



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



**ADAPTAÇÕES PLACENTÁRIAS E DESFECHO FETAL EM PROLE DE MÃES COM
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA**

Ana Paula Varela Sanches

Limeira, SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



Ana Paula Varela Sanches

ADAPTAÇÕES PLACENTÁRIAS E DESFECHO FETAL EM PROLE DE MÃES COM
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestra em Ciência da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Concentração Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Letícia Martins Ignácio-Souza.

Universidade Estadual de Campinas, Campus de Limeira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Marciane Milanski Ferreira

Universidade Estadual de Campinas, Campus de Limeira

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
ANA PAULA VARELA SANCHES, E ORIENTADA PELA
PROF.(A). DR(A). LETÍCIA MARTINS IGNÁCIO-SOUZA

Limeira – SP

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Sanches, Ana Paula Varela, 1995-
Sa55a Adaptações placentárias e desfecho fetal em prole de mães com
obesidade induzida por dieta hiperlipídica / Ana Paula Varela Sanches. –
Limeira, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Letícia Martins Ignácio-Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Aplicadas.

1. Feto - Desenvolvimento. 2. Obesidade. 3. Dieta hiperlipídica. 4.
Placenta. I. Souza, Letícia Martins Ignácio de, 1987-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Placental adaptation and fetal outcome in offspring from swiss mice with high-fat diet-induced obesity

Palavras-chave em inglês:

Fetal development

Obesity

Diet, high-fat

Placenta

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Letícia Martins Ignácio-Souza [Orientador]

Rosângela Maria Neves Bezerra

Juliana Almeida Faria

Data de defesa: 27-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5941-2590>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0304015597536804>

Folha de Aprovação

Autor(a): Ana Paula Varela Sanches

Título: Adaptações placentárias e desfecho fetal em prole de mães com obesidade induzida por dieta hiperlipídica

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 27 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Letícia Martins Ignácio-Souza (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Rosangela Maria Neves Bezerra (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Juliana Almeida Faria (membro externo)
Universidade de Cambridge, Reino Unido

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana Maria e Olívio, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, estarem sempre presentes mesmo de longe, por acreditarem em mim e mostrarem que eu sou capaz. Essa conquista não seria possível sem o suporte de vocês.

Agradecimentos

Primeiramente queria agradecer à Deus por sempre me guiar, abençoar e conceder luz e força para vencer os obstáculos da vida e nunca deixar que a desistência fosse uma opção. Por ter me acompanhado na minha caminhada e durante todo o meu trabalho, por estar sempre presente e por colocar pessoas especiais no meu dia-a-dia.

Um agradecimento especial à minha família, meus pais e meus irmãos por todo amor, carinho e suporte que nem mesmo os 4.663 km de distância foram capazes de impedir. Quero demonstrar aqui toda a minha gratidão por sempre acreditarem em mim mais do que eu mesma acredito e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

À minha orientadora, Letícia Souza, que é um exemplo de pessoa e profissional, símbolo de coragem e determinação e uma das pessoas mais inteligente que já conheci, pessoa na qual eu me inspiro muito todos os dias. Agradeço por ter me aceitado, ter acreditado em mim, me guiado e me acompanhado no meu trabalho, por todo conhecimento transmitido, por ter me mostrado as maravilhas da ciência, que é a base da explicação da nossa existência e de tudo que nos rodeia. Seu apoio e preocupação comigo me surpreende, me deixa tão feliz que me faltam palavras para te agradecer. Você é um exemplo que levarei para o resto da minha vida. Obrigada, Letícia, por toda atenção, carinho, dedicação e confiança depositada em mim. Sou muito sortuda por ter uma pessoa tão ilustre como minha orientadora.

À minha co-orientadora, Marciane, que é pessoa leve, feliz, inteligente que sempre transmite uma energia positiva com o seu jeito de ser. Muito obrigada Marciane, por ter me aceitado e acreditado em mim sem mesmo me conhecer. Você me abriu as portas e eu nunca me esquecerei disso!

Aos professores, Márcio Torsoni e Adriana Torsoni por terem me acolhido, por todas as discussões de grupo que certamente contribuíram muito para despertar nosso senso crítico. Vocês são um exemplo de pessoas e profissionais e com certeza, uma inspiração de vida não só para mim como para muitas outras pessoas.

Aos colegas do laboratório pelos conselhos, amizade, conversas, comilança e por tornarem os dias de trabalho mais leves e alegres. Agradeço a todos os alunos do LABDIME que estão sempre dispostos a ajudar e contribuir com o trabalho de todos. Um agradecimento especial à Josiane que com muita paciência e carinho atua como professora e amiga nos mais diversos experimentos do laboratório e que está conosco não só durante os experimentos, mas também nas nossas vidas pessoais. À Maíra que mesmo com pouco tempo no laboratório já contribuiu para o meu crescimento e mostrar que eu sou capaz de conseguir as coisas sozinha

também. À Josilene, que nem sei por onde começar a agradecer, que além de professora é amiga, que me sinto segura para falar sobre qualquer coisa. Josi, muito obrigada por tudo, por altas horas de estudos, de conversa, de brincadeiras, comilanças em casa e no laboratório, por horas e horas de risadas e de choros, pelas brigas e reconciliações, enfim, ficaria horas e horas aqui falando de você, mas tudo que eu quero dizer é, muito obrigada por me entender e me aceitar do meu jeito.

A todos os professores que fizeram parte desta caminhada e me mostraram que a ciência como um todo e a nutrição podem mudar o nosso mundo. Aos amigos que fizeram parte desta história, que apoiaram nos momentos bons e nos mais difíceis também.

A todas as ajudantes de limpeza que mantem nosso ambiente de trabalho limpo e adequado para melhor realização das tarefas.

A todas as ajudantes do restaurante universitário que preparam as nossas refeições diariamente.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha caminhada e tornaram possível esta conquista.

Agradeço a FAEPEX pelo suporte financeiro que também fez uma grande diferença.

“O dinheiro está entre os bens que contribuem para a felicidade, mas as boas relações interpessoais que construímos durante a nossa caminhada são fundamentais”. Autor desconhecido

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças” Charles Darwin

RESUMO

A obesidade materna traz complicações tanto para mãe quanto para o feto incluindo, diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, risco de prematuridade e, ainda não está claro a relação entre a fase do ganho de peso e o baixo peso ao nascer ou a macrosomia fetal. Além disso, é exatamente esse crescimento fetal alterado que está associado a um risco aumentado de doenças na idade adulta da progênie. As adaptações maternas à gravidez são amplamente mediadas pela placenta; a interface materno-placentária pode agir para modular a plasticidade do feto sobre seu ambiente futuro, em um processo conhecido por programação metabólica. O presente trabalho se propôs a verificar algumas adaptações do desfecho materno/fetal de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem Swiss, fêmeas foram divididas em dois grupos, um recebeu dieta controle (C) e outro dieta hiperlipídica (HFD) por 4 semanas antes do acasalamento. Durante esse período, o ganho de peso foi acompanhado e no final, fêmeas HFD foram designadas a dois grupos de acordo com o ganho de peso que apresentaram: propensas ou resistentes à obesidade (HF-P e HF-R, respectivamente). Após as quatro semanas iniciais do tratamento, cada grupo de fêmeas foram acasaladas com machos controles e continuaram recebendo a mesma dieta do período pré-gestacional até o 19º dia de gestação, quando foram realizados os procedimentos experimentais. As fêmeas expostas à dieta hiperlipídica antes do acasalamento e que exibiram um fenótipo de obesidade (HF-P) foram intolerantes à glicose antes e durante a gestação, tiveram menor eficiência placentária e produziram filhotes com baixo peso ao nascer quando comparados aos filhos de mães HF-R e CTL. Análises de regressão linear simples mostraram que a obesidade materna rompe com a proporcionalidade entre os desfechos materno (peso placentário) e fetal (peso fetal) da prenhez. Além disso, para o grupo HF-P, esses resultados estão inversamente relacionados, o que provavelmente está ligado às falhas nas adaptações hormonais e na exacerbação da inflamação no ambiente metabólico materno das fêmeas HF-P, levando à ineficiência placentária. Finalmente, o fenótipo obeso materno modificou a espessura da camada placentária, o transporte de ácidos graxos e o padrão dos fatores de crescimento. Assim, a expressão mais baixa de mRNA de EGFR no grupo HF-P sugere que essa diminuição pode ter contribuído para ruptura na espessura das camadas placentárias e resultado fetal adverso. Além disso, parece que, no caso do grupo resistente (HF-R), a manutenção do ambiente de homeostase da glicose materna e a superexpressão de PGF protegeu a placenta e os fetos contra danos morfológicos e funcionais.

Palavras-chave: DOHaD, obesidade, dieta hiperlipídica, eficiência placentária, desfecho fetal

ABSTRACT

Maternal obesity causes complications for both mother and fetus, including gestational diabetes, pre-eclampsia, and risk of preterm delivery. The association between the window of weight gain and low birth weight or fetal macrosomia is still unclear and any of this altered fetal growth is associated with an increased risk of disease in adulthood. Maternal adaptations to pregnancy are highly mediated by the placenta; a functional interface between the mother and the fetus that regulates adaptive maternal responses to the expectation of the future environment that the fetus will encounter after birth. Thus, the maternal nutritional signals and, therefore, a maternal-placental interface can act to modulate the fetus plasticity over its future environment, in a metabolic programming process. Our work aimed to verify some adaptations of the maternal-fetal outcome of obese mice induced by a high-fat diet. For this, Swiss mice were separated into two groups, a control diet (CTL) and high-fat diet (HFD, 45% fat) for 4 weeks before mating. During this period, weight gain was monitored and at the end, HFD were assigned in two groups according to the weight gain: prone or resistant to obesity (HF-P and HF-R, respectively). Then, they were mated with control males and maintained in the same diet from the pre-gestational period until the 19th day of gestation, when the experimental procedures were performed. Females exposed to the high-fat diet prior pregnancy who exhibited an obesity phenotype (HF-P) were glucose intolerant before and during pregnancy, had less placental efficiency and produced low birth weight pups when compared to the offspring of HF-R and CTL dams. Simple linear regression analyses showed that maternal obesity breaks with the proportionality between maternal (placental weight) and fetal (fetal weight) outcomes of pregnancy. In addition, for the HF-P group, these results are inversely related, which is probably linked to failures in hormonal adaptations and exacerbation of inflammatory status in the maternal metabolic environment of HF-P females, leading to placental inefficiency. Finally, the maternal obese phenotype changes the thickness of the placental layer, the transport of fatty acids and the pattern of growth factors. Thus, the lower expression of EGFR mRNA in the HF-P group suggests that this decrease may have contributed to rupture in the thickness of the placental layers and adverse fetal outcome. Furthermore, it appears that, in the case of HF-R, maintaining the maternal glucose homeostasis environment and overexpressing PGF protected the placenta and fetuses against morphological and functional damage.

Keywords: DOHaD, obesity, high fat diet, placental efficiency, fetal outcome

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental

ILUSTRAÇÕES DOS RESULTADOS

Figura 1. Desenvolvimento do fenótipo obeso em fêmeas expostas à dieta hiperlipídica durante as fases pré-gestacional e gestacional e o desfecho materno-fetal.

Figura 2. Efeitos do ganho de peso materno durante dos períodos pré-gestacional e gestacional e do estabelecimento do fenótipo obeso no desfecho fetal

Figura 3. Caracterização hormonal e metabólica do meio ambiente materno-fetal de fêmeas CTL, HF-P e HF-O no terço final da gestação (E19).

Figura 4. Perfil de expressão de transcritos relacionados ao transporte de nutrientes, crescimento placentário e sinalização hormonal e inflamatória na placenta de camundongos CTL, HF-P e HF-R

Figura 5. Adaptações morfológicas na placenta de animais submetidos à dieta hiperlipídica nos períodos pré-gestacional e gestacional

TABELA

Tabela 1. Composição nutricional das dietas hiperlipídicas empregadas no protocolo experimental

Tabela 2. Vias metabólicas, doenças ou funções biológicas da análise da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) dos dados de RNA-seq.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acrp30 - Adiponectina

CT - Dieta controle com 9,5% de lipídeos

GLUT - Transportador de glicose

GTT - Teste de tolerância à glicose

HE - Hematoxilina e Eosina

HFD - *High fat diet* com 45% de lipídeos

HF-P - High fat propenso à obesidade

HF- R - High fat resistente à obesidade

IR - Insulin *receptor*

IRS - Insulin *substract receptor*

IL-1 β - Interleucina 1 ‘beta’

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

mRNA PGF - Fator de crescimento placentário

mRNA EGFR -Receptor do fator de crescimento epidérmico

mRNA PDGFRA – Receptor alfa do fator de crescimento derivado das plaquetas

mRNA EPS8 – Substrato 8 da quinase receptora do fator de crescimento epidérmico

mRNA SLC2A1 - Gene transportador de glicose 1 (GLUT1)

mRNA SLC27 - Gene transportador de ácidos graxos

mRNA SLC38A1 - Gene transportador de aminoácidos 1 (SNAT1)

mRNA SMAD3/4 - *Mothers against decapentaplegic*

PCR - Proteína C reativa

SNAT- Transportador de aminoácidos

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

ZJ- Zona juncional

LZ – *Labirinte zone* (Zona do labirinto)

DC – Decídua Basalis

QUICK - Quantitative Insulin sensitivity Check Index

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos:	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Programação metabólica	17
3.3 Fisiologia gestacional	18
3.4. Hormônios	20
3.4.1. Leptina	20
3.4.2. Insulina.....	21
3.4.3. Adiponectina.....	21
3.4.4 Prolactina	22
3.5 Inflamação induzida por obesidade e gestação	22
3.5.1 IL-6	23
3.5.2 IL-1 β	23
3.6 Obesidade materna e desfecho fetal	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Desenho experimental	24
4.2. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)	25
4.3. Análise do perfil hormonal e de citocinas no soro e no líquido amniótico	26
4.5. Análise morfométrica da placenta	26
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO.....	49

1. INTRODUÇÃO

Os processos de urbanização e industrialização levaram a mudanças no padrão alimentar da população que passou a consumir uma dieta mais ocidentalizada, caracterizada pelo consumo de *fast food*, ou simplesmente alimentos com alta densidade energética, maior consumo de carnes, leite e derivados ricos em gorduras e redução do consumo de frutas, cereais, verduras e legumes. Esse padrão alimentar aliado à diminuição progressiva da atividade física, contribuiu para o aumento progressivo no ganho de peso corporal em populações de todo o mundo. A este fenômeno atribuímos um processo dinâmico conhecido como transição nutricional (MARIAHT et al, 2007).

Essas mudanças na dieta, no estilo de vida sedentário, estão levando a aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (incluindo obesidade, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, doença cerebrovascular e alguns tipos de câncer) e consequentemente se tornando as principais causas de mortes (WHO, 2003). A transição nutricional engloba duas outras transições importantes denominadas: 1) transição demográfica, associada à diminuição da taxa de fertilidade, redução da mortalidade e aumento da expectativa de vida; e 2) transição epidemiológica, relacionada à diminuição de doenças infecciosas e aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) associadas à mudanças no estilo de vida (DUARTE; BARRETO, 2012).

Dentre as DCNT destacamos a obesidade, que é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, associada a inflamação subclínica. Para classificar uma pessoa como obesa utiliza-se comumente o índice de massa corporal (IMC), estabelecendo-se um ponto de corte maior ou igual a 30 kg/m². Esta desordem está relacionada a várias comorbidades, entre elas o diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e alterações musculoesqueléticas. Componentes relacionados à predisposição genética, mas também a fatores externos, especialmente a influência direta dos aspectos ambientais incluindo estilo de vida e comportamentos não saudáveis, estão fortemente associados à doença (SHIN; KANG, 2017).

Em 2016 mais de 1,9 bilhão de pessoas maiores de 18 anos apresentavam excesso de peso e destes, mais de 650 milhões apresentavam obesidade. Esse dado vem crescendo de maneira epidêmica, se considerarmos que a prevalência da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016 (WHO, 2020). Segundo o Ministério da Saúde houve um aumento de 67,8% da obesidade no Brasil entre 2006 e 2018, partindo de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018.

Dados apontam ainda para aumento mais expressivo da obesidade entre adultos de 25 a 34 anos (84,2%) e 35 a 44 anos (81,1%). Embora o excesso de peso esteja mais comumente presente em homens, em 2018, esta prevalência foi ligeiramente maior (2% a mais) em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Estabelecendo um paralelo entre a faixa etária onde a prevalência da obesidade é maior, verificamos que esta coincide amplamente com a faixa de mulheres em idade fértil, que segundo WHO (2009) engloba o sexo feminino entre 15 a 44 anos.

Evidências epidemiológicas e estudos em animais têm sugerido que a obesidade materna e o consumo de alimentos não saudáveis durante a gravidez aumentam o risco de complicações, como por exemplo: diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, baixo peso ao nascer, macrosomia fetal e aborto espontâneo (DENISON et al 2010).

