

CAROLINE KROLL

EFEITO DAS VARIANTES GENÉTICAS
ADIPOQ-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609
NO ESTADO NUTRICIONAL DE MÃES E SEUS FILHOS: COORTE DE
NASCIMENTOS, SEIS ANOS

JOINVILLE, SC
2020

CAROLINE KROLL

EFEITO DAS VARIANTES GENÉTICAS
ADIPOQ-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609
NO ESTADO NUTRICIONAL DE MÃES E SEUS FILHOS: COORTE DE
NASCIMENTOS, SEIS ANOS

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Marco Fábio Mastroeni.

JOINVILLE, SC
2020

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

K93e Kroll, Caroline
Efeito das variantes genéticas *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609 no estado nutricional de mães e seus filhos: coorte de nascimentos, seis anos / Caroline Kroll; orientador Dr. Marco Fábio Mastroeni. – Joinville: UNIVILLE, 2020.

99 p.: il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Genética. 2. Obesidade em crianças. 3. Obesidade em mulheres. 4. Nutrição – Aspectos genéticos. 5. Hábitos de saúde. I. Mastroeni, Marco Fábio (orient.). II. Título.

CDD 618.92398

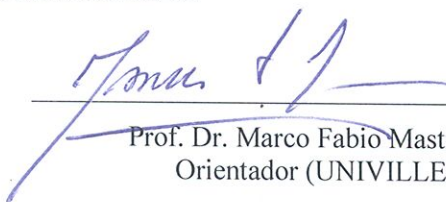
Termo de Aprovação

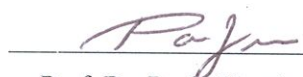
“Efeito das Variantes Genéticas ADIPOQ-rs2241766, LEP-rs7799039 e FTO-rs9939609 no Estado Nutricional de Mães e seus Filhos: Coorte de Nascimentos, Seis Anos”

por

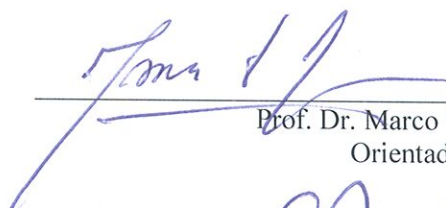
Caroline Kroll

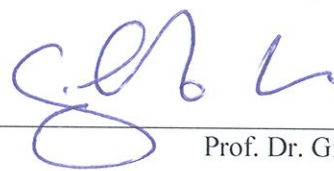
Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

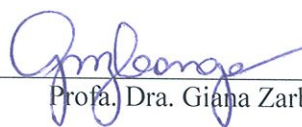

Prof. Dr. Marco Fabio Mastroeni
Orientador (UNIVILLE)

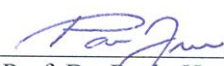

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marco Fabio Mastroeni
Orientador (UNIVILLE)


Prof. Dr. Gilberto Kac
(UFRJ)


Profa. Dra. Giana Zarbato Longo
(UFSC)


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
(UNIVILLE)

Joinville, 12 de dezembro de 2019

Dedico esse trabalho à minha família e ao meu marido que sempre me apoiaram.
Aos professores que tive nesses dezoito anos de estudos ininterruptos, em especial
ao professor Marco, meu orientador desde a graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus anjos que estiveram junto a mim me iluminando e concebendo-me sabedoria e força sempre que precisei.

De forma mais que especial agradeço à minha família. Minha mãe, Matilde, que desde seu ventre me fez ser quem sou, me ensinou a superar as dificuldades e sempre acreditou em mim e no meu potencial. Nunca mediu esforços para me ajudar e me amar da forma mais pura e verdadeira quando mais precisei (obs: tenho certeza que ela nunca entendeu bem o que estudei ao longo desses dez anos longe de casa, mas jamais deixou de me apoiar). Meu pai, Celso, que foi minha base em diversas situações e como minha mãe, acreditou (e muito!) no meu potencial. E meu irmão quase-filho, Filipe, que foi luz na minha vida, trazendo calma.

Agradeço de forma igualmente especial ao meu marido, Celso, que foi um dos presentes mais lindos que a vida me deu. Obrigada por seu companheirismo, por seu amor e por ser minha rocha. Obrigada por sempre me apoiar e dar forças (ou apenas me ouvir quando eu precisava ser ouvida). Obrigada pela família que temos construído (e a Bituca por estar sempre deitadinha aos meus pés enquanto eu incessantemente escrevia essa tese).

Agradeço também ao professor Marco, meu pai na pesquisa, o qual construímos um laço ao longo desses 8 anos de pesquisa. Se hoje estou aqui foi por seus incentivos e por acreditar em mim. Obrigada por me ajudar, ensinar, criticar quando necessário e me fazer uma pesquisadora.

Às amigas que o PREDI me deu. Em especial a Sandra, que assumiu papel de amiga e de mãe. Que me ajudou sempre que precisei, e me deu MUITO amor. Tenho certeza que Deus a pôs no meu caminho para que pudéssemos caminhar juntas nessa vida. E a Lidiane, uma pessoa ímpar, sempre disposta a ajudar e que me acolheu em sua vida também.

Aos demais integrantes PREDI-letos que fizeram a pesquisa acontecer. Que enfrentaram os desafios da pesquisa, mas não desistiram. Sem a ajuda de cada um de vocês esse trabalho não teria existido.

Agradeço a todos os professores que me acompanharam ao longo desses anos de estudos, da Escola Estadual Argemiro Gonçalves (Campo Alegre/SC) à

Universidade Univille. Vocês fizeram chegar onde cheguei. Foram fundamentais na construção do meu saber!

À equipe e aos amigos que fiz no Laboratório de Biologia Molecular da Univille, que nunca mediram esforços para me ajudar.

Aos membros da banca, fica minha admiração por cada um de vocês e pelas pesquisas que desenvolvem. Professor Paulo França, que me acompanha nesses oito anos de pesquisa e sempre esteve disposto a me ajudar quando precisei. E às professoras Patrícia Hinnig e Giana Longo e ao professor Gilberto Kac pela dedicação e disposição de realizarem uma leitura crítica para a construção melhoria deste trabalho.

Agradeço, também, à todas as mães e suas famílias que aceitaram participar do projeto PREDI e nos permitiram acompanhar um momento tão importante e delicado de suas vidas, com o nascimento e acompanhamento do crescimento de seus filhos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem a qual não conseguiria ter feito o doutorado.

Por fim, agradeço aos demais amigos e familiares que sempre me apoiaram ao longo desses anos.

Estou realizando um SONHO e essa realização só foi possível com a contribuição de cada um de vocês. Vocês foram luz e fortaleza, me ajudando com palavras, orações, ações e abraços. Do fundo do meu coração: MUITO OBRIGADA!

“Os obstáculos lapidam nossos poderes”

(@_houhou_)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das variantes dos genes *ADIPOQ* (rs2241766), *LEP* (rs7799039) e *FTO* (rs9939609) no estado nutricional de mães e seus filhos em seis anos de seguimento. Trata-se de um estudo de coorte que faz parte de um estudo maior, "PREDI Study", iniciado em 2012 e envolvendo 435 mães e seus filhos atendidos em uma maternidade pública da região de Joinville, SC. Foram obtidos dados sociodemográficos, econômicos, obstétricos, biológicos e antropométricos em quatro períodos: *Baseline* 2012 na maternidade; 1º seguimento 2013-2014, 2º seguimento 2016-2017 e 3º seguimento 2018, nas residências dos participantes. O estado nutricional das mulheres foi avaliado segundo o índice de massa corporal (IMC). Em neonatos, o estado nutricional foi determinado de acordo com as curvas de crescimento fetal e neonatal da INTERGROWTH-21st. Para as crianças de 1-5 anos e ≥ 6 anos o estado nutricional foi avaliado segundo as respectivas curvas de crescimento de acordo com IMC-para-idade e sexo. O excesso de peso corporal (EPC) materno foi definido como IMC ≥ 25 kg/m², e percentil >90 e percentil ≥ 85 para neonatos e crianças, respectivamente. As genotipagens das variantes *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609 foram determinadas através da técnica de Reação em Cadeira da Polimerase – Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP). Como resultado, os genótipos *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG foram um fator de risco independente para EPC em crianças aos 4-5 anos de idade (OR=2,4; 95%IC 1,09-5,30). Crianças com genótipo *LEP*-rs7799039 GA+AA apresentaram 49% menor chance de nascerem grandes para a idade gestacional (GIG) quando comparadas às crianças com genótipo GG (OR=0,5; 95%IC 0,3-0,8). As análises longitudinais não revelaram efeito significativo das variantes dos genes *ADIPOQ* e *LEP* no estado nutricional de crianças ao longo da coorte. A variante *FTO*-rs9939609 não foi considerada nas análises das crianças por não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mulheres com genótipos *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG foram 6,3kg mais pesadas e apresentaram 2,7kg/m² maior IMC do que as com o genótipo selvagem TT ($p<0,05$) no 3º seguimento. Em análise longitudinal, em mulheres a presença do genótipo *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG levou a um aumento de 1,5 vezes no risco de EPC ao longo dos anos (95%IC 1,2-1,9; $p<0,01$). Mulheres com pelo menos um alelo de risco (A) da variante do gene *FTO*-rs9939609 apresentaram maior peso (3,22-4,24kg) e IMC (1,04-1,30kg/m²) quando comparadas às mães com genótipo TT no período pré-gestacional e até um ano após a gestação ($p<0,05$). Concluindo, o genótipo *LEP*-rs7799039 GG revelou efeito protetor para EPC ao nascimento. Em contrapartida, o genótipo *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG foi um fator de risco para o EPC em crianças aos 4-5 anos de idade. Em mulheres, o genótipo *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG foi associado ao EPC ao longo dos seis anos de seguimento. Mulheres com genótipo TA/AA da variante *FTO*-rs9939609 apresentaram maior peso e IMC em relação ao genótipo TT.

Palavras-chaves: gene *ADIPOQ*, gene *LEP*, gene *FTO*, obesidade, sobrepeso

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of *ADIPOQ* (rs2241766), *LEP* (rs7799039) and *FTO* (rs9939609) gene variants on the weight status of mothers and their children at six years of follow-up. This is a cohort study which is part of a larger one, "PREDI Study", started in 2012 and involving 435 mothers and their children attended at a public maternity hospital in the Joinville region, SC. Sociodemographic, economic, obstetric, biological and anthropometric data were obtained in four time points: Baseline 2012 at the maternity hospital; 1st follow-up 2013-2014, 2nd follow-up 2016-2017 and 3rd follow-up 2018, at participants' homes. Women weight status was assessed according to body mass index (BMI). In neonates, weight status was assessed according to INTERGROWTH-21st fetal and neonatal growth curves. For 1-5 years and ≥ 6 years old children, the weight status was evaluated according to the respective growth curves according to BMI-for-age and sex. Excess boy weight (EBW) in women was defined as BMI ≥ 25 kg/m², and $>90^{\text{th}}$ percentile and $\geq 85^{\text{th}}$ percentile for neonates and children, respectively. The genotyping of the variants *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 and *FTO*-rs9939609 were determined by the Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. As result, the *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG genotypes were an independent risk factor for EBW in children aged 4-5 years (OR=2.4; 95% CI1.09-5.30). Children with *LEP*-rs7799039 GA+AA genotype were 49% less likely to be born large for gestational age (LGA) when compared to children with GG genotype (OR=0.5; 95%CI 0.3-0.8). Longitudinal analyses revealed no significant effect of *ADIPOQ* and *LEP* gene variants on weight status throughout the cohort. The *FTO*-rs9939609 gene variant was not considered in the children's analysis because it is not in Hardy-Weinberg equilibrium. Women carrying *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG genotype were 6.3kg heavier and had 2.7kg/m² higher BMI than those with wild TT genotype ($p<0.05$) at the 3rd follow-up. In longitudinal analysis, the presence of the *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG genotype in women increased 1.5-fold the risk of EBW over the years (95%CI1.2-1.9; $p<0.01$). Women with at least one risk allele (A) of the *FTO*-rs9939609 gene variant had higher weight (3.22-4.24kg) and BMI (1.04-1.30kg/m²) when compared to mothers with TT genotype in the pre-gestational period and up to one year after pregnancy ($p<0.05$). In conclusion, the *LEP*-rs7799039 GG genotype revealed a protective effect for EBW at birth. In contrast, the *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG genotype was a risk factor for EBW in children aged 4-5 years. In women, the *ADIPOQ*-rs2241766 TG+GG genotype was associated with EBW over the six years of follow-up. Women with TA/AA genotype of the *FTO*-rs9939609 variant had higher weight and BMI compared to TT genotype.

Keywords: *ADIPOQ* gene, *LEP* gene, *FTO* gene, obesity, overweight

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etiologia da obesidade.....	10
Figura 2 – Prevalência de EPC no mundo, segundo idade e sexo, 2013.....	22
Figura 3 – Comorbidades e complicações da obesidade infantil.....	24
Figura 4 – Formação de adiponectina e suas ações por meio da AMPK.....	27
Figura 5 – Organização genômica da variante genética <i>ADIPOQ</i> -rs2241766.....	28
Figura 6 – Vias de ação da leptina no hipotálamo – situação de elevada concentração circulante.....	30
Figura 7 – Papel dos neurônios do núcleo arqueado na sinalização da adiposidade pela leptina.....	32
Figura 8 – Mecanismo Janus-cinase-proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (JAK-STAT) da transdução de sinal da leptina no hipotálamo.....	33
Figura 9 – Organização genômica da variante genética <i>LEP</i> -7799039.....	34
Figura 10 – Atividade bioquímica do FTO.....	37
Figura 11 – Organização genômica da variante genética <i>FTO</i> -rs9939609.....	38
Figura 12 – Fluxograma da amostra ao longo dos seguimentos do estudo PREDI.....	43
Figura 13 – Fluxograma das estratégias adotadas para localizar as participantes do estudo.....	51
Figura 14 – Relação dos dados coletados para o presente estudo em cada seguimento da coorte.....	60
Figura 15 – Técnicas adotadas para análise genotípica das variantes dos genes <i>ADIPOQ</i> , <i>LEP</i> e <i>FTO</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH – Hormônio estimulante de alfa-melanócitos/ *α -melanocyte-stimulating hormone*

ADIPOQ – Adiponectina

AgRP – Peptídeo relacionado ao gene agouti

AIG – Adequado para a idade gestacional

AMP – Adenosina monofosfato

AMPK – Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

CC – Circunferência da cintura

CI – *Confidence interval* (ver IC)

CP – Circunferência do pescoço

DP – Desvio padrão

EBW – *Excess body weight* (ver EPC)

EPC – Excesso de peso corporal

FTO – Proteína associada a massa de gordura e obesidade /*Fat mass and obesity-associated*

GIG – Grande para a idade gestacional

GPG – Ganho de peso gestacional

GWAS – Estudo de associação ampla do genoma/*Genome wide-association study*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC – Intervalo de confiança

IMC – Índice de massa corporal

JAK – Janus-cinase

LEP – Leptina

LGA – *Large for gestational age* (ver GIG)

MC4R – Receptor de melanocorina 4

MDV – Maternidade Darcy Vargas

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase/*Polymerase chain reaction*

PIG – Pequeno para a idade gestacional

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

POMC – Pró-opiomelanocortina

PREDI (study) – Preditores do excesso de peso materno e infantil/*PREDIctors of maternal and infant excess body weight*

P-Tyr – Fosfo-tirosina

RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA/ *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RN – Recém-nascido

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único/*Single nucleotide polymorphism*

STAT – Transdutor de sinal e ativador da transcrição/*Signal transducer and activator of transcription*

Tyr – Tirosina

WHO – *World Health Organization* (ver OMS)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Excesso de peso corporal em mulheres e crianças	18
3.1.1 Etiologia do excesso de peso corporal e sua interface interdisciplinar	18
3.1.2 Prevalência de excesso de peso corporal no Brasil e no mundo	20
3.1.3 Fatores de risco associados ao excesso de peso corporal	22
3.2 Genética da obesidade	24
3.2.1 Gene da adiponectina	25
3.2.1.1 Variante rs2241766 do gene <i>ADIPOQ</i>	27
3.2.2 Gene da leptina	29
3.2.2.1 Variante rs7799039 do gene <i>LEP</i>	34
3.2.3 Gene da proteína associada a massa de gordura e obesidade	36
3.2.3.1 Variante rs9939609 do gene <i>FTO</i>	38
4 METODOLOGIA	42
4.1 Delineamento do estudo e coleta dos dados	42
4.2 Análise genotípica	61
4.2.1 Análise da variante rs2241766 do gene <i>ADIPOQ</i>	62
4.2.2 Análise da variante rs7799039 do gene <i>LEP</i>	63
4.2.3 Análise da variante rs9939609 do gene <i>FTO</i>	64
4.3 Processamento dos dados e análise estatística	66
4.4 Aspectos éticos	67

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICES	89
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
Apêndice B – Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	91
Apêndice C – Artigo “Association between <i>FTO</i> gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study”	92
Apêndice D – Artigo “Adiponectin and leptin gene variants and their effects on children’s excess body weight from birth to six years of age: The PREDI Study”	93
Apêndice E – Artigo “Effect of adiponectin and leptin gene variants on excess body weight in women of reproductive age over six years of follow-up: The PREDI Study”	94
Apêndice F – Sintaxe das análises estatísticas realizadas	95
ANEXOS	96
Anexo A – Curvas de crescimento fetal e neonatal INTERGROWTH-21 st para meninos e meninas	97
Anexo B – Curva de crescimento de acordo com o IMC por idade para meninos e para meninas menores de 5 anos	98
Anexo C – Curva de crescimento de acordo com o IMC por idade para meninos e para meninas de 5 a 19 anos	99

1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso corporal - EPC (sobrepeso e obesidade), definido como acúmulo excessivo e anormal de gordura corporal, é considerado uma epidemia de âmbito global, com valores de prevalência quase triplicados nas últimas quatro décadas¹⁻³. Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que mais de 1,9 bilhão de pessoas apresentam EPC, o que corresponde a 39,0% da população mundial³. No Brasil, 56,5% da população está com EPC e, destes, 55,4% são mulheres⁴. Entre as crianças, 42 milhões com idade inferior a cinco anos no mundo estão com EPC^{1,3,5}. No Brasil, o último estudo realizado em 2006 revelou uma prevalência de 7,3%⁶ de EPC.

As consequências do EPC estão associadas principalmente à deficiência funcional e à redução da qualidade de vida, com grandes taxas de morbidade e aumento dos índices de mortalidade devido, principalmente, às comorbidades associadas^{7,8}. Dentre essas comorbidades incluem-se as doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, cânceres, desordens músculo esqueléticas, entre outras^{3,7,9,10}. Em mulheres, os riscos associados ao EPC podem dobrar em comparação aos homens^{11,12}. Em relação às crianças, a obesidade tem sido um dos maiores desafios de saúde pública do século⁵. A criança com EPC possui maiores chances de se tornar um adulto obeso acometido por diversas comorbidades em idade precoce^{3,5,13}.

O EPC é determinado pelo desequilíbrio crônico no balanço energético^{3,14,15}, o qual pode ser regulado por fatores socioeconômicos, culturais, comportamentais, microbiológicos e genéticos^{14,16,17}. A obesidade é considerada, portanto, uma doença complexa e multifatorial que sofre influência ambiental e genética para se manifestar.

Até 70% das diferenças no IMC entre indivíduos são devido às variações genéticas¹⁸⁻²⁰ resultantes de múltiplas interações gênicas e com efeito aditivo de variantes genéticas²¹. Dentre essas variações genéticas destacam-se os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*), os quais são mutações não letais, presentes em mais de 1% na população, e quando um loco possui mais de um alelo funcional²². Entre as variantes genéticas associadas ao EPC destacam-se a rs2241766 do gene da adiponectina (*ADIPOQ*)^{23,24}, a rs7799039 do gene da leptina (*LEP*)^{25,26}, e a rs9939609 do gene da proteína associada a massa de gordura e obesidade (*FTO*, *fat mass and obesity-associated*)^{27,28}. Alguns estudos têm

sugerido que a variante *ADIPOQ*-rs2241766 está associada a alterações nos níveis de adiponectina plasmática, além do aumento de gordura corporal, circunferência da cintura, pressão arterial, colesterol total, aumento do risco de obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2^{23,29-33}. Esse efeito ocorre devido a adiponectina regular diversos processos metabólicos, incluindo homeostase da glicose e metabolismo do ácido graxo³⁴. Assim, uma diminuição da concentração sérica de adiponectina, a qual pode ser causada por uma alteração genética, promove uma redução na fosforilação de proteínas alvo por ação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), uma enzima chave no metabolismo de lipídeos e carboidratos³⁵⁻³⁷. Consequentemente, o metabolismo de vários tecidos é afetado, levando a diminuição do gasto energético e estimulando a fome.

Para a variante *LEP*-rs7799039 os resultados são muito semelhantes. A variante rs7799039 está associada aos níveis séricos de leptina, bem como: peso, estatura, IMC, circunferências da cintura e do quadril, pressão arterial, além do aumento do risco de obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e câncer^{25,26,38-44}. O aumento da concentração dos níveis de leptina age nos neurônios anorexígenos, diminuindo a fome, fornecendo sinais ao hipotálamo, diminuindo o apetite e aumentando o gasto energético^{45,46}. Dessa forma, variantes genéticas no gene da leptina afeta sua expressão, provavelmente a nível transcricional, alterando os níveis de leptina secretados pelo tecido adiposo e consequentemente interferindo no controle da saciedade^{47,48}.

A variante *FTO*-rs9939609, por sua vez, também está associada ao aumento no ganho de peso, IMC, adiposidade corporal, e das chances de sobrepeso e obesidade^{27,49-51}. Esse efeito ocorre devido ao fato de a variante estar associada aos níveis de grelina, um hormônio estimulador da fome⁵². Em um modelo celular, a super expressão do gene *FTO* reduziu os níveis de metilação no RNA mensageiro (RNAm) N⁶-metiladenina da grelina, aumentou os níveis de RNAm de grelina e consequentemente sua concentração circulante⁵². O *FTO* e a grelina parecem atuar de forma intrínseca no controle alimentar.

Estudos genéticos longitudinais são ferramentas importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do EPC. Adicionalmente, a realização de estudos envolvendo fatores genéticos preditores de EPC pode auxiliar na criação de programas e estratégias individualizadas e personalizadas de acordo com o perfil genético de cada pessoa. Quanto mais cedo for a identificação de

potenciais preditores genéticos para o EPC, mais cedo será possível aplicar medidas preventivas e intervenções específicas, tais como dietas adequadas, atividade física e acompanhamento psicológico de forma a evitar o aumento das taxas de sobrepeso e obesidade.

