

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Perfil da metilação do DNA do binômio mãe-filho no
contexto da obesidade materna, adiposidade fetal e
neonatal**

Perla Pizzi Argentato

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Nutrição em Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.**

**Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Helen de
Carvalho Rondó**

**São Paulo
2022**

Perfil da metilação do DNA do binômio mãe-filho no contexto da obesidade materna, adiposidade fetal e neonatal

Perla Pizzi Argentato

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Helen de Carvalho Rondó

**São Paulo
2022**

“Retenção de tese”

Autorizo a divulgação parcial deste trabalho, pois contém dados inéditos no formato de artigos científicos.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que se interessam por nutrição e programação metabólica fetal.

Agradecimentos

Há muitos agradecimentos, pois foram inúmeras pessoas que participaram de forma direta ou indireta, mas de maneira muito especial, na concretização desta pesquisa!

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Helén de Carvalho Rondó, pelos ensinamentos, seu exemplo de dedicação e ética, por confiar na minha capacidade e, principalmente, por seu apoio e amizade.

A todo grupo de pesquisa do Projeto Coorte de Araraquara, em especial ao grupo que iniciou o projeto: Laísia, Lívia Patrícia, Patrícia Nak, Naiara, Maria Paula, Talita e Lívia Casagrande, pela coleta árdua dos dados, atendimentos das gestantes e depois dos neonatos e pela colaboração com a coleta dos materiais e dados necessários para essa pesquisa. Dividimos trabalho, angústias, alegrias e, também, moradia. Aproveito para agradecer ao Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) por disponibilizar espaço tanto para nossa moradia, quanto para os atendimentos da Coorte. Em especial agradeço ao Dr. Walter Figueiredo, e Profa. Ângela Aparecida, que sempre deram atenção às demandas da coorte.

A todas as enfermeiras e demais profissionais envolvidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Araraquara e região, em especial à Técnica de Enfermagem Nilza, da UBS Santa Angelina e a Enfermeira Andressa, da UBS do município de Trabiú.

A todos os funcionários da maternidade Gota de Leite de Araraquara, desde recepcionistas, técnicos de enfermagem, enfermeiros, biomédicos, médicos e equipe de limpeza, dentre outros. A dedicação de todos em colocar em prática os protocolos de coleta da Coorte, bem como dessa pesquisa, foram essenciais para os resultados atuais. Agradeço em especial à Enfermeira Emanuely que intermediou com os funcionários e conosco e à Diretora Lúcia Ortiz, que além de dar opções de soluções para as muitas demandas que foram surgindo ao longo da pesquisa, foi um ombro amigo e conselheira quando precisei. Também ao Dr. Ademir Roberto e ao Dr. Eduardo Venerando, por interagirem com os demais médicos e residentes da maternidade.

A todos os alunos dos cursos da área da saúde da Faculdade UNIARA e UNIP de Araraquara, por colaborarem, de alguma forma, em alguma das vertentes do estudo de coorte. Agradeço à Coordenadora Cristina e Profa. Rita de Cássio, por articularem esse intercâmbio entre UNIP, UNIARA e USP.

A todas as gestantes e bebês que participaram desta pesquisa.

À Dra. Liania Alves Luzia, funcionária PROCONTES do projeto de coorte, que sempre me auxiliou com as demandas referentes aos insumos de laboratório, compras e prestação de contas desta pesquisa.

À Profa Dra. Estér Silveira Ramos, que foi uma segunda orientadora para mim, concedendo espaço em seu laboratório de pesquisa. Também agradeço a todos os alunos do seu grupo de pesquisa e ao técnico de laboratório Reginaldo Vila, pois sempre fui tratada como se fosse aluna pertencente ao próprio bloco C, da Genética, da USP de Ribeirão Preto. Em especial agradeço ao doutorando Jorge Augusto que esteve comigo durante todo período de bancada, me auxiliando e tirando todas as minhas dúvidas experimentais.

À Profa. Dra. Regina Fisberga, por ceder laboratório para análise das dietas e em especial à doutoranda Mariane Fontanelli, que me auxiliou no *software* e a aluna de iniciação científica Jennifer, que ajudou com a inserção dos recordatórios alimentares.

Ao estatístico Geraldo Cássio, que esteve à disposição para retirar minhas dúvidas, inclusive durante o início da pandemia e sempre que precisei.

À Profa. Dra. Mariana Maschietto e ao doutorando João Vieira da Universidade de Campinas (UNICAMP), por auxiliarem com as análises de bioinformática desta pesquisa.

Aos órgãos de fomento à pesquisa Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que concedeu uma bolsa de pesquisa no primeiro ano do meu doutorado e à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2018/17824-0), que concedeu uma bolsa de pesquisa nos anos subsequentes do meu doutorado e ainda à FAPESP (processo 2015/03333-6) por possibilitar o estudo maior de Coorte.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Edna e ao meu pai Arlindo pelo amor e carinho, aos meus irmãos Rodrigo e Marcelo e, também, queridos amigos, que compreenderam minha dedicação aos estudos. E aos meus pets, Bill e Fred, que foram meus maiores companheiros durante a pandemia e etapa de escrita desta pesquisa.

Enquanto escrevia esses agradecimentos, recordei de um trecho de William Shakespeare, em *Sonho de uma Noite de Verão*, onde dizia que “Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isto não tem muita importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado”

Por fim, agradeço à Deus por conceder às oportunidades e ter colocado todas essas pessoas em meu caminho. Essa pesquisa não teria ocorrido se não fosse à colaboração de cada uma delas. Muito obrigada!