As complicações advindas da obesidade podem afetar vários órgãos durante a gravidez, dentre eles a placenta, que é um órgão transitório de grande importância, que está presente apenas durante a gravidez (PAZINATO et al, 2016). Sabe-se que concentrações aumentadas de citocinas inflamatórias circulantes promovem inflamação crônica de baixo grau o que poderia, dessa forma, provocar uma disfunção placentária (VISSER et al 1999). Esta alteração está associada a resultados adversos na gravidez devido à desregulação do transporte de nutrientes e da sinalização feto-placentária (LAGER et al, 2014). Sendo a principal barreira entre a mãe e o feto, acredita-se que a adaptabilidade da placenta desempenha um papel importante na programação do desenvolvimento e transmissão vertical do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares (REYNOLDS, 2015).

Estudos mostram que em placenta de animais obesos a ativação exacerbada da sinalização de insulina e da mTOR aumentam o transporte de nutrientes, originando, desta forma, um bebê macrosômico (JANSSON et al, 2013). Por outro lado, a insuficiência placentária crônica ou disfunção uteroplacentária também afeta o fluxo sanguíneo para placenta durante a gravidez e consequentemente o suprimento de nutrientes e oxigênio para o suporte do crescimento fetal, além disso, altera o metabolismo, os níveis hormonais, os aspectos hematológicos, a imunidade e a função cardiovascular, o que poderia comprometer o desenvolvimento do conceito.

Assim, em modelos experimentais de exposição materna à obesidade ou a citocinas, não está claro o aumento do peso corporal fetal (DAHLGREN, NILSSON et al. 2001; ZEMBALA-SZCZERBA et al, 2017) e, um estudo do nosso grupo utilizando modelo animal de obesidade materna induzida por dieta em período pré-gestacional, mostra que filhotes de mães

obesas apresentaram peso corporal menor que os filhotes do grupo controle (SIMINO et al, 2017).

Assim, parece existir uma relação mais complexa entre o peso corporal materno e o desenvolvimento feto-placentário que não apenas a proporcionalidade do ganho de peso de ambos. Mudanças na permissividade placentária, hormônios circulantes e o período do ganho de peso materno parecem ser determinantes nos desfechos fetais e na progressão e auto-perpetuação das doenças na vida adulta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a relação entre o perfil de obesidade materna e seu estado metabólico com o desenvolvimento placentário e desfecho fetal em um modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar o modelo de obesidade materna induzido por dieta hiperlipídica e acompanhar o curso da prenhez e o desfecho fetal.
- Avaliar o desenvolvimento de distúrbios hormonais e inflamatórios da mãe e do ambiente intrauterino.
- Determinar a relação entre o estado nutricional materno com os parâmetros somáticos do feto.
- Avaliar o perfil de expressão gênica de transcritos marcadores do transporte de nutrientes, inflamatórios e de crescimento e desenvolvimento placentário.
- Verificar as adaptações gerais quali/quantitativas da morfologia placentária de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Programação metabólica

Durante a segunda guerra mundial houve uma drástica redução na ingestão alimentar devido ao baixo suprimento de alimentos pelo governo Alemão, além de um inverno intenso que impedia as pessoas de produzirem seus próprios alimentos. O registro sobre este fato permitiu que os cientistas aferissem os efeitos da fome na saúde dos filhos das mulheres que estavam gestantes naquela época (VAN DER ZEE, 1998). Na década de 80, Barker observou que as áreas mais carentes da Grã-Bretanha apresentavam maiores taxas de mortalidade neonatal e também maiores taxas de baixo peso ao nascer, a partir disso ele sugeriu através de dados epidemiológicos que o crescimento fetal prejudicado poderia estar implicado no desenvolvimento de doença cardíaca dos sobreviventes, quando adultos. Após alguns estudos o grupo de Barker verificou que de fato as mortes por doenças isquêmicas do coração eram mais comuns em homens que eram pequenos ao nascer e ao primeiro ano de vida, confirmando assim a primeira hipótese de Barker (BARKER et al, 1989).

Hales e Barker (1992) propuseram a hipótese denominada de “Hipótese de fenótipo econômico” a qual sugere que uma nutrição deficiente durante a gestação e infância, períodos críticos do desenvolvimento, originariam uma adaptação metabólica e/ou estrutural que eleva o risco de desenvolvimento de doença coronariana e outras doenças associadas como, diabetes e acidente vascular cerebral (AVC) na vida adulta. Mostraram ainda que o risco para o desenvolvimento destas doenças não está associado apenas à herança genética ou hábitos de vida do adulto, mas também aos fatores ambientais em períodos críticos da vida. Por exemplo, o feto exposto a um ambiente hipóxico ou com baixa disponibilidade de nutrientes desenvolve uma resposta preditiva-adaptativa ao ambiente extrauterino que pode ser favorável ao seu desenvolvimento em casos de privação ou limitações de oferta, por outro lado pode se tornar prejudicial se a oferta calórica for oposta àquela recebida anteriormente, predispondo à obesidade precoce e doenças metabólicas no futuro.

Isso porque, durante a gestação ocorrem algumas alterações endócrinas, endometriais, de requerimentos nutricionais e cardiovasculares que podem afetar a expressão do genoma fetal para além da sua carga germinativa, a fim de que ele possa se adaptar durante o desenvolvimento. Desta forma, o genoma fetal determinaria o potencial de crescimento intrauterino, no entanto o crescimento real seria determinado principalmente pelos efeitos ambientais, como por exemplo, a nutrição fetal e a atividade metabólico-hormonal do

ambiente.

A programação fetal sofre, assim, influência da composição corporal da mãe, da ingestão dietética, do fluxo sanguíneo para o útero e placenta. O feto se adapta à má nutrição materna por meio de alterações na produção de hormônios fetais e placentários que regulam o metabolismo, a redistribuição do fluxo sanguíneo e o controle do crescimento (KWON; KIM, 2017).

Assim, Lucas (1991) definiu a programação metabólica como insultos durante períodos críticos do desenvolvimento, como gestação e lactação, que levam a alterações estruturais permanentes mesmo na ausência do estímulo que as iniciou.

3.3 Fisiologia gestacional

A maioria dos tecidos e órgãos maternos respondem à prenhez via mudanças no tamanho, na morfologia, na função e na responsividade hormonal e metabólica. Essas mudanças incluem adaptações cardiovasculares, pulmonares, imunes e metabólicas. Algumas dessas modificações acontecem antes mesmo da placenta se estabelecer completamente, mas a maioria deles são orquestrados pelos hormônios placentários (DRYNDA et al., 2015).

A placenta conta com presença de diversos hormônios entre eles, a prolactina e a família de hormônios de crescimento, hormônios esteróides e hormônios neuroativos (melatonina e serotonina). Além disso, hormônios como insulina, leptina e adiponectina também são alguns dos quais promovem adaptações metabólicas importantes durante esse processo. Também, estrogênio e progesterona, além das suas funções básicas de aumentar a elasticidade da parede uterina e do canal cervical e relaxar a musculatura lisa do útero, respectivamente, promovem a formação e a proliferação das estruturas mamárias (NAPSO et al, 2018).

No início da gestação há resposta normal da insulina a concentração da glicose circulante, mas à medida que a gestação vai avançando maiores quantidades de insulina são necessárias para transportar a mesma quantidade de glicose (VITOLO, 2003), caracterizando um estado transitório de resistência à insulina. Isso porque no início da gestação, quando a demanda fetal ainda é baixa, o organismo materno experimenta um relativo aumento da sensibilidade à insulina ou, o aumento da secreção já estimula o acúmulo de reservas maternas. Entretanto, o terço final da gestação está mais associado à indução de resistência à insulina, como resultado da contra regulação de hormônios como a prolactina e o lactogênio

placentário, concomitante a um aumento da lipólise e da gliconeogênese hepática (FREEMARK et al., 2002; MUSIAL et al., 2016).

Em resposta às mudanças no metabolismo materno e disponibilidade de nutrientes, a estrutura e a função da placenta são alteradas, o que pode afetar o suprimento de nutrientes e oxigênio, a secreção de hormônios e citocinas da mãe para o feto. Dentre os transportadores de nutrientes, destacam-se, a família dos transportadores de glicose GLUTs presentes nos microvilos e na membrana basal do sinciciotrofoblasto. Em ratos, o GLUT1 e o GLUT3 estão localizados na camada do sinciciotrofoblasto do labirinto, onde o GLUT1 é responsável pelo suprimento de glicose para placenta como fonte de energia, enquanto o GLUT3 transporta a glicose para o feto (ZHOU; BONDY, 1993).

Quanto ao sistema de transporte de aminoácidos (SNAT), codificados pelos genes *SLC38A*, existem três isoformas: SNAT1, SNAT2 e SNAT4. O SNAT1 e SNAT2 auxiliam no transporte de pequenos aminoácidos neutros enquanto o SNAT4 tem a capacidade de interagir com os aminoácidos catiônicos (DESFORGES et al, 2009). Dentre essas isoformas, o SNAT1 encontra-se em maiores níveis no citotrofoblastos primários humanos em comparação com os outros. Além disso, o knockout desta isoforma levou a diminuição da atividade do sistema A sugerindo que o SNAT1 é o contribuidor chave do transporte de aminoácidos em placenta de humanos (DESFORGES et al, 2010)

Finalmente, para o transporte dos ácidos graxos (FATP) destaca-se a família SLC27 que é composta por seis genes (SLC27 1-6) que codificam as proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP 1-6). Os FATPs são proteínas presentes nas membranas placentárias e inúmeros outros órgãos, a sua expressão é regulada positivamente pelo estímulo dos seus ligantes, como ácidos graxos e seus derivados (ANDERSON e STAHL, 2013; SEGURA et al 2017).

Esses transportadores estão presentes no labirinto que é uma das três camadas placentárias, sendo a responsável pelas trocas tanto de nutrientes quanto de oxigênio e outros gases. Já as outras camadas, a da zona juncional e a decídua, são responsáveis pela função endócrina, ou seja, atuam na produção de hormônios e outras substâncias responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do feto (SOARES et al 1996; HERNANDEZ-VERDUN, 1974; JOLLIE, 1964).

A atividade e a expressão destes transportadores podem ser influenciadas por hormônios, citocinas e nutrientes. Especificamente a ativação da via do mTOR é conhecida como um regulador positivo dos transportadores de aminoácidos no trofoblasto (POWELL,

2012) e a sua sinalização promove síntese de proteína, via fosforilação de p70 S6 kinase 1, proteína ribossomal S6 e fator de iniciação eucariótica 4Ebinding proteína 1 (4EBP1) (ROOS; POWELL; JANSSON, 2009). Alguns hormônios metabólicos como o fator de crescimento semelhante à insulina, a insulina e a leptina são reguladores *upstream* do mTOR e estimulam o transporte de aminoácidos em culturas de trofoblasto placentário (KARL, 1995).

3.4. Hormônios

3.4.1. Leptina

A leptina é um hormônio sintetizado e liberado predominantemente pelos adipócitos, de forma proporcional à adiposidade corporal. Uma vez liberada na circulação, a leptina atua na periferia desempenhando importantes funções como, regulação da imunidade e da secreção de insulina, liberação de hormônios sexuais e lipólise nos adipócitos. Este hormônio também é sintetizado e secretado pelo trato gastrointestinal, onde participa tanto das atividades endócrinas quanto exócrinas, além disso, atua no núcleo arqueado do hipotálamo regulando a ingestão alimentar e o gasto energético (ZHANG et al. 1994). Durante a gestação normal, os níveis de leptina encontram-se elevados, com aumento mais expressivo especialmente durante o segundo trimestre. Na obesidade os níveis de leptina circulante encontram-se elevados, no entanto a sua capacidade de aumentar o gasto energético e reduzir a ingestão alimentar diminui. Este fenômeno é conhecido como resistência à leptina, onde este hormônio não consegue realizar suas ações de forma adequada, sendo assim uma das causas da obesidade (KOCH et al, 2014).

Os níveis maternos aumentados de leptina modulam a invasão dos trofoblastos e a oferta de nutrientes, o que talvez possa influenciar no crescimento fetal. O aumento do suprimento de nutrientes placentário devido à alteração nos níveis de leptina na circulação materna podem causar um supercrescimento fetal em gestações complicadas por obesidade (TESSIER; FERRARO; GRUSLIN, 2013). Estudos mostraram que os níveis de mRNA da leptina em proles de mães obesas se encontram permanentemente aumentados, o que pode ser causado por mecanismos epigenéticos que ocorrem no período pós-natal, ou ainda podem ser correlacionados com hipertrofia e diminuição da metilação do promotor de leptina (LECOUTRE et al, 2017).

3.4.2. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β pancreáticas e atua desempenhando importantes funções metabólicas, como, síntese de glicogênio, de triacilgliceróis e de proteínas (HARVEY; FERRIER, 2012). Este hormônio induz a captação de glicose via GLUT4 em diferentes tecidos, como tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco, mas não na placenta. Apesar deste hormônio não atravessar a placenta ou ativar o transportador de glicose placentário, o GLUT1, tem a capacidade de ligar ao receptor de insulina (do inglês IR) presente na membrana do trofoblasto ativando as vias de sinalização, contribuindo assim para o metabolismo placentário de nutrientes. A sinalização na placenta pode ocorrer por duas vias: via IRS (substrato IR) -PI3K-Akt-mTOR ou pela regulação da quinase por meio da sinalização extracelular Ras (Ras-ERK). Estas duas vias de sinalização atuam na regulação da sobrevivência, diferenciação, proliferação e metabolismo celular placentário (RUIZ-PALACIOS et al, 2017).

A obesidade materna é associada com o quadro de resistência à insulina devido ao ambiente inflamatório oriundo desta doença. Um estudo que avaliou a relação entre o peso e a eficiência placentária em gestantes obesas verificou que o aumento da obesidade foi associado com maior índice de HOMA-IR (TANAKA, et al 2018).

3.4.3. Adiponectina

Adiponectina é um hormônio também conhecido como *Acrp30* produzido pelo tecido adiposo (SCHERER et al, 1995), apresenta propriedade anti-inflamatória e atua melhorando a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose e o perfil lipídico. No entanto na obesidade seus níveis encontram-se diminuídos, sendo considerada uma das principais causas dos desfechos negativos à saúde relacionada à obesidade (PAJVANI et al 2003). Apesar de o estudo de SCHERER e colaboradores, (1995) mostrar que a adiponectina é produzida exclusivamente pelo tecido adiposo, alguns estudos têm identificado presença dos seus receptores na placenta (CAMINOS et al 2005; WEIWEI et al, 2009; CHEN et al, 2006) . Em mulheres grávidas com peso adequado, os níveis de adiponectina começam a diminuir gradualmente a partir do segundo semestre, que é quando se inicia o quadro de resistência à insulina (PENDELOSKI et al, 2017). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam diminuição dos genes da adiponectina, aumentando a resistência à insulina e hiperglicemia. Por outro lado, uma super expressão da adiponectina em animais obesos, diminui os níveis da glicose

sanguínea e melhora a resistência à insulina independentemente dos níveis da insulina plasmática (RUAN; DONG, 2016).

3.4.4 Prolactina

A prolactina é uma proteína secretada pela hipófise anterior durante o período de amamentação, acasalamento, evolução ou ainda em resposta ao estresse e estimula o metabolismo e a regulação imunológica. A principal função deste hormônio é promover o desenvolvimento da glândula mamária e a produção do leite. Consequentemente está mais relacionada ao período de lactação (BOLE-FEYSOT et al 1998; ORMANDY, 1997). Entretanto, esta produção está diminuída a partir de meados da gestação, quando a produção placentária predomina (BRIDGES, 2015). Assim, em várias espécies, como roedores e humanos, a prolactina é adicionalmente produzida pela decídua durante a prenhez.

Além disso, é estimulador do crescimento, desenvolvimento e metabolismo fetal, contribui também no processo de ovulação, implantação e formação placentária (PERKS et al, 2003). Uma grande variedade de estudos até o momento, tanto *in vivo* quanto *in vitro* contribuem para o conhecimento acerca do papel da ação da prolactina e dos fatores de crescimento na mediação da grande maioria das adaptações relacionadas à prenhez (revisado por NAPSO et al, 2018).

Entretanto, é fato que elevados níveis de prolactina em um contexto patológico, como por exemplo, em pacientes diabéticos mostraram-se prejudiciais uma vez que reduz a tolerância à glicose (EKINCI et al, 2017).

3.5 Inflamação induzida por obesidade e gestação

O processo inflamatório que ocorre na gravidez é considerado uma condição normal. No entanto essa condição é exacerbada pela obesidade materna, devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α , IL-6 e IL-1 β no sangue materno e na placenta. A inflamação placentária elevada pode causar disfunção deste órgão, desenvolvimento de resistência à insulina, aumento da oferta de aminoácidos e ácidos graxos livres para o feto ou ainda diminuição da respiração mitocondrial e da geração de ATP (LIONG; BARKER; LAPPAS, 2018).

3.5.1 IL-6

A IL-6 é uma citocina que inicialmente foi identificada como fator de diferenciação e maturação de células B em células produtoras de anticorpos. Esta citocina além de controlar o sistema imune, também é importante na regulação de outros tecidos incluindo a placenta (ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012).

Estudos mostraram que os níveis de IL-6 materno no início da gravidez em mulheres obesas se encontram aumentados. O baixo grau de inflamação associado à obesidade materna pode levar a um aumento de transporte de nutrientes placentários e promover o crescimento fetal, uma vez que vem sendo demonstrado que a IL-6 junto com TNF estimula o sistema de transporte de aminoácidos placentário (JONES; JANSSON; POWELL, 2009). A IL-6 aumenta ainda a absorção de ácidos graxos nas células trofoblásticas humanas, o que promove deposição excessiva de gordura em bebês nascidos de mães obesas (LAGER et al, 2011).