Em crianças, essas estratégias podem iniciar durante o desenvolvimento intrauterino, com intervenções maternas, e prosseguir durante a infância. As mães têm um importante papel na construção de hábitos de vida, visto que, além de cuidarem de sua própria saúde são, em geral, as principais responsáveis pelo cuidado na alimentação e estilo de vida de seus filhos⁵³. Identificar os preditores genéticos em mães e seus filhos e realizar o acompanhamento nutricional ao longo dos anos torna-se uma valiosa ferramenta de prevenção para diminuir o risco do EPC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das variantes dos genes *ADIPOQ* (rs2241766), *LEP* (rs7799039) e *FTO* (rs9939609) no estado nutricional de mães e seus filhos ao longo de seis anos de seguimento.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas das variantes dos genes *ADIPOQ* (rs2241766), *LEP* (rs7799039) e *FTO* (rs9939609) nas mães e seus filhos.
- Avaliar o estado nutricional (IMC) da mãe e da criança (curvas de crescimento neonatal e IMC-para-idade) ao longo dos seguimentos.
- Testar se existe associação entre variáveis ambientais (socioeconômicas, biológicas, obstétricas), antropométricas e genéticas (variantes *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609) da mãe e da criança.
- Estimar os efeitos brutos e ajustados das variantes *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609 da mãe como preditoras do estado nutricional materno ao longo dos seguimentos do estudo.
- Estimar os efeitos brutos e ajustados das variantes *ADIPOQ*-rs2241766, *LEP*-rs7799039 e *FTO*-rs9939609 da criança no estado nutricional infantil ao longo dos seguimentos do estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Excesso de peso corporal em mulheres e crianças

3.1.1 Etiologia do excesso de peso corporal e sua interface interdisciplinar

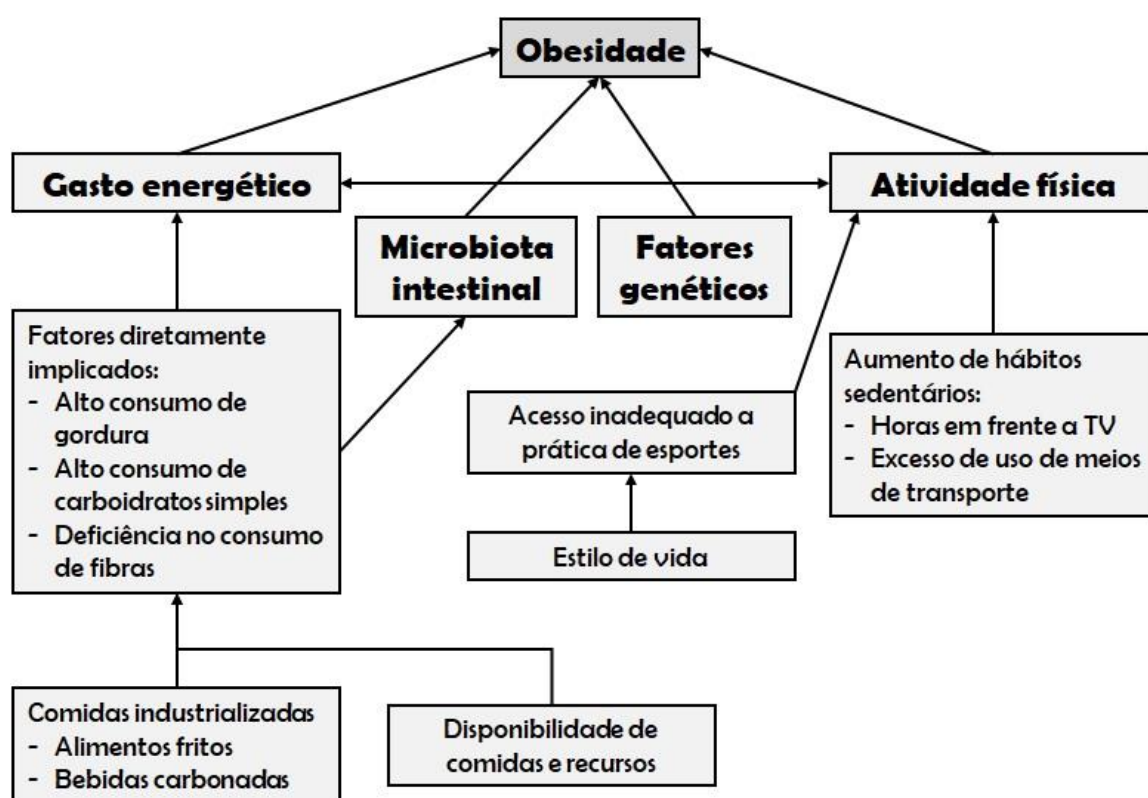
O sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo excessivo e anormal de gordura corporal⁵⁴. O EPC é considerado uma consequência de um desequilíbrio energético crônico, com um balanço energético positivo^{14,15}. Este, por sua vez, é definido pelo aumento do consumo energético – quantidade de calorias consumidas e diminuição do gasto energético, seja ele gasto basal, gasto pela termogênese, ou gasto pela atividade física^{14,15}. Alterações nos mecanismos relacionados à homeostase energética podem ser herdadas ou adquiridas como consequência da exposição ambiental¹⁴.

A etiologia do EPC é complexa e multifatorial, envolvendo interações entre fatores endógenos ou biológicos, como os genéticos, fatores exógenos ou ambientais, incluindo aspectos socioeconômicos, culturais, comportamentais, de estilo de vida, e até mesmo fatores envolvidos na microbiota intestinal^{14,16,17,55-58}. Os fatores exógenos suscitam um ambiente propício ao desenvolvimento da obesidade, denominado “ambiente obesogênico”. Segundo Swinburn *et al.*⁵⁹, o ambiente obesogênico é “a soma das influências que o entorno, as oportunidades ou as condições de vida têm para promover a obesidade em indivíduos ou populações”. O ambiente obesogênico se refere a disponibilidade barata e fácil no consumo de uma dieta altamente calórica e um estilo de vida sedentário, o qual leva a um balanço energético positivo²¹. Os hábitos alimentares podem também contribuir para a expressão de diferentes genes potencialmente associados ao desenvolvimento da obesidade²¹.

Os fatores associados à obesidade, com destaque à genética, ao gasto energético e à atividade física¹⁵, podem ser melhor visualizados na Figura 1. Os fatores genéticos possuem relação intrínseca com o EPC e interagem com os fatores relacionados ao gasto energético e a atividade física¹⁵. Dentre os fatores relacionados ao consumo energético, destacam-se o consumo de altas taxas de gordura, de carboidratos simples e de deficiência no consumo de fibras; consumo influenciado principalmente pela indústria alimentícia e também pela disponibilidade destes alimentos¹⁵. Ainda, associado ao gasto energético, outro fator relevante é a exposição

a alimentos ultra processados, com alta densidade energética e pobres em nutrientes, os quais são geralmente mais baratos e de fácil aquisição⁵. O estilo de vida inadequado atrelado ao acesso limitado à atividade física, bem como aos hábitos sedentários como elevado tempo de tela (televisão, computador, celular, *tablets*), e uso de meios de transporte motorizados também influenciam na redução da atividade física^{5,15}. Valores e normas culturais também influenciam na percepção de saúde, principalmente em crianças e mulheres⁵. Os fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento da obesidade, visto que, no que tange a prevenção, há escassez na promoção ou incentivo à atividade física, ao acesso a opções de alimentos saudáveis, e ações de efeitos culturais e sociais⁶⁰.

Figura 1 - Etiologia da obesidade



Fonte: Adaptado de Jiménez, 2013

Adicionalmente aos fatores genéticos, alimentares e de atividade física, na população feminina adulta existem, ainda, fatores relacionados à história reprodutiva da mulher. Esses fatores são considerados determinantes para seu estado nutricional, e incluem número de gestações, paridade, intervalo interpartal, ganho de peso

gestacional, idade da primeira gestação, esterilidade e menopausa^{2,33,61}. O ganho de peso antes, durante e após o período gestacional não afeta somente a gestação atual, mas também contribui para o desenvolvimento tardio da obesidade nas mulheres^{62,63}. A gestação é um importante fator de vulnerabilidade para algumas mulheres desenvolverem EPC⁶³.

Em crianças, outros preditores para EPC também merecem atenção, destacando: 1) doenças endócrinas 2) anormalidades hipotalâmicas congênitas ou adquiridas; 3) exposições intrauterinas à diabetes gestacional; 4) adiposidade materna; 5) EPC pré-gestacional materno; 6) ganho de peso gestacional excessivo materno; 7) peso ao nascer; 8) aleitamento; 9) rebote de adiposidade (recuperação precoce do IMC no período pós-infância); 10) dieta rica em açúcares; 11) gasto energético reduzido devido aos baixos níveis de atividade física; 12) aumento das horas em frente à televisão e outros eletrônicos; 13) menor duração de sono; 14) infecções microbianas e composição da flora intestinal, entre outros fatores^{56-58,64}.

Outra questão importante a ser considerada refere-se ao risco de obesidade ser passada de geração em geração como resultado de fatores comportamentais e biológicos^{5,53}. As influências comportamentais passam de geração à geração à medida que os filhos herdaram o hábito de vida da família, incluindo a situação socioeconômica, normas e comportamentos culturais, hábitos alimentares e de atividade física⁵. Já os fatores biológicos estão relacionados ao desenvolvimento fetal e da primeira infância, influenciados pela nutrição materna, por ações da microbiota materna-fetal, bem como fatores genéticos e epigenéticos de origem paterna e materna^{5,65}.

Sendo assim, entende-se que a obesidade é uma condição multifatorial que possui base genética, mas necessita também da existência de um ambiente favorável (obesogênico) para se manifestar⁶⁶.

3.1.2 Prevalência de excesso de peso corporal no Brasil e no mundo

A obesidade é considerada uma epidemia de âmbito global, tendo sua prevalência mundial quase triplicada no período de 1975-2016¹⁻³. Estima-se que pelo menos 7671 pessoas morrem por dia como resultado do EPC e obesidade³. Segundo os dados mundiais da OMS, em 2016 mais de 1,9 bilhão (39,0%) de adultos estavam com EPC, nas mesmas proporções entre homens e mulheres (39,0%), e mais de 650

milhões (13,0%) já eram considerados obesos³. Dentre os obesos, 11,0% eram homens e 15,0% era mulheres³. As projeções para 2025 são de 2,5 bilhões de adultos com EPC e 700 milhões obesos. Entre as crianças, esses valores podem chegar a 75 milhões para o EPC³.

No Brasil, segundo a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Ministério da Saúde realizada em 2010, 46,6% dos adultos estavam com EPC, sendo 51,0% entre os homens e 42,3% entre as mulheres⁶⁷. Dados da OMS de 2016 revelam uma prevalência de 56,5% de EPC na população brasileira, sendo que 55,4% do sexo feminino estava acima do peso⁴. De acordo com a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) do Ministério da Saúde de 2018, 55,7% dos brasileiros adultos estavam com EPC e 19,8% eram considerados obesos, com uma prevalência ligeiramente maior entre as mulheres (20,7%)⁶⁸. Na capital do estado de Santa Catarina, Florianópolis, a frequência de EPC em adultos foi de 52,1% e entre as mulheres a prevalência foi de 46,0%⁶⁸. Em Joinville/SC e região, estudos prévios do estudo PREDI indicam uma prevalência de EPC em mulheres de 39 a 62%⁶⁹.

Em relação à crianças e adolescentes, a obesidade está atingindo proporções alarmantes em vários países, mas principalmente em países com baixa ou média renda, como o Brasil, onde vivem 2/3 das crianças com EPC^{1,5}. Mundialmente, aproximadamente 42 milhões (7,0%) de crianças menores de 5 anos de idade estavam com sobrepeso em 2016³. De acordo com a OMS, no Brasil, a prevalência de EPC em crianças menores de 5 anos em 2014 era de 5,0 a 9,9%⁵. Especificamente na região de Joinville/SC, dados do estudo PREDI indicam uma prevalência de 30,6 a 41,3% de EPC em crianças de 2-4 anos de idade^{70,71}.

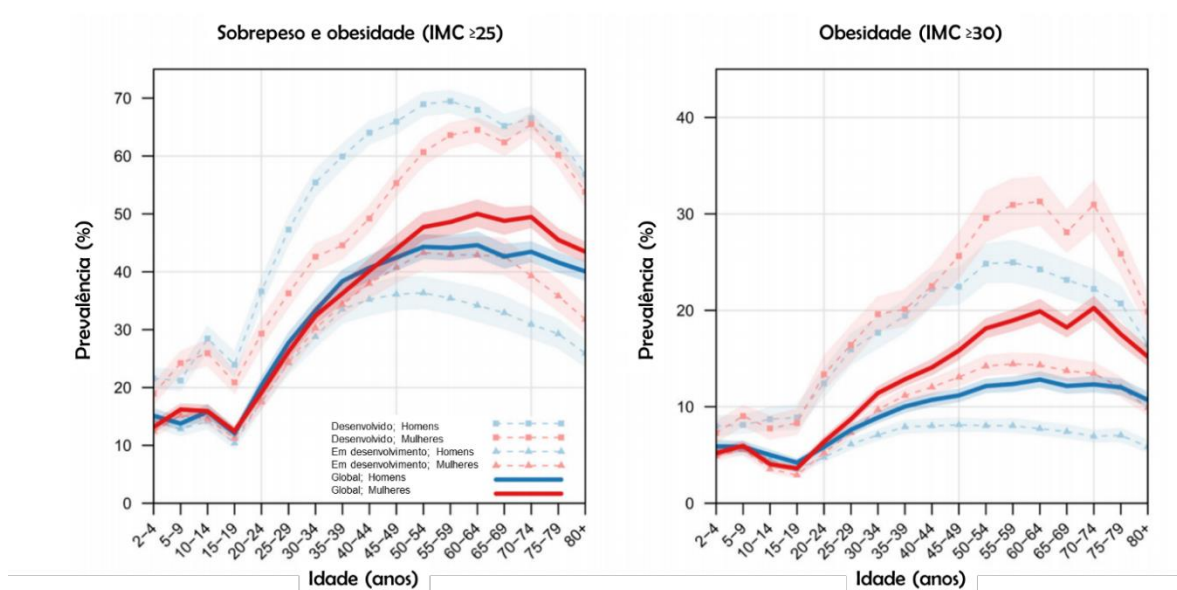
Em crianças e adolescentes de 5-19 anos, 340 milhões estavam com EPC em 2016 no mundo, aumentando de 4,0% em 1975 para mais de 18,0% no ano de 2016³. Aproximadamente 18,0% das meninas e 19,0% dos meninos estavam com EPC em 2016 e 6,0% das meninas e 8,0% dos meninos já eram considerados obesos³. De acordo com uma análise sistemática realizada com estudos de 1980-2013, em países em desenvolvimento como o Brasil, a prevalência de EPC em crianças de 2-19 em 2013 era de 12,9% para meninos e 13,4% para meninas¹.

Especificamente no Brasil, os dados são mais expressivos, 22,1% dos meninos e 24,3% das meninas menores de 20 anos estavam com sobrepeso; e 6,8% dos

meninos e 7,6% das meninas já eram considerados obesos¹. Dados reportados em 2016 pela OMS apresentam valores mais elevados de EPC em crianças brasileiras de 5-19 anos, sendo 29,7% para meninos e 26,3% para meninas, com uma prevalência geral de 28,0%⁷². Em Santa Catarina, alguns estudos demonstram uma prevalência de EPC em crianças variando de 29,7% a 44,0%⁷³⁻⁷⁵.

De maneira geral, a prevalência do EPC aumenta de acordo com a idade, com exceção da fase da adolescência, entre 15-19 anos, e após os 70 anos de idade¹ (Figura 2). Com relação a obesidade, sua prevalência é substancialmente maior em mulheres na idade adulta do que em homens¹ (Figura 2). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as prevalências de EPC e obesidade são maiores para as mulheres em comparação aos homens¹.

Figura 2 – Prevalência de EPC no mundo, segundo idade e sexo, 2013



Fonte: Adaptado de Ng *et al.*¹

3.1.3 Fatores de risco associados ao excesso de peso corporal

A obesidade é uma doença grave, casualmente associada a deficiência funcional e a redução da qualidade de vida, com elevadas taxas de morbidade, e aumento da mortalidade^{7,8}. A obesidade é o maior fator de risco para outras comorbidades e doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares (hipertensão e infarto); diabetes mellitus tipo 2; hipercolesterolemia;

cânceres, incluindo câncer endometrial, de mama, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar, rim e cólon; desordens músculo esqueléticas, especialmente osteoartrite; incapacidade laboral; e apneia do sono^{3,7,9,10,55}. Adicionalmente, a obesidade possui também consequências físicas e psicológicas durante a infância, adolescência, e vida adulta⁵.

Na idade adulta, o EPC afeta tanto homens quanto mulheres. Entretanto, em mulheres, o EPC encontra-se mais fortemente associado a outras doenças, como diabetes tipo 2 e doenças crônicas, podendo dobrar o risco em comparação aos homens^{11,12}. A obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença arterial coronariana no sexo feminino e um importante fator de risco modificável para prevenção de doenças cardiovasculares¹². Em mulheres, a obesidade pode levar a distúrbios endócrinos e reprodutivos, tais como: puberdade antecipada; ciclo menstrual irregular; síndrome do ovário policístico e redução dos efeitos dos métodos contraceptivos hormonais, no entanto, apresenta taxas de fecundidade reduzidas e qualidade de oócitos e embriões alteradas⁷⁶⁻⁷⁹. A obesidade também está associada a diminuição da intenção, iniciação e duração da amamentação bem como ao aumento dos riscos de múltiplos cânceres, como endometrial, cervical, de mama e de ovário⁷⁸. O aumento do risco de hipertensão, síndrome metabólica, resistência insulínica, dislipidemias, inflamação sistêmica, apneia do sono e mortalidade são outros fatores comumente associados a obesidade nas mulheres⁸⁰.

Em crianças, por sua vez, a obesidade se tornou um dos maiores desafios para a saúde pública no século 21. Um grande número de crianças apresenta risco de obesidade mesmo antes do nascimento⁵. A grande preocupação se deve ao fato de a criança com EPC possuir maior propensão a se tornar um adulto obeso³. A obesidade, por si só, é uma causa direta de morbidades na infância, incluindo complicações gastrointestinais, musculoesqueléticas, ortopédicas, apneia do sono e atraso nas funções cognitivas^{5,13}. Na Figura 3 são demonstrados alguns dos fatores de risco associados à obesidade na infância. Alguns estudos têm demonstrado que o peso ao nascer está associado ao aumento do IMC na fase adulta e ao desenvolvimento tardio da obesidade, diabetes, dislipidemias e doenças cardiovasculares⁸¹⁻⁸⁴. Entretanto, a obesidade infantil ainda parece ser subestimada como um problema de saúde pública, uma vez que em algumas culturas e regiões do mundo uma criança com EPC é frequentemente considerada como saudável⁵.

Figura 3 – Comorbidades e complicações da obesidade infantil

Endócrinas a) Metabolismo da glicose - Resistência à insulina - Pré-diabetes - Diabetes melitus tipo 2 - Síndrome metabólica b) Questões relacionadas ao crescimento e puberdade - Hiperandrogenismo/Síndrome do ovário policístico - Menarca antecipada - Início tardio da puberdade - Pseudo-micropênis - Redução da circulação andrógena - Mal funcionamento da tireóide	Gastrointestinais - Doença hepática gordurosa não alcohólica - Esteatose hepática - Colestase/colelitose
	Ortopédicas - Deformidade no ângulo dos ossos do fêmur e tíbia (coxa vara e tíbia vara) - Deslocamento da cabeça do fêmur (epifisiólise) - Fraturas - Doença degenerativa da articulação do quadril (Síndrome de Legg-Calvé-Perthes)
Cardiovasculares - Hipertensão - Dislipidemias - Doença cardíaca coronária - Outros riscos cardiovasculares	Dermatológicas - Manchas escuras e aveludadas nas dobras da pele (Acanthose Nigricans) - Frieira (intertrigo) - Furunculose
Pulmonares - Asma - Apneia obstrutiva do sono - Síndrome da hipoventilação por obesidade	Neurológicas - Hipertensão intracraniana idiopática
Psicossociais - Baixa auto-estima - Depressão	

Fonte: Adaptado de Gungor ⁵⁶

3.2 Genética da obesidade

A obesidade é uma doença complexa, determinada por fatores genéticos bem como pelo ambiente obesogênico^{85,86}. Em geral, 40 a 70% da diferença de IMC é atribuída a variação genética interindividual¹⁸⁻²⁰. Estudos com gêmeos têm revelado que 60 a 90% da variação do IMC na população é influenciada por efeitos genéticos⁸⁷. Diversos genes têm sido investigados por possuírem evidências biológicas, fisiológicas e farmacológicas no envolvimento das vias centrais e periféricas que

controlam o consumo e gasto energético⁸⁸. O T-HOD (*Text-mined Hypertension, Obesity, and Diabetes candidate genes database*), um banco de dados de genes candidatos à hipertensão, obesidade e diabetes baseados na literatura científica, revelou 1077 genes associados à obesidade⁸⁹.

A contribuição genética para a obesidade difere-se dos padrões de herança mendelianos tradicionais (herança monogênica), sendo a herança poligênica a mais comum (95%), por ser o resultado de múltiplas interações gênicas para a manifestação do fenótipo²¹. Na herança poligênica, cada gene associado a obesidade possui pequena contribuição para este desfecho^{14,90}. Mesmo assim, a variação herdada através de um conjunto de *loci* desempenha um papel importante na determinação do estado nutricional do indivíduo e como o mesmo é influenciado por fatores ambientais, tais como dieta e atividade física^{14,90}.

A maioria dos estudos relacionados a variações genéticas e obesidade é realizada com análises de SNPs pelo estudo de genes candidatos e mais recentemente pelos estudos amplos de associação ao genoma (GWAS, *genome-wide association studies*)^{14,21}. Os SNPs, também denominados variantes genéticas pontuais, são alterações genéticas derivados de mutações não letais, no qual um *loco* possui mais de um alelo funcional, estando presentes na população com uma frequência de no mínimo 1%²². Parte dessas variantes genéticas gera alteração na funcionalidade de genes, afetando a estrutura da proteína ou alterando a localização, quantidade ou tempo em que a proteína é produzida⁹⁰. Entre as variantes associadas ao EPC destacam-se os polimorfismos do gene da adiponectina (*ADIPOQ*)^{23,24}, do gene da leptina (*LEP*)^{25,26} e do gene do *fat mass and obesity-associated* (*FTO*)^{27,28}.

3.2.1 Gene da adiponectina

O gene da adiponectina, também conhecido como *ADIPOQ*, *ACDC*, *ADPN*, *APM1*, *APM-1*, *GBP28*, *ACRP30*, *ADIPQTL1*, está localizado no cromossomo 3 na região 3q27^{35,91,92}.

A adiponectina é uma adipocitocina reconhecida por ser a proteína mais abundante secretada pelos adipócitos^{37,93-96}. Com função hormonal, a adiponectina é composta por 224 aminoácidos e peso de 30 kDa que circula em altas concentrações (5-30 $\mu\text{g/mL}$) no plasma, sendo induzida durante o processo de adipogênese e envolvida em processos metabólicos e hormonais^{35,91,92,97}. Descoberta em meados de

1990 por Scherer *et al.*⁹⁸, a adiponectina participa da homeostase energética, através do catabolismo de carboidratos e lipídeos, e configura-se como uma molécula de sinalização para o tecido adiposo, sendo afetada pela obesidade⁹⁷⁻⁹⁹. Estudos posteriores ao de Scherer *et al.*⁹⁸ reforçaram ainda a existência de associação da adiponectina com a oxidação de ácidos graxos e sensibilidade à insulina^{35,96}. A adiponectina possui efeitos antidiabéticos, anti-inflamatórios, anti-aterogênicos e cardioprotetivos^{37,93,94}.

