ou 1%-5% BSA) por 1 h ou *overnight*, conforme instrução do fabricante. Após esse período as amostras foram incubadas com os anticorpos primários contra *SOD2* (Abcam, UK), *PPAR- α* (Abcam, UK), *PPARGC-*

1 β (Abcam, UK) e β -actina (Santa Cruz, USA) *overnight* a 4 °C e, então, lavadas 5 vezes em solução de TBS-T. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-*rabbit* (SOD2, PPAR- α e PPARGC-1 β) e anti-*mouse* (β -actina) por 2h. As bandas contendo as proteínas foram analisadas e quantificadas utilizando-se o aparelho G-Box (SynGene, UK). O conteúdo protéico total de SOD2, PPAR- α e PGC-1 β foi normalizado em relação à expressão da β -actina, sendo apresentados em unidades arbitrárias de densidade óptica

3.6 Análise estatística

A distribuição dos dados demográficos foi analisada pelos testes de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Cramer-von Mises. O teste t de Student foi utilizado para comparações dos resultados referentes à idade, peso do recém-nascido, IMC e glicemia de jejum entre os grupos (diabético *vs* não-diabético e obesos *vs* eutróficos). Para a análise dos dados de expressão gênica e proteica foi realizada a análise de variância a um critério (*one way* ANOVA), seguido da análise *post-hoc* pelo teste de Tukey. Para as comparações entre as proporções de indivíduos do sexo feminino e masculino foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* SAS para Windows (v.9.2). Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as características demográficas da população estudada. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo em relação à idade, peso do recém-nascido, ganho de peso durante a gestação, número de tabagistas e não tabagistas e de indivíduos/recém-nascidos do sexo feminino e masculino. Diferenças significativas foram observadas entre os valores de IMC das gestantes com DMG e as saudáveis ($31,92 \pm 6,89$ vs $23,46 \pm 1,50$; $p < 0,01$) e dos indivíduos obesos e eutróficos ($34,68 \pm 5,27$ vs $21,69 \pm 1,85$; $p < 0,01$).

Os dados sobre a expressão dos genes *SOD2*, *PPAR α* e *PPARGC-1 β* estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 1, 2 e 3. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa desses genes em células do tecido placentário (faces fetal e materna) e do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes com DMG e saudáveis. Os genes *SOD2*, *PPAR- α* e *PPARGC-1 β* apresentaram expressão significativamente aumentada nas células do sangue periférico dos indivíduos obesos comparados aos eutróficos ($p < 0,05$).

As Figuras 4, 5, 6 e 7 apresentam, respectivamente, os valores referentes à expressão das proteínas *SOD2*, *PPAR α* e *PPARGC-1 β* em células sanguíneas (sangue do cordão umbilical e periférico). Não foram observadas diferenças significativas na expressão das três proteínas nas células sanguíneas dos recém-nascidos de gestantes com DMG quando comparados aos de gestantes saudáveis. Por outro lado, foi detectado aumento significativo na expressão de *SOD2*, *PPAR α* e *PPARGC-1 β* no tecido sanguíneo de adultos obesos em comparação ao de indivíduos eutróficos ($p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7). As análises estatísticas que levaram em consideração as variáveis IMC, gênero, idade e hábito tabagista

(demonstrados na Tabela 1) demonstraram que essas não influenciaram os resultados da expressão gênica e proteica.

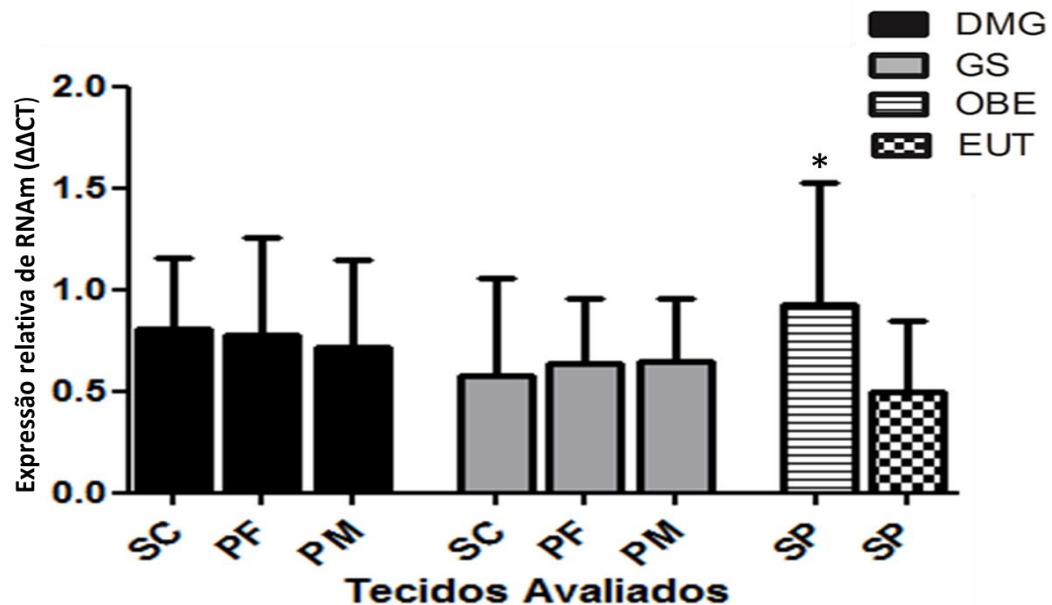


Figura 1 – Expressão relativa do gene *SOD2* em gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e seus respectivos recém-nascidos, e em adultos obesos e eutróficos. SC: células de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos; PF: células da placenta, face fetal; PM: células da placenta, face materna; SP: sangue periférico. * $p < 0,05$ em relação aos indivíduos eutróficos.

Tabela 1 – Dados demográficos da população estudada

Grupos	n (%)	Gênero (paciente ou RN)		Idade (anos)	Etnia		Glicemia em jejum (mg/dL)	IMC (kg/m ²)	Peso do RN (g)	Via de Parto		Consumo de Álcool		
		M	F		B	P/N				Cesárea	Vaginal	NC	CM	CE
Gestantes Saudáveis	19	9	10	31,19 ± 6,46	16	3	77,18±4,40	23,46±1,50	3312,1±418,30	19	-	13	6	-
Não Fumantes	16 (85)	7	8	-	13	3	-	-	-	-	-	13	5	-
Fumantes e ex-fumantes	3 (15)	2	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Gestantes com DMG	19	10	9	32,42 ± 5,19	14	5	95,81±10,00*	31,92±6,89*	3413,23±560,35	17	2	18	1	-
Não Fumantes	18 (95)	10	8	-	13	5	-	-	-	-	-	17	1	-
Fumantes e ex-fumantes	1(5)	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Obesos	19	11	8	30,26 ± 4,73	14	5	-	34,68±5,27**	-	-	-	1	15	3
Não fumantes	16 (85)	9	7	-	11	5	-	-	-	-	-	-	12	3
Fumantes e ex-fumantes	3(15)	2	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Eutróficos	19	10	9	28,52 ± 3,92	14	5	-	21,69±1,85	-	-	-	2	14	3
Não fumantes	16 (85)	7	9	-	11	5	-	-	-	-	-	1	14	1
Fumantes e ex-fumantes	3 (15)	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	1	-	2

RN: recém-nascido; M: masculino; F: feminino; B: branco; P/N: pardo ou negro; IMC: índice de massa corpórea; NC: não consome bebida alcoólica; CM: consumo moderado de bebida alcoólica; CE: consumo elevado de bebida alcoólica. * p<0,05 em relação às gestantes saudáveis; ** p<0,05 em relação aos indivíduos eutróficos.