3.5.2 IL-1 β

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória fundamental para defesa do organismo humano contra infecção e lesão. É produzida e secretada em menores quantidades por diferentes tipos de células, e em maiores quantidades pelas células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos e células placentária (DINARELLO et al, 1996; TAKEUCHI et al, 2010). Em mulheres obesas ou que apresentam diabetes mellitus gestacional, a inflamação é ainda mais elevada, fato este que ocorre devido ao aumento de citocinas inflamatórias como IL-1 β , além da IL-6 e TNF α . Um estudo mostrou que a IL-1 β inibiu a sinalização da insulina em células trofoblásticas, tanto pela diminuição da fosforilação de Tyr612 estimulada por IRS-1, quanto pelo aumento da fosforilação de Ser307 do IRS-1. Esta ação da IL-1 β na inibição da sinalização da insulina placentária ocorre devido à regulação negativa da expressão da IRS-1. Mães obesas apresentam altos níveis de IL-1 β placentário, o que é associado à resistência insulínica da placenta. Além disso, estudos mostram que a IL-1 β pode neutralizar os efeitos da hiperinsulinemia materna em gestações complicadas pela obesidade, no transporte de aminoácidos placentários e assim limitar o crescimento fetal (AYE; JANSSON; POWELL, 2013).

3.6 Obesidade materna e desfecho fetal

A obesidade materna dentre muitas outras complicações citadas anteriormente prejudica a saúde das crianças predispondo-as ao desenvolvimento de obesidade infantil e

alterações metabólicas, como hiperinsulinemia e hiperglicemia. Estas duas últimas afetam as crianças principalmente no período neonatal, o que deve em partes, ocorrer devido ao desenvolvimento de diabetes mellitus gestacional. Dieta materna obesogênica induz resistência à insulina e aumento dos níveis de glicose sanguínea acelerando o processo de maturação das células beta pancreática causando assim prejuízo na prole (HOWELL; POWELL, 2017).

Prole de mães obesas apresentam maior adiposidade e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias no cordão umbilical (CATALANO et al, 2009). Associado a isso Johns e colaboradores (2017) mostraram que a placenta de mães obesas apresenta alto conteúdo de triglicerídeos. Estudos têm evidenciado que bebês grandes para idade gestacional e que foram expostos ao ambiente intrauterino de mãe obesa, apresentam maior risco de desenvolver síndrome metabólica, obesidade e sobrepeso na vida adulta (TARRY-ADKINS; OZANNE, 2016). Por outro lado, a insuficiência placentária crônica causa crescimento inadequado do feto devido à influência fatores de ambientais e genéticos, quadro conhecido como retardo do crescimento intrauterino (WIXEY et al, 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental

Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (nº 5401-1), conforme o certificado apresentado como Anexo I.

Camundongos fêmeas Swiss, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP foram submetidos, por pelo menos quatro semanas antes do acasalamento, à dieta hiperlipídica e hipercalórica com 45% das calorias provenientes de gorduras, sendo o principal ingrediente desta fonte para a produção de dietas, a banha de porco (Tabela 1). O peso corporal, ingestão alimentar, dosagens hormonais e testes de tolerância à glicose foram aferidos a fim de garantir o estabelecimento do fenótipo antes do momento da concepção. Para coeficientes de variação acima de 30% (alta dispersão entre os dados), foram considerados para o acasalamento aquelas fêmeas que apresentaram ganho de peso relativo superior à média de ganho de peso do grupo controle.

Após, para cada grupo de duas fêmeas, foi destinado um macho e foram mantidos juntos por aproximadamente 3 dias. Durante esses dias foram examinados quanto à presença de sinais de acasalamento e a detecção do plug vaginal (dia E0.5 de prenhez). A medida do

ganho de peso corporal semanal foi utilizada para confirmar a prenhez que, em geral, se dá entre o 10º e 13º dia (após a confirmação do plug vaginal) quando os animais ganharam pelo menos 3 a 5 gramas de peso corporal.

Durante o curso da prenhez, os testes metabólicos e o acompanhamento do peso corporal foram repetidos e analisados em comparação com o estado pré-gestacional para caracterização do ambiente metabólico e nutricional materno.

A prenhez foi interrompida antes do parto natural (por volta do 19º dia de gestação) para coleta de amostras dos tecidos placentário e fetal, sangue materno e amostras do fluido amniótico para pesagem e/ou posterior análise.

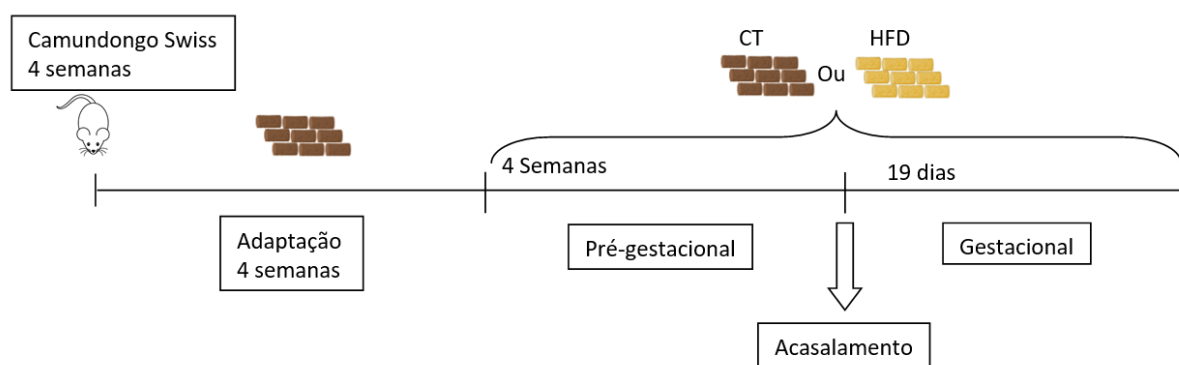


Figura 1. Delineamento experimental. CT: dieta controle com 9,5% de lipídeos; HFD: dieta hiperlipídica com 45% de lipídeos.

4.2. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Todas as fêmeas controles ou obesas foram submetidas, após jejum overnight de 12 horas seguido de realimentação por 2 horas e posterior jejum de 4 horas, ao teste de tolerância à glicose (GTT) antes e durante a gestação. Para isso, amostras de sangue foram coletadas por meio de um corte na extremidade da cauda do animal para dosagem de glicemia em glicosímetro automático no tempo 0 e em seguida os animais foram desafiados com um *bolus* de glicose na concentração de 1g/kg de peso animal e a glicemia foi aferida novamente nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Os resultados foram analisados via determinação das áreas sob as curvas glicêmicas durante o teste pelo método trapezoidal (software PRISMA® 8.0) (Matheus e colaboradores, 1990).

4.3. Análise do perfil hormonal e de citocinas no soro e no líquido amniótico

Amostras de sangue materno e do líquido amniótico (pool da ninhada) após dissecação da tuba uterina foram coletadas aos 19 dias de prenhez e foram processadas para análise do perfil de metabólitos por ensaio magnético Luminex® para hormônios (prolactina, adiponectina e leptina) e citocinas (IL6, IL10 e PCR). As amostras de fluido amniótico foram cuidadosamente coletadas por remoção da parede uterina materna e exposição dos sacos amnióticos. Após, estes foram isolados, o córion cuidadosamente removido e as placentas separadas. O fluido amniótico foi colhido através da ruptura do âmnio com uma micro-seringa.

4.4. PCR Real Time quantitativo (RT-qPCR)

O RNA placentário total foi extraído usando o reagente RNeasy® de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado usando o NanoDrop ND-2000. A transcrição reversa foi realizada com 3µg de RNA total, utilizando um kit de cDNA reverso de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). A expressão relativa foi determinada usando um sistema de detecção Taqman e iniciadores para os genes transportadores e de crescimento placentário e gene associado à inflamação (*mRNA SLC2A1, SLC27A2, SLC27A3, SLC27A4, SLC38A1, PGF, PDGFRA, EGFR, EPS8 e TNF, IL6, IL1β e IL10, ADIPOR2, SMAD3, SMAD4*). Os controles endógenos foram detectados com primers específicos para β -actina e GAPDH e a média dos controles foi utilizada para a normalização. A reação de PCR Real Time foi realizada em uma plataforma ABI Prism 7500 Fast e os dados foram analisados usando o sistema de detecção de sequência 2.0.5 e expressos como valores relativos determinados pelo método do ciclo do limiar comparativo (Ct) ($2^{-\Delta Ct}$).

4.5. Análise morfométrica da placenta

A placenta foi dissecada e armazenada no freezer -80 para posteriores análises. Inicialmente o tecido foi seccionado em criostato na espessura de 12 micrômetros, seguida de fixação em metanol 100%. Foi realizado também coloração com hematoxilina eosina para caracterizar o perfil morfológico do tecido bem como para ilustrar a espessura da barreira entre o espaço de troca (sangue materno e capilar fetal) placentário. O tecido foi encubado em hematoxilina e eosina por 30 segundos respectivamente. Todas as imagens foram capturadas no microscópio LEICA®.

4.6. Análise de sequenciamento de RNA

O RNA total extraído da placenta de um pequeno grupo de animais no dia E19 (CTL n = 3, HF-P, n = 3 e HF-R, n = 2) foi usado para realizar a análise de sequenciamento de RNA no Laboratório Central para Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida da UNICAMP (LaCTAD). A qualidade das amostras de RNA e número de integridade de RNA (RIN) foi realizada no Bioanalyzer (modelo 2100, Agilent®) e fixada em 7,0 como condição mínima para análise. As bibliotecas de DNA complementar (cDNA) foram geradas de acordo com o Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (RS-122-2001) e o sequenciamento realizado com Illumina HiSeq 2500 (Illumina®) que garante que pelo menos 80% das bases sequenciadas tenham uma pontuação de Phred ≥ 30 .

Os dados foram analisados pelo p-valor ajustado (padj) que contém os p-valores ajustados para múltiplos testes (Benjamini-Hochberg) para controlar a “taxa de descoberta falsa” (FDR). O “*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*” (DAVID) e “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*” (KEGG) foram utilizados para identificar vias biológicas relacionadas aos genes que foram expressos diferencialmente (considerando um padj $< 0,05$ e 2,5 vezes de modulação). Os dados do sequenciamento do RNA da placenta (RNA-seq) ainda não foram depositados no banco de dados GEO porque os dados completos não foram totalmente publicados e validados e por isso não são exibidos na íntegra nesse material.

4.7. Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como médias com seus erros padrão. O teste de Levene para homogeneidade de variâncias foi inicialmente usado para verificar o ajuste dos dados às suposições para a análise ANOVA e, quando necessário, os dados foram transformados em log. Assim, a análise foi realizada por “ANOVA one-way” seguida de teste “*post-hoc*” “*Least Significant Difference*” (LSD) para determinar a significância das diferenças individuais. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram analisados no pacote Statistica Software (StatSoft®) e os gráficos construídos no Prisma (GraphPad Prism Software®).

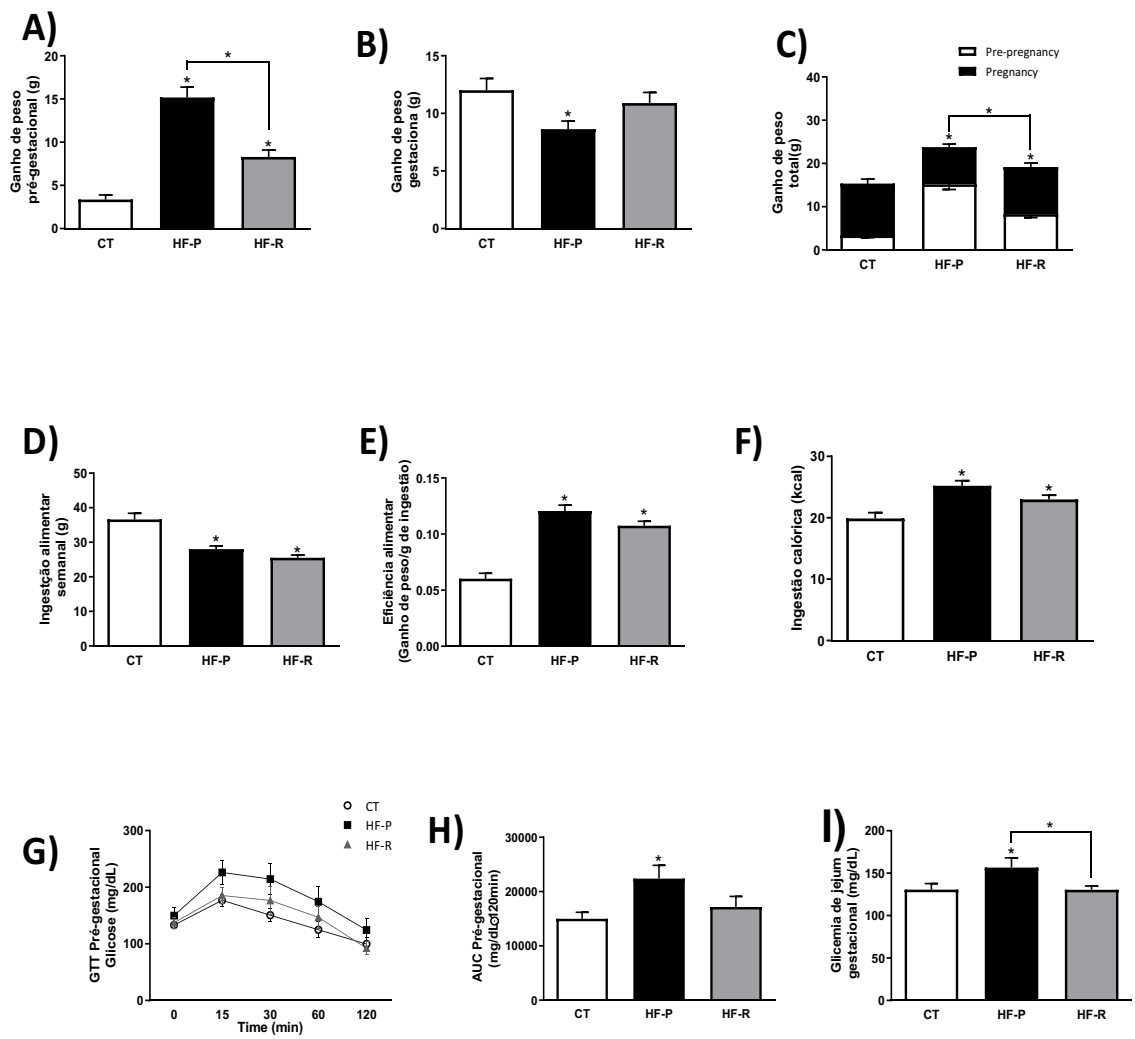
5. Resultados

Camundongos fêmeas expostas a dieta hiperlipídica (HFD do inglês) antes da gestação exibem fenótipos propenso ou resistente à obesidade e isso afeta a eficiência placentária e o desfecho fetal.

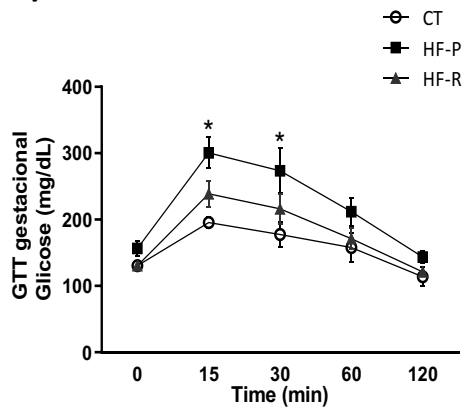
Camundongos fêmeas foram divididas em propenso ou resistente ao desenvolvimento da obesidade de acordo com o ganho de peso pré-gestacional (Simino et al, 2020). O grupo propenso à obesidade (HF-P) mostrou ganho de peso três vezes maiores do que o controle (C), diferente do grupo resistente à obesidade (HF-R) que mostrou maior ganho do que o controle, mas menor do que o HF-P (Fig1A). O ganho de peso gestacional foi menor no grupo HF-P (Fig1B) mas no final do período o perfil se manteve (Fig1C), pois apesar da menor ingestão bruta no grupo hiperlipídico, houve aumento na eficiência alimentar nesse grupo (Fig1D-E).

O fenótipo da obesidade pré-gestacional causou intolerância à glicose, demonstrada pela área sob a curva da glicose durante o GTT pré-gestacional (Fig1G-H) e o consumo da HFD prejudicou a sensibilidade à insulina avaliada pelo QUICKI (através da seguinte fórmula: $1/(\log \text{ glicemia basal} + \log \text{ insulinemia basal})$) durante a gestação (Fig1L) mas apenas o grupo HF-P mostrou aumento da glicemia de jejum e intolerância à glicose durante a gestação (Fig1I-K); os animais HF-R permaneceram homeostáticos.