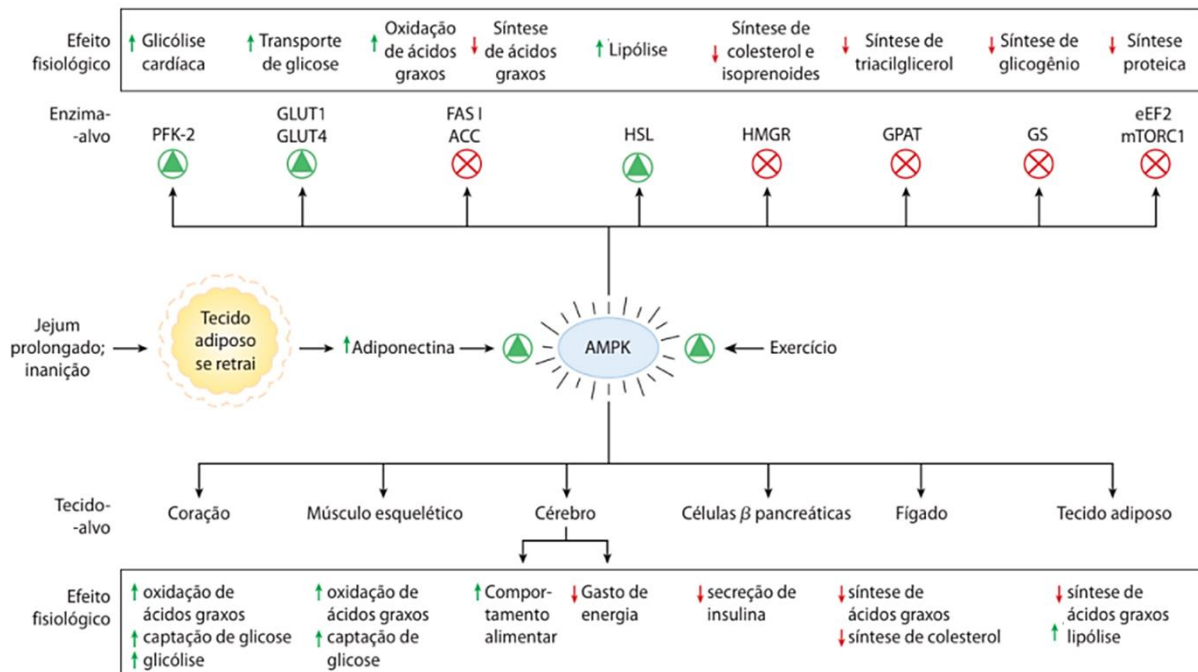
Diferentemente das demais adipocitocinas, a adiponectina possui correlação inversa com o IMC, seus níveis plasmáticos circulantes estão diminuídos em indivíduos obesos^{35,100,101}. O efeito contrário também parece ser verdadeiro: baixos níveis séricos de adiponectina podem levar ao aumento do risco de obesidade, acúmulo de gordura visceral, resistência insulínica, diabetes, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares¹⁰²⁻¹⁰⁹. Alguns estudos mostraram que mutações no gene *ADIPOQ* levam à hipoadiponectinemia^{91,97,98}, e à alterações do peso corporal, da circunferência da cintura, do colesterol total e da pressão arterial^{110,111}. Dentre essas mutações, a variante rs2241766 parece influenciar na expressão de adiponectina¹¹².

Os efeitos fisiológicos da adiponectina são indiretos e não claramente elucidados. Entretanto, a AMPK parece estar intimamente relacionada à adiponectina, controlando seus efeitos¹¹³. Na Figura 4 é possível observar os tecidos e enzimas-alvos e o efeito fisiológico da adiponectina no organismo pela ação da AMPK:

- a) O jejum prolongado resulta na diminuição das reservas de triacilgliceróis no tecido adiposo, desencadeando dessa forma a produção e liberação da adiponectina pelos adipócitos¹¹³.
- b) A adiponectina plasmática em níveis elevados liga-se aos seus receptores de membrana plasmática em vários órgãos e tipo celulares, fazendo com que os processos de gasto de energia sejam diminuídos e os processos de geração de energia sejam estimulados¹¹³.
- c) Dessa forma, a adiponectina ativa a AMPK, que por sua vez fosforila proteínas-alvos críticas para o metabolismo de lipídeos e carboidratos e altera o metabolismo de vários tecidos, distanciando-os dos processos que consomem energia, como a síntese do glicogênio, de ácidos graxos e de colesterol¹¹³.

- d) A adiponectina altera o metabolismo nos tecidos extra-hepáticos para o uso de ácidos graxos como energia (oxidação de ácidos graxos), aumento da glicólise e desencadeia a gliconeogênese no fígado¹¹³.

Figura 4 – Mecanismo de ação da adiponectina através da AMPK



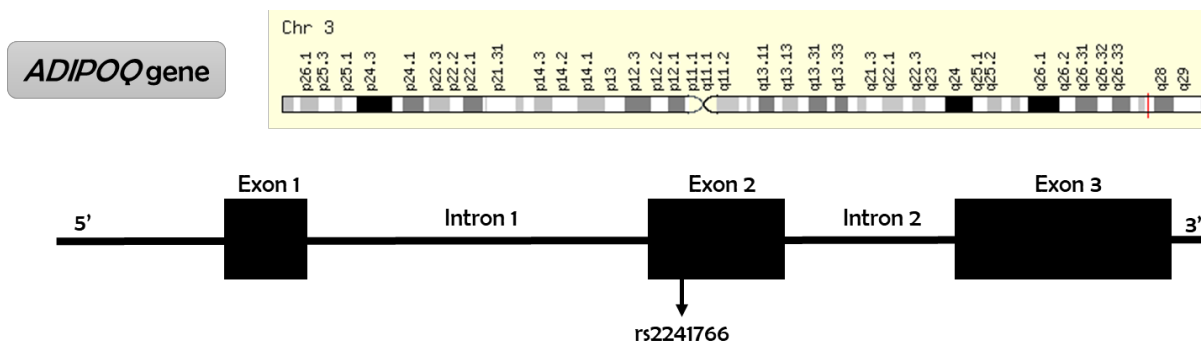
Fonte: Adaptado Nelson and Cox ¹¹³

Portanto, a hipoadiponectinemia proveniente da ação de variantes genéticas no gene *ADIPOQ* determina uma ação inversa, com diminuição da ação da AMPK e consequentemente aumento da síntese de ácidos graxos, de triacilgliceróis, colesterol e glicogênio. Essas mudanças têm efeito sobre o metabolismo energético ocasionando alterações do peso corporal¹¹⁴.

3.2.1.1 Variante rs2241766 do gene *ADIPOQ*

A variante rs2241766, conhecida também por SNP +45T>G, representa a transversão do nucleotídeo Timina (T) pelo nucleotídeo Guanina (G) na posição 45 do éxon 2 do gene codificante da adiponectina (Figura 5), levando a uma mutação silenciosa *GGT*→*GGG*, Gly→Gly, a qual impacta nos níveis séricos da proteína^{112,115,116}. A prevalência do alelo G é de aproximadamente 15,0% para a população de modo geral, sem distinção de raça¹¹⁷.

Figura 5 – Organização genômica da variante genética *ADIPOQ*-rs2241766



Fonte: Adaptado de Gene Cards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADIPOQ>) e Kroll ¹¹⁸.

Em um estudo de revisão sistemática, o genótipo GG da variante rs2241766 foi associado ao aumento do risco de obesidade em 1,39 vezes em relação ao genótipo TT²³. No entanto, o mesmo estudo mostrou que após análise por sub grupo de diferentes populações, o efeito do genótipo no risco de obesidade mostrou-se efetivo somente na população chinesa²³. Outra meta-análise realizada com a população chinesa revelou que o alelo G da variante rs2241766 está associado ao risco de síndrome metabólica³². Chineses portadores do alelo G possuem menores concentrações plasmáticas de adiponectina, maiores chances de apresentarem: diabetes tipo 2, altos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica, lipoproteínas de baixa densidade, e colesterol total; diminuição da sensibilidade à insulina e aumento da resistência insulínica²⁹. Em outro estudo com uma população mexicana-mestiça, os autores verificaram associação entre o alelo G e o risco de acúmulo de gordura corporal em indivíduos obesos, entretanto sem afetar os níveis plasmáticos de adiponectina¹¹⁹.

Na população iraniana e egípcia, o genótipo GG+TG foi associado ao aumento do risco de diabetes tipo 2 em 157,0% e 548,0%, respectivamente^{30,120}, e com diminuição dos níveis séricos de adiponectina na população egípcia¹²⁰, quando comparados com os portadores do genótipo TT. Em europeus, o alelo G da variante rs2241766 foi associado a obesidade, a menores níveis de adiponectina e sensibilidade à insulina, e aumento das concentrações de colesterol total e colesterol-LDL ^{104,110,121}. Outros autores demonstram haver associação entre o alelo T e baixas concentrações de HDL-c¹²², e o genótipo TT e maiores níveis de colesterol total e maior circunferência da cintura³¹; resultados opostos aos descritos anteriormente.

3.2.2 Gene da leptina

O gene da leptina, também conhecido por *LEP*, *OB*, *OBS* ou *LEPD*, está localizado no cromossomo 7 na região 7q31.3¹²³, e codifica o hormônio da leptina, uma proteína composta por 167 aminoácidos, com peso molecular de 16 kDa¹²⁴.

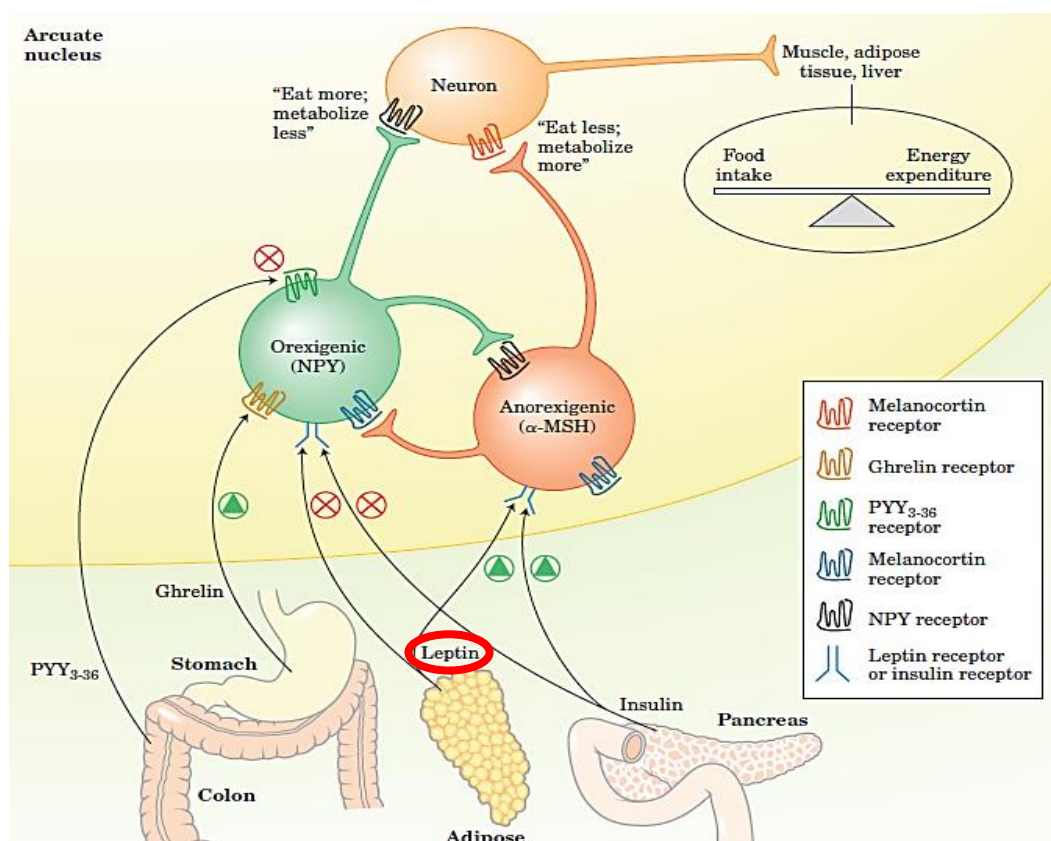
A leptina é sintetizada principalmente pelos adipócitos do tecido adiposo branco, e em menores quantidades por outras células^{125,126}. A maior predominância de RNAm de leptina ocorre no tecido adiposo branco, sendo encontrados também, no tecido adiposo marrom e tecidos periféricos, incluindo coração, placenta, estômago, glândulas mamárias, glândulas salivares, ovários e em alguns órgãos fetais (coração, osso/cartilagem, cérebro)^{126,127}. Os maiores níveis de expressão de RNAm da leptina são encontrados no tecido adiposo subcutâneo, especificamente em adipócitos subcutâneos, em comparação ao tecido adiposo visceral¹²⁸⁻¹³¹. Em geral, as mulheres possuem níveis mais elevados de leptina, podendo apresentar um aumento de 40% dos níveis quando comparadas aos homens¹²⁸⁻¹³². Essa diferença entre os sexos está relacionada as diferenças na distribuição de tecido adiposo, bem como as diferenças hormonais^{129,132}. Além disso, a expressão de RNAm da leptina no tecido adiposo aumenta durante a infância, atingindo a capacidade máxima na idade adulta¹³⁰.

Tanto a expressão da leptina como seus níveis séricos estão correlacionados a gordura corporal e ao tamanho do adipócito¹³³, o que identifica a quantidade de gordura corporal como o principal determinante para os níveis circulantes deste hormônio¹³⁴. A leptina está proporcionalmente relacionada à adiposidade corporal¹³⁵, e encontra-se usualmente elevada em indivíduos obesos e positivamente correlacionada com IMC, percentual de gordura corporal e quantidade de gordura corporal^{124,125,136-138}. Devido ao tamanho aumentado das células adiposas em indivíduos obesos, os níveis de leptina e sua excreção é até sete vezes maior ao de indivíduos eutróficos^{139,140}. Alguns autores sugerem que a leptina possui função endócrina e que seu mecanismo de ação está relacionado a manutenção do controle homeostático da massa do tecido adiposo através da atividade dos circuitos neuronais com efeitos sobre o consumo alimentar, gasto energético e metabolismo^{141,142}.

A leptina é considerada o hormônio da saciedade, agindo em neurônios anorexigênicos (inibidores do apetite), fornecendo sinais ao hipotálamo e consequentemente, levando à diminuição do apetite e ao aumento de gasto energético^{45,113,124,141}. Após ser produzida, a leptina é secretada na corrente

sanguínea e transportada até o cérebro^{46,134}. O aumento dos níveis sanguíneos de leptina age através de duas vias em seus receptores específicos no hipotálamo, especificamente no núcleo arqueado (Figuras 6 e 7):

Figura 6 – Vias de ação da leptina no hipotálamo – situação de elevada concentração circulante

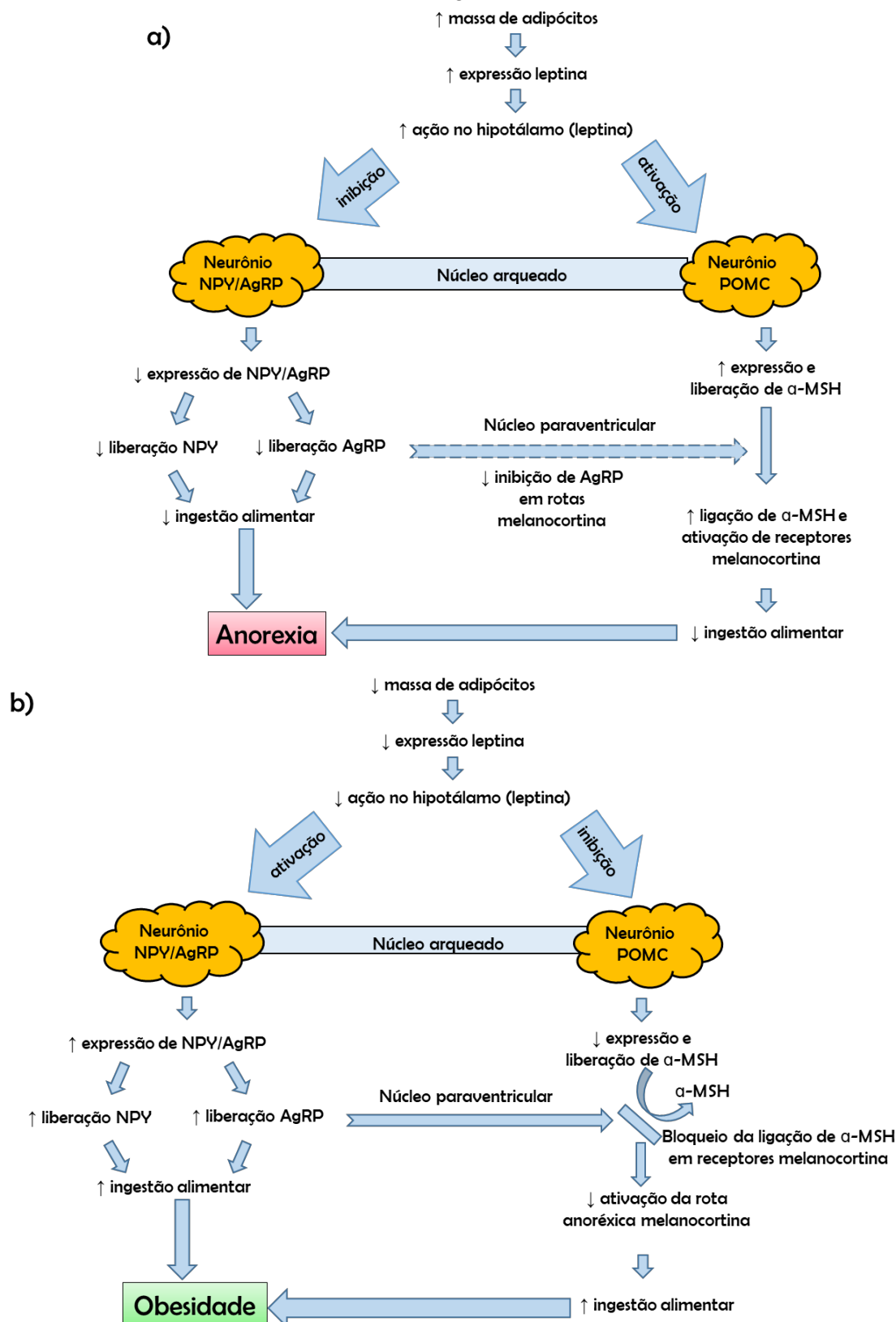


Fonte: Nelson and Cox ¹⁴³

- Inibindo o efeito dos neurônios orexigênicos (estimuladores de apetite) e, portanto, impedindo a secreção de seus estimuladores neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP), levando a diminuição do apetite e aumento da termogênese pela ativação do sistema nervoso simpático;
- Estimulando os neurônios anorexigênicos, como o pró-opiomelanocortina (POMC), provocando a síntese e liberação do inibidor alpha-melanócito estimulante/melanocortina (*alpha-melanocyte-stimulating hormone*, α -MSH), o qual inibe o consumo alimentar e aumenta o gasto energético^{45,46,113,124,141,144}.

No entanto, a queda nos níveis de leptina plasmática estimula os neurônios orexigênicos NPY e AgRP, levando ao aumento do apetite e diminuindo o metabolismo energético basal¹⁴⁵.

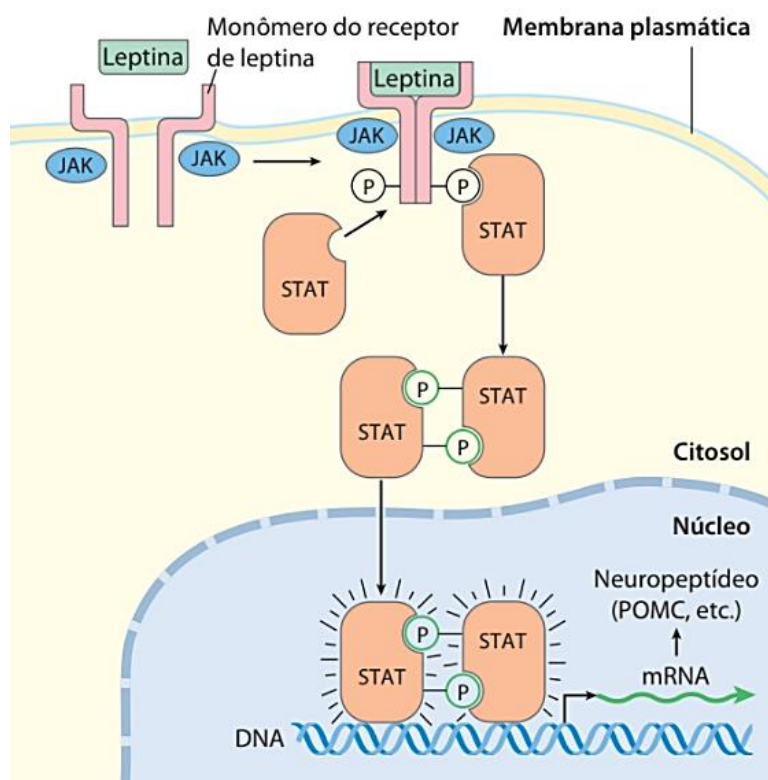
Figura 7 – Papel dos neurônios do núcleo arqueado na sinalização da adiposidade pela leptina. a) O aumento da ação da leptina no núcleo arqueado inibe a via anabólica NPY/AgRP e estimula a via catabólica POMC, resultando na redução do consumo energético e anorexia. b) Via de sinalização na deficiência de leptina, onde ocorre bloqueio de receptores melanocortina e aumento do consumo energético, levando a obesidade



Fonte: Adaptado de Schwartz *et al.* ¹⁴⁵

O mecanismo de ação da leptina está apresentado na Figura 8. A ligação da leptina induz a dimerização do seu receptor, seguida da fosforilação de resíduos específicos de tirosina (Tyr) do receptor, catalisada pela enzima Janus-cinase (JAK), resultando em um resíduo de P-Tyr em seu domínio intracelular^{113,146}. Os resíduos de P-Tyr tornam-se locais de ancoragem para proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT)^{113,146}. As STAT dimerizam-se e são translocadas para o núcleo celular, onde ligam-se a regiões reguladoras específicas no DNA e estimulam a transcrição de genes-alvo, incluindo o gene POMC, precursor da α -MSH (responsável pela inibição do consumo alimentar e aumento do gasto energético)^{113,146}. Além disso, a leptina tem uma ação direta na regulação do metabolismo do tecido adiposo através da inibição da lipogênese e estimulação da lipólise^{147,148}.

Figura 8 – Mecanismo Janus-cinase-proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (JAK-STAT) da transdução de sinal da leptina no hipotálamo



Fonte: Nelson and Cox ¹¹³

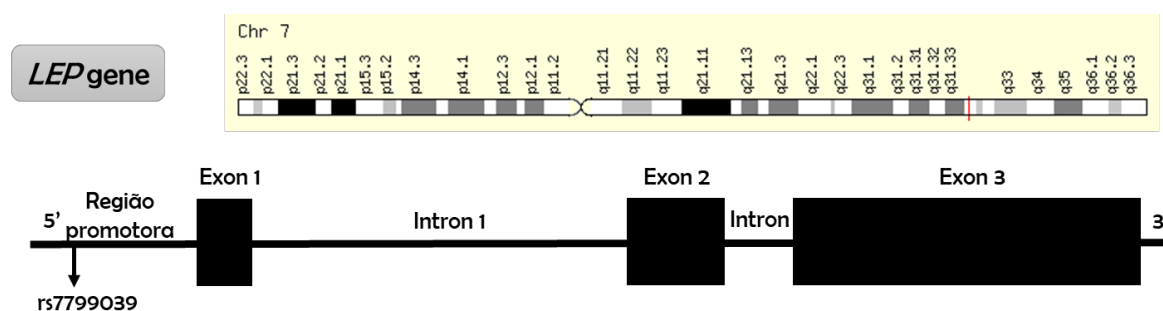
Apesar de alguns indivíduos, sobretudo os obesos, apresentarem elevados níveis de leptina endógena, seu efeito parece não ter eficácia, devido a resistência à

leptina^{45,133,142}. A resistência à leptina é definida como uma incapacidade de a leptina entrar no fluido cerebrospinal e alcançar as regiões hipotalâmicas responsáveis por regular o apetite^{45,133,142}. Baixos níveis de leptina também podem ser considerados uma alteração não benéfica considerando o EPC. A deficiência de leptina, causada por mutações genéticas, não somente aumenta o consumo alimentar, como também ativa respostas biológicas que reduzem o gasto energético, sustentando e mantendo o tecido adiposo¹⁴². Em pessoas sem a mutação, essa resposta é ativada somente após o jejum com queda dos níveis plasmáticos de leptina¹⁴². Uma dessas mutações no gene *LEP* é a variante rs7799039^{25,38}. Em adultos com deficiência de leptina, a terapia com reposição diária de leptina humana recombinante reduz o consumo energético em 84,0% reduzindo os escores de fome sem mudança na saciedade¹⁴⁹.

3.2.2.1 Variante rs7799039 do gene *LEP*

A variante rs7799039, também designada como *LEP* G-2548A, encontra-se na região promotora 5' do gene, e consiste na substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleotídeo -2548 do sítio de iniciação ATG^{26,39}, possuindo 40,0% de prevalência para o alelo A na população¹⁵⁰ (Figura 9).