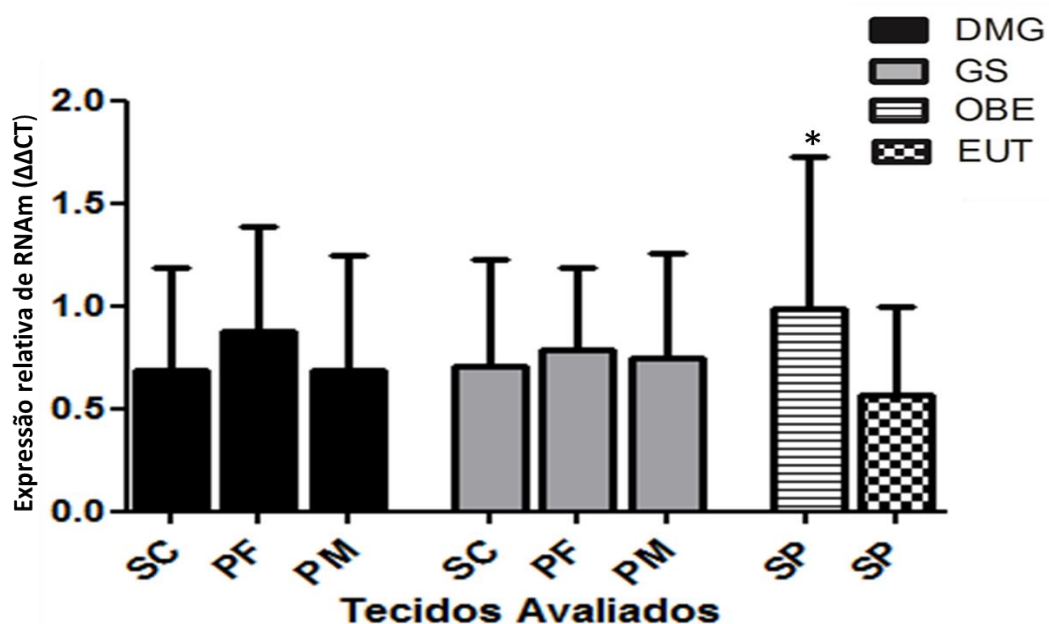


Figura 2 – Expressão relativa do gene *PPARα* em gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e seus recém-nascidos, e em adultos obesos e eutróficos. SC: células de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos; PF: células da placenta, face fetal; PM: células da placenta, face materna; SP: sangue periférico. * $p < 0,05$ em relação aos indivíduos eutróficos.

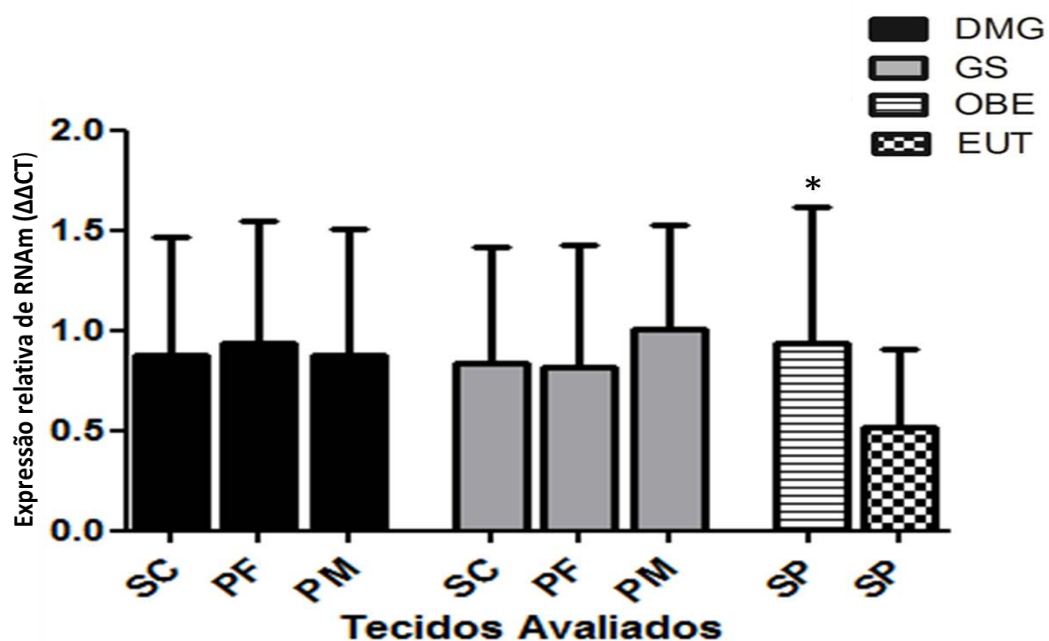


Figura 3 – Expressão relativa do gene *PPARGC-1β* em gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e seus recém-nascidos, e em adultos obesos e eutróficos. SC: células de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos; PF: células da placenta, face fetal; PM: células da placenta, face materna; SP: sangue periférico. * $p < 0,05$ em relação aos indivíduos eutróficos.

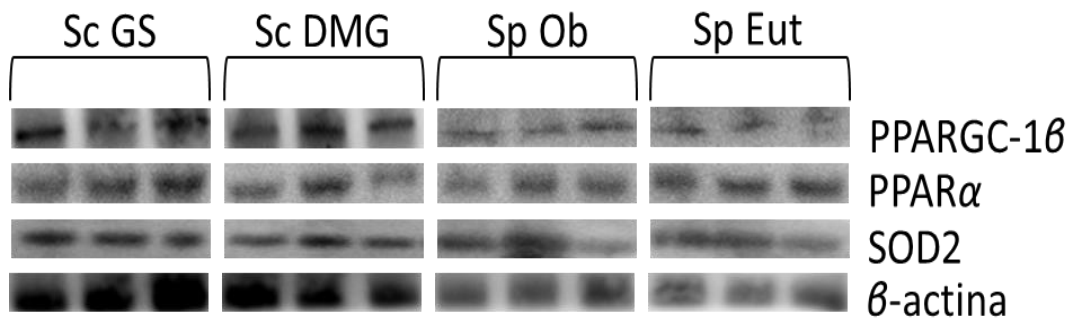


Figura 4 – Análise da expressão das proteínas SOD2, PPARα e PPARGC-1β por *Western Blotting* (3 bandas representativas por grupo) em células de sangue do cordão umbilical (Sc) de recém-nascidos de gestantes com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e saudáveis (GS), e de sangue periférico (Sp) de adultos obesos (Ob) e eutróficos (Eut).

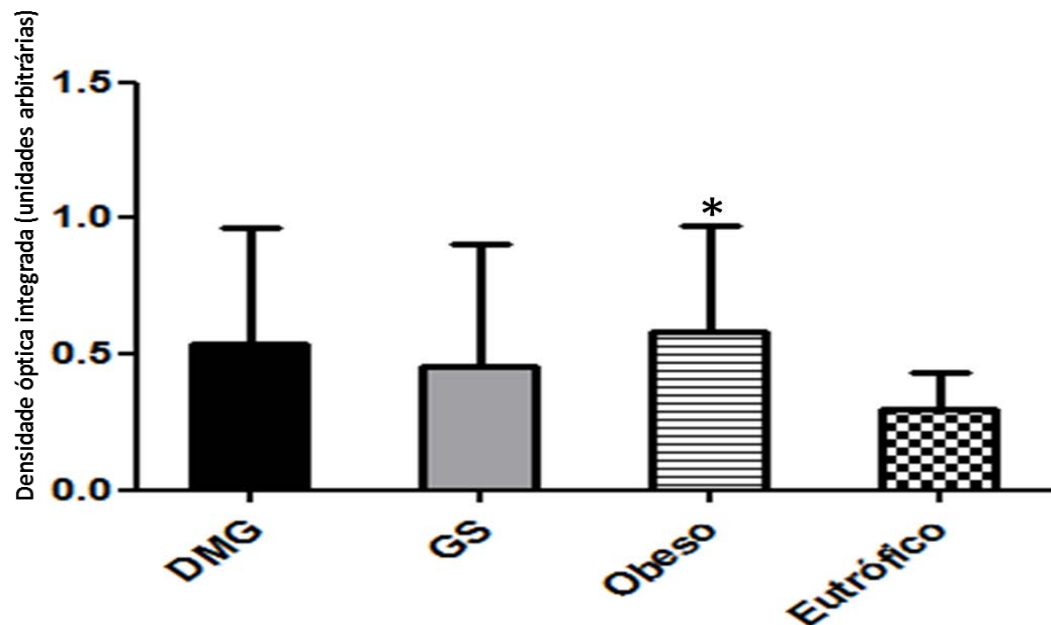


Figura 5 – Expressão relativa da proteína SOD2 em células de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), normalizados pela β-actina (n = 9). Dados apresentados como média e desvio padrão. *p < 0,05 em relação aos indivíduos eutróficos.