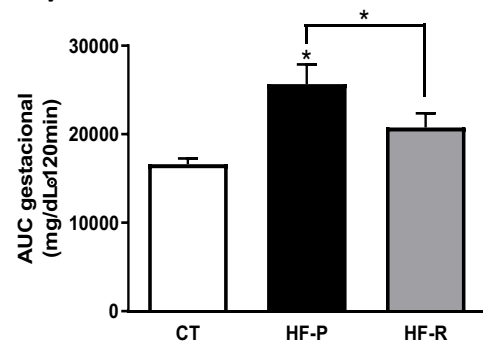
Como resultado da fisiologia dessa fase, o peso do feto, e a eficiência da placenta (peso fetal: peso placentário) aos 19 dias foram afetados negativamente pela obesidade materna, mas não teve efeito no tamanho da ninhada (realizado através da contagem do número de fetos) (Fig1N-Q).



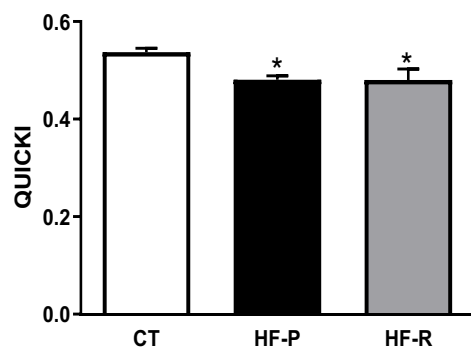
J)



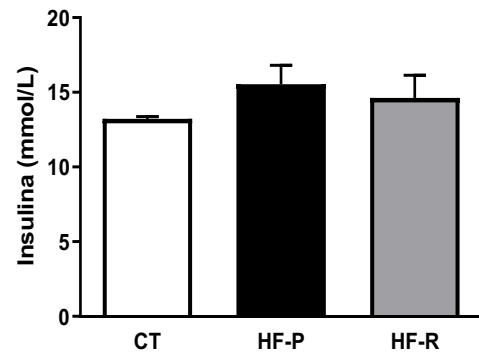
K)



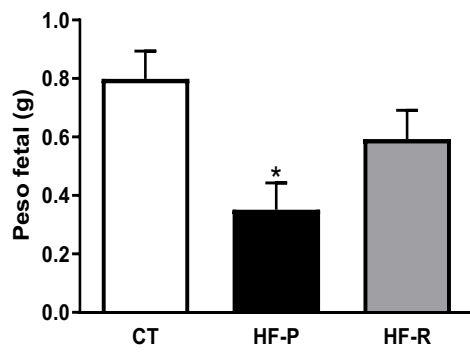
L)



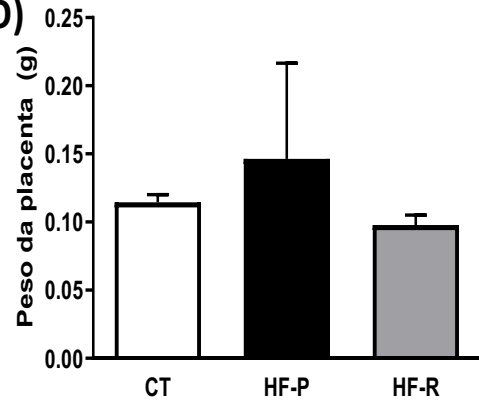
M)



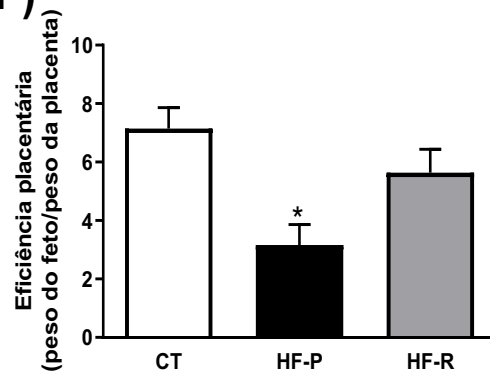
N)



O)



P)



Q)

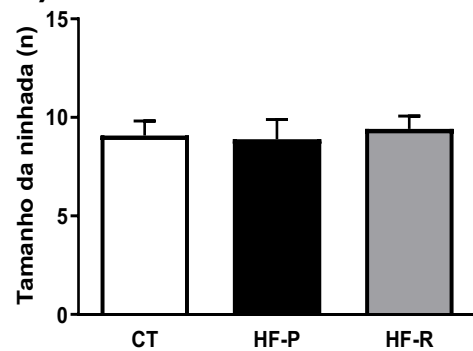
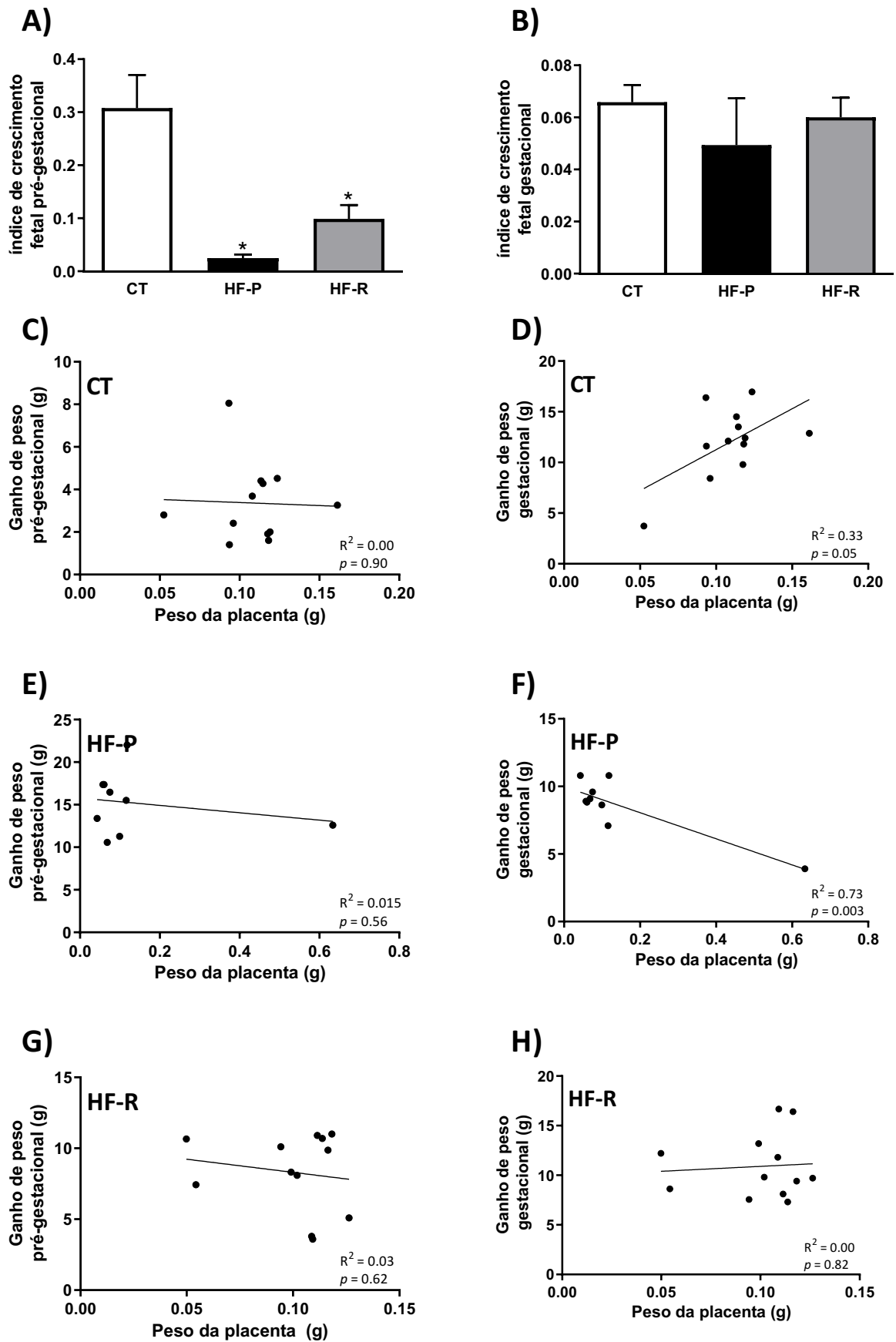


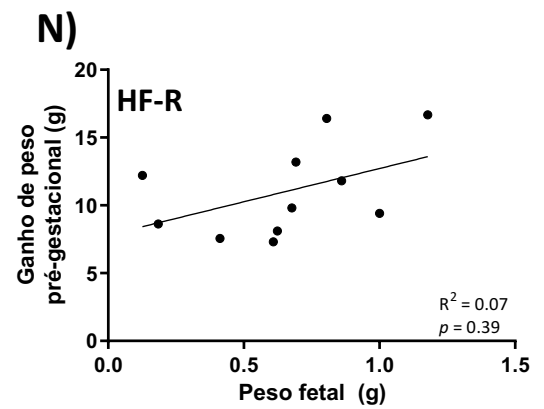
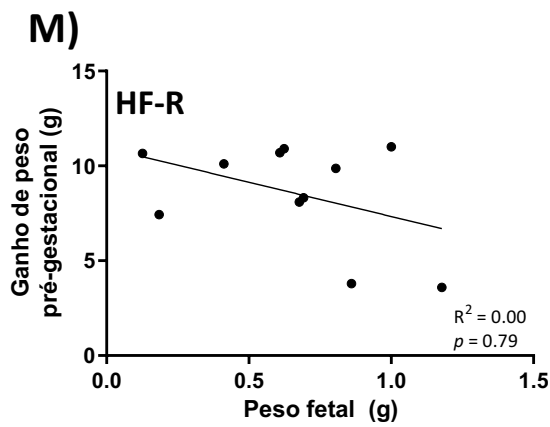
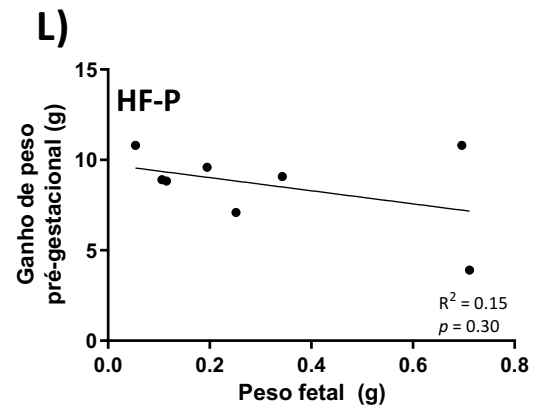
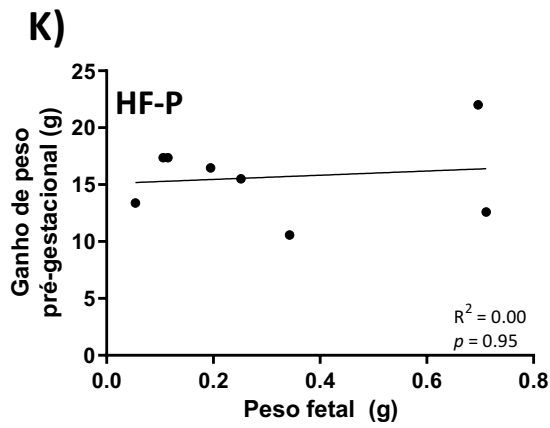
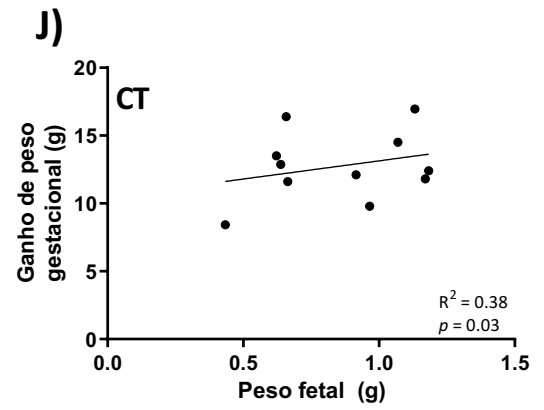
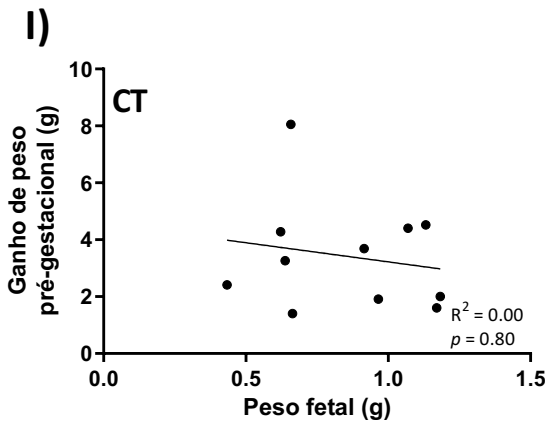
Figura 1. Desenvolvimento do fenótipo obeso em fêmeas expostas à dieta hiperlipídica durante as fases pré-gestacional e gestacional e o desfecho materno-fetal. (A) Ganho de peso pré gestacional. (B) Ganho de peso gestacional. (C) Ganho de peso total. (D) Ingestão alimentar semanal (E). Eficiência alimentar. (F) Ingestão calórica. (G) GTT pré-gestacional. (H) Área sob a curva pré-gestacional. (I) Glicemia de jejum gestacional. (J) GTT gestacional. (K) Área sob a curva pré-gestacional. (L) QUICKI. (M) Insulina basal gestacional. (N) Peso fetal. (O) Peso da placenta. (P) Eficiência da placenta. (Q) Tamanho da ninhada. CT (controle). HF-P (hiperlipídico propenso à obesidade). HF-R (hiperlipídico resistente à obesidade). (n=7-10 animais por grupo; QUICKI, n=3 animais por grupo). *ANOVA one-way seguido de LSD com $p < 0,05$.

Resultados da gestação são relacionadas com o ganho de peso pré-gestacional e com o fenótipo da obesidade e inversamente relacionada com o ganho de peso durante a gestação.

Para avaliar o impacto de dois períodos no resultado da gestação, nós normalizamos o peso fetal para cada componente do ganho de peso materno, pré-gestacional e gestacional, separadamente (peso fetal: ganho de peso materno). O índice de crescimento fetal em relação ao peso pré-gestacional foi menor no grupo HFD, mas ainda menor no grupo HF-P (Fig2A-B).

Assim, foi realizada análise de regressão linear para verificar os componentes que explicam os desfechos da gestação. Como esperado, para o grupo controle, o peso da placenta e do feto e a eficiência da placenta foram positivamente correlacionadas com o ganho de peso gestacional (Fig2C-D, I-J, O-P). Curiosamente, para o grupo HFD, essa relação não foi significativa e, além disso, o perfil de inclinação do grupo HF-P, mostrou uma correlação inversa entre o peso fetal e placentário com o ganho de peso materno (Fig2E-H, K-N, Q-T).