Figura 9 – Organização genômica da variante genética *LEP*-7799039



Fonte: Adaptado de Gene Cards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEP&keywords=lep>) e Kroll¹¹⁸

Essa mutação na região promotora do gene da leptina afeta a expressão gênica, provavelmente a nível transcricional, e a secreção das taxas de leptina do tecido adiposo^{41,47}. Alguns estudos têm revelado que a variação na sequência do gene pode alterar os níveis circulantes deste hormônio e consequentemente levar a um

distúrbio no controle da saciedade^{41,47}. Entretanto, os resultados referentes a variante rs7799039 são ainda controversos em relação ao alelo de risco.

Presença do alelo G como fator de risco para o excesso de peso corporal

Alguns autores sugerem que o alelo A e o genótipo AA estão associados ao aumento dos níveis de leptina e de RNAm, podendo apresentar 50,0% maiores níveis de leptina e 60,0% a mais de RNAm quando comparadas aos genótipos GA/GG⁴⁷. Outros estudos demonstram, ainda, que o alelo G e o genótipo GG estão associados a menores níveis de leptina e são mais frequentes em indivíduos com EPC^{25,38} e obesidade extrema^{42,44}. Indivíduos com EPC são mais sensíveis ao ganho de peso devido à baixa sinalização de leptina no sistema nervoso central⁴⁷. A associação do alelo G com o risco de obesidade foi reportada em europeus³⁸, aborígenes taiwaneses, brasileiros²⁵, caucasianos⁴², afro-americanos e paquistaneses⁴³. Em recém-nascidos brasileiros, o genótipo GG está associado ao estado nutricional, levando a um aumento de duas vezes as chances da criança nascer grande para idade gestacional quando comparadas aos genótipos GA+AA¹⁵².

Alguns autores sugerem que o alelo G está associado a maiores níveis de leptina e aumento do IMC^{25,43}. Mulheres portando o alelo G possuem maiores níveis de leptina e de IMC, apresentando quatro vezes maior risco de obesidade quando comparadas às portadoras do alelo A²⁵. Em crianças e adolescentes o alelo G é mais prevalente em obesos e está associado ao aumento do IMC, circunferência de cintura e do quadril, pressão arterial sistólica e diastólica, maiores níveis de leptina e fibrinogênio quando comparadas a portadores do genótipo AA⁴³.

Presença do alelo A como fator de risco para o excesso de peso corporal

Ainda que alguns autores tenham demonstrado que o alelo A apresenta risco para excesso de peso corporal, outros sugerem que o genótipo AA está associado ao risco de obesidade, sendo o genótipo AA mais frequente em indivíduos obesos^{26,153,154}. Um estudo de coorte recrutado com paquistaneses demonstrou haver maior prevalência do alelo A no grupo de obesos, além da sua associação com peso, estatura, IMC, circunferência da cintura, e menores níveis de leptina e de HDL-c⁴¹. Em indianos, o genótipo AA foi associado ao aumento do risco de obesidade em até

84,0%¹⁵³. O genótipo AA também foi associado ao aumento do risco de síndrome metabólica e obesidade em tunisianos, sendo que indivíduos portadores dos genótipos AG e AA possuem respectivamente 1,81 e 3,4 vezes maior chance de serem obesos, quando comparados a portadores do genótipo GG²⁶. Apesar dos genótipos AA+AG também estarem associados ao aumento do IMC em pacientes turcos, há também aumento dos níveis de leptina¹⁵⁴. Além da sua associação com o estado nutricional, o genótipo AA é um fator de risco independente para a diabetes tipo 2 em mulheres, e o alelo A também demonstrou estar associado ao aumento do risco de câncer, principalmente de próstata e de mama em caucasianos³⁹. Um estudo realizado com gestantes brasileiras revelou que o alelo A foi associado ao aumento do risco de ganho de peso gestacional excessivo, entretanto sem efeitos sobre o IMC pré-gestacional e sobre a concentração de leptina durante a gestação¹⁵⁵. Ainda em brasileiras, gestantes portadoras do alelo A apresentaram maior consumo energético e de gorduras, e tiveram maiores concentrações de triglicerídeos durante a gestação, quando comparadas a portadoras dos genótipos AG ou GG¹⁵⁶.

A razão para a divergência nos resultados em relação aos alelos ainda não foi claramente elucidada, mas deve-se provavelmente às diferenças de idade, sexo, etnia, gordura corporal, métodos de avaliação do estado nutricional, tamanho amostral, diferença nos critérios de seleção da amostra, bem como a interação de gene-ambiente e do gene com outras variantes e receptores do gene da leptina^{47,152}.

3.2.3 Gene da proteína associada a massa de gordura e obesidade

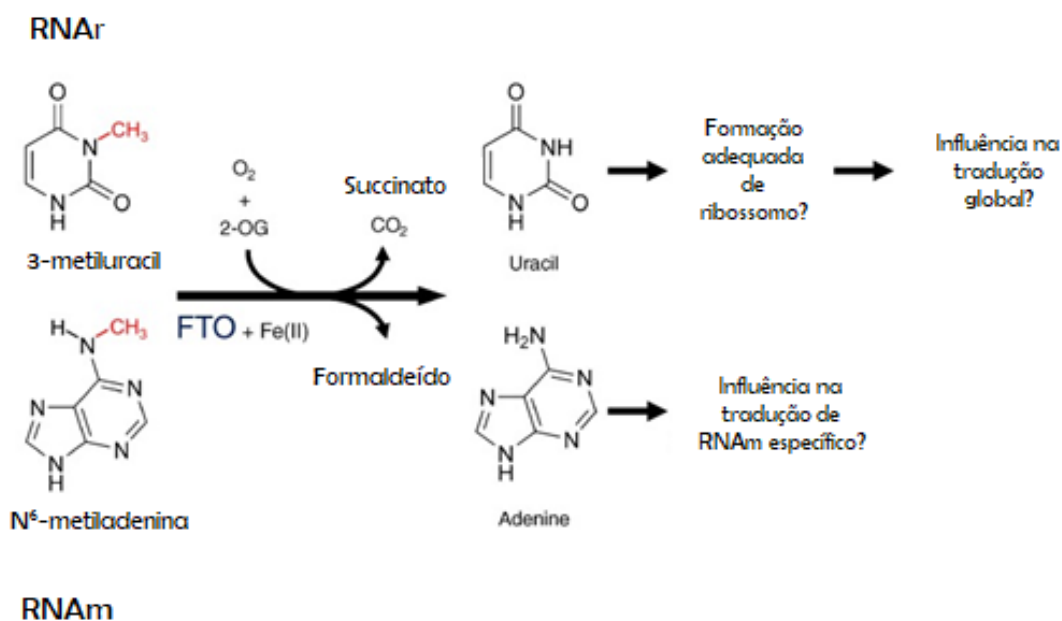
O gene *FTO* localiza-se no cromossomo 16 na região 16q12.2¹⁵⁷ e produz uma proteína de 505 aminoácidos e peso molecular de 58 kDa^{158,159}. O *FTO* codifica a enzima 2-oxoglutarato ácido nucleico-dependente desmetilase, cuja função é remover grupos metil do DNA e/ou, principalmente, do RNA^{160,161}. A proteína FTO catalisa a desmetilação do 3-metiluracil e da N⁶-metiladenina na presença de ferro (Fe) e 2-oxoglutarato (2-OG), liberando assim succinato, formaldeído e dióxido de carbono, e formando uracil e adenina (Figura 10)¹⁶². O 3-metiluracil e o N⁶-metiladenina são amplamente encontrados em RNA ribossômico e RNAm, respectivamente¹⁶².

O gene *FTO* é expresso em diversos tecidos corporais, especialmente na região hipotalâmica, responsável por controlar a ingestão alimentar; especificamente nos núcleos arqueados, paraventricular, dorsomedial e ventromedial^{159,163,164}, regiões

que englobam genes-chave como NPY, AgRP, POMC e receptor de melanocortina 4 (MC4R)¹⁶⁴. Há, ainda, correlação positiva entre os níveis de RNAm de *FTO* no tecido adiposo subcutâneo e o IMC^{165,166}, com um maior nível de RNAm em tecido adiposo de indivíduos obesos¹⁶⁷.

O *FTO* foi o primeiro gene de susceptibilidade à obesidade identificado por análise ampla do genoma (GWAS, *Genome Wide Association*)^{27,168}, e possui o *locus* com maior efeito sobre IMC e risco de obesidade^{169,170} com 15 grupos de variantes identificadas¹⁷¹, dentre elas a rs9939609²⁷. Alguns estudos sugerem que o gene *FTO* está associado ao risco de obesidade da infância à idade adulta^{27,172-175}.

Figura 10 – Atividade bioquímica do FTO. Em ensaio *in vitro*, o FTO é capaz de catalisar a desmetilação dependente de Fe (II) e 2-OG do 3-metiluracil e N⁶-metiladenina em uma fita única de DNA e RNA para uracila e timina, respectivamente. O 3-metiluracil encontra-se amplamente no RNAr, enquanto que o N⁶-metiladenina é encontrada no RNAm, assim as consequências da desmetilação podem estar associadas na formação adequada de ribossomos, bem como possuir influência na tradução de proteínas.



Fonte: Adaptado de Gulati and Yeo¹⁶²

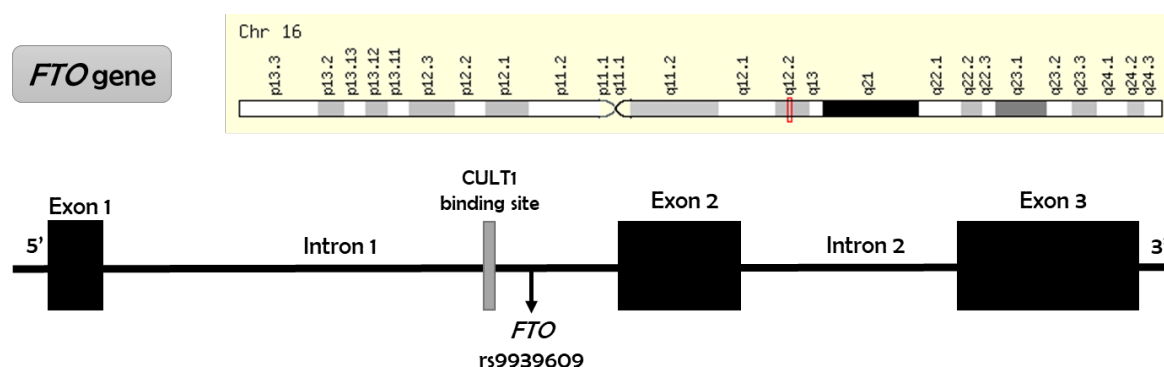
O gene *FTO* pode influenciar a homeostase energética através de um efeito direto no consumo alimentar^{164,170}. Além de estar associado ao aumento do consumo energético^{173,176,177}, o gene *FTO* também está relacionado ao aumento do consumo dietético de gorduras ou proteínas¹⁷⁸, aumento do apetite e diminuição da saciedade^{179,180}, escolha por alimentos ricos em calorias¹⁸¹, e a perda do controle

alimentar¹⁸². Entretanto, o mecanismo exato responsável pelo efeito do *FTO* na obesidade ainda não está completamente elucidado.

3.2.3.1 Variante rs9939609 do gene *FTO*

A primeira variante estudada em relação ao gene *FTO* foi a rs9939609, a qual situa-se no primeiro *intron* do gene¹⁸³ e apresenta os alelos T ou A, sendo que o alelo A apresenta uma prevalência de 34,0% na população¹⁸⁴ (Figura 11).

Figura 11 – Organização genômica da variante genética *FTO*-rs9939609



Fonte: Adaptado de Gene Cards (<http://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=FTO&keywords=fto>) e Kroll ¹¹⁸.

Associação da variante genética *FTO*-rs9939609 e estado nutricional

O trabalho pioneiro de GWAS realizado em 2007 por Frayling *et al.* ²⁷ demonstrou haver uma relação entre a variante rs9939609 e o risco de obesidade. Aproximadamente 16,0% dos indivíduos homozigotos para o alelo de risco A apresentaram 3Kg a mais e 1,67 maior chance de serem obesos em relação aos portadores do alelo T²⁷. Meta-análises realizadas com estudos de crianças, adolescentes¹⁸⁶ e adultos⁵⁰ demonstraram haver um aumento do risco de obesidade em 1,39 e 1,31 chances/alelo, respectivamente. A presença do alelo A revelou possuir efeito na adiposidade corporal de descendentes europeus, com uma estimativa de aumento de 0,28-0,39 Kg/m² ^{49,51}. Em populações asiáticas o alelo A contribuiu para o aumento do risco de obesidade em 1,25 chances/alelo e para sobrepeso em 1,13 chances/alelo, com um aumento do IMC em 0,26 Kg/m² por alelo¹⁸⁷. Em crianças chinesas de 10-12 anos o alelo de risco A foi associado a maiores médias de IMC¹⁸⁸.

O primeiro estudo investigando o efeito da variante rs9939609 no estado nutricional em brasileiros foi realizado por Ramos *et al.*¹⁸⁹. O alelo A foi associado ao IMC na população multiétnica, sendo que os indivíduos homozigotos para o alelo A pesaram 3,1 Kg a mais que os portadores do genótipo TT¹⁸⁹. Outros estudos com a população brasileira também revelaram um efeito do alelo A no aumento dos valores de IMC estando significativamente associada a obesidade e percentual de gordura corporal em crianças¹⁹⁰ e em adultos¹⁹¹. É importante salientar que o efeito do gene varia em relação à diferença étnica da população estudada¹⁶⁰.

Associação da variante genética *FTO*-rs9939609 e outros parâmetros de avaliação da saúde

Além do seu efeito sobre o IMC, a variante rs9939609 foi associada ao risco de diabetes tipo 2, insuficiência cardíaca, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral isquêmico, hipertensão arterial, dislipidemia, síndrome metabólica e mortalidade¹⁹². A variante rs9939609 também foi associada ao aumento de diversos parâmetros, como: dos níveis de glicose e insulina em jejum; níveis de glicose pelo TOTG-2h; HbA1c; pressão arterial; níveis de triglicerídeos, colesterol total e frações; enzimas hepáticas; e marcadores inflamatórios¹⁹². Grande parte dessas associações são mediadas pelo efeito do *FTO* no IMC¹⁹². Outros estudos reforçam a relação entre os genótipos com pelo menos um alelo A e o risco de hiperglicemia, apresentando também menores níveis de leptina^{193,194} e maiores níveis de adiponectina plasmáticas¹⁹⁴.

Crianças e adolescentes com pelo menos um alelo A têm risco aumentado para o desenvolvimento da obesidade e apresentam valores superiores de IMC, circunferências da cintura e do quadril, pressão arterial sistólica e diastólica¹⁹⁵. Portadores do genótipo TA ou AA apresentam ainda elevadas concentrações de triglicerídeos, glicemia em jejum, colesterol de baixa densidade, e menores índices de colesterol de alta densidade, quando comparados com indivíduos que apresentam o genótipo TT¹⁹⁵.

Variante genética *FTO*-rs9939609, preferência alimentar e consumo energético

Alguns autores têm sugerido que o risco de EPC dependente da variante do gene *FTO* está intimamente relacionado ao alto consumo energético nos indivíduos portadores do alelo A em adultos e crianças^{173,176,183,196}. Indivíduos portando o genótipo AA ingerem até 1231 kJ (294 kcal) a mais quando comparados aos indivíduos portando o genótipo TT/TA¹⁷⁶. A preferência por alimentos ricos em gordura e proteína, e o baixo consumo de alimentos ricos em fibras parecem ser as principais escolhas dos indivíduos portadores do alelo de risco A^{183,196,197}.

Sonestedt *et al.*¹⁹⁸ demonstraram que o impacto dos genótipos TA e AA pode depender dos níveis de gordura consumidos, sendo que para indivíduos com alto consumo de gorduras o IMC foi 1,0 kg/m² maior em pessoas com genótipo AA. O hábito de consumir mais gordura pode ser um efeito causado pela diminuição da resposta à saciedade¹⁹⁸. Crianças portando pelo menos um alelo de risco A possuem menor controle alimentar e preferem alimentos mais gordurosos¹⁸², e em indivíduos homozigotos os índices de sensibilidade à saciedade estão reduzidos¹⁷⁹. Em adultos, o genótipo TA/AA também foi associado à diminuição da saciedade pós-prandial após o consumo de uma refeição¹⁹⁹.

Via de ação da variante genética *FTO*-rs9939609 sobre o consumo energético

Uma das explicações para a influência da diminuição da saciedade foi descrita por Karra *et al.*⁵². De acordo com os autores, os portadores do alelo de risco A exibem supressão pós-prandial atenuada dos níveis de fome e de acil-grelina, comparados com homozigotos TT⁵². A grelina é um hormônio orexigênico, também conhecido como hormônio da fome, e responsável pelo aumento da ingestão de alimentos e preferência por alimentos ricos em gordura⁵². Além dos portadores do alelo de risco apresentarem maiores níveis de grelina no sangue, também apresentam respostas neuronais diferentes nas regiões cerebrais responsáveis por regular o apetite, o processamento de recompensas, incentivo e motivação⁵². Em modelo celular, a super expressão do *FTO* reduziu os níveis de metilação no RNAm N⁶-metiladenina da grelina, aumentando desta forma a concentração de RNAm de grelina e os níveis de peptídeos⁵². Acredita-se que o *FTO* regula a grelina e, portanto, seja um mediador chave no controle alimentar. Speakman¹⁸³ sugere que o impacto da variante no

consumo alimentar parece estar relacionado à saciedade pós-prandial e ao aumento da fome, provavelmente relacionado aos níveis pós-prandiais de leptina e grelina. Adicionalmente, a variante rs9939609 possui ação na lipólise de células adiposas, uma importante explicação do porquê o gene estar envolvido no ganho de peso corporal¹⁶⁶.

Mudanças no estilo de vida, envolvendo dieta e atividade física, podem acentuar ou atenuar a predisposição genética para a obesidade^{160,198,200-202}. O efeito do *FTO* no IMC e no risco de obesidade é 27,0% menor em indivíduos fisicamente ativos quando comparado a indivíduos sedentários²⁰³. Adicionalmente, um estudo recente revelou que a amamentação exclusiva na infância, durante cinco meses ou mais, age antagonizando o efeito do alelo de risco da variante aos 15 anos de idade²⁰⁴.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo e coleta dos dados

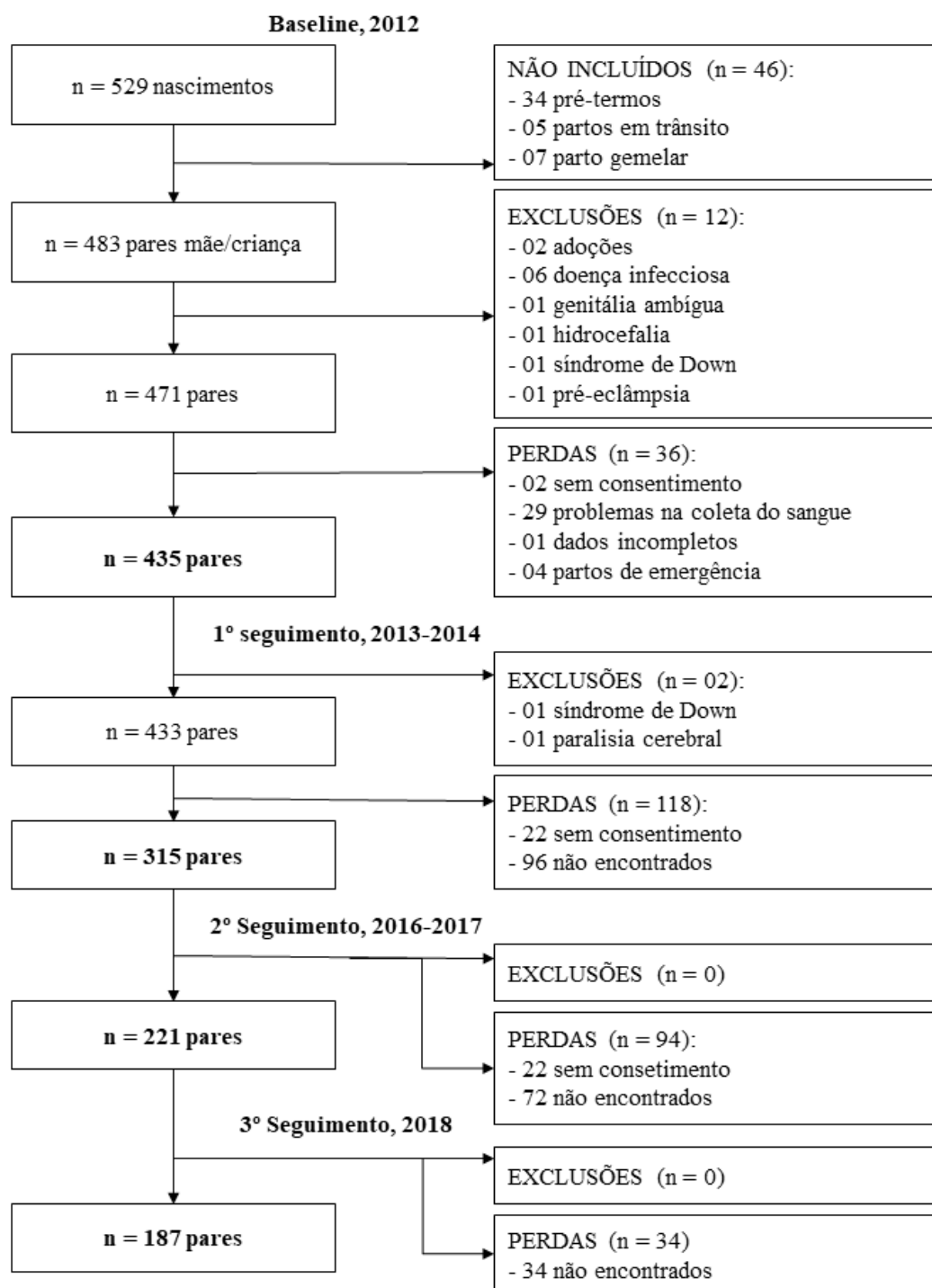
Trata-se de um estudo de coorte, prospectivo, que utilizou dados de um estudo maior denominado “*PREDIctors of maternal and infant excess body weight - PREDI Study*”. O estudo PREDI teve início em 2012 e investigou 435 mães e seus filhos atendidos na Maternidade pública Darcy Vargas (MDV), localizada em Joinville/SC. A MDV atende mensalmente cerca de 600 pacientes da cidade e região. O objetivo do estudo PREDI é avaliar os principais determinantes do EPC da mãe e da criança ao longo dos anos e, até o momento, compreendeu 4 períodos de coleta (*baseline*, 2012; 1º seguimento 2013-2014, 2º seguimento 2016-2017, 3º seguimento 2018). Na Figura 12 está apresentado o fluxograma da amostra ao longo dos seguimentos da coorte. Detalhes do processo encontram-se descritos em alguns trabalhos previamente publicados^{57,58,71,152,205-207}.

A cada período de coleta de dados, uma equipe de pesquisadores envolvendo profissionais e alunos das áreas de nutrição, fisioterapia, ciências biológicas, educação física, enfermagem, psicologia e medicina realizou um pré-teste com os instrumentos e equipamentos utilizados nas coletas de dados. Os mesmos equipamentos foram utilizados em todos os períodos de coleta, sendo devidamente calibrados a cada novo seguimento. O treinamento possibilitou maior homogeneidade na obtenção das informações e uniformização na aferição das medidas antropométricas. As informações do pré-teste não compuseram o banco de dados da pesquisa.