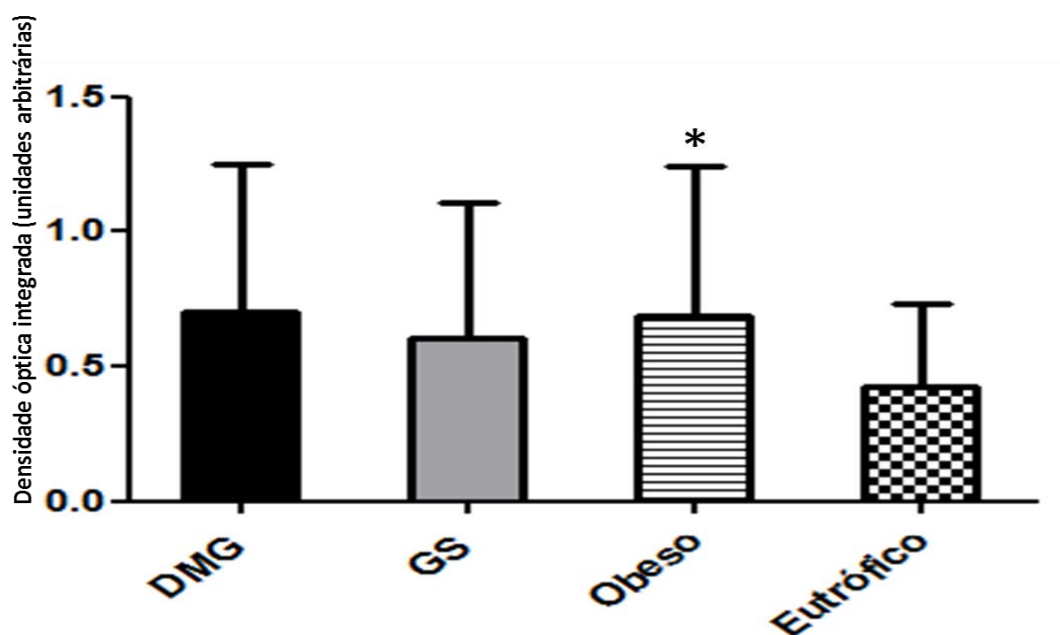


Figura 6 – Expressão relativa da proteína PPAR α em células de sangue do cordão umbilical de recém-nascido de gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), normalizados pela β -actina (n = 9). Dados apresentados como média e desvio padrão. *p< 0,05 em relação aos indivíduos eutróficos.

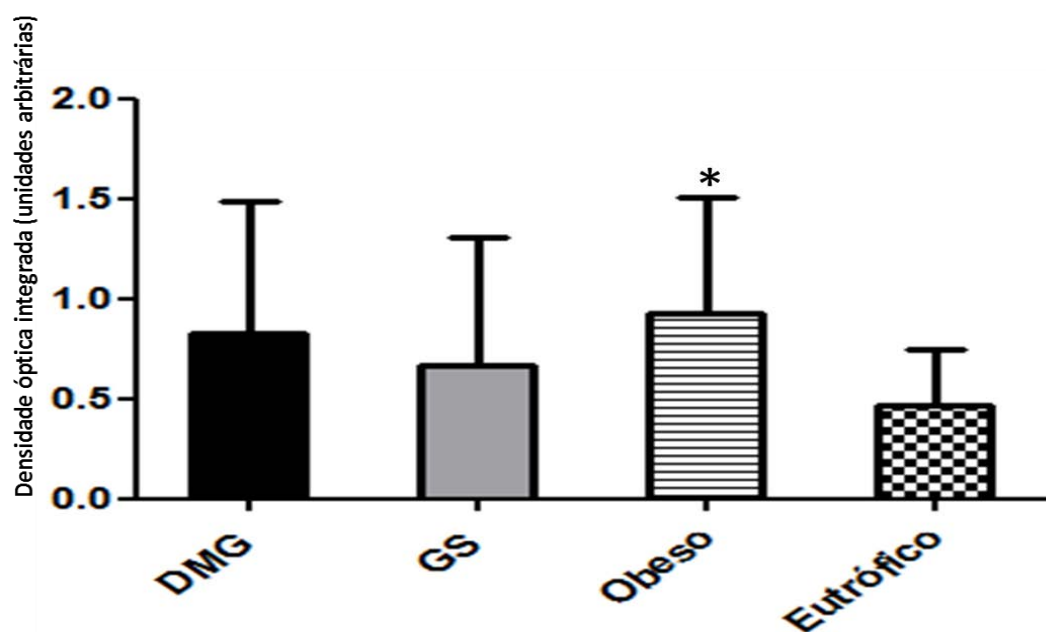


Figura 7 – Expressão relativa da proteína PPARGC-1 β em células de sangue de sangue do cordão umbilical de recém-nascido de gestantes saudáveis (GS) e com *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), normalizados pela β -actina (n = 9). Dados apresentados como média e desvio padrão. *p< 0,05 em relação aos indivíduos eutróficos.

5. DISCUSSÃO

Durante a gravidez, a hiperglicemia, promovida pelo diabetes (tipo 1, 2 ou gestacional), pela pré-eclâmpsia e por outros estímulos estressores, pode levar ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que, por sua vez, podem modular a expressão gênica e alterar proteínas essenciais para o metabolismo placentário. Essas alterações podem ter sérias repercussões no desenvolvimento fetal, predispondo o recém-nascido ao desenvolvimento de doenças na idade adulta¹⁰²⁻¹⁰⁶. Sabe-se que placenta é essencial para o desenvolvimento fetal e é profundamente afetada pelo diabetes materno⁸¹, podendo, este, promover alterações estruturais como o espessamento do estroma das vilosidades coriônicas, as quais podem estar relacionadas à macrosomia fetal⁸⁰.

A literatura reporta que recém-nascidos de gestantes com DMG têm risco aumentado para a macrosomia (peso $\geq 4,0$ kg ao nascimento)¹⁰⁷, além de apresentarem quadro hipoglicêmico devido à hiperinsulinemia e potencial para o desenvolvimento de síndrome metabólica na idade adulta¹⁰⁸⁻¹¹⁰. A prevalência de recém-nascidos macrossômicos de gestações com ocorrência de DMG é de 20% a 30%^(ref.108). Há uma grande quantidade de dados que mostram que as taxas de macrosomia e complicações metabólicas nos recém-nascidos podem ser diminuídas por meio da regulação do nível materno de glicose¹¹¹⁻¹¹². Em nosso estudo, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os pesos dos recém-nascidos de gestantes saudáveis e de gestantes com DMG (Tabela 1). Da mesma forma, nossos resultados não evidenciaram que gestantes com DMG apresentavam parâmetros de hemoglobina glicada alterados (apenas a glicemia de jejum estava aumentada em relação às gestantes saudáveis) e o nível glicêmico do recém-nascido esteve dentro da normalidade. Contudo, cabe ressaltar que as mães com DMG, foram submetidas ao tratamento com

insulina, quando dieta e exercícios físicos prévios não tivessem sido eficazes para o controle da glicemia.

Recentemente, Nicholas *et al.*⁶⁴ observaram que a obesidade materna em ovinos promovia diminuição da expressão dos genes *PPAR-α*, *PPARGC-1α* e *GCN5* no tecido hepático da prole, alterando o metabolismo lipídico, o que poderia contribuir para o desenvolvimento futuro de obesidade e diabetes. Da mesma forma, Borengasse *et al.*¹¹³, observaram em ratos Sprague-Dawley, que a obesidade materna levava à diminuição na expressão do *PPARGC-1β* nos tecidos placentário, hepático e muscular esquelético da prole, confirmando que alterações funcionais no organismo materno podem alterar o metabolismo energético da prole, aumentando o risco para o desenvolvimento tardio de obesidade.

Por outro lado, inúmeros estudos demonstram que o quadro de hiperglicemia está associado ao aumento do estresse oxidativo e a consequente diminuição da capacidade antioxidante e da expressão gênica e proteica de genes relacionados à defesa antioxidante e disfunção mitocondrial, como o *SOD2*, o *CuZnSO*, o *GPx* e o *PPAR-α*^{83,85,85,87,106,114,115}. Considerando que a disfunção mitocondrial pode ter papel importante na gênese da obesidade, o presente estudo avaliou se possíveis alterações transcricionais e traducionais dos genes *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* (relacionados ao metabolismo mitocondrial) estariam associadas à predisposição do recém-nascido a obesidade em gestações com ocorrência de DMG. Nossos resultados evidenciaram, no entanto, que o DMG não interferiu no padrão de transcrição e tradução desses genes nas células sanguíneas dos recém-nascidos e no tecido placentário face fetal e materna.