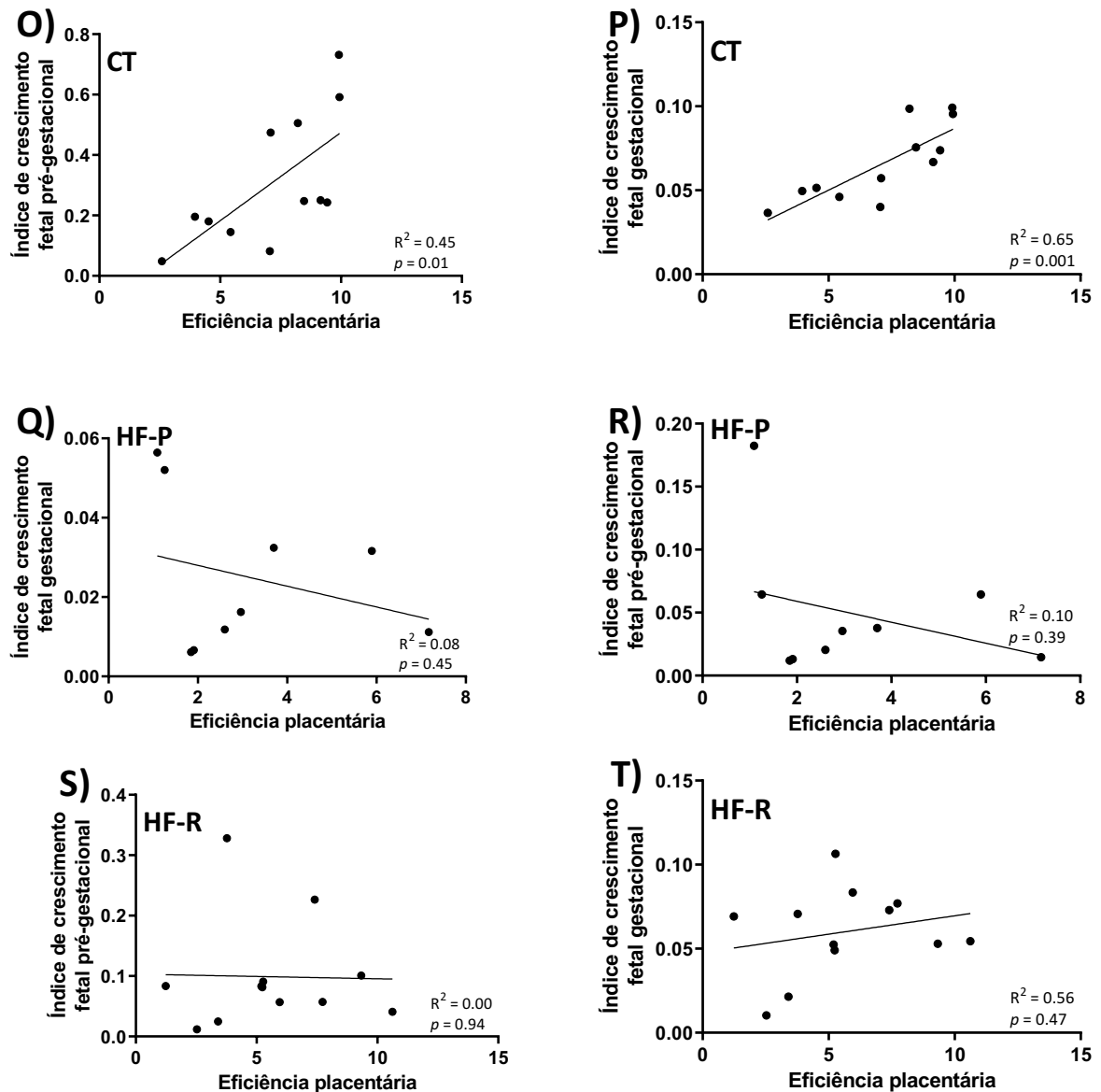


Figura 2. Efeitos do ganho de peso materno pré-gestacional e gestacional e do estabelecimento do fenótipo obeso no desfecho fetal. (A) Índice de crescimento fetal em relação ao peso pré-gestacional. (B) Índice de crescimento fetal gestacional. Regressão linear simples entre o ganho de peso pré-gestacional ou gestacional e o peso da placenta em CT (C e D, respectivamente). Regressão linear entre o ganho de peso pré-gestacional ou gestacional e o peso da placenta em HF-P (E e F, respectivamente). Regressão linear entre o ganho de peso pré-gestacional ou gestacional e o peso da placenta em HF-R (G e H, respectivamente). Regressão linear entre o ganho de peso pré-gestacional e gestacional e o peso do feto em CT (I e J, respectivamente). Regressão linear entre o ganho de peso pré-gestacional e gestacional e o peso do feto em HF-P (K e L, respectivamente). Regressão linear entre o ganho de peso pré-gestacional e gestacional e o peso do feto HF-R (M e N, respectivamente). Regressão linear entre Índice de crescimento fetal em relação ao peso pré-gestacional e gestacional e a eficiência placentária em CT (O e P, respectivamente); HF-P (Q e R, respectivamente) e HF-R (S

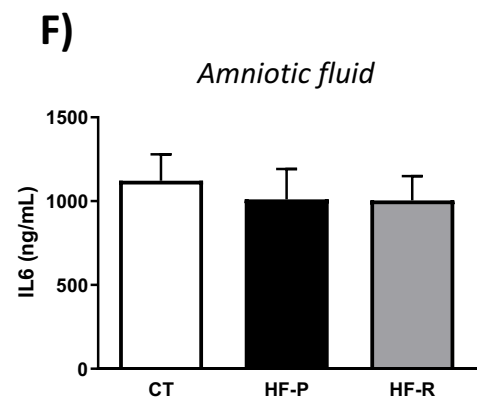
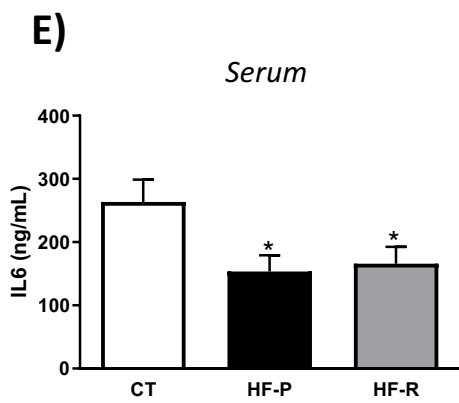
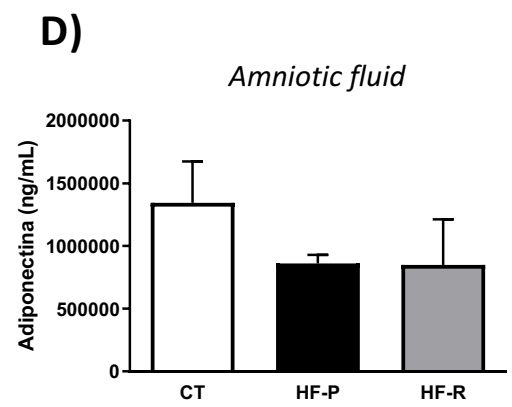
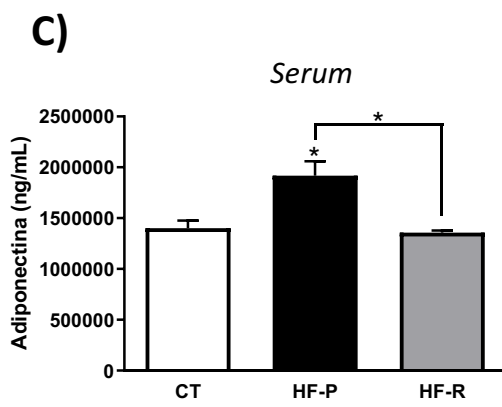
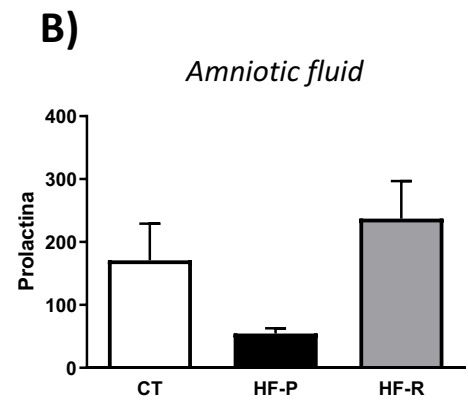
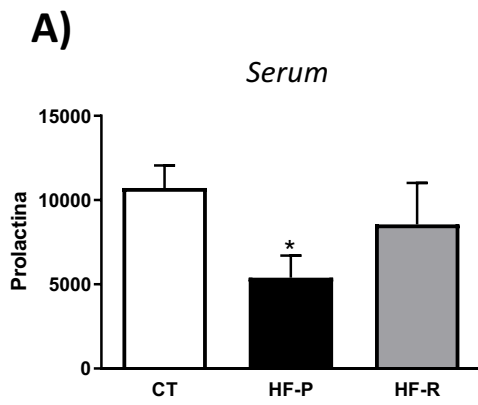
e T, respectivamente). CT (controle). HF-P (hiperlipídico propenso à obesidade). HF-R (hiperlipídico resistente à obesidade). (n=9-12 animais por grupo).

O ambiente materno nos animais HF-P apresenta falha nas adaptações da gestação, exacerba a inflamação e leva a ineficiência placentária

Para compreender o ambiente materno durante o período gestacional, foi avaliado no dia E19 alguns hormônios e citocinas no sangue materno e no pool do líquido amniótico dos fetos. Prolactina e adiponectina foram antagonicamente moduladas na circulação materna. Enquanto a prolactina foi reduzida nos animais obesos (Fig3A), a adiponectina foi aumentada (Fig3C). A leptina mostrou o padrão clássico em resposta ao ganho de peso e dieta hiperlipídica (Fig3K).

Surpreendentemente, IL6 diminui no sangue materno do grupo HFD, independentemente do fenótipo (Fig3E) mas por outro lado, os níveis do PCR estavam extremamente altos no soro materno, porém diminuídos no líquido amniótico do grupo HFD (Fig3I-J).

Considerando que adiponectina na interface fetal é derivada principalmente do organismo materno, nós mostramos a diferença entre a circulação materna e o líquido amniótico que foi maior no grupo HFD (Fig3L). Δ da adiponectina = adiponectina do soro – adiponectina do líquido amniótico.



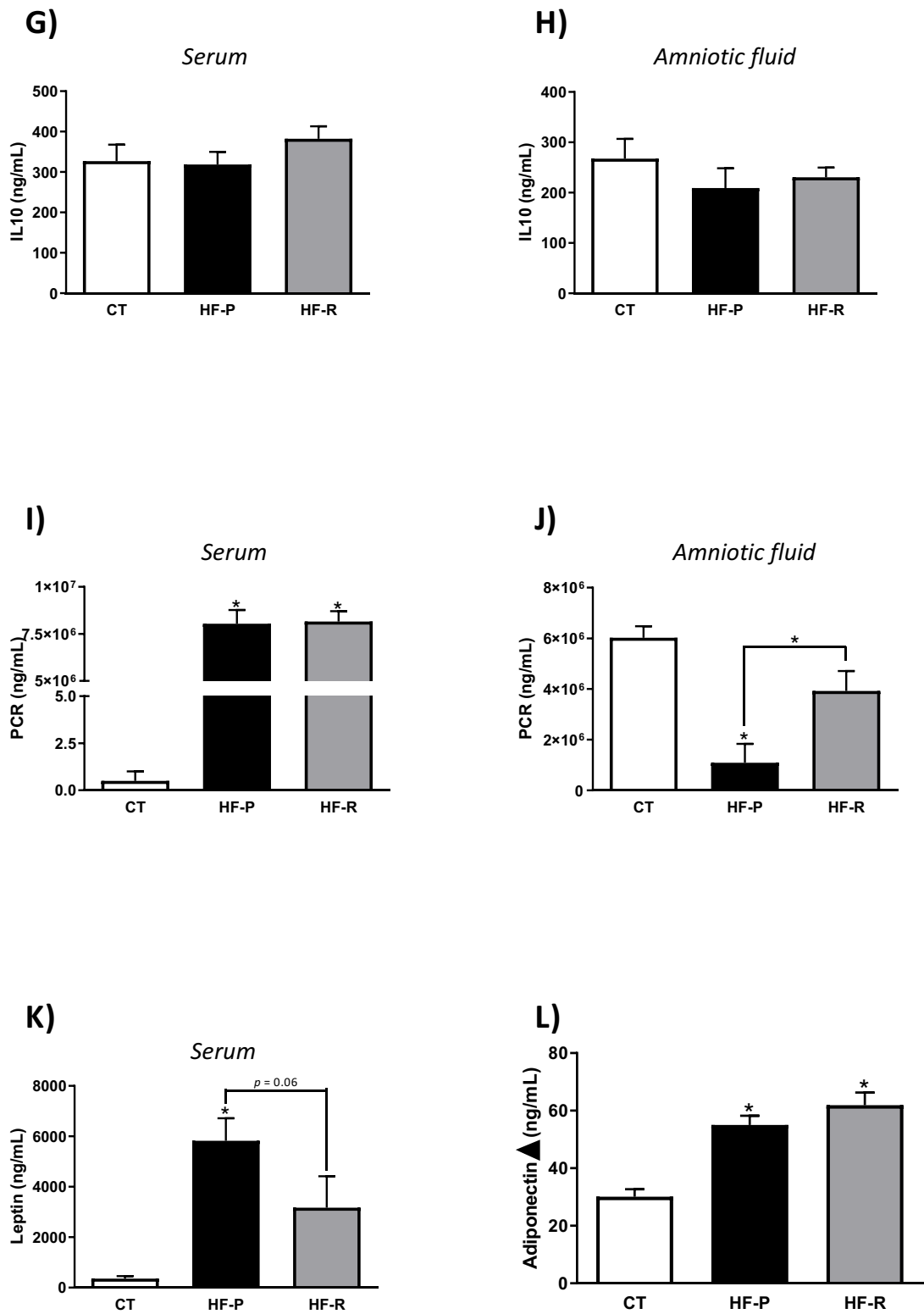
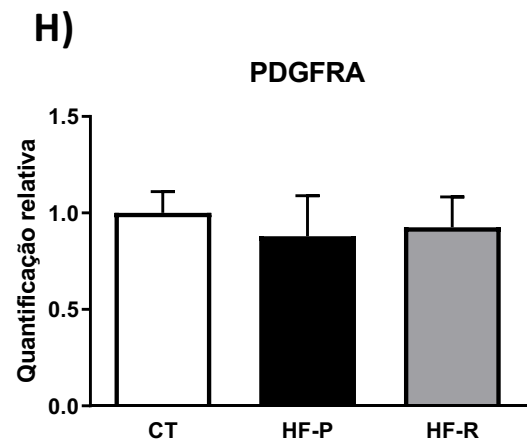
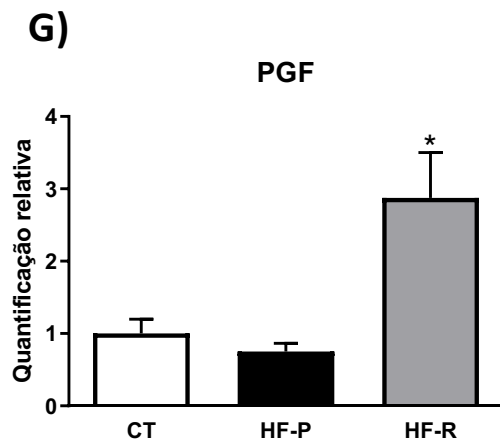
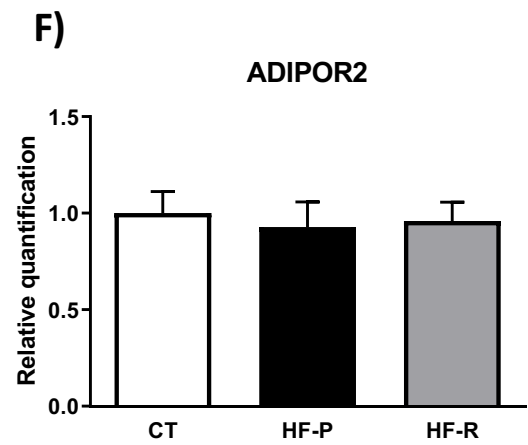
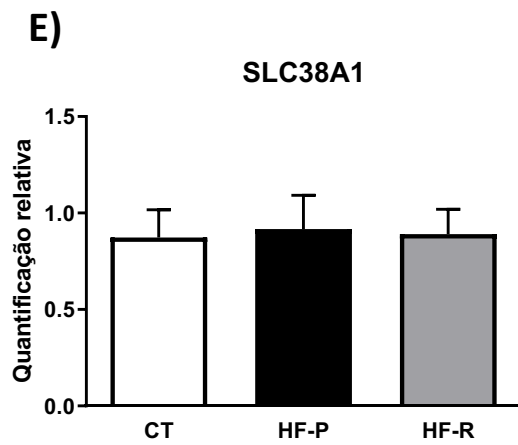
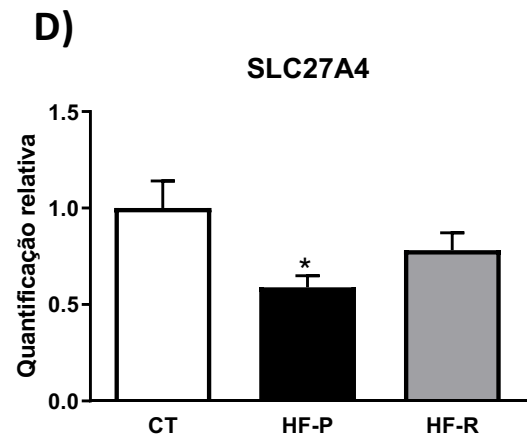
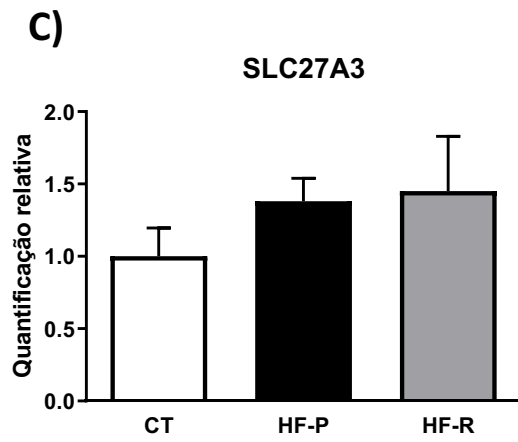
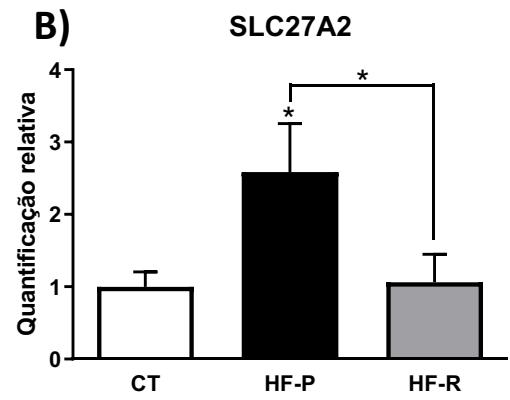
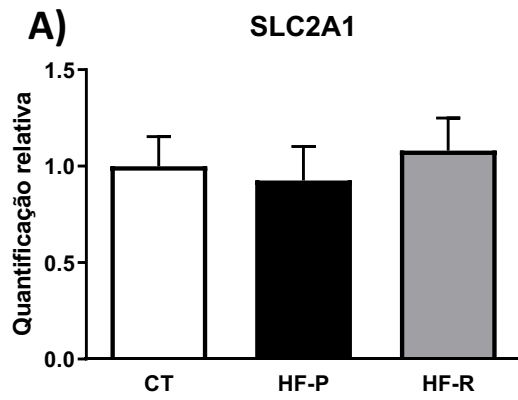


Figura 3. Caracterização hormonal e metabólica do meio ambiente materno-fetal de fêmeas CTL, HF-P e HF-O no terço final da gestação (E19). (A) Prolactina no soro materno. (B) Prolactina no líquido amniótico. (C) Adiponectina no soro materno. (D) Adiponectina no líquido amniótico. (E). IL6 no soro materno. (F) IL6 no líquido amniótico. (G) IL10 no soro materno. (H) IL10 no líquido amniótico. (I) PCR no soro materno. (J) PCR no líquido amniótico. (K) Leptina no soro materno (L) Delta de Adiponectina. CT (controle). HF-P (hiperlipídico propenso à obesidade). HF-R (hiperlipídico resistente à obesidade). (n=7-10 animais por grupo). * ANOVA one-way seguido de LSD com $p < 0,05$.