Critérios de inclusão e exclusão do estudo PREDI

Na primeira coleta de dados (*baseline*), realizada em 2012, participaram todas as parturientes internadas na MDV durante o período de 14 de janeiro a 16 de fevereiro de 2012 e que preencheram os critérios de inclusão: recém-nascidos vivos, de parto não gemelar, puérperas com idade ≥ 18 anos e idade gestacional a termo (37-42 semanas).

Figura 12 – Fluxograma da amostra ao longo dos seguimentos do estudo PREDI



Fonte: Estudo PREDI

Foram excluídas as mulheres com pré-eclâmpsia ou doenças infectocontagiosas descritas no prontuário (síndrome da imunodeficiência humana-HIV, hepatite, sífilis e toxoplasmose) e os recém-nascidos com algum tipo de anomalia pondero-estatural ou que foram encaminhados à adoção imediatamente após o nascimento. Após as exclusões, 435 pares de mães e recém-nascidos compuseram a amostra do estudo PREDI.

Cálculo amostral do estudo PREDI

O cálculo amostral do estudo PREDI utilizou como parâmetro a prevalência de nascimento de recém-nascidos macrossômicos. A partir de uma prevalência de 6% de macrossomia, com intervalo de confiança de 95%, uma precisão absoluta de 2,5% e considerando uma população anual de 7200 recém-nascidos, o tamanho amostral foi estimado em 331 indivíduos. Assumindo uma perda de 20%, foram necessários pelo menos 397 para compor a amostra. O cálculo amostral foi realizado no programa OpenEpi versão 3.02.

4.1.1 Coleta de dados no *baseline*, 2012

Coleta de dados

A coleta dos dados das mães foi realizada ainda na maternidade até 48 horas após o parto. Cada parturiente foi contatada individualmente pela equipe de pesquisa, a qual esclareceu os objetivos, riscos e benefícios do estudo, e quando houve concordância, a parturiente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A) em duas vias. A coleta de dados transcorreu com: 1) aplicação do formulário específico; 2) coleta das medidas antropométricas maternas; e 3) realização da busca pelos dados da parturiente no prontuário eletrônico e do recém-nascido no registro de nascimentos do berçário.

O formulário específico envolveu dados de identificação e características socioeconômicas, obstétricas e antropométricas tanto maternas quanto do neonato.

a) Dados de identificação e características socioeconômicas

Os dados de identificação da mãe, bem como as características socioeconômicas e demográficas utilizadas para este estudo, compreenderam: nome completo, data de nascimento, CPF, endereço, telefone, idade, estado civil, anos de estudo, renda familiar em salários mínimos, e tabagismo antes da gestação. Os dados de identificação e socioeconômicos foram baseados na metodologia aplicada no Censo 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística²⁰⁸:

- *Nome*: nome completo da participante.
- *Data de nascimento*: dia, mês e ano do nascimento da participante.
- *CPF*: número do Cadastro de Pessoa Física da participante.
- *Endereço*: endereço completo, incluindo rua, número da casa/apartamento, bairro e cidade.
- *Telefone*: telefone completo da participante, e se possível, telefone completo do acompanhante ou de alguém da família ou próximo.
- *Idade*: idade completa, em anos, no dia da internação na maternidade. A idade foi posteriormente categorizada em: < 20, ≥ 20 a < 30 e ≥ 30 anos.
- *Estado civil*: foi solicitada a natureza do estado civil atual, dividindo-se em duas categorias de resposta:
 - *solteira/separada/viúva*: para a pessoa que vive sem a companhia de cônjuge;
 - *casada ou vivendo em união consensual*: para a pessoa que vivia em companhia de cônjuge.
- *Escolaridade*: a variável anos de estudo foi obtida a partir do relato do número de anos de estudo realizados pela mãe, e posteriormente categorizada em: < 9 anos de estudo; ≥ 9 a < 12 anos de estudo; ≥ 12 anos de estudo.

- *Renda familiar*: renda familiar mensal obtida em número de salários mínimos, registrado como sendo R\$ 622,00 em 2012, equivalente a US\$ 305,60 na época. As categorias utilizadas no estudo foram:
 - *< 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia até R\$1.865,99
 - *≥ 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia três ou mais salários mínimos e portanto, apresentava renda superior a R\$ 1.866,00.
- *Tabagismo antes da gestação*: relato do uso de tabaco/fumo antes da gestação (fumou/não fumou).

b) Características obstétricas

As características obstétricas analisadas para esse estudo, foram: paridade, presença de diabetes diagnosticada, intervalo interpartal, via de parto e idade gestacional em semanas.

- *Paridade*: número de filhos contando com o filho nascido em 2012, e sendo categorizada posteriormente em: 1 filho, 2 filhos, 3 ou mais filhos.
- *Presença de diabetes*: presença de qualquer tipo de diabetes com diagnóstico médico e sendo relatada como: sim (apresenta diabetes) ou não (ausência de diabetes).
- *Intervalo interpartal*: intervalo interpartal relatado em meses, desde o nascimento do último filho. A variável foi categorizada em: intervalo < 48 meses e intervalo ≥ 48 meses.
- *Via de parto*: tipo de parto do filho nascido em 2012, sendo considerado como: parto normal ou parto cesárea.

- *Idade gestacional*: idade gestacional, em semanas, considerando a data da última menstruação e o dia do parto do filho nascido em 2012.

c) Características antropométricas

Para as medidas antropométricas das mães foram coletadas as variáveis estatura até 48h pós-parto, peso pré-gestacional relatado e peso imediatamente antes do parto. Em relação aos recém-nascidos foram coletadas informações sobre peso e comprimento, e realizada a classificação do recém-nascido de acordo com o estado nutricional.

- *Estatuta materna*: para a mensuração da estatura utilizou-se um estadiômetro portátil da marca Cardiomed® (Biogênese, Brasil) com capacidade para até 220 cm e divisão de 0,1 cm. A estatura foi aferida até 48 horas pós-parto e seguiu as técnicas de Gordon *et al.* ²⁰⁹. A participante foi posicionada logo abaixo do estadiômetro, distribuindo seu peso de forma equilibrada em ambos os pés e mantendo olhar fixo para frente. Neste momento, a participante manteve a linha da visão perpendicular ao corpo (plano de Frankfurt). Os braços permaneceram relaxados ao lado do tronco, com as palmas das mãos voltadas para o mesmo. Os calcanhares foram dispostos paralelamente e juntos. A parte móvel do estadiômetro foi, então, direcionada até a parte superior da cabeça, efetuando-se pressão suficiente para comprimir o cabelo e registrar a medida. Foram efetuadas duas medições e considerou-se a média entre ambas como medida final.
- *Peso materno pré-gestacional*: o peso pré-gestacional, em kg, foi obtido a partir do relato da participante.
- *Peso materno*: o peso materno imediatamente antes do parto, em kg, foi coletado no momento da internação na MDV, efetuado pela triagem e anotado no prontuário.
- *IMC pré-gestacional*: para cálculo do IMC pré-gestacional considerou-se o peso pré-gestacional relatado pela parturiente e a estatura aferida até 48

horas pós-parto. O IMC pré-gestacional foi calculado dividindo-se o peso (kg) pela estatura (m) ao quadrado, e foi utilizado para classificar o estado nutricional das participantes de acordo com a OMS⁵⁴ (Quadro 1) em:

1. *baixo peso*: $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$,
2. *eutrofia*: $IMC \geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 24,9 \text{ kg/m}^2$,
3. *sobrepeso*: $IMC \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 29,9 \text{ kg/m}^2$,
4. *obesidade*: $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$

Quadro 1 – Classificação do estado nutricional segundo IMC para adultos.

Classificação	IMC (kg/m^2)	Risco de comorbidades
Baixo do peso	$< 18,50$	Baixo
Magreza severa	$< 16,00$	
Magreza moderada	16,00-16,99	
Magreza leve	17,00-18,49	
Peso normal	18,50-24,99	Médio
Excesso de peso corporal	$\geq 25,00$	Aumentado
Pré-obeso/sobrepeso	25,00-29,99	
Obesidade	$\geq 30,00$	Moderado Severo Muito severo
Obesidade grau I	30,00-34,99	
Obesidade grau II	35,00-39,99	
Obesidade grau III	$\geq 40,00$	

Fonte: Adaptado de WHO, 2000

- *Ganho de peso gestacional*: o ganho de peso gestacional foi calculado subtraindo-se o peso obtido no momento da internação na maternidade pelo peso pré-gestacional auto-relatado. Os valores do ganho de peso gestacional foram avaliados segundo o *Institute of Medicine*³³, com base no IMC pré-gestacional. Mulheres com baixo peso devem ganhar entre 12,5 e 18 kg; mulheres com IMC adequado entre 11,5 e 16,0 kg, mulheres com sobrepeso entre 7,0 e 11,5 kg e mulheres com obesidade entre 5,0 e 9,0 kg (Quadro 2). O ganho de peso gestacional foi classificado em:

- *ganho de peso gestacional excessivo*: quando a gestante acumulou peso superior ao recomendado pelo Institute of Medicine ³³.
- *ganho de peso gestacional não excessivo*: quando o ganho de peso gestacional acumulado foi adequado em relação aos valores recomendados.

Quadro 2 – Ganho de peso gestacional segundo o IMC pré-gestacional.

IMC pré-gestacional	Ganho de peso recomendado total na gestação
Baixo do peso – < 18,50 kg/m ²	12,5 a 18,0 kg
Peso normal – 18,50-24,99 kg/m ²	11,5 a 16,0 kg
Sobrepeso – 25,00-29,99 kg/m ²	7,0 a 11,5 kg
Obesidade – ≥ 30,00 kg/m ²	5,0 a 9,0 kg

Fonte: Adaptado de *Institute of Medicine*, 2009.

- *Peso do recém-nascido*: o peso do RN foi aferido em balança eletrônica da marca Urano® (Brasil), modelo UBB 20/2, com capacidade de até 20 kg e divisão de 2 g. O peso do recém-nascido foi obtido do Livro de Registros do Berçário, localizado na triagem dos recém-nascidos na MDV.
- *Comprimento do recém-nascido*: Para a mensuração do comprimento utilizou-se um estadiômetro infantil portátil tipo régua da marca Cardiomed® (Biogênese, Brasil) com capacidade para até 220 cm e divisão de 0,1 cm. O comprimento do recém-nascido também foi coletado do Livro de Registros do Berçário.
- *Estado nutricional do recém-nascido*: o estado nutricional foi avaliado de acordo com as curvas de crescimento fetal e neonatal definidas pela INTERGROWTH-21st 210 (Anexo A), as quais levam em consideração o peso (kg), a idade gestacional (semanas) e o sexo da criança (feminino ou masculino). Dessa forma, o recém-nascido foi classificado em²¹¹:
 - *pequeno para a idade gestacional (PIG)*: quando o recém-nascido apresentou percentil < 10;

- *adequado para a idade gestacional (AIG)*: quando o recém-nascido apresentou percentil ≥ 10 e ≤ 90 ;
- *grande para a idade gestacional (GIG)*: quando o recém-nascido apresentou percentil > 90 .

4.1.2 Coleta de dados do primeiro seguimento, 2013-2014

O primeiro seguimento foi realizado no período de março de 2013 a março de 2014 através de visita domiciliar. Todas as mães e crianças que participaram da primeira coleta de dados do estudo (*baseline*, 2012) foram convidadas a participar do primeiro seguimento. Crianças com alguma anormalidade que interferisse nas avaliações antropométricas foram excluídas do estudo no primeiro seguimento. Dos 435 pares mãe-crianças que participaram do *baseline*, 314 pares permaneceram no estudo (Figura 12).

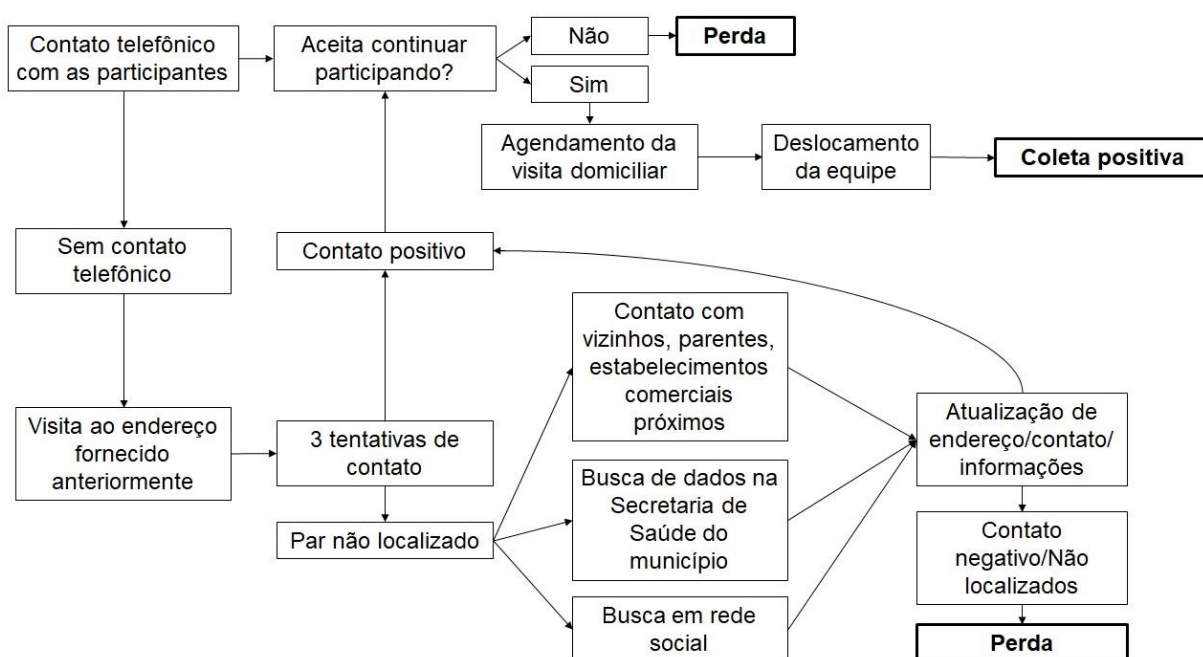
Localização das famílias e agendamento das visitas

Para o contato com as mães, utilizaram-se diversas abordagens, conforme descrito na Figura 13:

1. *Contato telefônico*, conforme cadastrado no início do projeto maior;
2. *Deslocamento até a residência*, mesmo sem contato telefônico;
3. *Contato com os vizinhos, parentes, amigos e estabelecimentos comerciais próximos da residência*;
4. *Outros retornos à residência* para tentar localizar a mãe;
5. *Contato com a Secretaria de Saúde* do Município de Joinville e região (Garuva, Itapoá, Araquari, Guaramirim, São João do Itaperiú, São Francisco do Sul, Balneário Barra do Sul e Campo Alegre) para atualizar o endereço da mãe;
6. *Contato com as agentes de saúde* nas Unidades Básicas de Saúde dos bairros;
7. Contato na rede social *Facebook*.

Considerou-se como perda: a) quando não foi possível o contato com a família em nenhum dos meios descritos anteriormente; b) quando realizadas três ou mais visitas e os participantes não foram encontrados; e c) quando houve desistência da mãe/criança em continuar no estudo.

Figura 13 – Fluxograma das estratégias adotadas para localizar o par mãe-criança do estudo



Fonte: Da autora.

Coleta de dados

Nos casos em que a visita foi realizada, um grupo de pesquisadores dirigiu-se até a residência e fez o primeiro contato com a mãe lembrando os objetivos e os procedimentos do estudo. Quando houve o aceite, foi solicitada a mãe informações sobre ela e a criança, seguido da aferição das medidas antropométricas. Seguindo os protocolos de treinamento, a equipe de pesquisadores procurou gerar o mínimo de desconforto possível para a família durante a coleta de dados.

As variáveis coletadas da mãe durante o 1º seguimento e utilizadas neste estudo incluíram dados de identificação, socioeconômicos, obstétricos e antropométricos.

a) Dados de identificação e características socioeconômicas

As variáveis de identificação e características socioeconômicas utilizadas nesse estudo incluíram: atualização de endereço e telefone, idade, estado civil, anos de estudo, renda familiar, tabagismo, e a variável idade da criança. Com exceção da renda familiar, todas as outras variáveis foram classificadas conforme o *baseline*.

- *Renda familiar*: renda familiar mensal obtida em de salários mínimos, registrado como sendo R\$ 724,00 em 2014, equivalente a US\$ 306,00. As categorias utilizadas no estudo foram:
 - *< 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia até R\$ 2.171,99.
 - *≥ 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia três ou mais salários mínimos e, portanto, apresentava renda superior a R\$ 2.172,00.

b) Características obstétricas

As características obstétricas do primeiro seguimento utilizadas neste estudo foram: paridade (categorizada conforme *baseline* e considerando o número de filhos até o dia da visita), tempo de aleitamento e tipo de aleitamento.

- *Tempo de aleitamento*: período em meses, em que a criança foi alimentada exclusivamente pelo leite materno. Amamentação exclusiva definida como lactente que foi alimentado exclusivamente com leite humano, diretamente do peito ou ordenhado, e não recebeu nenhum outro líquido ou sólido, com exceção de vitaminas, suplementos minerais ou medicamentos²¹².

c) Características antropométricas

Para as medidas antropométricas das mães foram coletadas as variáveis circunferência da cintura, circunferência do pescoço, estatura e peso, e calculada a

variável IMC para avaliar o estado nutricional. Em relação às crianças foram coletadas informações sobre circunferência do pescoço, peso e comprimento e avaliado o estado nutricional.

- *Circunferência da cintura materna*: para a aferição da circunferência da cintura utilizou-se fita métrica inextensível da marca Cardiomed® (Biogênese, Brasil), com capacidade para até 150 cm e precisão de 0,1 cm e seguindo-se as técnicas propostas pela OMS²¹³. Para a tomada da medida, a fita métrica foi posicionada entre o ponto médio da última costela e a crista ilíaca com a participante em pé, ereta, com abdômen relaxado, de braços estendidos ao longo do corpo, as pernas paralelas e com a roupa afastada na região da cintura que foi aferida^{213,214}. Foram efetuadas duas aferições e utilizada a média de ambas.
- *Circunferência do pescoço em mães e crianças*: a medida foi realizada utilizando-se fita métrica inextensível da marca Cardiomed® (Biogênese, Brasil), com capacidade para até 150 cm e precisão de 0,1 cm e adotando-se as técnicas propostas por Lohman *et al.* ²¹⁵. A aferição foi realizada com a mãe em pé e a criança em plano horizontal no colo da mãe, com a cabeça posicionada no plano horizontal de Frankfurt. O pesquisador posicionou então a fita ao redor do pescoço palpando-se o pescoço para localizar a cartilagem cricóide, exercendo pressão mínima no momento da tomada da medida para melhor contato da fita com a pele²¹⁵. Foram efetuadas duas aferições e utilizada a média de ambas.
- *Estatuta materna*: a estatura da mãe foi aferida seguindo-se os mesmos procedimentos, equipamentos e técnicas realizados em 2012, no *baseline*.
- *Peso materno*: para a avaliação do peso foram adotadas as técnicas de Gordon *et al.* ²⁰⁹, utilizando-se uma balança digital portátil marca Cardiomed® (Biogênese, Brasil) com capacidade até 150 kg e divisão de 0,1 kg. No momento da mensuração a participante vestia o mínimo de roupas possível, estava com os bolsos vazios, sem casaco, chapéu, boné, cinto, xale e demais acessórios, sem calçados, e posicionada no centro da

balança, de forma a distribuir o peso do corpo entre os pés²⁰⁹. Foram efetuadas duas medições e utilizada a média de ambas.

- *IMC materno*: o IMC foi avaliado conforme a classificação da OMS adotada para o IMC pré-gestacional no *baseline*.
- *Peso da criança*: o peso foi mensurado utilizando-se balança portátil digital pediátrica da marca Beurer® (Ulm, Alemanha) modelo BY20, com capacidade para até 20 kg e incrementos de 10 g, adotando-se as técnicas do Ministério da Saúde²¹⁴. No momento da mensuração as crianças estavam desprovidas de roupa e fraldas e foram posicionadas sentadas no centro da balança²¹⁴. Foram efetuadas duas medições e utilizada a média de ambas. Em crianças com idade superior a dois anos, as medidas de peso foram realizadas seguindo os padrões de aferição de adultos, descritos no *baseline*.
- *Comprimento da criança*: o comprimento foi obtido com uso de uma régua antropométrica pediátrica marca Indaiá® (Indaiá Bengalas e Muletas, Brasil), com capacidade de até 100 cm e incrementos de 1 mm, adotando-se as técnicas do Ministério da Saúde²¹⁴. Para a medida do comprimento as crianças foram posicionadas deitadas em uma superfície horizontal, firme e lisa²¹⁴. A cabeça foi apoiada firmemente contra a parte fixa do equipamento, com pescoço reto e o queixo afastado do peito, no plano de Frankfurt, com os ombros totalmente em contato com a superfície de apoio da régua, e os braços estendidos ao longo do corpo²¹⁴. Foram efetuadas duas medições e utilizada a média de ambas.
- *Estado nutricional da criança*: o estado nutricional da criança foi avaliado segundo o IMC (peso [kg] / comprimento [m²]) por idade (meses) e sexo, conforme as curvas de avaliação do crescimento infantil dos 0-5 anos da OMS²¹⁶ (Anexo A), o qual classifica (Quadro 4) como:
 1. *magreza*: crianças com percentil < 3;
 2. *eutrofia*: percentil ≥ 3 e percentil ≤ 85;
 3. *risco de sobrepeso*: percentil > 85 e percentil ≤ 97

4. *sobrepeso*: percentil > 97 e percentil ≤ 99,9;
5. *obesidade*: percentil > 99,9.

Considerou-se risco de EPC quando as crianças possuíam percentil > 85, abrangendo as categorias risco de sobrepeso, sobrepeso e obesidade.

Quadro 4 – Classificação do estado nutricional segundo IMC por idade e sexo

Classificação	Percentil IMC	Escore-z IMC
Magreza acentuada	< 0,1	< -3
Magreza	≥ 0,1 e < 3	≥ -3 e < -2
Eutrofia	≥ 3 e ≤ 85	≥ -2 e ≤ +1
Risco de sobrepeso	> 85 e ≤ 97	> +1 e ≤ +2
Sobrepeso	> 97 e ≤ 99,9	> +2 e ≤ +3
Obesidade	> 99,9	> +3

Fonte: Adaptado de e Brasil ²¹⁴

4.1.3 Coleta de dados no segundo seguimento, 2016-2017

O segundo seguimento foi realizado no período de julho de 2016 a agosto de 2017, através de visita domiciliar. Todas as mães e seus filhos que participaram do 1º seguimento foram convidados a dar continuidade no estudo. A busca pelas mães e crianças, bem como a coleta de dados, ocorreu de forma semelhante ao seguimento anterior (primeiro seguimento). Ao final do 2º seguimento, 221 pares de mães-crianças permaneceram no estudo (Figura 12).

Coleta de dados

As variáveis coletadas para o 2º seguimento incluíram dados de identificação e características socioeconômicas, obstétrica e antropométricas.

a) Dados de identificação e características socioeconômicas

Dentre as variáveis de identificação e características socioeconômicas utilizadas nesse estudo incluíram-se as variáveis maternas: atualização de endereço

e telefone, idade, estado civil, anos de estudo, renda familiar em salários mínimos e tabagismo; e a variável idade da criança. As classificações adotadas para estado civil, anos de estudo e tabagismo das mães seguiram os procedimentos detalhados no *baseline*. A idade das crianças seguiu os procedimentos do primeiro seguimento.

- *Idade materna*: idade completa, em anos, no dia da visita domiciliar. A idade foi posteriormente categorizada em < 30 e ≥ 30 anos.
- *Renda familiar*: renda familiar mensal obtida em número de salários mínimos, registrado como sendo R\$ 937,00 em 2017, equivalente a US\$ 271,60. As categorias utilizadas no estudo foram:
 - *< 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia até R\$ 2.810,99
 - *≥ 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebia três ou mais salários mínimos e, portanto, apresentava renda superior a R\$ 2.811,00.

b) Características obstétricas

A única característica obstétrica envolvida no segundo seguimento foi paridade, categorizada conforme *baseline* e considerando o número de filhos até o dia da visita.

c) Características antropométricas

As medidas antropométricas da mãe coletadas no segundo seguimento incluíram circunferências da cintura e do pescoço, estatura e peso, e cálculo da variável IMC para avaliação do estado nutricional. Em relação às crianças foram aferidos circunferência do pescoço, peso e estatura, e calculado o estado nutricional.