Em estudo realizado por Holdsworth-Carson *et al.*¹¹⁶ não foram também observadas alterações transcricionais do gene *PPARα*, embora tenha sido detectada diminuição da expressão da proteína *PPARα* no tecido placentário de gestantes com DMG. Esses autores

sugerem que a diminuição dos níveis da proteína poderia diminuir a repressão exercida pelo gene sobre alguns fatores de transcrição pró-inflamatórios (como o *NF-κB*), permitindo, desta maneira, a transcrição de genes relacionados à síntese de citocinas pró-inflamatórias. Mais recentemente, Dubé *et al.*¹¹⁷ demonstraram a existência de relação entre alto IMC e/ou sobrepeso em gestantes com DMG e o aumento do nível de expressão da proteína PPARα (mas não do gene *PPARα*) no tecido placentário (face materna). Por outro lado, os autores não detectaram alterações de expressão gênica e proteica em gestantes com DMG, mas com peso normal, sugerindo que a regulação pós-transcricional de PPARα em gestantes com DMG seria mediada pelo aumento do IMC. Finalmente, os autores sugerem que alto IMC associado ao DMG pode promover alterações nos níveis proteicos de PPARα e receptores de lipoproteínas que modulam o metabolismo lipídico, promovendo o aumento da transferência de compostos de origem lipídica da mãe para o feto. Diferentemente dos nossos achados, Nitert *et al.*¹¹⁸ detectaram aumento da expressão gênica de *PPARα* no tecido placentário de gestantes com DMG com sobrepeso. Os autores ressaltaram que o *PPARα* tem função importante na regulação do *FGF21* (gene relacionado à regulação do metabolismo lipídico e glicolítico), sugerindo que a expressão aumentada desses dois genes poderia estar relacionada ao aumento do transporte de HDL para o feto, embora não tenham sido observadas diferenças entre o peso dos recém-nascidos de gestantes com DMG e dos de gestantes saudáveis.

O gene *PPARGC-1β*, tem fundamental importância para a diferenciação e proliferação mitocondrial, além de regular a expressão do *PPARγ*, gene envolvido na angiogênese placentária (Rodgers *et al.*, 2008). Recentemente, Martin *et al.*¹¹⁹ confirmaram a importância dos genes *PPARGC-1β* e *PPARGC-1α* no desenvolvimento fetal, relacionando as alterações transcricionais durante o período fetal a cardiopatia letal. Contudo, não há na literatura informações sobre o possível efeito do DMG na modulação da expressão do

PPARGC-1 β . Nossos dados demonstraram, no entanto, que o DMG não interferiu no padrão de expressão gênica do *PPARGC-1 β* no tecido placentário faces fetal e materna. Achados publicados por Crunkhorn *et al.*¹²⁰ mostram, apenas, a relação entre obesidade e diminuição da expressão de *PPARGC-1 β* em tecido muscular de camundongos, sugerindo que essa modulação poderia estar relacionada a alterações no metabolismo bioenergético das mitocôndrias, promovidas pelo excesso de ácidos graxos livres. Anteriormente, Andersen *et al.*¹²¹ reportaram que a substituição do aminoácido que gera o alelo Ala203Pro do gene *PPARGC-1 β* estaria relacionada à diminuição do risco de obesidade, tendo, assim, papel crucial na manutenção do IMC e do metabolismo energético. Além disso, os autores sugeriam que esta variação alélica poderia ser responsável pela regulação da proteína NFR1, que tem papel central na expressão de genes mitocondriais e, portanto, no metabolismo energético.

Novamente, a literatura é escassa em informações sobre a possível relação entre o DMG e alterações transcricionais e traducionais do gene *SOD2*. Mordwinkin *et al.*¹²² observaram diminuição da expressão de *SOD2* e também de *SOD3* em sangue periférico de gestantes com DMG, com este padrão se refletindo parcialmente no sangue do cordão umbilical do recém-nascido, uma vez que foi detectada somente diminuição da expressão de *SOD3*. Por outro lado, Lappas *et al.*¹²³, avaliando o tecido placentário de gestantes com DMG, não observaram alterações na expressão do gene *SOD3*, mas apenas aumento da expressão de *CAT* e *GSR*, genes relacionados ao sistema antioxidante. Diminuição do nível de expressão de *SOD1* no tecido placentário (face fetal) de gestantes com pré-eclâmpsia foi detectado por Roland *et al.*¹²⁴, que sugerem que o estresse oxidativo promovido pela doença seria o responsável por tal alteração. Em conjunto, os achados desses autores sugerem que o aumento da expressão de genes relacionados ao sistema antioxidante ocorreria como mecanismo adaptativo de proteção do feto contra danos induzidos por altos níveis de EROs.

O fato do presente estudo não mostrar alterações no padrão de expressão gênica e protéica em gestantes com DMG e em seus respectivos recém-nascidos, pode ser explicado pelo eficiente controle glicêmico realizado desde o início da gravidez, minimizando o efeito de um ambiente intrauterino desfavorável. Lembramos que os valores de hemoglobina glicada das gestantes e os glicêmicos e de peso ao nascimento dos respectivos recém-nascidos apresentaram-se dentro da normalidade¹²⁵.

Com o objetivo de avaliar se alterações nos padrões de expressão gênica e proteica de *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* nos recém-nascidos poderiam estar associadas a maior predisposição ao desenvolvimento da obesidade, avaliamos o padrão de expressão desse genes e de suas respectivas proteínas em adultos obesos. Como demonstrado em estudos anteriores^{64,126-129}, nossos dados confirmaram que a expressão dos genes *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* e da proteína SOD2 estão aumentadas no tecido sanguíneo de indivíduos obesos quando comparados a eutróficos. No entanto, nossos resultados não identificaram semelhanças entre a expressão dos genes e respectivas proteínas entre os recém-nascidos de mães com DMG e os adultos obesos. Esses achados sugerem que esses genes e proteínas não teriam papel central na predisposição dos recém-nascidos ao desenvolvimento da obesidade. De fato, o aumento das expressões em obesos pode estar relacionado a uma resposta adaptativa ao acentuado estresse oxidativo característico da obesidade^{62,130}, uma vez que esses genes desempenham função importante na defesa antioxidante e metabolismo lipídico e energético do organismo, e têm relação direta com diversos genes relacionados ao sistema antioxidante^{64,113,131}.

Finalizando, nossos dados além de terem demonstrado que os genes *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* e suas respectivas proteínas não sofreram alterações de expressão no ambiente

hiperglicêmico (DMG), confirmaram que esses são biomarcadores importantes que evidenciam a associação entre disfunções mitocondriais e obesidade.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo mostraram que:

- Os genes *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* são importantes biomarcadores de obesidade;
- O DMG não promove alteração na expressão dos genes *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* em células do tecido placentário (faces materna e fetal) e de sangue do cordão umbilical do recém-nascido;
- O DMG não promove alteração na expressão das proteínas *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* em células de sangue do cordão umbilical do recém-nascido
- Os níveis de expressão gênica e proteica de *SOD2*, *PPARα* e *PPARGC-1β* em células sanguíneas de recém-nascidos não são parâmetros sensíveis para identificar predisposição para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132 (6):2087-102.
2. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. <http://www.who.int/en/>. Accessed June 2014.
3. World Health Organization (WHO). Overweight and obesity. Fact sheet No. 311 updated March 2013. Geneva: WHO. 2013.
4. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med* 2003; 348 (17):1625-38.
5. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 2003; 108 (13):1546-51.
6. Feng Q, Jiang L, Berg RL, Antonik M, MacKinney E, Gunnell-Santoro J, *et al.* A common CNR1 (cannabinoid receptor 1) haplotype attenuates the decrease in HDL cholesterol that typically accompanies weight gain. *PLoS One* 2010; 5 (12):e15779.
7. Ohtani N, Yoshimoto S, Hara E. Obesity and Cancer: A Gut Microbial Connection. *Cancer Research* 2014; 74 (7):1885-9.
8. Zamosky, L. The obesity epidemic. While America swallows \$147 billion in obesity-related healthcare costs, physicians called on to confront the crisis. *Medical Economics* 2013; 90:14-17.
9. Martinez JA, Parra MD, Santos JL, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Martinez-Gonzalez MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac. J. Clin. Nutr* 2008; 17 (1):119-22.
10. Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes. Rev* 2009; 10 (4):383-92.
11. Latham KE, Sapienza C, Engel N. The epigenetic lorax: gene-environment interactions in human health. *Epigenomics* 2012; 4 (4):383–402.
12. Schwenk RW, Vogel H, Schurmann A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Mol. Metab* 2013; 2 (4):337–347.
13. Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J. Diabetes* 2010; 1 (3):76-88.