O fenótipo da obesidade modifica a espessura da camada placentária, o padrão dos transportadores dos ácidos graxos e fatores de crescimento

O transporte de nutrientes é a principal função da placenta durante o desenvolvimento fetal. Apesar de um ambiente rico em ácidos graxos, os transportadores destes nutrientes foram modulados inversamente pelo ganho de peso e não apenas pelo consumo da HFD. Entre os transportadores analisados, *SLC27A2* mRNA foi super-regulado e *SLC27A4* mRNA foi infra regulado no grupo HF-P (Fig4A-E).

Em seguida, o fator de crescimento da placenta e o receptor do fator de crescimento epidérmico e moléculas chaves de sinalização foram amplificados para verificar possíveis arranjos morfo-funcionais. Dessa forma, a HFD induziu uma resposta contrária, na dependência do desenvolvimento do fenótipo da obesidade: O grupo HF-R apresentou aumento no mRNA *PGF* (Fig4) e os animais HF-P mostraram diminuição do mRNA *EGFR* e *SMAD3* (Fig4). Deste modo, a inflamação local foi observada de acordo com os animais propensos à obesidade, com altos níveis no mRNA *IL6* e baixos níveis do *IL10* (Fig4).



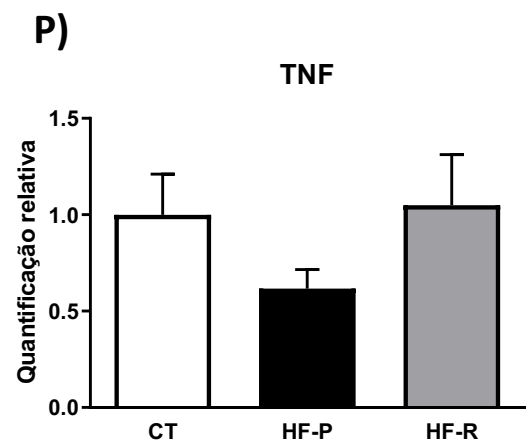
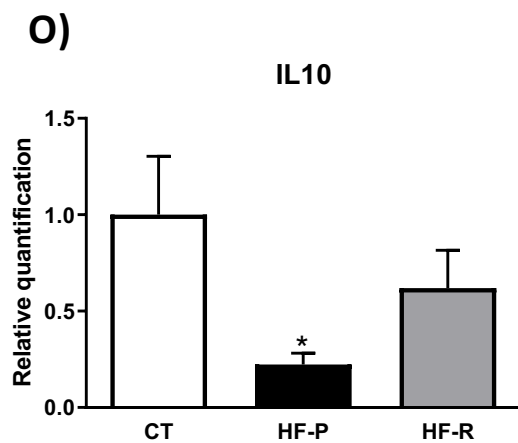
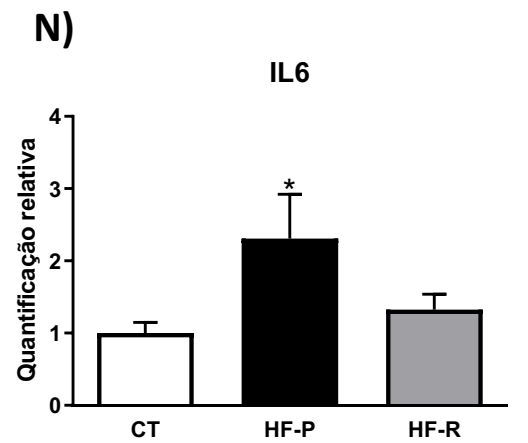
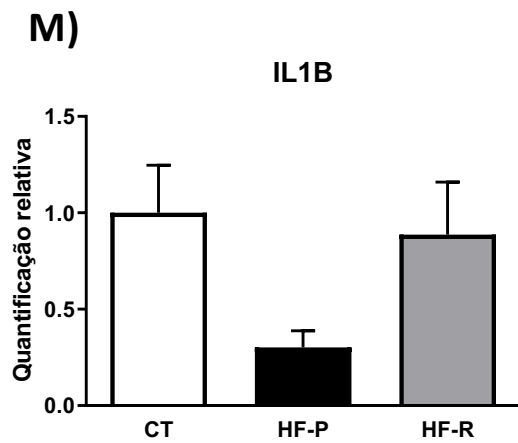
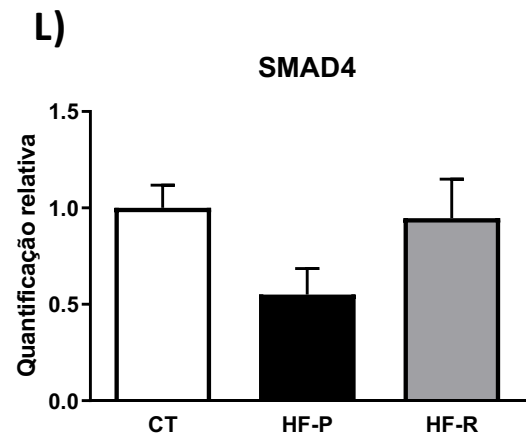
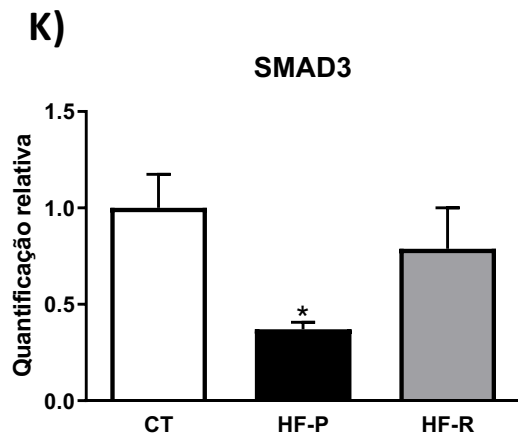
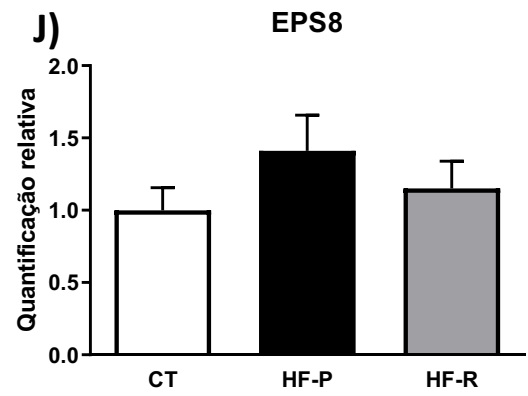
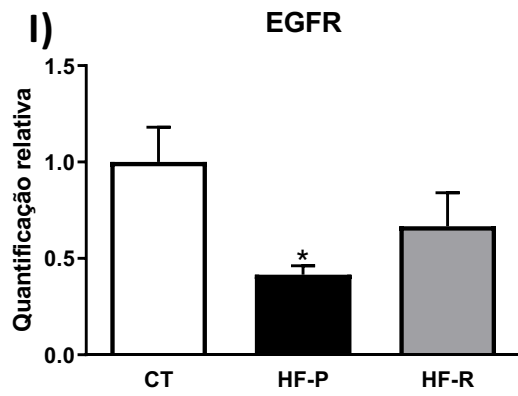


Figura 4. Perfil de expressão de transcritos relacionados ao transporte de nutrientes, crescimento placentário e sinalização hormonal e inflamatória na placenta de camundongos CTL, HF-P e HF-R. (A) mRNA SLC2A1. (B) mRNA SLC27A2. (C) mRNA SLC27A3. (D) mRNA SLC27A4. (E) mRNA SLC38A1. (F) mRNA ADIPOR2. (G) mRNA PGF. (H) mRNA PDGFRA. (I) mRNA EGFR. (J) mRNA EPS8. (K) mRNA SMAD3. (L) mRNA SMAD4. (M) mRNA IL1 β . (N) mRNA IL6. (O) mRNA IL10. (P) mRNA TNF. CT (controle). HF-P (hiperlipídico propenso à obesidade). HF-R (hiperlipídico resistente à obesidade). (n=7-10 animais por grupo). * ANOVA one-way seguido de LSD com $p < 0,05$.

Finalmente, para analisar a adaptação morfológica ao consumo da HFD, foi aferida a espessura da camada placentária de dois espécimes independentes e a imagem representativa está na Fig5. Apesar do efeito súbito da área na placenta, a decídua basal nos animais HF-P estava mais espessa do que nos outros grupos (Fig5C) e labirinto, a zona efetiva de trocas, encontra-se ligeiramente mais fino no mesmo grupo mas essa diferença não chega a ser significativa (Fig5E). O fenótipo obeso reorganizou as camadas placentárias, como mostrado na Fig5B.

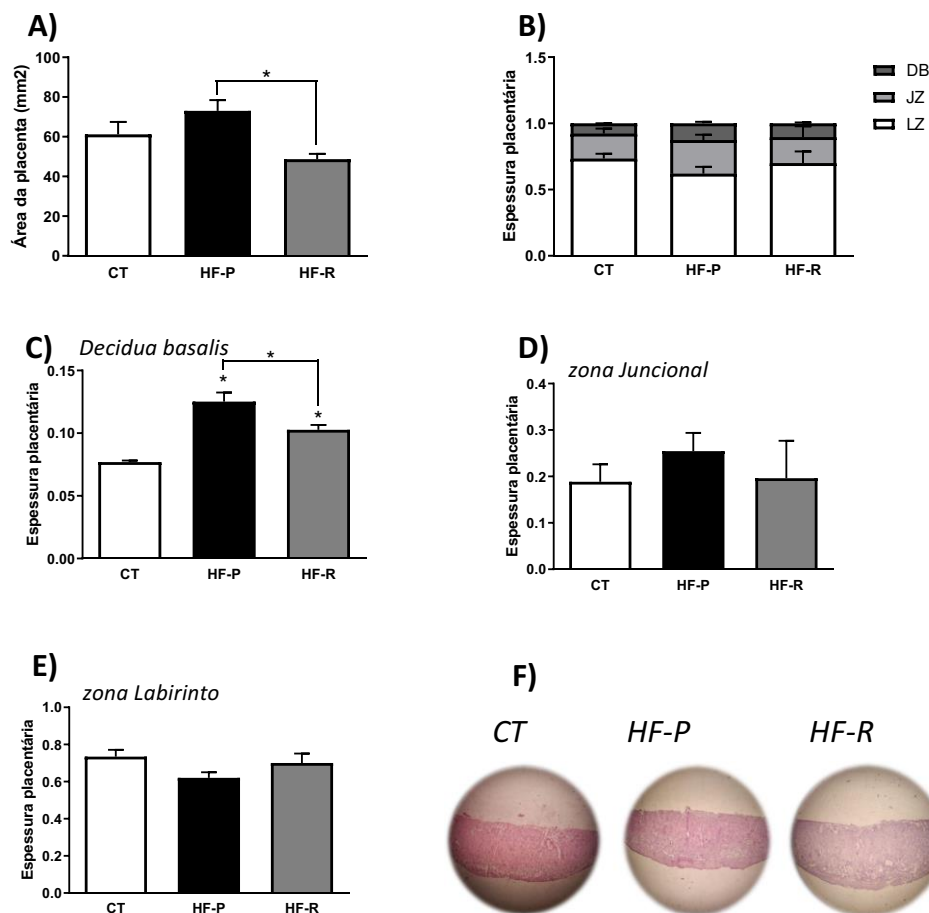


Figura 5. Adaptações morfológicas na placenta de animais submetidos à dieta hiperlipídica nos períodos pré-gestacional e gestacional. (A) Área da placenta. (B) Espessura da placenta. (C) Espessura da decídua basal.

(D) Espessura da zona juncional. (E) Espessura do labirinto (F) Imagem histológica representativa. (controle). HF-P (hiperlipídico propenso à obesidade). HF-R (hiperlipídico resistente à obesidade). * ANOVA *one-way* seguido de LSD com $p < 0,05$.

A análise de expressão diferencial de sequenciamento de RNA confirma a regulação descendente funcional nas vias principais da placenta de mães com tendência à obesidade

Considerando os resultados alcançados até o momento, revisitamos uma análise de sequenciamento de RNA anterior (dados não publicados) considerando todas as particularidades que revelamos neste trabalho sobre o fenótipo materno. Considerando apenas o efeito da dieta, a análise de RNAseq revelou um total de 482 transcritos diferencialmente expressos na placenta de mães com HFD em comparação com CTL com um limiar de significância de p -valor ajustado (p_{adj}) $< 0,05$ e uma modulação de pelo menos 2,5 vezes.

Porém, considerando que nossos resultados são baseados em um fenótipo obeso, comparando apenas os grupos HF-P com CTL, o número de genes triplica, passando para 1343, provavelmente devido a comparações mais específicas. As análises com DAVID foram usadas com o mesmo limite de p_{adj} ($< 0,05$) para identificar vias biológicas enriquecidas. Aqui, mostramos as vias e funções biológicas significativamente moduladas para baixo, apenas pelo efeito da dieta (CTL *versus* HFD), vias diferenciais no fenótipo obeso (CT *versus* HF-P), vias comumente moduladas e, em seguida, destacamos aquelas relacionadas à eficiência e desenvolvimento da placenta que apresentaram regulação negativa na análise das vias KEGG (Tabela 2).

Tabela 2. Vias metabólicas, doenças ou funções biológicas da análise da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) dos dados de RNA-seq com um limiar de padj <0,05 e alteração de 2,5 vezes, mostrando as funções moleculares e celulares significativas reguladas para baixo na placenta de fêmeas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica, classificados por P-Valor.

<i>Vias</i>	<i>#genes</i>	<i>P-Valor</i>
<i>CTL x HF-R – efeito da dieta</i>		
Axon guidance	5	1.0E-2
Cholinergic synapse	4	3.9E-2
<i>CTL x HF-P – efeito do fenótipo obeso</i>		
Axon guidance	10	5.7E-3
Ras signaling pathway	14	5.8E-3
TGF-beta signaling pathway	8	5.9E-3
Gap junction	8	6.3E-3
Protein digestion and absorption	8	7.2E-3
Malaria	6	7.3E-3
PI3K-Akt signaling pathway	18	8.5E-3
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	10	8.8E-3
MAPK signaling pathway	14	1.2E-2
Pathways in cancer	19	1.2E-2
Focal adhesion	12	1.7E-2
Rap1 signaling pathway	12	2.1E-2
Prostate câncer	7	2.5E-2
Melanoma	6	3.5E-2
Renin secretion	6	3.5E-2
Calcium signaling pathway	10	4.2E-2
Circadian rhythm	4	4.4E-2

6. Discussão

Estudos prévios já demonstraram que o fenótipo de obesidade apesar do consumo da HFD apresenta diferentes perfis de distúrbios metabólicos na prole. Portanto, o consumo materno da HFD sem consequente fenótipo da obesidade pode proteger o recém-nascido e a prole no pós desmame de distúrbios metabólicos. Ainda, o fenótipo dos animais propenso ao desenvolvimento da obesidade induzida por dieta antes da gestação potencializa os prejuízos no metabolismo da glicose e do lipídeo em recém-nascidos e proles recém desmamados, enquanto que os animais resistentes à obesidade são capazes de abrandar os distúrbios metabólicos precoces (Simino et al, 2020).

Animais expostos à HFD apresentam comportamento de ganho de peso bimodal. Assim, não é claro o quão dispendioso é isso para progênie durante o desenvolvimento de acordo com o conceito DOHaD. Isso porque não é apenas o conceito da plasticidade que determina a programação metabólica, mas também a comunicação materno-fetal através da placenta.

Todos os animais que consumiram HFD mostraram ganho de peso maior que o grupo controle (Fig 1). Pelo menos 50% das fêmeas expostas a HFD ganham mais peso do que o controle, e que o grupo resistente, no entanto essas fêmeas apresentam diminuição da fertilidade em torno de 40%, pois, na maioria dos experimentos, o número de casos de fertilidade é menor no grupo HF-P. Apesar dos três perfis nutricionais antes do acasalamento, o ganho de peso durante a gestação estava diferente somente no grupo HF-P e mesmo sendo menor não foi suficiente para alterar o peso corporal no final da gestação que era maior no grupo HF-P, seguido do grupo resistente e ambos, maiores que o controle provavelmente devido a maior eficiência alimentar do componente lipídico da HFD, já bem documentado. Isso foi acompanhado de prejuízos na tolerância à glicose. Aqui, destacamos que o principal responsável por esta alteração no distúrbio do metabolismo antes da gestação foi o ganho de peso pré-gestacional.