As variáveis circunferência da cintura e do pescoço e peso da mãe, e circunferência do pescoço, peso e estado nutricional da criança foram avaliados conforme descrito no 1º seguimento. As estaturas materna e da criança foram aferidas conforme a estatura materna descrita no *baseline*. O IMC da mãe foi classificado segundo a OMS e encontram-se descritos no IMC pré-gestacional do *baseline*.

4.1.4 Coleta de dados no terceiro seguimento, 2018

O terceiro seguimento foi realizado no segundo semestre de 2018, através de visita domiciliar e com a inclusão de 221 mães e crianças do 2º seguimento. A busca pelas mães e crianças, bem como a coleta de dados, ocorreu utilizando-se os mesmos critérios e procedimentos das coletas anteriores. Ao final do terceiro seguimento, 187 pares permaneceram no estudo.

Coleta de dados

As variáveis coletadas no 3º seguimento incluíram dados de identificação e características socioeconômicas, obstétrica e antropométricas.

a) Dados de identificação e características socioeconômicas

Dentre as variáveis de identificação e características socioeconômicas utilizadas nesse estudo foram incluídas as variáveis maternas: atualização de endereço e telefone, idade, estado civil, anos de estudo, renda familiar em salários mínimos e tabagismo; e a variável idade da criança. As classificações adotadas para estado civil, anos de estudo e tabagismo das mães seguiram os procedimentos detalhados no *baseline*. A idade das crianças seguiu os procedimentos do primeiro seguimento. A idade materna foi classificada seguindo os procedimentos do segundo seguimento.

- *Renda familiar*: renda familiar mensal obtida em número de salários mínimos, foi registrada como sendo R\$ 954,00 em 2018, equivalente a US\$ 257,14. As categorias utilizadas no estudo foram:
 - *< 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebe até R\$ 2.861,99
 - *≥ 3 salários mínimos*: para o grupo familiar que recebe três ou mais salários mínimos e, portanto, apresenta renda superior a R\$ 2.862,00.

b) Características obstétricas

A única característica obstétrica envolvida no terceiro seguimento foi paridade, categorizada conforme *baseline* e considerando o número de filhos até o dia da visita.

c) Características antropométricas

As medidas antropométricas das mães coletadas no terceiro seguimento incluíram: circunferência da cintura, circunferência do pescoço, estatura e peso, e cálculo da variável IMC para avaliação do estado nutricional. Em relação às crianças, foram sendo coletadas informações referentes a circunferência do pescoço, peso e estatura e calculado o estado nutricional. As medidas antropométricas como estatura e IMC das mães foram realizadas conforme descrito no *baseline*. As medidas de circunferência da cintura e peso das mães e as medidas de circunferência do pescoço das mães e crianças foram realizadas conforme descrição no primeiro seguimento. As medidas de estatura e peso das crianças foram aferidas da mesma forma que em adultos e descritos no *baseline* e primeiro seguimento, respectivamente.

- *Estado nutricional da criança*: o estado nutricional das crianças foi avaliado segundo o IMC por idade e sexo, conforme as curvas de avaliação do crescimento infantil dos 5-19 anos da OMS^{216,217} (Anexo B), o qual classifica (Quadro 5) como:
 - *magreza*: crianças com percentil < 3;
 - *eutrofia*: percentil ≥ 3 e percentil ≤ 85;
 - *sobrepeso*: percentil > 85 e percentil ≤ 97;
 - *obesidade*: percentil > 97 e percentil ≤ 99,9;
 - *obesidade grave*: percentil >99.

Quadro 5 – Classificação do estado nutricional segundo IMC por idade e sexo para crianças de 5-19 anos

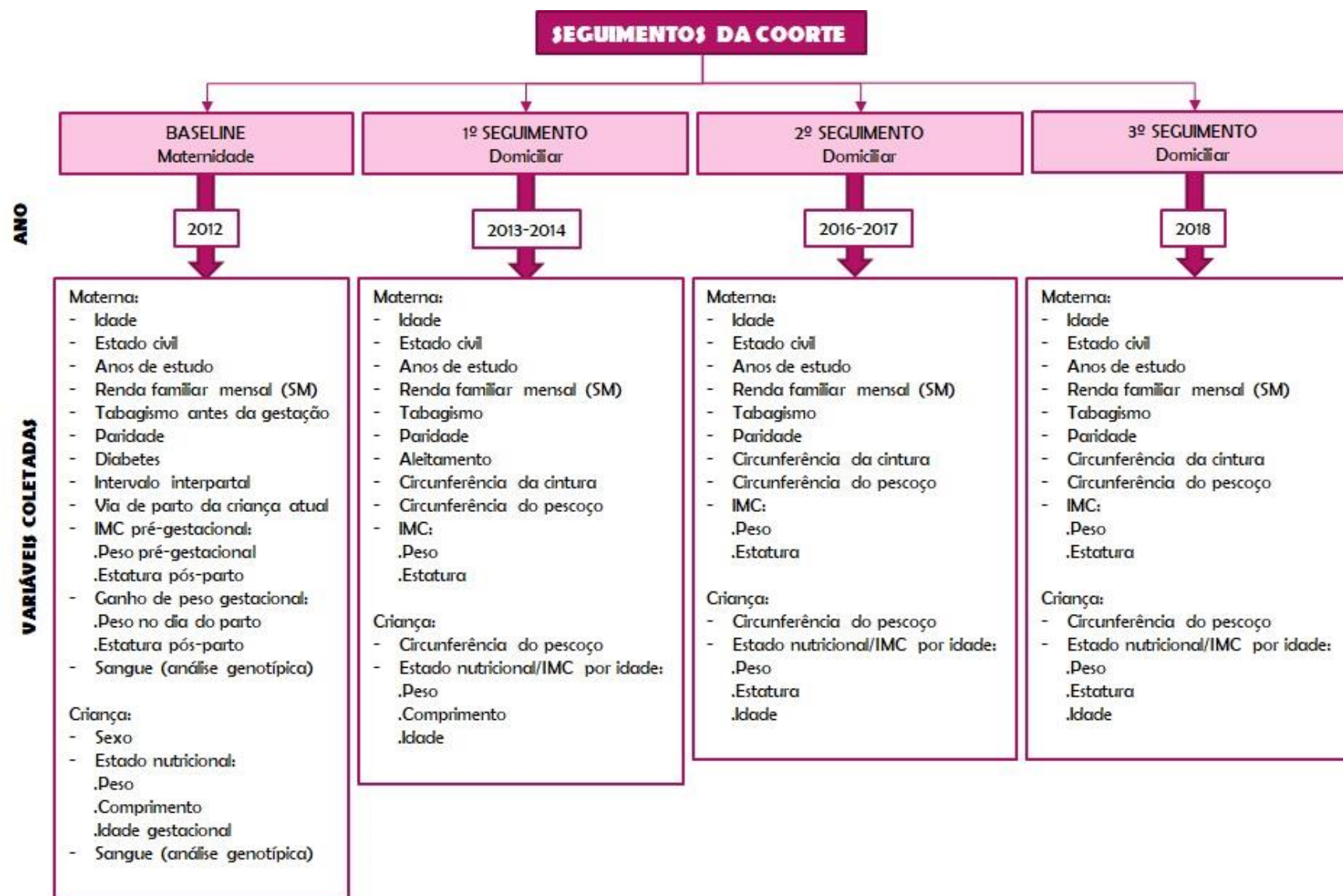
Classificação	Percentil IMC	Escore-z IMC
Magreza acentuada	< 0,1	< -3
Magreza	≥ 0,1 e < 3	≥ -3 e < -2
Eutrofia	≥ 3 e ≤ 85	≥ -2 e ≤ +1
Sobrepeso	> 85 e ≤ 97	> +1 e ≤ +2
Obesidade	> 97 e ≤ 99,9	> +2 e ≤ +3
Obesidade grave	> 99,9	> +3

Fonte: Adaptado de de Onis *et al.* ²¹⁷ e Brasil ²¹⁴.

Considerou-se EPC quando as crianças foram classificadas com percentil > 85, abrangendo as categorias de sobrepeso, obesidade e obesidade grave. A Figura 15 apresenta os dados considerados para esse estudo, segundo o período da coorte.

Em 2020 está prevista a coleta de dados do 4º seguimento.

Figura 15 – Relação dos dados coletados para o presente estudo em cada seguimento da coorte



Fonte: Da autora.

4.2 Análise genotípica

Para a análise genotípica foram coletadas amostras de sangue da gestante e do cordão umbilical do recém-nascido no momento do parto. Uma gota de sangue de cada sujeito do estudo foi transferida para um cartão *CloneSaver*TM (*GE Healthcare Life Sciences*, UK), impregnado por reagentes que conservam o material genético. Após a transferência, o cartão foi armazenado em dessecador, livre de umidade, para posterior análise no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville (Univille).

A extração do DNA genômico humano do cartão *CloneSaver*TM seguiu as normas do fabricante para extração de DNA com utilização do reagente de purificação FTA/“*FTA Purification Reagent*” (*GE Healthcare Life Sciences*, UK)^{218,219}:

- 1) Uma pequena fração da área do cartão (diâmetro 1,2 mm) foi removida com auxílio de um perfurador (*micropunch*), previamente limpo e seco, e transferido para um microtubo de 500 µL.
- 2) Adicionou-se 200 µL do reagente de purificação FTA no microtubo e incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente.
- 3) Ao início e no final do período de incubação realizou-se uma agitação de 1 a 2 segundos em um agitador de tubos Vortex-Genie2® (*Scientific Industries*, Inc., USA).
- 4) Transcorrido o tempo, descartou-se o reagente usando uma pipeta. Repetiu-se os passos 2-4 por mais duas vezes, totalizando 3 lavadas com o reagente de purificação FTA.
- 5) Foram então adicionados 200 µL de TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) em cada microtubo contendo o disco do cartão com a amostra de cada sujeito.

- 6) Incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente, agitando de 1 a 2 segundos o microtubo, no início e ao final do período de incubação, com auxílio do agitador de tubos Vortex-Genie2®.
- 7) Ao final, removeu-se todo o conteúdo do TE Buffer utilizado com auxílio de uma pipeta. Repetiu-se os passos 5-7 por mais duas vezes, totalizando 3 lavadas com o TE Buffer.

Por fim, após a certificação de que todo o líquido das lavagens havia sido removido, o microtubo, com o disco contendo material genético, foi inserido em um termobloco para secagem a temperatura de 60°C por 30 minutos.

Para cada amostra seguida da genotipagem, a extração de DNA foi realizada isoladamente.

4.2.1 Análise da variante rs2241766 do gene *ADIPOQ*

As genotipagens da variante rs2241766 do gene *ADIPOQ* foram determinadas através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase – Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP, *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), com o auxílio dos iniciadores *forward* 5'-TCTCTCCATGGCTGACAGTG-3' e *reverse* 5'-CCTTTCTCACCTTCTCACC-3' descritos por Menzaghi *et al.* ¹¹¹, e a enzima de restrição *SmaI* (*Thermo Scientific*, Lituânia).

Cada tubo, contendo amostra ou controles positivo/negativos (um negativo para extração e um negativo para PCR), recebeu 50 µL de solução, preparada em cabine de segurança de uso específico, contendo: 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Platinum Taq® polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1x Tampão de reação (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e água tratada com Dietil-piromcarbonato (DEPC). A termociclagem foi efetuada no termociclador *LGC XP* (BIOER Technology Co., Japão), sendo 95 °C durante 2 min para a desnaturação inicial, 30 ciclos a 95 °C por 30 s para a desnaturação, 58 °C por 30 s para o anelamento, 72 °C por 30 s para o alongamento e uma etapa final e adicional a 72 °C durante 10 min.

Foram aplicados 10 µL dos produtos de PCR – *amplicons* – juntamente com 3 µL de tampão de aplicação (0,05% Azul de Bromofenol, 0,5% Xileno Cianol, 40%

Glicerol) em gel de agarose a 1% e tampão Tris/Borato/EDTA (TBE), seguido pela eletroforese por 1 h a 100 V, e submetidos em seguida à luz ultravioleta (UV) em um trans-iluminador (MiniBis, DNR *Bioimage Sytems*). Os padrões de tamanhos obtidos foram comparados a um padrão de tamanhos de bases disponível comercialmente (100 pares de base (pb)) (Ladder, *Thermo Scientific*, Lituânia). Na sequência os dados foram digitalizados para confirmação de amplificação.

Quando confirmada a amplificação, através da presença de segmentos de 250 pb, do controle positivo e das amostras, os *amplicons* foram submetidos ao processo de digestão enzimática (RFLP). Para cada amostra adicionou-se 10 µL de *amplicons*, 7 µL de água estéril, 2 µL de Buffer Tango e 10 U de enzima *SmaI*, e manteve-se à temperatura de 25 °C em banho-maria por 2 h. Dessa forma, os *amplicons* foram submetidos à digestão pela *SmaI* que possui um sítio de reconhecimento 5'-CCC[^]GGG-3', permitindo a discriminação alélica T/G.

Após a digestão dos *amplicons*, os produtos da RFLP foram adicionados a 3 µL de tampão de aplicação (0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xileno Cianol, 40,0% Glicerol) e submetidos à eletroforese submersa em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE, por 1 h e 30 min a 100 V, seguido de exposição à luz UV e digitalização. Os padrões de fragmentos obtidos foram comparados a uma Ladder de 50 pb (*Thermo Scientific*, Lituânia), analisando-se o perfil de restrição correspondente ao: (1) genótipo homozigoto selvagem *TT*: 250 pb (não digerido), (2) genótipo heterozigoto *TG*: 250 pb, 164 pb e 86 pb, e (3) genótipo homozigoto mutante *GG*: 164 pb e 86 pb.

4.2.2 Análise da variante rs7799039 do gene *LEP*

Para as genotipagens da variante rs7799039 foram realizadas as mesmas técnicas (PCR/RFLP) adotadas para a variante do gene *ADIPOQ*, porém utilizando os iniciadores: *forward* 5'-CTTTTGT TTTGT TTTGCGACAGGGGTGC-3', e *reverse* 5'-GCTCCCTTTGCCCGACCCCG-3' e a enzima de restrição *Alw44I* (*Thermo Scientific*, Lituânia)²⁵.

As condições definidas para a termociclagem foram: 94 °C durante 3 min para a desnaturação inicial, 30 ciclos a 94 °C por 30 s e 70 °C por 90 s para amplificação. Em seguida procedeu-se a extensão final de 72 °C durante 10 min.

A amplificação era confirmada através da eletroforese em gel agarose pela presença de produtos com 427 pb. Para a digestão enzimática foi utilizada a

quantidade de 10 U da enzima *A/w44I* por amostra na solução de digestão, e incubada em banho-maria à temperatura de 37 °C por 2 h, seguida da aplicação das amostras em gel agarose a 1,5%. A enzima *A/w44I* possui um sítio de reconhecimento 5'-G^ATGCAC-3' que permite a discriminação alélica A/G, gerando um perfil de restrição correspondente ao: (1) genótipo homozigoto selvagem GG: 332 pb e 95 pb, (2) genótipo heterozigoto GA: 332 pb, 307 pb, 95 pb e 25 pb, (3) genótipo homozigoto mutante AA: 307 pb e 25 pb.

4.2.3 Análise da variante rs9939609 do gene *FTO*

As genotipagens para a variante rs9939609 do gene *FTO* foram realizadas através das mesmas técnicas adotadas para a variante do gene *ADIPOQ*, entretanto foram utilizados os iniciadores: *forward* 5'-AACTGGCTCTTGAATGAAATAGGATTCAGA-3', *reverse* 5'-AGAGTAACAGAGACTATCCAAGTGCAGTAC-3' e a enzima *Scal* (*Thermo Scientific*, Lituânia)¹⁷².

Os valores definidos para a termociclagem foram: 94 °C durante 5 min para a pré-desnaturação, 20 ciclos de 94 °C por 45 s, 61 °C por 45 s (queda de 0,5 °C/seg) e 72 °C por 45 s, seguida de 15 ciclos de 94 °C durante 45 s para o anelamento, 51 °C por 45 s, e 72 °C por 45 s, e por fim, a extensão final de 72 °C durante 10 min.

A amplificação foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose pela presença de segmentos com 182 pb. Para a RFLP foi utilizada a concentração de 10 U da enzima *Scal* (*Thermo Scientific*, Lituânia) por amostra na solução de digestão, incubado em banho-maria à temperatura de 37 °C por 2 h. A enzima *Scal* possui um sítio de reconhecimento 5'-AGT^AACT-3' que permite a discriminação alélica T/A, gerando um perfil de restrição correspondente ao: (1) genótipo homozigoto selvagem TT: 182 pb, (2) genótipo heterozigoto TA: 182 pb, 154 pb e 28 pb, (3) genótipo homozigoto mutante AA: 154 pb e 28 pb¹⁷². Para a eletroforese dos produtos da digestão utilizou-se a concentração de agarose a 3,0%.

Um resumo dos padrões e das técnicas adotadas para a genotipagem das três variantes genéticas encontra-se demonstrado no Quadro 6 e na Figura 15.

Foram realizadas duplicatas em 5,0% das amostras, randomicamente selecionadas, para cada uma das três variantes genéticas. A taxa de concordância foi

de 100,0% para a variante do gene *FTO* e 95,0% para as variantes dos genes *ADIPOQ* e *LEP*.

Amostras em triplicata de cada variante (três amostras de três pacientes distintos com o mesmo genótipo e variante) foram sequenciadas pelo método Sanger para confirmar os perfis da digestão enzimática. O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando-se o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (*Applied Biosystems*, USA). Os DNA-moldes (30-60 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de cada *primer forward* correspondente a cada variante genética em tubos separados e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standard* (*Applied Biosystems*, USA) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cyclor com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75,0% e lavagem com etanol a 60,0%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (*Applied Biosystems*, USA), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares (Brasil).

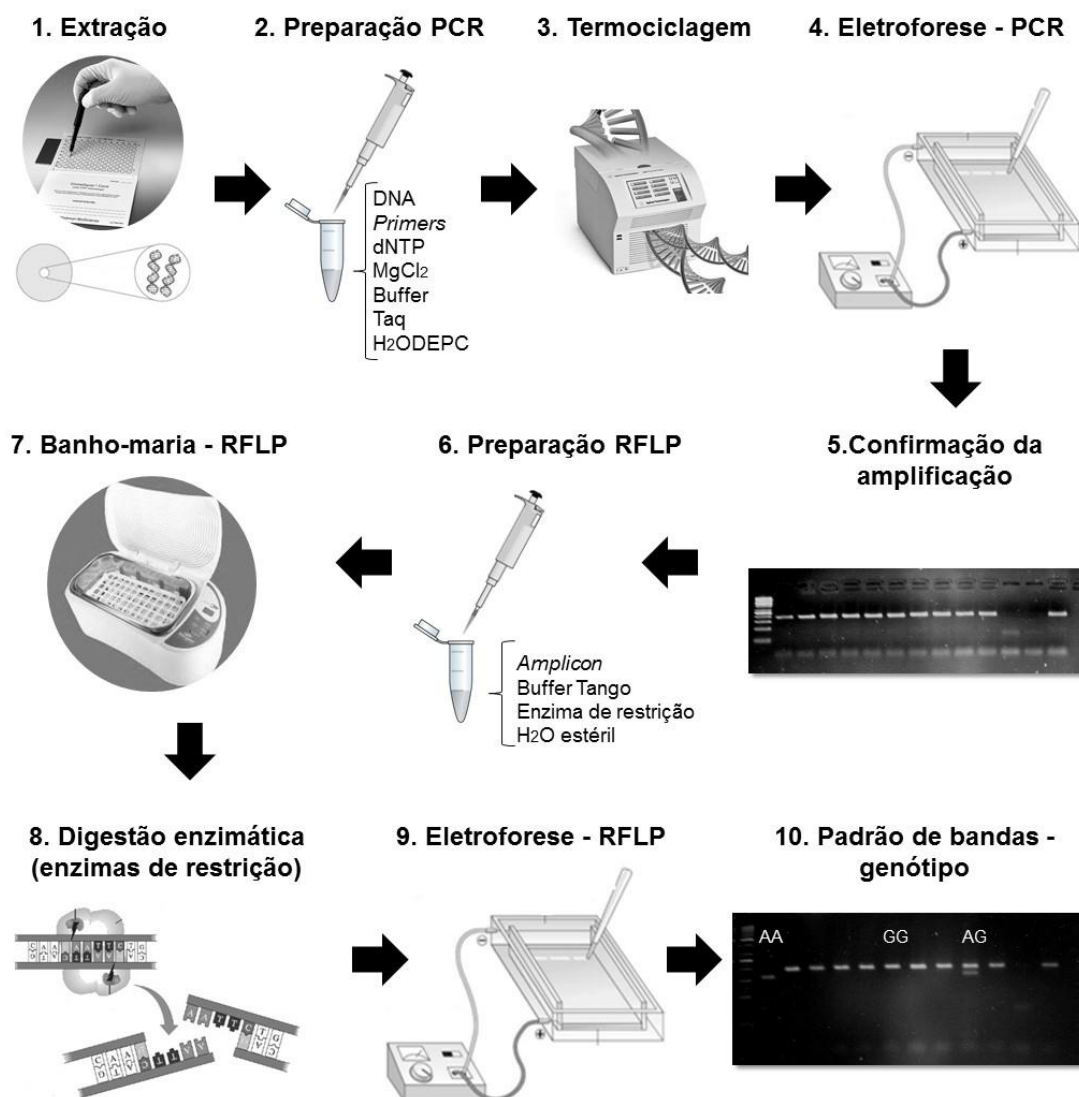
O resultado do sequenciamento foi comparado às sequências nucleotídicas disponíveis em um banco de dados de acesso livre (GenBank) para confirmação dos genótipos.

Quadro 6 – Padrões adotados para as genotipagens das variantes genéticas estudadas

	Variante genética		
	<i>ADIPOQ</i> rs2241766	<i>LEP</i> rs7799039	<i>FTO</i> rs9939609
Primer forward (5'-3')	TCTCTCCATGGCT GACAGTG	CTTTTGT TTTGT TTT GCGACAGGGGTGC	AACTGGCTCTTGAAT GAAATAGGATTTCAGA
Primer reverse (5'-3')	CCTTTCTCACCT TCTCACC	GCTCCCTTTGCCCG ACCCCG	AGAGTAACAGAGACT ATCCAAGTGCAGTAC
Enzima de restrição	<i>Sma</i> I	<i>Alw</i> 44I	<i>Scal</i> I
Sítio de restrição (5'-3')	CCC^GGG	G^TGCAC	AGT^ACT
Alelos	T, G	G, A	T, A
Bandas (pb)	TT: 250	GG: 332 e 95	TT: 182
	TG: 250, 164 e 86	GA: 332, 307, 95 e 25	TA: 182, 154 e 28
	GG: 164 e 86	AA: 307 e 25	AA: 154 e 28

Fonte: Da autora.

Figura 15 – Técnicas adotadas para análise genotípica das variantes dos genes *ADIPOQ*, *LEP* e *FTO*



Fonte: Kroll ¹¹⁸

4.3 Processamento dos dados e análise estatística

Os dados foram armazenados em banco de dados criado no programa Excel® Office 2003 da Microsoft, e analisados no programa SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. O teste de Mann-Whitney *U* foi utilizado para examinar se houve diferenças entre as mães/crianças incluídos no *baseline* e aquelas que não permaneceram nos seguimentos seguintes.