14. Gamber KM, Huo L, Ha S, Hairston JE, Greeley S, Bjørnbæk C. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. *PLoS One* 2012; 7 (1):e30485.
15. Maassen JA't Hart LM, Ouwens DM. Lessons that can be learned from patients with diabetogenic mutations in mitochondrial DNA: implications for common type 2 diabetes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2007; 10:693–697.
16. Qian W, Van Houten B. Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods* 2010; 51:452–457.
17. El-Sayed Moustafa JS, Froguel P. From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat. Rev. Endocrinol* 2013;9:402–413
18. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet* 2010; 42 (11):937-48.
19. Tang L, Ye H, Hong Q, Chen F, Wang Q, Xu L, *et al.* Meta-analyses between 18 candidate genetic markers and overweight/obesity. *Diagnostic Pathology* 2014; 9:56.
20. Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, *et al.* Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* 2005; 48 (9):1776-83.
21. Hindle AK, Koury J, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Dysregulation of gene expression within the peroxisome proliferator activated receptor pathway in morbidly obese patients. *Surg. Endosc* 2009; 23 (6):1292-7.
22. Hulsmans M, Geeraert B, De Keyser D, Mertens A, Lannoo M, Vanaudenaerde B, *et al.* Interleukin-1 receptor-associated kinase-3 is a key inhibitor of inflammation in obesity and metabolic syndrome. *PLoS One* 2012; 7(1):e30414.
23. Carless MA, Kulkarni H, Kos MZ, Charlesworth J, Peralta JM, Göring HH *et al.* Genetic effects on DNA methylation and its potential relevance for obesity in Mexican Americans. *PLoS One* 2013; 8 (9):e73950. doi: 10.1371/journal.pone.0073950.
24. García-Cardoso MC, Huang F, García-Vivas JM, López-Camarillo C, Del Río Navarro BE, Navarro Olivios E, *et al.* DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes (Lond)* 2014; doi: 10.1038/ijo.2014.30.

25. Monteiro JP, Wise C, Morine MJ, Teitel C, Pence L, Williams A, *et al.* Methylation potential associated with diet, genotype, protein, and metabolite levels in the Delta Obesity Vitamin Study. *Genes Nutr* 2014; 9 (3):403.
26. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16 (1):6-21.
27. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sc.* 2006; 31:89–97.
28. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007; 128 (4):669-81.
29. Kar S, Sengupta D, Deb M, Shilpi A, Parbin S, Rath SK, *et al.* Expression profiling of DNA methylation-mediated epigenetic gene-silencing factors in breast cancer. *Clin. Epigenetics* 2014; 6 (1):20. eCollection 2014.
30. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J, *et al.* TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature.* 2011; 473 (7347):343–348.
31. Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Eberhart CG. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PLoS One* 2012; 7 (7):e41036
32. Wang F, Yang Y, Lin X, Wang JQ, Wu YS, Xie W, *et al.* Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet* 2013; 22 (18):3641–53
33. Sierksma ASR, Prickaerts J, Chouliaras L, Rostamian S, Delbroek L, Rutten BPF, *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol Aging.* 2013; 34 (1):319–37.
34. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324:930–935.
35. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010; 466:1129–1133.
36. Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res.* 2010; 20 (12):1390-3. doi: 10.1038/cr.2010.156.

37. Ge ZJ, Zhang CL, Schatten H, Sun QY. Maternal Diabetes Mellitus and the Origin of Non-Communicable Diseases in Offspring: The Role of Epigenetics. *Biol. Reprod* 2014; doi: 10.1095/biolreprod.114.118141.
38. Su S, Zhu H, Xu X, Wang X, Dong Y, Kapuku G, *et al.* DNA Methylation of the LY86 Gene is Associated With Obesity, Insulin Resistance, and Inflammation. *Twin Res. Hum. Genet* 2014; 17 (3):183-91.
39. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Åïssi D, Wahl S, *et al.* DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet* 2014; 383 (9933):1990-8. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62674-4.
40. Stilling RM, Röncke R, Benito E, Urbanke H, Capece V, Burkhardt S, *et al.* K-Lysine acetyltransferase 2a regulates a hippocampal gene expression network linked to memory formation. *EMBO J* 2014; 33 (17):1912-27.
41. Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, Wang L, Gimble JM, Lander ES, *et al.* Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell* 2010; 143 (1):156-69.
42. Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R, *et al.* Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: Maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J. Mol. Endocrinol* 2008; 41:91–102.
43. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989; 298 (6673):564-7.
44. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990; 301 (6746):259-62.
45. Joubert BR, Håberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, *et al.* 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ. Health Perspect* 2012; 120:1425–1431.
46. Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE, *et al.* Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109 Suppl: 17253–17260.
47. Reynolds RM, Jacobsen GH, Drake AJ. What is the evidence in humans that DNA methylation changes link events in utero and later life disease? *Clin. Endocrinol (Oxf)* 2013; 78:814-822.

48. American Diabetes Association (ADA). Diagnostic and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care* 2014; supplement 1.
49. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology* 2000; 64 (1):139-153.
50. Mohamed JS, Hajira A, Pardo PS, Boriek AM. MicroRNA-149 Inhibits PARP-2 and Promotes Mitochondrial Biogenesis via SIRT-1/PGC-1 α Network in Skeletal Muscle. *Diabetes* 2014; 63 (5):1546-59.
51. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med* 2014; 20 (12): 1427-35.
52. Wojtczak L, Zabłocki K. Mitochondria in cell life, death and disease. *Postepy Biochem* 2008; 54 (2):129-41.
53. Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J. Intern. Med* 2008; 263:167–178.
54. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, *et al.* Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 2005; 54 (9):2685-93.
55. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, *et al.* Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol* 2012; 32 (2):309-19;
56. Lindinger A, Peterli R, Peters T, Kern B, von Flue M, Calame M, *et al.* Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue. *Obes. Surg* 2010; 20:84–92.
57. Hernández-Alvarez MI, Thabit H, Burns N, Shah S, Brema I, Hatunic M, *et al.* Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* 2010; 33 (3):645-51.
58. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, *et al.* Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 2012; 23:11-30.

59. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115:81-103.
60. Madsen-Bouterse SA, Zhong Q, Mohammad G, Ho YS, Kowluru RA. Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes and its protection by manganese superoxide dismutase. *Free Radic Res* 2010; 44 (3):313-21.
61. Larsen S, Stride N, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Andersen JL, Madsbad S, *et al.* Increased mitochondrial substrate sensitivity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2011; 54 (6):1427-36.
62. Liu Y, Qi W, Richardson A, Van Remmen H, Ikeno Y, Salmon AB. Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2013; 438 (1):78-83.
63. Burri L, Thoresen GH, Berge RK. The role of PPAR α activation in liver and muscle. *PPAR Research* 2010; doi: 10.1155/2010/542359.
64. Nicholas LM, Rattanatrak L, Morrison JL, Kleemann DO, Walker SK, Zhang S, *et al.* Maternal obesity or weight loss around conception impacts hepatic fatty acid metabolism in the offspring. *Obesity* 2014; 7:1685-93.
65. Capobianco E, Martínez N, Fornes D, Higa R, Di Marco I, Basualdo MN, *et al.* PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. *Mol. Cell Endocrinol* 2013; 377 (1-2):7-15.
66. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, *et al.* PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Nature* 2002; 418:797–801.
67. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, *et al.* PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 2005; 3 (4):101.
68. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev* 2008; 88:611–638.
69. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the pgc-1 α and sirt1 pathways. *FEBS Lett* 2008; 582:46–53.
70. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, *et al.* Characterization of the human, mouse and rat PGC1 β (peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 β) gene in vitro and in vivo. *Biochem. J* 2003; 373:155–165.

71. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP. Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am. J. Clin. Nutr* 2002; 72:1101–1106.
72. Gonzalez-Barranco J, Rios-Torres JM, Castillo-Martinez L, Lopez-Alvarenga JC, Aguilar-Salinas CA, Bouchard C, *et al.* Effect of malnutrition during the first year of life on adult plasma insulin and glucose tolerance. *Metabolism* 2003; 52:1005–1011.
73. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C *et al.* Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* 2011; 60 (5):1528-34. doi: 10.2337/db10-0979.
74. Gillman MW, Rifas-Shiman S, Berkey CS, Field AE, Colditz GA. Maternal gestational diabetes, birth weight, and adolescent obesity. *Pediatrics* 2003; 111 (3):e221-6.
75. Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, *et al.* Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91 (10):4137-43.
76. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell* 2012; 148 (6):1160-71.
77. American Diabetes Association (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes – 2013. *Diabetes care* 2013; s11-s66.
78. Lawlor DA, Lichtenstein P, Långström N. Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. *Circulation* 2011; 123 (3):258-65.
79. Yessoufou A, Moutairou K. Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". *Exp. Diabetes Res* 2011; doi:10.1155/2011/218598.
80. Vambergue A, Fajardy I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J. Diabetes* 2011; 2 (11):196-203.
81. Desoye G, Gauster M, Wadsack C. Placental transport in pregnancy pathologies. *Am. J. Clin. Nutr* 2011; 94 (6):1896S-1902S.
82. Marseille-Tremblay C, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Mounier C, *et al.* Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Mol. Reprod. Dev* 2008; 75 (6):1054-62.

83. Wentzel P, Gäreskog M, Eriksson UJ. Decreased cardiac glutathione peroxidase levels and enhanced mandibular apoptosis in malformed embryos of diabetic rats. *Diabetes* 2008; 57 (12):3344-52.
84. Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE. Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J* 2010; 24 (8):2762-71.
85. Martínez N, Kurtz M, Capobianco E, Higa R, White V, Jawerbaum A. PPAR α agonists regulate lipid metabolism and nitric oxide production and prevent placental overgrowth in term placentas from diabetic rats. *J. Mol. Endocrinol* 2011; 47 (1):1-12.
86. Martínez N, White V, Kurtz M, Higa R, Capobianco E, Jawerbaum A. Activation of the nuclear receptor PPAR α regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth. *Diabetes Metab. Res. Rev* 2011b; 27 (1):35-46.
87. Kurtz M, Martínez N, Capobianco E, Higa R, Fornes D, White V, *et al.* Increased nitric oxide production and gender-dependent changes in PPAR α expression and signaling in the fetal lung from diabetic rats. *Mol. Cell. Endocrinol* 2012; 362(1-2):120-7.
88. Pinney SE, Simmons RA. Metabolic programming, epigenetics, and gestational *Diabetes mellitus*. *Curr. Diab. Rep* 2012; 12 (1):67-74.
89. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br. J. Nutr* 2007; 97 (3):435-9.
90. Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br. J. Nutr* 2008; 100 (2):278-82.
91. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105 (44):17046-9.

92. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, *et al.* DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet* 2009; 18 (21):4046-53.
93. Van Abeelen AF, Elias SG, Bossuyt PM, Grobbee DE, van der Schouw YT, Roseboom TJ, *et al.* Famine Exposure in the Young and the Risk of Type 2 Diabetes in Adulthood. *Diabetes* 2012; 61:2255–2260.
94. Rudge MV, Peracoli JC, Berezowski AT, Calderon IM, Brasil MA. The oral glucose tolerance test is a poor predictor of hyperglycemia during pregnancy. *Braz. J. Med. Biol. Res* 1990; 23 (11): 1079-89.
95. World Health Organization (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
96. Centers for Disease Control and Prevention Tobacco Control State Highlights 2012. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2013.
97. Gontijo AM, Marcondes JP, Elias FN, de Oliveira ML, de Lima RO, Salvadori DM *et al.* DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen* 2002; 40:190-199.
98. Knapp P, Chabowski A, Blachnio-Zabielska A, Jarzabek K, Wolczynski S. Altered peroxisome-proliferator activated receptors expression in human endometrial cancer. *PPAR Res* 2012; 2012:471524.
99. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248–254.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001; 25 (4):402-8.
101. Brandt JZ, Silveira LT, Grassi TF, Anselmo-Franci JA, Fávaro WJ, Felisbino SL, *et al.* Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod. Toxicol* 2014; 43:56-66.
102. Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004; 25:78–84.

103. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak A. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006; 27:327–332.
104. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum. Reprod. Update* 2006; 12:747–755.
105. Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol. Obstet Invest* 2007; 64:187–192.
106. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010; 31:566-569.
107. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N. Engl. J. Med* 2005; 352:2477–2486.
108. Kjos SL, Buchanan TA. Gestational *Diabetes mellitus*. *N. Engl. J. Med* 1999; 341:1749–1756.
109. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49:270–283.
110. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009; 373:1789–1797.
111. Klein J, Charach R, Sheiner E. Treating diabetes during pregnancy. *Expert. Opin. Pharmacother* 2014; 1-12.
112. Viana LV, Gross JL, Azevedo MJ. Dietary Intervention in Patients With Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials on Maternal and Newborn Outcomes. *Diabetes Care*. 2014; 37 (12):3345-3355
113. Borengasser SJ, Faske J, Kang P, Blackburn ML, Badger TM, Shankar K. In utero exposure to prepregnancy maternal obesity and postweaning high-fat diet impair regulators of mitochondrial dynamics in rat placenta and offspring. *Physiol. Genomics* 2014; 46 (23):841-50.
114. El-Bab MF, Zaki NS, Mojaddidi MA, Al-Barry M, El-Beshbishy HA. Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. *Int. J. Gen. Med* 2013; 6:799-806.

115. Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, Rubattu S, Volpe M, Frati G, *et al.* New Insights into the Role of Mitochondrial Dynamics and Autophagy during Oxidative Stress and Aging in the Heart. *Oxid. Med. Cell Longev* 2014; 2014:210934. Epub 2014 Jul 15.
116. Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, Lappas M. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta* 2010; 31 (3):222-9.
117. Dubé E, Ethier-Chiasson M, Lafond J. Modulation of cholesterol transport by insulin-treated gestational diabetes mellitus in human full-term placenta. *Biol. Reprod* 2013; 88 (1):16.
118. Nitert MD, Barrett HL, Kubala MH, Scholz Romero K, Denny KJ, Woodruff TM, McIntyre HD, Callaway LK. Increased placental expression of fibroblast growth factor 21 in gestational. *Diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab* 2014; 99 (4):E591-8. doi: 10.1210/jc.2013-2581.
119. Martin OJ, Lai L, Soundarapandian MM, Leone TC, Zorzano A, Keller MP, *et al.* A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth. *Circ. Res* 2014; 114 (4):626-36.
120. Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva WS, Espinoza D, *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem* 2007; 282 (21):15439-50.
121. Andersen G, Wegner L, Yanagisawa K, Rose CS, Lin J, Glümer C, *et al.* Evidence of an association between genetic variation of the coactivator PGC-1beta and obesity. *J. Med. Genet* 2005; 42 (5):402-7.
122. Mordwinkin NM, Ouzounian JG, Yedigarova L, Montoro MN, Louie SG, Rodgers KE. Alteration of endothelial function markers in women with gestational diabetes and their fetuses. *Matern. Fetal Neonatal Med* 2013; 26 (5):507–512.
123. Lappas M1, Mitton A, Permezel M. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *J. Endocrinol* 2010; 204 (1):75-84.

124. Roland L, Beauchemin D, Acteau G, Fradette C, St-Pierre I, Bilodeau JF. Effects of labor on placental expression of superoxide dismutases in preeclampsia. *Placenta* 2010; 31 (5):392-400.
125. American Diabetes Association (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes care* 2014; supplement 1 514-580.
126. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology* 2000; 141 (11): 4021-31.
127. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, Kawada T, Miyoshi M, Ezaki O, Kakizuka A. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100 (21):12378-83.
128. Fruchart J-C. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.008.
129. Rong X, Li Y, Ebihara K, Zhao M, Kusakabe T, Tomita T. Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPAR alpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br. J. Pharmacol* 2010; 160 (7):1796-807.
130. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest* 2004; 114 (12):1752-61.
131. Boyle KE, Newsom SA, Janssen RC, Lappas M, Friedman JE. Skeletal muscle MnSOD, mitochondrial complex II, and SIRT3 enzyme activities are decreased in maternal obesity during human pregnancy and gestational *Diabetes mellitus*. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2013; 98(10):E1601-9. doi: 10.1210/jc.2013-1943.