“...quando minha mãe estava grávida do segundo filho
eu tinha quatro anos
apontei para sua barriga inchada
sem saber como minha mãe tinha ficado tão grande em tão pouco tempo
meu pai me ergueu com braços de tronco de árvore
e disse que nesta terra
a coisa mais próxima de deus
é o corpo de uma mulher
é de onde a vida vem
e ouvir um homem adulto dizer algo tão poderoso
com tão pouca idade
fez com que eu visse o universo inteiro
repousando aos pés da minha mãe...”

Rupi Kaur

Resumo

Argentato PP. Perfil da metilação do DNA do binômio mãe-filho no contexto da obesidade materna, adiposidade fetal e neonatal [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, 2022.

Introdução: Um mecanismo epigenético pelo qual os efeitos adversos do ambiente intra-uterino são transferidos aos descendentes é a metilação do DNA. **Objetivo:** Avaliar a relação entre obesidade materna, ganho de peso gestacional (GPG) e alteração da metilação do DNA sobre o desenvolvimento fetal e neonatal. **Metodologia:** Subpopulação de gestantes do estudo epidemiológico prospectivo “Coorte Araraquara” foram acompanhadas durante os três trimestres da gestação, parto e no pós-parto. Para avaliar o impacto do GPG na metilação do DNA e desenvolvimento fetal e neonatal, as gestantes foram alocadas em 2 grupos: ganho de peso gestacional adequado (n=45) e ganho de peso gestacional excessivo (n=30). Para avaliar o impacto da obesidade materna na metilação do DNA e desenvolvimento fetal e neonatal, as gestantes foram alocadas em 2 grupos: A. IMC pré-gestacional adequado (n=25) e B. IMC pré-gestacional sobrepeso/obesidade (n=39 gestantes). A biometria e composição corporal fetal foram avaliadas por ultrassom Siemens ACUSON X300TM (Siemens®, Mountain View, CA, USA) e a composição corporal do neonato por pletismografia, com o PEA POD (Cosmed®, Concord, CA, USA). A dieta materna ao final da gestação foi investigada por recordatórios de 24 horas e analisada no *software Nutrition Data System for Research* (NDSR, Minnesota, USA). O DNA dos sangues materno e cordão umbilical, da vilosidade e decídua placentárias foram extraídos utilizando proteinase K pelo método *santing-out*. As regiões hipo e hipermetiladas foram analisados pela técnica de Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa (qPCR) e a expressão gênica por qPCR. Para análise da influência do GPG o DNA do sangue materno de gestantes com GPG adequado (N=8) *versus* com GPG excessivo (N=8), foi hibridizado na plataforma Illumina com o *Human Methylation 850K Bead Chip* (Illumina, CA, USA). Para análise estatística aplicou-se o Teste t, Qui-quadrado (X^2), ANOVA de medidas repetidas e modelos de regressão linear múltiplo e o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. **Resultados:** O excessivo ganho de peso gestacional (EGPG) alterou os triglicerídeos (TGs) e colesterol total (CT) maternos, o diâmetro occipito-frontal (DOF) do feto, a circunferência da cabeça, perímetro torácico, peso e a massa gorda neonatais.

A análise de metilação global do DNA materno identificou 46 posições diferencialmente metiladas e 11 regiões diferencialmente metiladas (DMRs). Nove fenótipos humanos foram enriquecidos para essas 11 DMRs localizadas em 13 genes (EMILIN1, HOXA5, CPT1B, CLDN9, ZFP57, BRCA1, POU5F1, ANKRD33, HLA-B, RANBP17, ZMYND11, DIP2C, TMEM232), destacando-se os termos resistência à insulina e hiperglicemia. O DNAm materno foi associado com parâmetros de composição corporal, como: tecido total da coxa e do braço fetais e gordura subcutânea da coxa e do braço fetais, bem como ao percentual de massa gorda e massa gorda neonatais. A metilação do DNA materno também foi associada com os TGs e a insulina de jejum maternos, com circunferência abdominal e circunferência da cabeça fetais (CC) e CC neonatal. As DMRs estudadas foram enriquecidas em 142 processos biológicos, 21 funções moleculares e 17 componentes celulares. Três módulos gênicos diferencialmente metilados foram identificados. Por outro lado, o IMC pré-gestacional sobrepeso/obesidade alterou os percentis do diâmetro biparietal (DBP), o DOF, a CC, a espessura da gordura subcutânea do abdômen (ETSA), tecido total do braço, massa muscular do braço e gordura subcutânea do braço fetais e a CC do neonato. O gene H19DMR foi significativamente menos metilado no sangue materno do grupo com sobrepeso/obesidade em comparação ao grupo com IMC pré-gestacional adequado, para o sangue do cordão umbilical e tecidos placentários, não houve diferença de metilação entre os grupos, bem como não houve diferença de expressão gênica dos genes H19 e IGF2 nos tecidos placentários entre os grupos. Houve associações entre metilação de H19DMR no sangue do cordão umbilical com os percentis do DBP, com a ETSA e a CC neonatais; na decídua com o DOF, a CC e comprimento fetais; no vilo com o DOF, a CC e a ETSA fetais e com a CC neonatal. A expressão do gene H19 na decídua também foi associada ao DBP e ao percentil do comprimento do fêmur fetais; no vilo com o DOF e gordura subcutânea do braço fetais. A expressão do gene IGF2 na decídua foi associada com o DBP fetal e no vilo com o DOF fetal. **Conclusão:** A metilação do DNA foi alterada pelo ganho de peso gestacional e obesidade maternos e se associou com a adiposidade e crescimento fetais. O excessivo GPG alterou o metiloma materno e está envolvido com um fenótipo de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas e metabólicas, a exemplo da diabetes.

Descritores: Obesidade Materna; Ganho de Peso Gestacional; Metilação do DNA; Placenta; Adiposidade Fetal e Neonatal.