As variáveis contínuas foram reportadas em médias e desvios-padrão para dados com distribuição normal, e como mediana e intervalo interquartil para os dados com distribuição não normal. As variáveis categóricas foram reportadas em frequências absolutas e relativas. O teste de análise de variância (ANOVA), para variáveis com distribuição normal, ou Kruskal-Wallis, para distribuição não normal, foram utilizados para comparar as médias das medidas antropométricas (peso, estatura, IMC, circunferência da cintura e circunferência do pescoço) das mães e crianças (com exceção da circunferência da cintura) segundo os genótipos das variantes. Para testar se existe associação entre o desfecho EPC em mães e filhos para cada seguimento da coorte e as variantes genéticas, foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher (quando necessário).

Para avaliar o efeito bruto das variantes genéticas e outras covariáveis socioeconômicas, demográficas e obstétricas das mães e das crianças no desfecho “estado nutricional da mãe e da criança” foram estimados os valores de *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% utilizando-se regressão logística. O efeito independente de cada preditor sobre o desfecho foi estimado a partir de análise multivariada por regressão logística e ajustando-se os modelos para covariáveis socioeconômicas, demográficas e obstétricas da mãe e da criança.

Para avaliar o efeito bruto e ajustado das variantes genéticas sobre o desfecho ao longo dos seguimentos foram calculados os riscos relativos (RR) e os IC de 95% utilizando-se regressão de Poisson com análise robusta através dos modelos generalizados lineares. As sintaxes das análises estatísticas realizadas envolvendo regressão logística e de Poisson ajudadas estão apresentadas no Apêndice F.

As frequências genotípicas obtidas em relação às frequências esperadas pelas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimadas e testadas utilizando-se o teste de qui-quadrado.

O nível de significância adotado foi de 5%.

4.4 Aspectos éticos

O desenvolvimento do estudo seguiu os requisitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde²²⁰, que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. Cada mãe recebeu informações sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo, e foi informada sobre a continuidade do projeto nos

anos subsequentes ao nascimento da criança. Quando houve concordância em participar do estudo, a mãe assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE em duas vias, sendo uma de posse da mesma e outra da equipe. A coleta do material biológico foi realizada somente no ano de 2012, e obedeceu às normas de biossegurança. O banco de dados gerado com as informações coletadas ficará sob responsabilidade do coordenador do estudo. Os formulários utilizados nas entrevistas ficarão armazenados durante um período de cinco anos sob responsabilidade do coordenador do estudo. Após esse período os formulários serão picotados de forma a inutilizar-se completamente suas informações. Qualquer forma de divulgação científica será realizada sem a identificação das participantes.

Este estudo foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, ofício nº 107/2011 (Apêndice B).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville/UNIVILLE, o capítulo Resultados e Discussão foi apresentado no formato de artigo científico. Fazem parte dos resultados da tese os seguintes artigos:

1. **Kroll C**, de Franca PHC, Mastroeni MF. Association between *FTO* gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study. *Am J Hum Biol.* 2018;30(5):e23164 (Apêndice C).
2. **Kroll C**, de Franca PHC, Mastroeni MF. Adiponectin and leptin gene variants and their effects on children's excess body weight from birth to six years of age: The PREDI Study. Manuscrito submetido ao periódico *Childhood Obesity* em agosto de 2019 (Apêndice D).
3. **Kroll C**, Mastroeni MF. Effect of adiponectin and leptin gene variants on excess body weight in women of reproductive age over six years of follow-up: The PREDI Study. Manuscrito será submetido ao periódico *Nutrition Research* após a defesa de doutorado (Apêndice E).

Outros artigos publicados durante o doutorado relacionados ao estudo PREDI ou ao tema da tese:

1. **Kroll C**, Mastroeni SSBS, Veugelers PJ, and Mastroeni MF. Association of *ADIPOQ*, *LEP*, and *FTO* gene polymorphisms with large for gestational age infants. *Am J Hum Biol.* 2017 Jan; 29(1). doi: 10.1002/ajhb.22893
2. **Kroll C**, Mastroeni SSBS, Czarnobay SA, Ekwaru JP, Veugelers PJ, Mastroeni MF. The accuracy of neck circumference for assessing overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hum Biol.* 2017 Dec; 44(8):667-677. doi: 10.1080/03014460.2017.1390153.
3. Mastroeni, MF, Czarnobay, SA, **Kroll, C**. et al. The Independent Importance of Pre-pregnancy Weight and Gestational Weight Gain for the Prevention of Large-for-Gestational Age Brazilian Newborns. *Matern Child Health J.* 2017 Apr;21(4):705-714. doi: 10.1007/s10995-016-2156-0.

4. Czarnobay SA, **Kroll C**, Schultz LF, Malinovski J, Mastroeni SSBS, Mastroeni MF. Predictors of excess birth weight in Brazil: a systematic review. *J Pediatr (Rio J)*. 2018 May 19. pii: S0021-7557(18)30301-2. doi:10.1016/j.jpmed.2018.04.006
5. **Kroll C**, Mastroeni SSBS, Veugelers PJ, Mastroeni MF. Associations of *ADIPOQ* and *LEP* Gene Variants with Energy Intake: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11(4):750. doi: 10.3390/nu11040750.
6. **Kroll C**, Mansani CMC, Schultz LF, El Rafihi-Ferreira R, Mastroeni MF. Association of *LEP*-rs7799039 and *ADIPOQ*-rs2241766 polymorphisms with sleep duration in preschool age children. *Sleep medicine*. 2019. doi: 10.1016/j.sleep.2019.07.028.
7. Schultz LF, **Kroll C**, Constantino B, Mansani CMC, El Rafihi-Ferreira R, Mastroeni MF. Influence of maternal depression and anxiety symptoms on the sleep duration in children at preschool age. *Matern Child Health J*. 2020 Jan;24(1):62-72. doi: 10.1007/s10995-019-02843-z.

6 CONCLUSÃO

No que tange o **estado nutricional materno**, mulheres portando os genótipos de risco TG+GG da variante *ADIPOQ*-rs2241766 apresentaram maior peso, IMC e chances de excesso de peso corporal quando comparadas às mulheres portadoras do genótipo selvagem TT. Na análise longitudinal, houve aumento de 1,5 vezes o risco das mães com genótipos de risco TG+GG apresentarem EPC quando comparadas às mães com genótipo TT, mesmo após o ajuste do modelo.

A variante *LEP*-rs7799039 não foi associada ao estado nutricional materno. No entanto, mulheres portando os genótipos de risco TA+AA da variante *FTO*-rs9939609 apresentaram significativamente maior média de peso e IMC até um ano após o parto quando comparadas às mulheres com genótipo TT.

Em relação ao **estado nutricional das crianças**, as portadoras dos genótipos TG+GG da variante *ADIPOQ*-rs2241766 apresentaram maiores valores de IMC, peso corporal, circunferência da cintura e ganho médio de IMC quando comparadas às com genótipo TT, entretanto sem significância estatística. Adicionalmente, crianças com o mesmo genótipo de risco TG+GG apresentaram significativamente 2,4 vezes maior chance de EPC quatro anos após o parto quando comparadas às crianças com genótipo TT, mesmo após o ajuste para potenciais variáveis de confusão.

A análise da variante *LEP*-rs7799039 revelou estar associada ao estado nutricional do recém-nascido. Crianças portando os genótipos GA+AA apresentaram 49% menos chances de nascerem GIG quando comparadas às crianças com genótipo GG, mesmo após o ajuste para potenciais variáveis de confusão da mãe e da criança.

A distribuição alélica e genotípica da variante *FTO*-rs9939609 das crianças não apresentou equilíbrio de Hardy-Weiberg.

REFERÊNCIAS

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384 (9945):766-781.
2. WHO World Health Organization. *Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation World Health Organization technical report series* Geneve: 2000.
3. WHO World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 31 Jan 2018.
4. WHO World Health Organization. Prevalence of overweight among adults, BMI $\geq$ 25, age-standardized. Estimates by country. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.A897A?lang=en>>. 2018.
5. WHO World Health Organization. *Report of the comission on ending childhood obesity*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2016.
6. Brasil Ministério da Saúde. *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006 : dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança. Estatística e Informação em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. 2009.
7. Seidell JC, Halberstadt J The Global Burden of Obesity and the Challenges of Prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2015;66(suppl 2) (Suppl. 2):7-12.
8. Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH et al. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16 (6):1161-1177.
9. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama*. 1999;282 (16):1523-1529.
10. Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med*. 2001;161 (13):1581-1586.
11. Hu FB Overweight and obesity in women: health risks and consequences. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003;12 (2):163-172.
12. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med*. 2002;162 (16):1867-1872.
13. Lobstein T, Jackson-Leach R Estimated burden of paediatric obesity and co-morbidities in Europe. Part 2. Numbers of children with indicators of obesity-related disease. *Int J Pediatr Obes*. 2006;1 (1):33-41.

14. Palou A, Bonet ML Challenges in obesity research. *Nutr Hosp.* 2013;28 Suppl 5 144-153.
15. Gonzalez Jimenez E Obesity: etiologic and pathophysiological analysis. *Endocrinol Nutr.* 2013;60 (1):17-24.
16. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, Sociedade Brasileira de Clínica Médica Obesidade: Etiologia. *Projeto Diretrizes Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.* 2005.
17. Gerard P Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73 (1):147-162.
18. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;20 (6):501-506.
19. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 1997;27 (4):325-351.
20. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJF et al. Variability in the Heritability of Body Mass Index: A Systematic Review and Meta-Regression. *Frontiers in Endocrinology.* 2012;3 29.
21. Sheikh AB, Nasrullah A, Haq S, Akhtar A, Ghazanfar H, Nasir A et al. The Interplay of Genetics and Environmental Factors in the Development of Obesity. *Cureus.* 2017;9 (7):e1435.
22. Pimentel M, Santos-Rebouças C, Gallo C *Genética essencial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.
23. Wu J, Liu Z, Meng K, Zhang L Association of adiponectin gene (ADIPOQ) rs2241766 polymorphism with obesity in adults: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9 (4):e95270.
24. Loos RJ, Ruchat S, Rankinen T, Tremblay A, Perusse L, Bouchard C Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to resting metabolic rate, respiratory quotient, and adiposity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;85 (1):26-34.
25. Hinuy HM, Hirata MH, Forti N, Diamant J, Sampaio MF, Armaganijan D et al. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Archives of Endocrinology and Metabolism.* 2008;52 (4):611-616.
26. Boumaiza I, Omezzine A, Rejeb J, Rebhi L, Ouedrani A, Ben Rejeb N et al. Relationship between leptin G2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms and obesity and metabolic syndrome risk in Tunisian volunteers. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16 (7):726-733.
27. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007;316 (5826):889-894.
28. Solak M, Ozdemir Erdogan M, Yildiz SH, Ucok K, Yuksel S, Arikan Terzi ES et al. Association of obesity with rs1421085 and rs9939609 polymorphisms of FTO gene. *Mol Biol Rep.* 2014.

29. Li LL, Kang XL, Ran XJ, Wang Y, Wang CH, Huang L et al. Associations between 45T/G polymorphism of the adiponectin gene and plasma adiponectin levels with type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34 (12):1287-1290.
30. Mohammadzadeh G, Zarghami N Associations between single-nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene, serum adiponectin levels and increased risk of type 2 diabetes mellitus in Iranian obese individuals. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69 (7):764-771.
31. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Sjostrom L, Bouchard C Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort. *Metabolism*. 2003;52 (7):881-884.
32. Zhou JM, Zhang M, Wang S, Wang BY, Han CY, Ren YC et al. Association of the ADIPOQ Rs2241766 and Rs266729 Polymorphisms with Metabolic Syndrome in the Chinese Population: A Meta-analysis. *Biomed Environ Sci*. 2016;29 (7):505-515.
33. Institute of Medicine (2009) National Research Council Committee to Reexamine, I. O. M. Pregnancy Weight Guidelines. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines* [KM Rasmussen and AL Yaktine, editors]. Washington (DC): National Academies Press (US). National Academy of Sciences.
34. Gonzalez-Muniesa P, Martinez-Gonzalez MA, Hu FB, Despres JP, Matsuzawa Y, Loos RJF et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3 17034.
35. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257 (1):79-83.
36. Kroll C, Mastroeni SSBS, Veugelers PJ, Mastroeni MF Associations of ADIPOQ and LEP Gene Variants with Energy Intake: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11 (4):750.
37. Lee B, Shao J Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15 (2):149-156.
38. Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet*. 2000;64 (Pt 5):391-394.
39. Liu Y, Wu H, Zhu Y, Gao Y Genetic association between leptin-2548G/A polymorphism and risk of cancer: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8 (1):448-455.
40. Meshkani R, Nasimian A, Taheripak G, Zarghooni M, Rezaei M, Sadeghi A et al. Association between Leptin G2548A and Leptin Receptor Q223R Polymorphisms with Type 2 Diabetes in an Iranian Population. *Clinical Laboratory*. 2016;62 89-96.
41. Shabana, Hasnain S Leptin promoter variant G2548A is associated with serum leptin and HDL-C levels in a case control observational study in association with obesity in a Pakistani cohort. *J Biosci*. 2016;41 (2):251-255.

42. Li WD, Reed DR, Lee JH, Xu W, Kilker RL, Sodam BR et al. Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet.* 1999;63 (Pt 3):227-234.
43. Shahid A, Rana S, Mahmood S, Saeed S Role of leptin G-2548A polymorphism in age- and gender-specific development of obesity. *J Biosci.* 2015;40 (3):521-530.
44. Wang TN, Huang MC, Chang WT, Ko AM, Tsai EM, Liu CS et al. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 (2):183-187.
45. Feng H, Zheng L, Feng Z, Zhao Y, Zhang N The role of leptin in obesity and the potential for leptin replacement therapy. *Endocrine.* 2013;44 (1):33-39.
46. Jequier E Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967 379-388.
47. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res.* 2002;34 (7):355-359.
48. Saleem S, Hasnain S Leptin promoter variant G2548A is associated with serum leptin and HDL-C levels in a case control observational study in association with obesity in a Pakistani cohort. *J Biosci.* 2016;41 (2):251-255.
49. Hertel JK, Johansson S, Sonestedt E, Jonsson A, Lie RT, Platou CGP et al. FTO, Type 2 Diabetes, and Weight Gain Throughout Adult Life. *Diabetes* 2011;60 (5):1637-1644.
50. Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Medicine.* 2011;9 71-71.
51. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet.* 2010;42 (11):937-948.
52. Karra E, O'Daly OG, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, Neary MT et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest.* 2013;123 (8):3539-3551.
53. Chen JL, Guo J, Esquivel JH, Chesla CA Like Mother, Like Child: The Influences of Maternal Attitudes and Behaviors on Weight-Related Health Behaviors in Their Children. *J Transcult Nurs.* 2018;29 (6):523-531.
54. WHO World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity.* Geneva: 1998.
55. Ferreira APdS, Szwarcwald CL, Damacena GN Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2019;22.
56. Gungor NK Overweight and obesity in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014;6 (3):129-143.

57. Mastroeni MF, Czarnobay SA, Kroll C, Figueiredo KB, Mastroeni SS, Silva JC et al. The Independent Importance of Pre-pregnancy Weight and Gestational Weight Gain for the Prevention of Large-for Gestational Age Brazilian Newborns. *Matern Child Health J.* 2016.
58. Contarato AA, Rocha ED, Czarnobay SA, Mastroeni SS, Veugeliers PJ, Mastroeni MF Independent effect of type of breastfeeding on overweight and obesity in children aged 12-24 months. *Cad Saude Publica.* 2016;32 (12):e00119015.
59. Swinburn B, Egger G, Raza F Dissecting obesogenic environments: the development and application of a framework for identifying and prioritizing environmental interventions for obesity. *Prev Med.* 1999;29 (6 Pt 1):563-570.
60. Huang JS, Barlow SE, Quiros-Tejiera RE, Scheimann A, Skelton J, Suskind D et al. Childhood obesity for pediatric gastroenterologists. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56 (1):99-109.
61. Gunderson EP Childbearing and Obesity in Women: Weight Before, During, and After Pregnancy. *Obstetrics and gynecology clinics of North America.* 2009;36 (2):317-ix.
62. Gunderson EP, Sternfeld B, Wellons MF, Whitmer RA, Chiang V, Quesenberry CP, Jr. et al. Childbearing may increase visceral adipose tissue independent of overall increase in body fat. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16 (5):1078-1084.
63. Linne Y, Dye L, Barkeling B, Rossner S Weight development over time in parous women--the SPAWN study--15 years follow-up. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27 (12):1516-1522.
64. Czarnobay SA, Kroll C, Schultz LF, Malinowski J, Mastroeni SSdBS, Mastroeni MF Predictors of excess birth weight in Brazil: a systematic review. *Jornal de Pediatria.* 2019;95 128-154.
65. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ Role of the microbiome in human development. *Gut.* 2019;68 (6):1108-1114.
66. Qi L, Cho YA Gene-environment interaction and obesity. *Nutrition reviews.* 2008;66 (12):684-694.
67. Brasil Ministério da Saúde. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE. 2010.
68. Brasil Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. *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.
69. Kroll C, de Franca PHC, Mastroeni MF Association between FTO gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study. 2018;30 (5):e23164.

70. Constantino B, Silva JCD, Michels MdS, Mastroeni MF Symptoms of maternal depression and anxiety and their effect on the child's weight status four years after delivery. *Early Child Development and Care*. 2019;1-10.
71. Mastroeni MF, Mastroeni S, Czarnobay SA, Ekwaru JP, Loehr SA, Veugelers PJ Breast-feeding duration for the prevention of excess body weight of mother-child pairs concurrently: a 2-year cohort study. *Public Health Nutr*. 2017;20 (14):2537-2548.
72. WHO World Health Organization. Prevalence of overweight among children and adolescents, BMI>+1 standard deviation above the median, crude. Estimates by country, among children aged 5-19 years. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.BMIPLUS1C?lang=en>>. 2018.
73. Kneipp C, Habitzreuter F, Mezadri T, Höfelmann DA Excesso de peso e variáveis associadas em escolares de Itajaí, Santa Catarina, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2015;20 2411-2422.
74. Bernardo CdO, Pudla KJ, Longo GZ, Vasconcelos FdAGd Fatores associados ao estado nutricional de escolares de 7 a 10 anos: aspectos sociodemográficos, de consumo alimentar e estado nutricional dos pais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2012;15 651-661.
75. D Avila GL, Müller RL, Gonsalez PS, Vasconcelos FdAGd Associação entre estado nutricional da mãe e a frequência, local e companhia durante as refeições com o sobrepeso/obesidade de adolescentes da cidade de Florianópolis, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2015;15 289-299.
76. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine Obesity and reproduction: an educational bulletin. *Fertil Steril*. 2008;90 (5 Suppl):S21-29.
77. Robker RL Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*. 2008;15 (2):115-121.
78. Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schragger S Obesity and women's health: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med*. 2011;24 (1):75-85.
79. Lash MM, Armstrong A Impact of obesity on women's health. *Fertil Steril*. 2009;91 (5):1712-1716.
80. Azarbad L, Gonder-Frederick L Obesity in women. *Psychiatr Clin North Am*. 2010;33 (2):423-440.
81. Gillman MW, Rifas-Shiman S, Berkey CS, Field AE, Colditz GA Maternal gestational diabetes, birth weight, and adolescent obesity. *Pediatrics*. 2003;111 (3):e221-226.
82. Sorensen HT, Sabroe S, Rothman KJ, Gillman M, Fischer P, Sorensen TI Relation between weight and length at birth and body mass index in young adulthood: cohort study. *BMJ : British Medical Journal*. 1997;315 (7116):1137-1137.
83. Pribylova H, Dvorakova L Long-term prognosis of infants of diabetic mothers. Relationship between metabolic disorders in newborns and adult offspring. *Acta Diabetol*. 1996;33 (1):30-34.
84. Sociedade Brasileira de Cardiologia SBC. I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 2005;85 (6):3-36.

85. Ordovas JM, Robertson R, Cleirigh EN Gene-gene and gene-environment interactions defining lipid-related traits. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22 (2):129-136.
86. Razquin C, Marti A, Martinez JA Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55 (1):136-149.
87. Hinney A, Vogel CIG, Hebebrand J From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 2010;19 (3):297-310.
88. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 (4):529-644.
89. T-HOD Text-mined Hypertension, Obesity, and Diabetes Candidate Gene Database. Obesity. Intelligent Agent Systems Lab., Institute of Information Science, Academia Sinica. Disponível em : <<http://bws.iis.sinica.edu.tw/THOD/>>. Acesso em 17 Out 2019.
90. Lyon HN, Hirschhorn JN Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr*. 2005;82 (1 Suppl):215s-217s.
91. NCBI National Center for Biotechnology Information. ADIPOQ adiponectin, C1Q and collagen domain containing [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9370>>. Acesso em 22 jan 2018.
92. Saito K, Tobe T, Minoshima S, Asakawa S, Sumiya J, Yoda M et al. Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28). *Gene*. 1999;229 (1-2):67-73.
93. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie*. 2012;94 (10):2137-2142.
94. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003;52 (7):1779-1785.
95. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7 (8):941-946.
96. Ahima RS Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 1 9s-15s.
97. Hu E, Liang P, Spiegelman BM AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996;271 (18):10697-10703.
98. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270 (45):26746-26749.
99. Guimarães DED, Sardinha FLdC, Mizurini DdM, Carmo MdGTd Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de Nutrição*. 2007;20 549-559.

100. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100 (25):2473-2476.
101. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17 (23):2801-2811.
102. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Saruta T Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89 (1):87-90.
103. Bostrom MA, Freedman BI, Langefeld CD, Liu L, Hicks PJ, Bowden DW Association of adiponectin gene polymorphisms with type 2 diabetes in an African American population enriched for nephropathy. *Diabetes*. 2009;58 (2):499-504.
104. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet*. 2002;11 (21):2607-2614.
105. Francke S, Manraj M, Lacquemant C, Lecoecur C, Leprêtre F, Passa P et al. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. *Human Molecular Genetics*. 2001;10 (24):2751-2765.
106. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet*. 2000;67 (6):1470-1480.
107. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116 (7):1784-1792.
108. Peters KE, Beilby J, Cadby G, Warrington NM, Bruce DG, Davis WA et al. A comprehensive investigation of variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/R2), and their association with serum adiponectin, type 2 diabetes, insulin resistance and the metabolic syndrome. *BMC Medical Genetics*. 2013;14 15-15.
109. De Rosa A, Monaco ML, Capasso M, Forestieri P, Pilone V, Nardelli C et al. Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects. *Eur J Endocrinol*. 2013;169 (1):37-43.
110. Stumvoll M, Tschrötter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M et al. Association of the TG Polymorphism in adiponectin (Exon 2) with obesity and insulin sensitivity interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51 (1):37-41.
111. Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002;51 (7):2306-2312.

112. Lu JF, Zhou Y, Huang GH, Jiang HX, Hu BL, Qin SY Association of ADIPOQ polymorphisms with obesity risk: a meta-analysis. *Hum Immunol.* 2014;75 (10):1062-1068.
113. Nelson DL, Cox MM *Princípios de bioquímica de Lehninger. Capítulo 23: Regulação hormonal e integração do metabolismo em mamíferos.* . Porto Alegre: Artmed: 2014.
114. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* 2004;10 (5):524-529.
115. Heid IM, Wagner SA, Gohlke H, Iglseider B, Mueller JC, Cip P et al. Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes.* 2006;55 (2):375-384.
116. Pollin TI, Tanner K, O'Connell J R, Ott SH, Damcott CM, Shuldiner AR et al. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene. *Diabetes.* 2005;54 (1):268-274.
117. NCBI National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variations. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs2241766. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9939609#locus>. Acesso em 19 jan 2018.
118. Kroll C. Influência dos polimorfismos dos genes *ADIPOQ*, *LEP* e *FTO* no estado nutricional de recém-nascidos. Dissertação, UNIVILLE: 2016.
119. Guzman-Ornelas M-O, Chavarria-Avila E, Munoz-Valle J-F, Armas-Ramos L-E, Castro-Albarran J, Aldrete MEA et al. Association of ADIPOQ +45T>G polymorphism with body fat mass and blood levels of soluble adiponectin and inflammation markers in a Mexican-Mestizo population. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 2012;5 369-378.
120. Motawi T, Salman T, Shaker O, Abdelhamid A Association of polymorphism in adiponectin (+45 T/G) and leptin (-2548 G/A) genes with type 2 diabetes mellitus in male Egyptians. *Archives of Medical Science : AMS.* 2015;11 (5):937-944.
121. Galcheva SV, Martorana D, Iotova VM, Yotov Y, Neri TM, Street ME Associations between two single nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene, its circulating concentrations and cardiometabolic risk factors in prepubertal children with and without abdominal obesity. *J Endocrinol Invest.* 2013;36 (10):869-875.
122. Yan WL, Chen SF, Huang JF, Shen Y, Qiang BQ, Liu DH et al. Common SNPs of APM1 gene are not associated with hypertension or obesity in Chinese population. *Biomed Environ Sci.* 2006;19 (3):179-184.
123. NCBI National Center for Biotechnology Information NCBI. LEP leptin [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952>>. Acesso em 19 jan 2018.
124. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372 (6505):425-432.