8. APÊNDICES

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

Projeto: “Caracterização molecular da programação fetal no diabetes gestacional: predisposição para o desenvolvimento da obesidade”

Subprojeto 1: Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve.

Subprojeto 2: Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre Diabetes mellitus gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade.

Subprojeto 3: Efeito do Diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e a implicação na predisposição do recém-nascido à obesidade.

Pesquisador – Responsável: Prof^a Dr^a Marilza Vieira Cunha Rudge, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP. (14 3880-1631); marilzarudge@gmail.com

Registro do voluntário no estudo:.....

Data: / /

I – Identificação

1 – Nome:

2 – RGH:| | | | | | |

3 – Sexo [M] masculino [F]feminino.....

4 – Profissão:

5- Cor: ☐ branca ☐ parda ☐ negra ☐ amarela

6 – Data de nascimento: / .. / ..

7 – Idade:

II – Antecedentes pessoais

1 – Fuma [S] sim [N] não.....

2 – Há quanto tempo (anos)

3 - Quantos cigarros/dia.....	
-------------------------------	--

4 – Tipo [1] cachimbo [2] charuto [3] palha [4] papel c/ filtro [5] outros.....

5 – Já fumou [S] sim [N] não.....

6 - Há quanto tempo deixou de fumar (meses)

7 – Quantos cigarros/dia.....

8 – Durante quanto tempo fumou (meses)

9 – Tipo [1] [2] [3] [4] [5]

10 – Bebe [S] sim [N] não.....

11 – Há quanto tempo (meses)|

12 – Tipo [1] cachaça [2] cerveja [3] whisky [4] vodka [5] vinho [6] outras.....|_____

13 – Quantidade/dia – No copos /dia

14 – Já bebeu [S] sim [N] não.....|

15 – Tipo [1] [2] [3] [4] [5] [6]

16 - Quantidade/dia – No copos /dia|

17 – Há quanto tempo deixou (meses)

18 – Contato com substâncias tóxicas [S] sim [N] não.....|

19 – Quais _____

- 20 – Por quanto tempo.....| |
- 21 – Período sem contato com a(s) substância(s)| |
- 22 - História de exposição à radiação [S] sim [N] não.....| |
- 23 – Número de RX.....| |
- 24 – Usa habitualmente algum tipo de medicação [S] sim [N] não.....| |
- 25 – Quais [A] antibiótico [V] vitamina [AI] antiinflamatório [X] xarope [O] outros.....| |
- 26 – Frequência/dia.....| |
- 27 - Tipo.....| |
- 28 – Já usou algum tipo de medicamento [S] sim [N] não.....| |
- 29 - Quais [A] antibiótico [V] vitamina [AI] antiinflamatório [X] xarope [O] outros.....| |
- 30 - Frequência/dia.....| |
- 31 - Tipo.....| |
- 32 - Há quanto tempo deixou (meses).....| |
- 33 – Possui algum tipo de doença? Qual (s)?.....
- 34 – Histórico familiar: () obesidade / () diabetes / () hipertensão / () hipercolesterolemia
() doença cardiovascular / () outros / quem?.....
- 35- Peso (kg):.....Altura (m):.....IMC (kg/m^2):.....

FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

Projeto: “**Caracterização molecular da programação fetal no diabetes gestacional: predisposição para o desenvolvimento da obesidade**”

Subprojeto 1: Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve.

Subprojeto 2: Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre Diabetes mellitus gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade.

Subprojeto 3: Efeito do Diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e a implicação na predisposição do recém-nascido à obesidade.

Pesquisador – Responsável: Prof^a Dr^a Marilza Vieira Cunha Rudge, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP. (14 3880-1631); marilzarudge@gmail.com

DADOS DA PACIENTE

Nome:.....Paciente n^o

Data:...../...../.....

Registro FMB.....

Data de nascimento:...../...../.....

RG:.....

Qual o seu endereço (rua, n^o, cidade, CEP):

Telefone para contato _____

Qual é sua nacionalidade? _____

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()

Estado civil

(1) casada (2) divorciada (3) solteira

(4) amasiada (5) viúva

Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () há quanto tempo?.....

Por quanto tempo fumou?.....

Fuma () N^o de cigarros/dia.....

Tipo: () cachimbo () charuto () palha () papel com filtro () outros

Convive com fumante? Sim () Não ()

Local: () casa () trabalho () outros

No. de pessoas?.....Quantas horas/dias?.....

Consume bebida alcoólica? Sim () Não ()

Até 7 doses/sem. () Mais de 7 doses/sem ()

Usa drogas? Sim () Não ()

Tipo: () maconha () cocaína () craque () outros

Vias de administração: () inalatória () endovenosa () outras

Durante quanto tempo?.....

Já usou? Sim () Não () Quanto tempo?.....

Parou há quanto tempo?.....

Contato com substâncias tóxicas? Sim () Não ()

Quais?.....

Por quanto tempo (meses)?.....

Período sem contato com a (s) substância (s) (meses):.....

Possui algum tipo de doença? Sim () Não () Qual(is)?

Diabetes mellitus ()

Já teve infarto? Sim () Não () Há quanto tempo?.....

É hipertensa? Sim () Não ()

É obeso? Sim () Não ()

Peso (Kg)..... Altura (cm)..... IMC:.....

Toma medicamento? Sim () Não ()

Qual(is)? Em que dosagem?.....

Profissão:..... Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()

Pratica exercício físico? Sim () Não () Com que frequência?.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente com:

Diabetes Mellitus () Obesidade () Hipertensão ()

Doença cardiovascular () Hipercolesterolemia () () outros

Quem?.....

Não tem () Não sabe ()

HISTÓRIA GESTACIONAL

G:.....P:.....A:.....C:.....

DUM:.....

Pré-natal: Sim () Não () No. de consultas?.....

Intercorrências durante a gravidez: (..)náuseas () vômitos () dor abdominal

() dor para urinar () corrimentos () sangramento () outros

Doenças durante a gestação: Sim () Não () Tipo?.....

Tratamento: Sim () Não () Qual?.....

Fatores de risco para HIV? Sim () Não ()

AVALIACÕES

	Inicial	Final
Peso (kg) (verificar no cartão de pré-natal ou na folha rosa do prontuário)		
Pressão Arterial (mmHg) (verificar no cartão de pré-natal ou na folha rosa do prontuário)		

DADOS DO RECÉM-NASCIDO (RN)

Tipo de parto: () normal () cesária () fórceps () outros

Sinais de sofrimento fetal? Sim () Não ()

Qual?.....

Mecônio: Sim () Não ()

Tipo: () fluido () moderado () espesso

Apgar: 1' 5' 10'

New Ballard (NB):.....Sexo:.....Peso:.....Estatura:.....

PC:.....PT:.....PA:.....

Classificação do RN: () PIG () AIG () GIG

Necessidade de reanimação: () máscara () ventilação sob pressão () intubação

() drogas Quais drogas?.....

Óbito RN: Sim () Não ()

Vasos do cordão: () 2 artérias e 1 veia () 1 artéria e 1 veia () outros

Anomalias ou malformações: Sim () Não ()

Quais?.....