A gestação é uma janela de oportunidade nutricional e metabólica para garantir um ambiente saudável para o desenvolvimento de transformação corporal materna assim como para o desenvolvimento fetal. A gestação é marcada por importantes alterações hormonais, inflamatórias e metabólicas, a fim de segurar o correto suprimento de nutrientes para o feto e expansão de tecidos transientes como a placenta (Drynda et al, 2015).

Embora seja consenso de que o final da gestação está associado com diminuição materna a sensibilidade à insulina (Freemark et al., 2002; Musial et al., 2016), o grupo HF-P apresentou prejuízo na homeostase da glicose com maiores níveis da glicemia de jejum e área sob a curva do GTT apesar do índice QUICKI semelhante ao HF-R, indicando que esse último grupo ainda manteve o controle glicêmico.

Assim, como resultado desse processo, o fenótipo fetal e placentário foram avaliados e não surpreendentemente, para confirmar estudos prévios do nosso grupo, filhotes de mães propensas à obesidade, mesmo antes do parto, no dia E19 eram menores que o controle e HF-R. Diversos fatores estão envolvidos no crescimento fetal, entre eles o adequado transporte de nutrientes, via placenta. Até mesmo na prática clínica, a habilidade da placenta na manutenção do adequado suprimento pode ser determinada pela taxa de peso ao nascer em

relação ao peso da placenta (taxa BW/PW) (Wilson e Ford, 2001). Nesse estudo, nós adaptamos essa taxa para grama de peso fetal pela grama de peso da placenta no dia E19. A taxa BWPW, na literatura, é descrita como “eficiência placentária”, e pode ocorrer em resposta ou a estímulos maternos ou fetais, causando adaptações placentárias morfológica e funcional. A falha nessa adaptação placentária pode resultar em fetos muito pequenos ou muito grandes dependendo do seu potencial de crescimento genético (Fowden et al, 2009). Dessa forma, a prole pequena para idade gestacional no grupo HF-P era proporcional a eficiência placentária.

Estudos prévio também mostraram, em mulheres gestantes, que menor taxa BWPW estava associada com maior risco de nascimento de bebês a termo pequenos para idade gestacional (SGA do inglês) (Luque-Fernandez et al, 2015). Sabe-se que a restrição do crescimento fetal (FGR do inglês), uma condição em que o feto não consegue atingir o potencial de crescimento genético, é associada com disfunção placentária. A placenta na FGR mostra alterações na capacidade do transporte de nutrientes para compensar as funções subótimas (Sibley et al, 1997).

Em humanos, o peso ao nascer aumenta 0.4 SD a cada semana gestacional, e sua associação parece ser linear e provavelmente, é correlacionado com a progressão do peso corporal. Contudo, quando a avaliação da taxa BWPW é verificada em associação com a obesidade associada ao IMC, a eficiência placentária aumenta com a diminuição do IMC assim como com a redução de outros comportamentos de risco como hábito de fumar e do consumo de bebidas alcoólicas pela mãe (Salavati et al., 2017).

A diabetes pré-gestacional ou gestacional, ambas as morbidades maternas e neonatal, obesidade materna ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), e pré-eclâmpsia foram significativamente associadas com baixa taxa BWPW e, por outro lado, alta taxa BWPW foi associado com a diminuição do risco da obesidade materna e pré-eclâmpsia. Essas associações foram acompanhadas do índice de pulsatibilidade da artéria uterina e umbilical que pode explicar porque a adaptação de placenta falha no transporte de nutrientes de acordo com a demanda fetal, ou que os fatores de crescimento em mulheres obesas levam ao crescimento placentário excessivo (Jansson et al, 2013).

A taxa BWPW é considerado um medidor de como o desenvolvimento e a função da placenta adapta para conhecer o requerimento nutricional fetal e o suprimento materno (Fowden et al, 2009). O aumento da taxa BWPW (placenta relativamente pequena), implica no aumento do transporte do nutriente por grama da placenta. Portanto, o contrário é

verdadeiro: a diminuição da taxa BWPW sugere que a transferência de nutrientes por grama da placenta é reduzida.

O presente estudo indica que não apenas o tamanho da placenta, mas também a redução relativa do tamanho da placenta é associada com maior resistência no leito vascular (Bhide et al, 2013).

Nossos achados confirmam experimentalmente que o crescimento e o desenvolvimento anormal do feto e da placenta no fenótipo da obesidade podem explicar algumas das associações epidemiológicas da obesidade materna, como aumento do risco de natimortos, prematuridade e pré-eclâmpsia.

Estudos anteriores já demonstraram que intervenções dietéticas suficientes para causar obesidade materna ainda que modesta, resistência à insulina e hiperglicemia (fenótipo HF-P), causa relativamente poucos efeitos imediatos a sua prole, mas promove claramente restrição de crescimento e efeitos metabólicos persistentes em gerações não expostas, F2, por meio herança tanto materna quanto paterna. Essa redução no peso ao nascer é associada com aumento da gordura, dos níveis da insulina e alteração da expressão de genes hepáticos em proles machos da geração F2 (King et al, 2013).

No sentido de estabelecer alguma relação entre os resultados da gestação como o desfecho fetal e placentário com os parâmetros maternos, nós verificamos que quando o peso fetal é normalizado pelo ganho de peso materno (pré-gestacional e gestacional), o comportamento é diferente. Assim, o desfecho fetal parece ser, pelo menos em parte, mais relacionado com o estado nutricional pré-gestacional que com o ganho de peso durante a gestação.

Como esperado, a regressão linear dos dados de peso das mães em relação ao peso fetal e placentário demonstrou que esses tecidos apresentam crescimento positivamente relacionado ao ganho de peso somente dentro de uma faixa saudável ao considerar a inclinação positiva e a significância estatística no grupo controle. O oposto foi observado no grupo HF-P.

Alguns autores discutem que em algumas situações de distúrbio nutricional o sistema envolvido dá uma relativa prioridade a mãe em relação ao feto. Isso porque, evolutivamente, o feto pode ser visto como substituível, enquanto que a mãe precisa sobreviver para passar os seus genes para outras gerações (Gluckman e Hanson, 2004). Deste modo, é lógico supor que irão existir vários mecanismos pelos quais os fatores maternos sobrepõem a trajetória do crescimento fetal. O termo “restrição materna” vem sendo usado para definir o conjunto de

influências não-genéticas e não-patológicas pelo qual a mãe limita o crescimento fetal. Isso pode ser visto como uma limitação na capacidade absoluta da mãe e da placenta para o suprimento de nutrientes para o feto. Além disso, a restrição materna pode atuar sem ser considerado apenas o contexto de retardo de crescimento (Gluckman and Hanson, 2004).

Evolutivamente, a mãe limita seu investimento fetal. Em caso de superinvestimento na progênie, há grande risco de mortalidade materna. Portanto, em termos da história de vida é essencial, que seus genes sejam passados para as próximas gerações, preservando a variação genotípica das espécies, mas também para que as mães possam sobreviver para reproduzir (Stettler et al, 2000). Então, mesmo na faixa do desenvolvimento fetal a custo de distúrbios no meio materno, a adaptação do conceito pode apresentar consequências a longo prazo para o risco de doenças. Especialmente nas mudanças epidemiológicas atuais no estado nutricional que mostram que essa influência da restrição materna fisiológica merece mais atenção e, talvez, significância clínica. Na vida intra-uterina, mudanças hormonais leves e transitórias, mesmo dentro dos níveis fisiológicos atualmente aceitos, podem afetar diretamente o perfil de expressão dos genes alvos, que geralmente estão envolvidos no crescimento e maturação normais (Burton and Jauniaux, 2018). Mecanismos epigenéticos podem pressupor tais consequências que, em alguns casos, são evidentes apenas nas gerações subsequentes (Auyeung et al., 2013; Cottrell & Seckl, 2009; Harris & Seckl, 2011). Desbalanço hormonal devido a disfunção placentária ou estresse crônico pré-natal não apenas prejudicam a maturação e crescimento fetal mas também podem induzir complicações obstétricas, perinatal e neonatal incluindo parto cesariano, asfixia perinatal, síndrome de dificuldade respiratória, regulação glicêmica anormal ou função adrenal inadequada e responsividade do eixo hipotálamo pituitário (HPA do inglês) (Colella et al, 2018).

Diversos estudos avaliaram a função da família de PRL-GH (prolactin-growth hormone) tanto *in vivo* quanto *in vitro* na adaptação metabólica materna a gestação. Esses eixos são marcadamente conectados a resposta a insulina e glicose nesse processo por meio da indução da expansão da célula β , aumento da secreção da insulina e regulação da sensibilidade à insulina (Weinhaus et al, 1996). Em humanos já vem sendo demonstradas associações entre polimorfismos/mutações na família dos genes e receptores da PRL-GH com diabetes gestacional e restrição do crescimento fetal (Rygaard et al., 1998; Le et al., 2013).

A adiponectina total é positivamente correlacionada com a sensibilidade a insulina e neutraliza os níveis da leptina em humanos e roedores (Worda et al, 2004, Napso et al, 2018).

Em quadros de diabetes e obesidade, níveis baixos da adiponectina são relacionados como o grau da hiperinsulinemia e severidade da resistência à insulina (Weyer et al, 2001).

Estudos prévios vêm demonstraram que a hipoadiponectinemia é uma marca registrada em situações onde ocorre resistência à insulina, incluindo obesidade, diabetes tipo 2 e diabetes gestacional (Kondo et al, 2004). Análises longitudinais realizadas desde o período pré-gestacional até o terceiro trimestre confirmam que a gravidez em humanos, em uma condição fisiológica no qual a circulação da adiponectina é diminuída (Catalano et al, 2006), e na ausência da obesidade, as mudanças na adiponectina são relacionadas com prejuízo na sensibilidade periférica da glicose à insulina mas não o metabolismo do lipídeo. No presente trabalho, o grupo HF-P apresentou concentração elevada de adiponectina sérica apesar de um perfil de resultado oposto no líquido amniótico, provavelmente como uma forma de neutralizar a piora da resistência à insulina para melhorar o suprimento metabólico para as mães às custas do filhote.

Durante a gestação, ocorre um equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no sentido de evitar a rejeição do embrião. Além disso, a inflamação na obesidade não é novidade, como demonstrado pelos níveis do PCR, a concentração sérica do IL6 estava diminuída nos animais que consumiram HFD, independente do fenótipo. Embora esse nível de IL6 possa ser uma resposta fisiológica ao equilíbrio inflamatório, o fato é que algumas citocinas, como o próprio IL6 não é essencial para o sucesso da gestação, mas pode desempenhar um papel modulador durante a implantação do embrião e desenvolvimento da placenta (Prins et al, 2012), o que pode ser relacionada ao prejuízo na eficiência placentária.

Finalmente, para entender alguns mecanismos regulados na placenta, foram avaliados alguns transportadores de nutrientes e genes intimamente relacionados com a função placentária. O transporte de nutrientes placentários depende de ambos, o gradiente entre a circulação materna e fetal e o funcionamento desse órgão. Sua função pode ser afetada pelo número e atividade de proteínas carreadoras envolvidas nesse processo. A placenta tem habilidade de alterar seu metabolismo a fim de se adaptar às condições do ambiente (FOWDEN et al 2009).

As respostas da expressão dos transportadores de ácidos graxos à dieta materna também variam ao longo do tempo, com a dieta exercendo um efeito mais expressivo do que a diabetes, por exemplo (Kappen et al, 2019). O gene *SLC27A4*, ou FATP4 é conhecido como um importante transportador de ácidos graxos (FA do inglês) placentários, que, assim como no presente estudo, foi encontrado em baixos níveis em mulheres obesas comparadas com

eutróficas (DÍAZ et al, 2015). DUBÉ et al (2012), que também encontraram baixos níveis de *SLC27A4* no grupo obeso, sugerem possíveis mudanças na esteresterificação dos FA placentários, uma vez que, de acordo com Larqué et al (2006), *SLC27A4* na placenta está principalmente envolvida na esteresterificação. Também, embora o knockout *SLC27A2/FATP2* não apresente diferenças no tamanho da ninhada, genótipo, peso do embrião e da placenta (Mishima et al., 2011), a deleção do gene *SLC27A4/FATP4* em camundongos provocou letalidade embrionária, sugerindo que esse gene desempenha uma função fundamental no transporte de ácidos graxos durante a embriogênese (Gimeno et al, 2003).

O PGF é o principal fator angiogênico placentário e desempenha um papel chave na placentação e desenvolvimento fetal (SIBIUDE et al 2012, WU et al, 2017, VRACHNIS et al, 2013). Ghosh et al 2013 encontraram baixos níveis de PGF nos grupos com sobrepeso e níveis ainda menores naqueles com obesidade. Baixos níveis de PGF durante a gestação estão associados com resultados adversos, como retardo do crescimento intrauterino, o que pode estar relacionado com disfunção placentária.

Além disso, o receptor de fator de crescimento epidérmico é conhecido por regular diversas funções como a diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celular (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001) e, por isso, estudos mostram que a deficiência do EGFR gera bebês e placentas pequenos ao nascer, possivelmente devido a redução da camada de células de espongiotrofoblastos e deficiência no desenvolvimento da decídua (SIBILIA et al 1995; THREADGILL, 1995). Portanto a diminuição da expressão do mRNA EGFR no grupo HF-P sugere que essa diminuição pode contribuir para o prejuízo na espessura das camadas placentárias, e resultado fetal adverso. Além disso, parece que, no grupo HF-R, a superexpressão de PGF protegeu a placenta contra danos morfológicos e funcionais e ineficiência que foi acompanhada pela manutenção da homeostasia glicêmica no ambiente materno.

A ativação das vias das SMADs, proteínas que respondem diretamente ao Fator de Transformação do Crescimento beta, TGF β (do inglês, *transforming growth factor beta*) regula positivamente a diferenciação dos trofoblastos (CHENG et al, 2018). E sabe-se que maturação e migração incompleta do trofoblasto é um dos fatores envolvidos na insuficiência placentária e em uma série de eventos relacionados à má adaptação circulatória durante a gestação (WALLENBURG, 1988). No presente trabalho foi observado diminuição da

expressão da SMAD3, indicando possível prejuízo no adequado funcionamento dessa via que é importante para diferenciação dos trofoblastos e eventos subsequentes.

Para fechar esses dados com uma confirmação mais robusta, apresentamos uma parte da análise de RNA-seq que ainda não foi publicada na íntegra, mas alguns aspectos desses dados merecem atenção. Um estudo recente mostrou uma modulação semelhante do transcriptoma placentário de mães alimentadas com dieta obesogênica, entretanto existem algumas diferenças no modelo e diferenças importantes entre a composição das dietas. Mesmo assim, um número total semelhante de moléculas (350) moduladas pela dieta também foi demonstrado por De Barros Mucci (2020). Porém, aqui refinamos a busca de acordo com o fenótipo desenvolvido e, a seguir, algumas confirmações do nosso modelo foram esclarecidas. Resumidamente, *Smad3*, *Tgif1*, *Acvr1b*, *Bmp4*, *Bmp8a*, *Inhba*, *Inhbb*, *Ltbpl* da via do TGF β ; *Htr2b*, *Egfr*, *Gucylb2*, *Itpr2*, *Pdgfra*, *Pdgfb*, *Pdgfa*, *Pdgfc* da via de junções intercelulares “tipo-Gap” foram infra reguladas e afetaram significativamente esta sinalização fisiológica em ambos: o modelo matemático e estatístico usado na análise KEGG bem como foi demonstrado por nossos resultados funcionais e fenotípicos anteriores.

7. Conclusão

Nossos resultados mostraram que os desfechos fetais adversos estão causalmente relacionados ao desenvolvimento de um fenótipo propenso à obesidade. Esse fenótipo, retratado no grupo HF-P, reuniu exacerbação da resistência à insulina, intolerância à glicose, hipoprolactinemia, hiperadiponectinemia e desequilíbrio no meio inflamatório. Esse cenário levou à insuficiência placentária, diminuição da expressão de transportadores de nutrientes e de fatores de crescimento, desencadeando a restrição do crescimento fetal.

Por outro lado, o grupo HF-R manteve o equilíbrio nos meios hormonal, inflamatório e metabólico, sustentou o desenvolvimento placentário com aumento do fator de crescimento placentário e promoveu um bom resultado fetal. Apesar deste resultado, vale ressaltar que os primeiros 1000 dias de vida representa um importante janela de programação que dependendo dos estímulos/ambiente pós natal, esse cenário pode ser alterado trazendo complicações à saúde.

Suporte financeiro

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Código Financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq, Projeto Universal, Souza LMI nº448882/2014-0), Fundo de Apoio à Educação, Pesquisa e Extensão da Unicamp (FAEPEX, Bolsa de estudos, Sanches APV nº 2184/2018) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Projeto Regular Souza LMI nº2017_11608-0).

O Laboratório de Doenças Metabólicas pertence ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades da FAPESP (OCRC).

REFERÊNCIAS

ANDERSON, C.M; Stahl, A. SLC27 fatty acid transport proteins. **Molecular Aspects of Medicine**, v.34, pag. 516–528, 2013.