Tipo de placenta: () normal () calcificada () outras

DADOS DA PACIENTE - EXAMES LABORATORIAIS

(serão anotados e avaliados pela Equipe LAPGO posteriormente)

Parâmetros	Data da coleta	Valores
Glicemia Inicial (mg/dL)		
Glicemia Final (mg/dL)		
Relação cintura/quadril Inicial (cm)		
Relação cintura/quadril Final (cm)		
Glicemia em jejum (mg/dL)		
Glicemia pós-prandial (mg/dL)		
Glico-hemoglobina (mg/dL)		
Insulinemia em jejum (mg/dL)		
Insulinemia pós-prandial (mg/dL)		
Colesterol total (mg/dL)		
LDL-c (mg/dL)		
HDL-c (mg/dL)		
VLDL-c (mg/dL)		
Triglicérides (mg/dL)		
Adiponectina		
Ácidos graxos livres		

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EXPLICAÇÃO AO VOLUNTÁRIO (SAUDÁVEL)

O número de pessoas obesas (crianças, adolescentes e adultos) vem aumentando nas últimas décadas. As pessoas obesas têm maior risco para desenvolverem diversas doenças, como as cardiovasculares (que afetam o coração, artéria e veias), diabetes e até mesmo alguns tipos de câncer. Os maus hábitos alimentares (frituras, etc), a falta de exercícios físicos e algumas características genéticas (herdadas dos pais) podem aumentar o risco de uma pessoa ser obesa, mas não explicam, totalmente, porque o número de pessoas obesas vem aumentando. Diversos estudos sugerem que alguns problemas durante a gravidez, como, por exemplo, o diabetes, pode aumentar o risco de o bebê tornar-se obeso no futuro. Assim é importante entender como o diabetes, durante a gestação, pode modificar o organismo dos bebês e aumentar a chance de serem obesos no futuro.

Em decorrência disto, o (a) Sr (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo para investigar se o diabetes gestacional (que se origina durante a gravidez) pode causar alguma alteração genética que aumentaria o risco do bebê ser obeso na vida adulta. Para isso, há necessidade de comparar as células do bebê com as de adultos magros e obesos para verificar se existem algumas similaridades. O Sr (a) irá compor um grupo de pessoas saudáveis (que não apresentam sobrepeso ou obesidade, ou qualquer tipo de doença), que será a referência (controle) controle para a grupo de participantes. Os resultados deste estudo poderão não trazer benefícios diretos e imediatos, mas poderão contribuir, futuramente, para que se estabeleçam tratamentos que possam diminuir o risco de desenvolvimento da obesidade. Caso aceite participar, serão retirados 15 mL de sangue (punção venosa), por profissional qualificado, utilizando material descartável, não havendo grande desconforto (a

não ser o causado pela picada da agulha), ou complicações. Se sobrar, parte do sangue coletado poderá ser armazenada para possíveis estudos futuros, que serão realizados somente após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa de um novo projeto de pesquisa e novo termo de consentimento livre e esclarecido. Será também pedido para o (a) Sr (a) responder algumas perguntas contidas em um questionário sobre seus hábitos de vida, como por exemplo, se é fumante, se bebe, etc. A aplicação deste questionário é rápida, levando em média 30 minutos para ser realizada.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(2 VIAS: VOLUNTÁRIO E PESQUISADOR RESPONSÁVEL)

I. Identificação do Paciente

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1- Título do Protocolo da Pesquisa: "Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre *Diabetes mellitus* gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade".

Subprojeto 1: Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve.

Subprojeto 2: Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre Diabetes mellitus gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade.

Subprojeto 3: Efeito do Diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e a implicação na predisposição do recém-nascido à obesidade.

2- Pesquisador responsável: Profª Drª Marilza Vieira Cunha Rudge

3- Avaliação de risco da Pesquisa: a pesquisa não oferece risco ou desconforto, pois serão coletados apenas 15 mL de sangue por punção venosa.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: diversos estudos sugerem a associação entre fatores estressores durante a gravidez ao risco aumentado do recém-nascido tornar-se obeso. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar possíveis alterações genéticas, estimuladas pelo diabetes gestacional, que possam aumentar a predisposição do recém-nascido para o desenvolvimento da obesidade.

2 - Procedimentos utilizados: serão coletados, por profissional qualificado e utilizando material descartável, 15 mL de sangue periférico por punção venosa. A amostra será utilizada neste estudo e parte poderá ser armazenada para análises futuras em estudos que serão encaminhados, oportunamente, ao Comitê de Ética para avaliação. Além disso, será aplicado pelos pesquisadores, um questionário detalhado sobre os hábitos de vida de todos os participantes do estudo. Destacamos que serão utilizados, quando necessário, os dados de prontuários médicos de cada participante.

3 - Desconfortos e riscos: o único desconforto físico será devido à coleta de sangue por punção venosa.

4 - Benefícios que poderão ser obtidos: no futuro, os resultados deste estudo poderão contribuir para a identificação de sinais precoces que mostrem se há maior risco para o recém nascido de mães com diabetes gestacional desenvolver obesidade na vida adulta e para a busca de novos tratamentos que possam auxiliar na prevenção da obesidade.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?

[] SIM

[] NÃO

- 2- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.
[] SIM [] NÃO
- 3- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?
[] SIM [] NÃO
- 4- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 5- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 6- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 7- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?
[] SIM [] NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo,

portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de _____

_____, _____ ou _____

Pesquisador

Paciente ou Responsável

Este documento, após aprovação do CEP, será elaborado em duas vias, sendo uma destinada ao sujeito da pesquisa e a outra para o arquivamento pelo pesquisador.

VI - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Nome: Dra. Marilza Vieira da cunha Rudge

Endereço: Depto. de Ginecologia e Obstetrícia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N, Botucatu – SP; telefone: (14) 3811-6227 – marilzrudge@gmail.com.

**Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP –
Telefone: (14)3880-1608**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

GESTANTES DIABÉTICAS E NÃO DIABÉTICAS SEUS RECÉM-NASCIDOS

I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (VOLUNTÁRIO)

Nome:		
RG:	Código (não preencher):	
Endereço:		
Cidade:	Bairro:	
CEP:	Estado:	Telefone:

II. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA PROGRAMAÇÃO FETAL NO DIABETE GESTACIONAL: PREDISPOSIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Subprojeto 1: Avaliação no padrão de expressão gênica em células do sangue total de gestantes diabéticas e com hiperglicemia gestacional leve.

Subprojeto 2: Mecanismos moleculares associados à obesidade: relação entre Diabetes mellitus gestacional, modulação do epigenoma fetal e predisposição à obesidade.

Subprojeto 3: Efeito do Diabetes mellitus gestacional na modulação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e a implicação na predisposição do recém-nascido à obesidade.

Pesquisador – Responsável: Prof^a Dr^a Marilza Vieira Cunha Rudge, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP. (14 3880-1631); marilzarudge@gmail.com

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE

O presente estudo tem por objetivos identificar os genes relacionados ao diabetes pela análise do seu sangue e os marcadores genéticos do seu filho, que podem ser modificados pelo diabetes, para entender melhor os riscos de ele apresentar obesidade no futuro. Desta forma, solicitamos sua autorização para coleta de uma amostra do seu sangue (máximo de 2,5ml) para realização de exames bioquímicos e extração de material genético (DNA) das células para avaliação de características genéticas (genes) que são responsáveis pelas respostas do seu organismo à exposição a algumas substâncias. Solicitamos, também, sua autorização para que sejam coletadas amostras de placenta e amostra de sangue do cordão

umbilical do bebê para realização dos mesmos exames e autorização para que parte das amostras de sangue e placenta possam ser armazenadas, sob responsabilidade da Faculdade de Medicina de Botucatu, para a realização de estudos semelhantes no futuro. Destacamos que serão utilizados, quando necessário, os dados de prontuários médicos de cada participante. Esclarecemos que, a não ser o pequeno desconforto no momento da picada da agulha, a coleta do sangue não tem risco, pois será feita por profissional qualificado e utilizando material descartável. Se sobrar, parte do material biológico coletado poderá ser armazenada para possíveis estudos futuros, que serão realizados somente após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa de um novo projeto de pesquisa e novo termo de consentimento livre e esclarecido. Será também pedido para a Sra. responder algumas perguntas contidas em um questionário sobre seus hábitos de vida, como por exemplo, se é fumante, se bebe, etc. A aplicação deste questionário é rápida, levando em média 30 minutos para ser realizada. A senhora pode, a qualquer momento, se recusar em contribuir com o estudo sem ser prejudicada no seu tratamento e acompanhamento médico, ou pode, também, ter acesso aos resultados. Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Os resultados deste estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade. Os resultados do estudo não trarão benefícios imediatos a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para redução dos efeitos adversos causados por essa patologia. Os pesquisadores responsáveis por este estudo, sempre que solicitados, estarão à sua disposição para o esclarecimento de qualquer questão relacionada à pesquisa. Ressaltamos que nem os pesquisadores e nem o paciente receberá qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa.

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo e sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

Botucatu, _____ de _____ de _____

Paciente

Profª. Marilza Vieira Cunha Rudge
Pesquisadora

Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
Telefone: (14)3880-1608