AYE, L.M.H; JANSSON, T; POWELL, TL. Interleukin-1b inhibits insulin signaling and prevents insulin-stimulated 4 system A amino acid transport in primary human trophoblasts. **Molecular and Cellular Endocrinology**, pag. 1-10, 2013.

BARKER, D.J.P et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart diseases. **The Lancet**, 1989.

BHIDE, G. et al. Trudinger, ISUOG practice guidelines: use of Doppler ultrasonography in obstetrics, Ultrasound Obstet, **Gynecol**, v. 41, pag.233-239, 2013.

BURTON, G, J et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **BMJ**, v.366, n.2381, pag. 2-15, 2019.

BOLE-FEYSOT, C et al. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. **The Endocrine Society**, v. 19, n. 3, pag. 225–268, 1998.

CAMINOS, J.E et al. Expression and Regulation of Adiponectin and Receptor in Human and Rat Placenta. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v.90, n.7, pag. 4276–4286, 2005.

CATALANO, P.M et al. Fetuses of Obese Mothers Develop Insulin Resistance in Utero. **DIABETES CARE**, V.32, N. 6, 2009.

CHEN, J, et al. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. **Diabetologia**, v.49, pag.1292–1302, 2006.

CHENG, J.-C., Yi, Y., CHANG, H.-M., & LEUNG, PCK. O TGF-β1 regula positivamente a expressão de caderina-11 através do Snail: um mecanismo potencial para diferenciação de células trofoblásticas humanas. **Cellular Signaling**, v.43, p.55-61, (2018).

COLELLA M., et al. Neonatal and Long Term Consequences of Fetal Growth Restriction. **Curr Pediatr Rev**, v.14, v.4, pag.212-218, 2018.

COTTRELL, E.C; SECKL, J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. **Front Behav Neurosci** v.3, n.19. 2009.

DAHLGREN, J et al. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. **The American Physiological Society**, v.281, 2001.

DENISON, F. C., K. A. et al.2010. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. **Reproduction** 140:373–385.

DESFORGES, M et al. The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.398, pag.130–134, 2010.

DESFORGES, M et al. The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. **J Physiol**, v.587.n.1, pag. 61–72, 2009.

DINARELLO, C.A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **The Journal of The American Society of Hematology**, v.87, n.6, 1996.

DÍAZ, P et al. Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. **American Journal of Physiology** v.309, pag.1569–1577, 2015.

DRYNDA, R., et al. The role of nonplacental signals in the adaptation of islets to pregnancy. **Horm. Metab. Res**, v.47, pag.64–71, 2015.

DUARTE, E.C; BARRETO, S.M. Transição demográfica e epidemiológica: a Epidemiologia e Serviços de Saúde revisita e atualiza o tema. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.21, n.4, Pag.529–532, Brasília dez. 2012.

DUBÉ, E et al. Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. **Biology of reproduction** v.87, n.14, pag. 1–11, 2012.

EKINCI, E.I. et al. Higher maternal serum prolactin levels are associated with reduced glucose tolerance during pregnancy. **Journal of Diabetes Investigation**, v.8, n. 697–700, 2017.

ERTA, M; QUINTANA, A; HIDALGO, J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, pag. :1254-1266, 2012.

FOWDEN, A.L et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **Journal of Physiology**, v.587, n.14, pag 3459–3472, 2009.

FREEMARK, M., et al. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, Insulin production, and glucose tolerance. **Endocrinology** v.143, pag.1378–1385, 2002.

GEORGIADES; FERGUSON-SMITH; BURTON. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**, v.23, pag.3–19, 2002.

GIMENO R.E et al. Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. **J Biol Chem** 2003; 278:49512–49516.

GLASTRAS, S.J. et al. Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. **Bioscience Reports**, 2018.

GLUCKMAN, P.D; HANSON, M.A. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. **Fetal and Neonatal Medicine**, v.9, pag.419-425, 2004.

GHOSH, S.K et al. Serum placental growth factor as a predictor of early onset preeclampsia in overweight/obese pregnant women. **Journal of the American Society of Hypertension** v.7, n.2, pag.137–148, 2013.

HALES, C.N, Barker D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia** 1992;35:595-601.

HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica ilustrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 520 p. ISBN 9788536326252.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Morphogenesis of the Syncytium in the Mouse Placenta Ultrastructural Study. **Cell Tiss. Res.** V.148, pag.381—396, 1974.

HOWELL, K.R; Powell, T.L. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. **Society for Reproduction and Fertility**, pag. 97–108, 2017.

JANSSON, N. Activation of Placental mTOR Signaling and Amino Acid Transporters in Obese Women Giving Birth to large Babies. **Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n.1, pag.105–113, 2013.

JOLLIE, W.P. Fine Structural Changes in Placental Labyrinth of the Rat with Increasing Gestational Age 1. **J. Ultrastructure research**, V.10, pag. 27-47, 1964.

JONES, H.N; JANSSON, T; POWELL, T.L. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. **American Physiological Society**, v.297, pag.1229-1234, 2009.

JOHNS, E.C., DENISON, F.C; REYNOLDS, R.M. The impact of maternal obesity in pregnancy on placental glucocorticoid and macronutrient transport and metabolism. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. 2020 Feb 1;1866(2):165374.

KAPPEN C, KRUGER C, JONES S, HERION NJ, SALBAUM JM. Maternal diet modulates placental nutrient transporter gene expression in a mouse model of diabetic pregnancy. **PLoS One**. 2019 Nov 27;14(11):e0224754.

KARL, P.I. Insulin-like Growth Factor-1 Stimulates Amino Acid Uptake by the Cultured Human Placental Trophoblast. **Journal of Cellular Physiology**. v.165, pag.83-88 1995.

KING et al. Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. **Endocrinology**, July 2013, 154(7):2514–2524

KOCH, C.E. et al. High-Fat Diet Induces Leptin Resistance in Leptin-Deficient Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v.26, pag.58–67, 2014.

KONDO E, SUGIYAMA T, KUSAKA H, TOYODA N (2004) Adiponectin mRNA levels in parametrial adipose tissue and serum adiponectin levels are reduced in mice during late pregnancy. **Horm Metab Res** 36:465–469.

KWON, E.K; KIM, Y.J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstetrics and Gynecology Science**, Correia, v.60, n.6, pag.506-519, 2017.

LAGER, S et al. Effect of IL-6 and TNF- α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. **Placenta**, v.32, pag.121-127, 2011.

LAGER, S et al. Diet-induced obesity in mice reduces placental efficiency and inhibits placental mTOR signaling. **Physiological Reports**, v.2, n.2, pag. 1-7 2014.

LARQUÉ, E et al. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.84, pag.853–861, 2006.

LE, T. N., et al. Prolactin receptor gene polymorphisms are associated with gestational diabetes. **Genet. Test. Mol. Biomarkers** v.17, pag.567–571. 2013.

SIBLEY C, GLAZIER J; D’SOUZA S Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. **Exp Physiol**, v.82, pag.389–402, 1997.

LECOUTRE, S et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. **Molecular metabolism**, v.6, pag.922-930, 2017.

LIMONGI, J.E ;FERRO, E.A.V. Barreira placentária de calomys callous (rodentia cricetidae). **Biosci.j**, Uberlândia, v.19, n.3, pag. 89-94, 2003.

LIONG,S; BARKER,G; LAPPAS, M. Placental Ras Regulates Inflammation Associated with Maternal Obesity. **Hindawi**, pag.1-20, 2018.

LUCAS A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v.156, pag.38-50, 1991.

LUQUE-FERNANDEZ MA, Ananth CV, Jaddoe VW, et al. (2015). Is the fetoplacental ratio a differential marker of fetal growth restriction in small for gestational age infants? **Eur J Epidemiol**;30(4): 331–341. doi: 10.1007/s10654-015-9993-9.

MATHEWS, J.N et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**. London, v. 300, n. 6719, pag. 230-235, 1990.

MARIAHT, A. B et al. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 897-905, abr. 2007.

MARIS, E; BEVILACQUA, AF.; ABRAHAMSOHN,P.A. Ultrastructure of Trophoblast Giant Cell Transformation During the Invasive Stage of Implantation of the Mouse Embryo. **Journal of morphology**, v.198, pag.341-351, 1988.

MEO, S.A; HASSAIN,A. Metabolic Physiology in Pregnancy. **J Pak Med Assoc**, V. 66, N.1, pag.8-10, 2016.

MISHIMA,T et al. The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. **PLoS One**, v.6, n.10,25865, 2011.

MUSIAL, B., et al. Proximity to Delivery Alters Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Pregnant Mice. **Diabetes** v.65, pag.851–860, 2016.

NAPSO T, YONG HEJ, LOPEZ-TELLO J, SFERRUZZI-PERRI AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation **Front Physiol**. 2018 Aug 17;9:1091.

ORMANDY, C.J et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. **Genes & development** v.11, n.167-178, 1997.

PAJVANI, U.B et al. Structure-Function Studies of the Adipocyte-secreted Hormone Acrp30/Adiponectin. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, V. 278, N. 11, pag. 9073–9085, 2003.

PAZINATO, F.M et al. Histological features of the placenta and their relation to the gross and data from Thoroughbred mares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, pag.665-670, 2016.

PENDELOSKI,K.P.T. et al. Maternal obesity and inflammatory mediators: A controversial association.**Wiley**, pag.1-8, 2017.

PERKS, C.M et al. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. **Human Reproduction**, v.18, n.12 pag. 2672-2677, 2003.

POWELL, S.L.T. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. **Journal of Pregnancy**, pag.1-14, 2012.

REYNOLDS, C.M, et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. **Physiological reports**, New Zealand, v.3, n.5, p.1-10, 2015.

ROOS, S; POWELL, T.L; JANSSON. **Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth**. **Biochemical Society**,v. 37, pag. 295–298, 2009.

ROSSANT, J; CROSS,J.C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nature reviews**, V.2, pag.1-11, 2001.

RUAN, H; DONG, L.K . Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. **Journal of Molecular Cell Biology**, 2016.

RUIZ-PALACIOS, M et al. Role of Insulin in Placental Transport of nutrients in gestational diabetes mellitus. **Ann Nutr Metab**, v.70, pag.16–25, 2017.

RYGAARD, K., et al. Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (HGH-V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion, **Hum Genet**, v.102, 87–92, 1998.

SABEN, J et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. **Placenta** v.35 pag.171e177, 2014.

SALAVATI, N., et al. Birth weight to placenta weight ratio and its relationship to ultrasonic measurements, maternal and neonatal morbidity: A prospective cohort study of nulliparous women. **Placenta**, v.63, pag.45-52, 2018.

SEGURA, M.T et al. Maternal BMI and gestational diabetes alter placental lipid transporters and fatty acid Composition. **Placenta**, 10.1016/j.placenta.2017.07.001, 2017.

SCHERER, P.E. et al. Uma nova proteína sérica semelhante a C1q, produzida exclusivamente em adipócitos. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.26746-26749, 1995.

SHIN, H-Y; KANG, H-T. Recent trends in the prevalence of underweight, overweight, and obesity in Korean adults: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey from 1998 to 2014. **Journal of Epidemiology**, Korea, v.27, p.413-419, 2017.

SIBILIA, M et al. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. **The EMBO Journal** v.17 n.3 pp.719–731, 1998.

SIBIUDE, J et al. Placental Growth Factor for the Prediction of Adverse Outcomes in Patients with Suspected Preeclampsia or Intrauterine Growth Restriction. **Plos one**, v.7, n.11, pag.1-8, 2012.

SIMINO, L.A.P. et al. Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. **Nutrition & Metabolism**, Brasil, v.14, n.16, pag.1-15, 2017.

SIMINO, L., et al. Maternal resistance to diet-induced obesity partially protects newborn and post-weaning male mice offspring from metabolic disturbances. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, pag.1-11, 2020.

SOARES, M.J. Differentiation of Trophoblast Endocrine Cells. **Placenta**, V.17, pag.277-289, 1996.

TANAKA, K et al. Increased maternal insulin resistance promotes placental growth and decreases placental efficiency in pregnancies with obesity and gestational diabetes mellitus. **The Journal of Obstetric and Gynaecologic Research**. v. 44, n. 1, pag. 74–80, 2018.

TARRY-ADKINS, J.L.; OZANNE, S.E. Nutrition in early life and age-associated diseases. **Elsevier**, Cambridge, p.1-7, 2016.

TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**. pag 805–20, et al, 2010.

TEESALU, T; BLASI, F; TALARICO, B. Expression and Function of the Urokinase Type Plasminogen Activator During Mouse Hemochorial Placental Development. **Developmental dynamics** v.213, pag.27–38 1998.

TESSIER, D.R; FERRARO, Z.M, GRUSLIN, A. Role of leptin in pregnancy: Consequences of maternal obesity. **Placenta**, v. 34, n.3, pag.205-211, 2013.

THREADGILL, D.W et al. Targeted Disruption of Mouse EGF Receptor: Effect of Genetic Background on Mutant Phenotype. **Science**, v. 269, n.5221, pag.230-234, 1995.

VAN der Zee, Henri A. The Hunger Winter: Occupied Holland 1944–1945. **University of Nebraska Press**, pag.304-305, 1998.

VIGITEL Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2019.

VISSER, M et al. Elevated C-Reactive Protein levels in overweight and obese adults. **Jama**, v.282, n.22, pag.2131-2135, 1999.

VITOLO, M.R. **Nutrição: da gestação à adolescência**. Rio de Janeiro: Reichman & Affonso editores, 2003.

VRACHNIS, N et al. Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth. **The Journal of Matern-Fetal Neonatal Medicine**, v.26, n.10, pag.995–1002, 2013.

WALLENBURG, HC. Prevention of hypertensive disorders in pregnancy. **Clin Exp Hypertens Pregnancy**, v.7p.121-37, 1988.

WEINHAUS AJ, STOUT LE, SORENSON RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long-term up-regulation of islets. **Endocrinology** v.137, pag.1640 –1649, 1996.

WEIWEI, T et al. Expressions of Adiponectin Receptors in Placenta and Their Correlation With Preeclampsia. **Reproductive Sciences**, v.16, n.7, pag.676-684, 2009.

WEYER C; FUNAHASHI T; TANAKA S et al (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab** 86:1930–1935.

WILSON, M.E; FORD, S.P. Comparative aspects of placental efficiency. *Reproduction Suppl* 58, 223–232. Fowden, A.L et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **Journal of Physiology**, v.587, n.14, pag. 3459–3472, 2009.

WIXEY, J.A. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. **Placenta**, Australia, v.54, p.117-124, 2017.

WORDA C et al D (2004) Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol** 191:2120–2124

WORLD HEALTH ORGANIZATION TECHNICAL REPORT SERIES. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO Library, 2003. 160 p. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Mulheres e saúde: evidências de hoje, agenda de amanhã, pag 1 112, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> Acesso em 03/04/2020.

WU, W et al. Decreased PGF may contribute to trophoblast dysfunction in fetal growth restriction. **Reproduction**, v.154 pag.319–329, 2017.

YARDEN, Y; SLIWKOWSKI M.X. Untangling the erbb signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v.2, pag.127 – 137, 2001.

ZEMBALA-SZCZERBA et al. Low-Grade Metabolically-Induced Inflammation Mediators Interleukin-6, Adiponectin, and TNF- α Serum Levels in Obese Pregnant Patients in the Perinatal Period. **Medical Science Monitor Basic Research**, v.23, pag. 1-7, 2017.

ZHANG.Y, R Proenca, M Maffei, M Barone, L Leopold, J.M Friedman.Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue **Nature**,v. 372, pag.425-432, 1994.

ZHOU, J; BONDY,C.A. Placental Glucose Transporter Gene Expression and Metabolism in the Rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v.91,pag.845-852, 1993.

ANEXOS

Tabela 1. Composição nutricional das dietas hiperlipídicas empregadas no protocolo experimental

<i>Ingredientes</i>	<i>Crescimento</i>			<i>Manutenção</i>		
	<i>Quantidade</i>	<i>Kcal</i>	<i>% calórico total</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Kcal</i>	<i>% calórico total</i>
Amido	95	380		167,1	668,4	
Maltodextrina	125	500	35,26	125	500	41,09
Sacarose	201	804		201	804	
Caseína	233	932	19,51	167	668	13,92
Óleo de soja	40	360	45,23	40	360	44,99
Banha	200	1800		200	1800	
Minerais	35	0		35	0	
Vitaminas	10	0		10	0	
Fibras	55,5	0		50	0	
L - cistina	3	0		2,4	0	
Bitratarato de colina	2,5	0		2,5	0	
Total	1000	4776	100	1000	4800,4	100

Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UNICAMP.



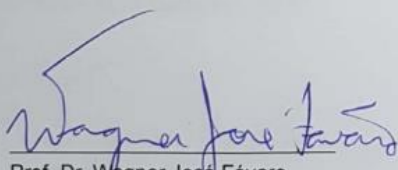
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Adaptações placentárias e desfecho fetal em prole de mães obesas induzidas por dieta hiperlipídica.**, registrada com o nº **5401-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Leticia Martins Ignácio De Souza e Ana Paula Varela Sanches**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **10/10/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/10/2019 a 31/10/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/10/2019 a 31/10/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	150
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	50 Machos 100 Fêmeas
Origem:	Aviário etc. Biotério Central da Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **07 de novembro de 2019**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.