125. Verdes G, DuTa CC, Popescu R, Mituletu M, Ursoniu S, Lazar OF Correlation between leptin and ghrelin expression in adipose visceral tissue and clinical-biological features in malignant obesity. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58 (3):923-929.
126. Trayhurn P, Beattie JH Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001;60 (3):329-339.
127. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res*. 1995;5 (1):5-12.
128. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 1997;46 (3):342-347.
129. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*. 1998;47 (6):913-917.
130. Schoof E, Stuppy A, Harig F, Carbon R, Horbach T, Stohr W et al. Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. *Eur J Endocrinol*. 2004;150 (4):579-584.
131. Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. *Eur J Clin Invest*. 2006;36 (6):389-394.
132. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82 (2):579-584.
133. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME The biology of leptin: a review. *Journal of animal science*. 1998;76 (5):1405-1420.
134. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E Genetics of Leptin and Obesity: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. 2005;162 (2):101-114.
135. Ghalandari H, Hosseini-Esfahani F, Mirmiran P The Association of Polymorphisms in Leptin/Leptin Receptor Genes and Ghrelin/Ghrelin Receptor Genes With Overweight/Obesity and the Related Metabolic Disturbances: A Review. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2015;13 (3):e19073.
136. Considine RV Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med*. 2005;5 (1):15-24.
137. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334 (5):292-295.
138. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1 (11):1155-1161.

139. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, LaFerrere B Regulation of leptin production in humans. *J Nutr.* 2000;130 (12):3127s-3131s.
140. Lonnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thorne A, Schalling M, Arner P Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest.* 1997;99 (10):2398-2404.
141. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269 (5223):543-546.
142. Friedman JM Leptin and the regulation of body weigh. *Keio J Med.* 2011;60 (1):1-9.
143. Nelson DL, Cox MM *Princípios de bioquímica de Lehninger.* Porto Alegre: Artmed, 2005.
144. Dhillon WS Appetite regulation: an overview. *Thyroid.* 2007;17 (5):433-445.
145. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404 (6778):661-671.
146. Bloomgarden ZT Gut and adipocyte peptides. *Diabetes Care.* 2006;29 (2):450-456.
147. Bai Y, Zhang S, Kim KS, Lee JK, Kim KH Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem.* 1996;271 (24):13939-13942.
148. Wang MY, Lee Y, Unger RH Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem.* 1999;274 (25):17541-17544.
149. Farooqi IS, O'Rahilly S 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol.* 2014;223 (1):T63-70.
150. NCBI National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variations. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs7799039.
151. Gene Cards Gene Cards®. Human Genome Database. LEP Gene (Protein Coding). Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEP&keywords=lep>>. Acesso em 01 Mar 2018.
152. Kroll C, Mastroeni SS, Veugelers PJ, Mastroeni MF Association of ADIPOQ, LEP, and FTO gene polymorphisms with large for gestational age infants. *American Journal of Human Biology.* 2017;29 (1).
153. Dasgupta S, Salman M, Siddalingaiah LB, Lakshmi GL, Xaviour D, Sreenath J Genetic variants in leptin: Determinants of obesity and leptin levels in South Indian population. *Adipocyte.* 2015;4 (2):135-140.
154. Sahin DS, Tumer C, Demir C, Celik MM, Celik M, Ucar E et al. Association with leptin gene C.-2548 G>A polymorphism, serum leptin levels, and body mass index in Turkish obese patients. *Cell Biochem Biophys.* 2013;65 (2):243-247.

155. Martins MC, Trujillo J, Farias DR, Kac G Polymorphisms in the leptin (rs7799039) gene are associated with an increased risk of excessive gestational weight gain but not with leptin concentration during pregnancy. *Nutr Res.* 2017;47 53-62.
156. Farias DR, Alves-Santos NH, Eshriqui I, Martins MC, Struchiner CJ, Lepsch J et al. Leptin gene polymorphism (rs7799039; G2548A) is associated with changes in serum lipid concentrations during pregnancy: a prospective cohort study. 2019.
157. NCBI National Center for Biotechnology Information. FTO, alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase [Homo sapiens (human)]. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79068>> Acesso em 21 jan 2018.
158. Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* 2007;8 23.
159. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 2007;318 (5855):1469-1472.
160. Zdrojowy-Welna A, Tupikowska M, Kolackov K, Bednarek-Tupikowska G The role of fat mass and obesity-associated gene (FTO) in obesity - an overview. *Endokrynol Pol.* 2014;65 (3):224-231.
161. Vujovic P, Stamenkovic S, Jasnic N, Lakic I, Djurasevic SF, Cvijic G et al. Fasting Induced Cytoplasmic Fto expression in Some Neurons of Rat Hypothalamus. *PLOS ONE.* 2013;8 (5):e63694.
162. Gulati P, Yeo GS The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor. *Diabetologia.* 2013;56 (10):2113-2121.
163. Fredriksson R, Hagglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM et al. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology.* 2008;149 (5):2062-2071.
164. Olszewski PK, Fredriksson R, Olszewska AM, Stephansson O, Alsio J, Radomska KJ et al. Hypothalamic FTO is associated with the regulation of energy intake not feeding reward. *BMC Neurosci.* 2009;10 129.
165. Tews D, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M Regulation of FTO and FTM expression during human preadipocyte differentiation. *Horm Metab Res.* 2011;43 (1):17-21.
166. Wahlen K, Sjolín E, Hoffstedt J The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res.* 2008;49 (3):607-611.
167. Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab U, Pulkkinen L, de Mello VD, Vaittinen M et al. Gene expression of FTO in human subcutaneous adipose tissue, peripheral blood mononuclear cells and adipocyte cell line. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2010;3 (1):37-45.

168. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007;3 (7):e115.
169. Lu Y, Loos RJ Obesity genomics: assessing the transferability of susceptibility loci across diverse populations. *Genome Med.* 2013;5 (6):55.
170. Loos RJ, Yeo GS The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10 (1):51-61.
171. Mao L, Fang Y, Campbell M, Southerland WM Population differentiation in allele frequencies of obesity-associated SNPs. *BMC Genomics.* 2017;18 861.
172. Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, Sebastiani G, de Zegher F, Dunger DB et al. The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93 (4):1501-1505.
173. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CN An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med.* 2008;359 (24):2558-2566.
174. Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos RJ et al. Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet.* 2010;19 (3):545-552.
175. Sovio U, Mook-Kanamori DO, Warrington NM, Lawrence R, Briollais L, Palmer CN et al. Association between common variation at the FTO locus and changes in body mass index from infancy to late childhood: the complex nature of genetic association through growth and development. *PLoS Genet.* 2011;7 (2):e1001307.
176. Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16 (8):1961-1965.
177. Zhao X, Yang Y, Sun BF, Zhao YL, Yang YG FTO and obesity: mechanisms of association. *Curr Diab Rep.* 2014;14 (5):486.
178. Ahmad T, Lee IM, Pare G, Chasman DI, Rose L, Ridker PM et al. Lifestyle interaction with fat mass and obesity-associated (FTO) genotype and risk of obesity in apparently healthy U.S. women. *Diabetes Care.* 2011;34 (3):675-680.
179. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Plomin R Obesity associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93 (9):3640-3643.
180. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr.* 2008;87 (2):398-404.
181. Brunkwall L, Ericson U, Hellstrand S, Gullberg B, Orho-Melander M, Sonestedt E Genetic variation in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) in association with food preferences in healthy adults. *Food Nutr Res.* 2013;57.

182. Tanofsky-Kraff M, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, Wolkoff LE et al. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr*. 2009;90 (6):1483-1488.
183. Speakman JR The 'Fat Mass and Obesity Related' (FTO) gene: Mechanisms of Impact on Obesity and Energy Balance. *Curr Obes Rep*. 2015;4 (1):73-91.
184. NCBI National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variations. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs9939609. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9939609#locus>. Acesso em 19 jan 2018.
185. Gene Cards Gene Cards®. Human Genome Database. FTO Gene (Protein Coding). Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FTO&keywords=fto>>. Acesso em 01 Mar 2018
186. Quan LL, Wang H, Tian Y, Mu X, Zhang Y, Tao K Association of fat-mass and obesity-associated gene FTO rs9939609 polymorphism with the risk of obesity among children and adolescents: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19 (4):614-623.
187. Li H, Kilpelainen TO, Liu C, Zhu J, Liu Y, Hu C et al. Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. *Diabetologia*. 2012;55 (4):981-995.
188. Jiang Y, Mei H, Lin Q, Wang J, Liu S, Wang G et al. Interaction effects of FTO rs9939609 polymorphism and lifestyle factors on obesity indices in early adolescence. *Obes Res Clin Pract*. 2019;13 (4):352-357.
189. Ramos AV, Bastos-Rodrigues L, Resende BA, Friedman E, Campanha-Versiani L, Miranda DM et al. The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. *BMC Medical Genetics*. 2012;13 101-101.
190. Ferreira Todendi P, de Moura Valim AR, Klinger E, Reuter CP, Molina S, Martinez JA et al. The role of the genetic variants IRX3 rs3751723 and FTO rs9939609 in the obesity phenotypes of children and adolescents. *Obes Res Clin Pract*. 2019;13 (2):137-142.
191. da Fonseca ACP, Abreu GM, Zembrzuski VM, Campos Junior M, Carneiro JRI, Nogueira Neto JF et al. The association of the fat mass and obesity-associated gene (FTO) rs9939609 polymorphism and the severe obesity in a Brazilian population. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12 667-684.
192. Fall T, Hagg S, Magi R, Ploner A, Fischer K, Horikoshi M et al. The role of adiposity in cardiometabolic traits: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Med*. 2013;10 (6):e1001474.
193. Labayen I, Ruiz JR, Ortega FB, Dallongeville J, Jimenez-Pavon D, Castillo MJ et al. Association between the FTO rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: a possible link with energy balance control. The HELENA study. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35 (1):66-71.

194. Duicu C, Marginean CO, Voidazan S, Tripon F, Banescu C FTO rs 9939609 SNP Is Associated With Adiponectin and Leptin Levels and the Risk of Obesity in a Cohort of Romanian Children Population. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95 (20):e3709.
195. Yang M, Xu Y, Liang L, Fu J, Xiong F, Liu G et al. The Effects of Genetic Variation in FTO rs9939609 on Obesity and Dietary Preferences in Chinese Han Children and Adolescents. *PLoS One*. 2014;9 (8):e104574.
196. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI et al. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr*. 2008;88 (4):971-978.
197. Steemburgo T, Azevedo MJ, Gross JL, Milagro FI, Campion J, Martinez JA The rs9939609 polymorphism in the FTO gene is associated with fat and fiber intakes in patients with type 2 diabetes. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2013;6 (2):97-106.
198. Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Orho-Melander M Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. *Am J Clin Nutr*. 2009;90 (5):1418-1425.
199. den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp KR Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr*. 2009;90 (5):1426-1432.
200. Oyeyemi BF, Ologunde CA, Olaoye AB, Alamukii NA FTO Gene Associates and Interacts with Obesity Risk, Physical Activity, Energy Intake, and Time Spent Sitting: Pilot Study in a Nigerian Population. *J Obes*. 2017;2017 3245270.
201. Celis-Morales C, Marsaux CF, Livingstone KM, Navas-Carretero S, San-Cristobal R, O'Donovan C B et al. Physical activity attenuates the effect of the FTO genotype on obesity traits in European adults: The Food4Me study. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24 (4):962-969.
202. Sonestedt E, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Hedblad B, Orho-Melander M Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in FTO. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35 (8):1041-1049.
203. Kilpelainen TO, den Hoed M, Ong KK, Grontved A, Brage S, Jameson K et al. Obesity-susceptibility loci have a limited influence on birth weight: a meta-analysis of up to 28,219 individuals. *Am J Clin Nutr*. 2011;93 (4):851-860.
204. Wu YY, Lye S, Briollais L The role of early life growth development, the FTO gene and exclusive breastfeeding on child BMI trajectories. *International Journal of Epidemiology*. 2017;46 (5):1512-1522.
205. Sales WB, Silleno Junior JD, Kroll C, Mastroeni SSBS, Silva JC, Mastroeni MF Influence of altered maternal lipid profile on the lipid profile of the newborn. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2015;59 123-128.
206. Santos D, Contarato AAPF, Kroll C, Bertoli M, Czarnobay SA, Figueirêdo KBW et al. Neck circumference as a complementary measure to identify excess body weight in children aged 13-24 months. *Revista Brasileira de Saude Materno Infantil*. 2015;15 (3):301-307.

207. Kroll C, Mansoni Carraro Trombelli MC, Schultz LF, El Rafihi-Ferreira R, Mastroeni MF Association of LEP-rs7799039 and ADIPOQ-rs2241766 polymorphisms with sleep duration in preschool age children. *Sleep Medicine*. 2019.
208. IBGE *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Censo demográfico 2010. Manual do Recenseador CD - 1.09*. Rio de Janeiro. 2010.
209. Gordon CC, Chumlea WC, Roche AF (1988) Stature, Recumbent Length, and Weight. In *Anthropometric Standardization Reference Manual*, pp. 3-8 [HK Books, editor]. Champaign, Illinois.
210. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*. 2014;384 (9946):857-868.
211. Francis A, Hugh O, Gardosi J Customized vs INTERGROWTH-21st standards for the assessment of birthweight and stillbirth risk at term. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2018;218 (2):S692-S699.
212. WHO World Health Organization. *Indicators for assessing infant and young child feeding practices*. Geneva: 2010.
213. WHO World Health Organization. *Waist circumference and waist–hip ratio: report of a WHO expert consultation*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008.
214. Brasil Ministério da Saúde. *Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde : Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Estatística e Informação em Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde. 2011.
215. Lohman TG, Roche AF, Martorell R *Anthropometric standardization reference manual*. Illinois: Human Kinetics Books. 1988.
216. WHO World Health Organization. *WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development*. . Geneva: 2006.
217. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85 (9):660-667.
218. Whatman FTA Protocol BD08 Preparing an FTA® Disc for DNA Analysis. Disponível em: <<http://www4.ncsu.edu/~rgfranks/research/protocols/FTA%20cards%20protocols/BD08%20-%20Preparing%20an%20FTA%20Disc%20for%20Analysis.pdf>>. Acesso em 24 jan 2018
219. Whatman FTA Protocol BD09 Removing a Sample Disc from an FTA® or CloneSaver™ Card for Analysis. Disponível em: <<http://www4.ncsu.edu/~rgfranks/research/protocols/FTA%20cards%20protocols/BD09%20-%20Punching%20Protocol.pdf>>. Acesso em 24 jan 2018

220. Brasil Ministério da Saúde. Conselho Nacional da Saúde. Resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012. Diário Oficial. 2012.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Conforme Resoluções 196 e 340 do Conselho Nacional de Saúde

Eu, _____ concordo participar do estudo “Preditores da retenção de peso da parturiente no pós-parto, e do estado nutricional do recém-nascido”, sob coordenação dos Profs. Marco F. Mastroeni e Silmara SBS Mastroeni, e dos pesquisadores Sandra A. Czarnobay e Silleno JD Júnior. Esta pesquisa será realizada no período de janeiro a abril de 2012. O objetivo desta pesquisa é determinar os principais preditores da retenção de peso da parturiente no pós-parto, e do estado nutricional de recém-nascidos na Maternidade Darcy Vargas de Joinville, SC. Declaro permitir que os pesquisadores envolvidos na pesquisa obtenham meus dados e de meu filho para serem utilizados exclusivamente nesta pesquisa. Tais dados incluem idade, estado civil, tabagismo, renda, escolaridade, estatura, peso, tipo de parto, idade da menarca, paridade, número de gestações, número de consultas pré-natal, intervalo interpartal, idade gestacional, uso de medicamentos e informações sobre comorbidades. Em relação ao meu filho serão obtidos dados sobre peso, comprimento, apgar, circunferências craniana e torácica ao nascer. Fornecerei todos os dados de forma gratuita. O único exame que irá gerar um desconforto devido a punção venosa será a colheita de sangue para a dosagem dos exames de: colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicerídeos, hemoglobina glicada, leptina, adiponectina e outros metabólitos associados, caso estritamente necessário. Uma gota de sangue será utilizada para o estudo de genes associados à obesidade. Poderei optar em receber ou não os resultados dos exames, os quais poderão ser utilizados para divulgação científica porém, sem a minha identificação e a de meu filho. A amostra de sangue será encaminhada ao laboratório conveniado, onde será processada e analisada. Com o término desta pesquisa minha amostra de sangue e a de meu filho serão descartados pelo coordenador da pesquisa. A amostra contendo o material genético será armazenada na Univille e poderei retirá-la/eliminá-la quando eu julgar necessário. Caso seja diagnosticado qualquer tipo de doença serei imediatamente encaminhada ao SUS para acompanhamento médico. No caso de eventual dano comprovadamente ocasionado pela colheita de sangue, receberei indenização na forma de acompanhamento médico pelo SUS e custeio de medicamentos necessários ao tratamento.

As informações obtidas nesta pesquisa irão contribuir para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde voltadas à prevenção da obesidade materna e do estado nutricional inadequado da criança ao nascer. Permito que toda informação obtida com meus dados e de meu filho seja divulgada em eventos científicos porém, sem que eu e meu filho sejam identificados. Fui esclarecida quanto aos procedimentos a serem realizados na pesquisa e estou ciente que os riscos são mínimos. Em qualquer momento poderei solicitar maiores esclarecimentos sobre o desenvolvimento das atividades e serei prontamente atendida pelos pesquisadores responsáveis. Poderei retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e prejuízo ao seu cuidado. Para outras informações ou esclarecimentos devo entrar em contato com Marco ou Silmara através dos números: 47 3425-8743 ou 9978-2590. Para reclamações, devo entrar em contato com o Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente/Univille, através do número 47 3461-9152. Este termo está redigido em duas vias, uma que ficará sob minha guarda e outra sob a guarda do coordenador da pesquisa.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço – Paulo Malschitzki, 10 - Bairro Zona Industrial - Campus Universitário - CEP 89.219-710 -Joinville/ SC.

Data: _____ / _____ / 2012, Joinville, SC.

Assinatura da parturiente

Prof. Dr. Marco F. Mastroeni (CRB 17.172 03D)
Profª. Drª Silmara S.B.S. Mastroeni (CRN 5765 02R)
Pesquisadores responsáveis

Apêndice B – Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Joinville, 04 de maio de 2011

OFÍCIO N.º 107/2011 - PRPPG/ CEP

Para Prof. Marco Fabio Mastroeni
Projeto de Pesquisa – Ciências Biológicas/MSMA
UNIVILLE

ASSUNTO: Parecer Processo nº 046/2011

O Projeto de pesquisa intitulado **"PREDITORES DA RETENÇÃO DE PESO DA PARTURIENTE NO PÓS-PARTO, E DO ESTADO NUTRICIONAL DO RECÉM-NASCIDO"** e seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de sua responsabilidade, foram **APROVADOS** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, após terem sido analisados e verificados que atendem plenamente aos parâmetros descritos na Res. CNS 196/96 e complementares, e Res. 19/07 CEP/UNIVILLE, conforme parecer em anexo.

Lembramos que, ao finalizar a pesquisa, deverá ser encaminhado ao CEP/UNIVILLE o relatório final.

Atenciosamente,



Eleide Abril Gordon Findlay

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

Apêndice C – Artigo “Association between *FTO* gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study”

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Association between *FTO* gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study

Caroline Kroll  | Paulo Henrique Condeixa de França  | Marco Fabio Mastroeni 

Post-graduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Joinville, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Caroline Kroll, Post-graduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, no. 10., Joinville-Santa Catarina CEP 89.219-710, Brazil.
Email: carolinekroll.bio@gmail.com

Funding information

University of Joinville Region, Grant/Award Number: 4555/2011, 02/2009 and 01/2014.

Abstract

Objective: The aim of this study was to examine the influence of the *FTO*-rs9939609 polymorphism on excess body weight in women during the reproductive transition from pre- to post-pregnancy.

Methods: This was a prospective cohort study covering a period extending from before pregnancy to 2 and 4 years after pregnancy. A total of 435 women were first included in the study and, at last follow-up, 220 of them continued to participate in the study. The *FTO*-rs9939609 polymorphism was analyzed by the polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) method.

Results: The *FTO*-rs9939609 polymorphism was associated with increasing weight and body mass index (BMI) during the follow-up period. Women carrying at least 1 risk allele (A) were significantly heavier ($P < .05$, up to 4.24 kg) and had a 1.30 kg/m² higher BMI. Although the AA genotype was significantly associated with a greater risk compared to the wild-type genotype in the cross-sectional analysis, the results did not differ significantly in the longitudinal analysis (AA genotype, $\beta = 1.20$, 95% CI 0.85–1.68), even after adjustment for pre-pregnancy age, smoking before pregnancy, parity at pregnancy, and gestational weight gain.

Conclusions: The *FTO*-rs9939609 polymorphism was associated with increased weight and BMI in mothers before and after pregnancy. However, we found no significant effect of the polymorphism on excess body weight of women during the reproductive trajectory.

1 | INTRODUCTION

Overweight and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that poses a risk to health (WHO, 2000). According to the WHO, in 2014, more than 1.9 billion adults were overweight, with 600 million of them obese, and most of them women (WHO, 2014). In women, obesity is associated with an increased risk of hypertension, metabolic syndrome, insulin resistance, dyslipidemia, systemic inflammation, cardiovascular disease, sleep apnea, polycystic ovary syndrome, stroke, cancer, and mortality (Azarbad and Gonder-Frederick, 2010). Obesity is also influenced by a variety of genetic, hormonal, environmental, and cultural factors, as well as by reproductive

transitions such as pregnancy and menopause (Azarbad and Gonder-Frederick, 2010).

In the past decade, genome-wide association studies have identified a common variant in the alpha ketoglutarate-dependent dioxygenase *FTO* (fat mass and obesity-associated protein) gene related to overweight and obesity (Frayling et al., 2007). Although the precise mechanism responsible for the effect of *FTO* on obesity is still unclear, *FTO* variants are known to play a central role in the regulation of food intake or energy expenditure (Zhao et al., 2014). The risk allele (“A”) of the *FTO*-rs9939609 polymorphism is associated with increased odds of being either overweight or obese (Celis-Morales et al., 2016; Emond et al., 2017; Frayling et al., 2007; Liu et al., 2010; Lopez-Bermejo et al., 2008; Oyeyemi

et al., 2017; Peng et al., 2011; Ramos et al., 2012; Yang et al., 2012). Studies on pregnant women suggest a positive association of the *FTO*-rs9939609 AA genotype with high pre-pregnancy weight (Lawlor et al., 2011; Martins et al., 2016) and pre-pregnancy BMI (Lawlor et al., 2011; Martins et al., 2016; Wehby and von Hinke Kessler Scholder, 2013), maternal obesity (Wehby and von Hinke Kessler Scholder, 2013), and excessive gestational weight gain (GWG) (Groth and Morrison-Beedy, 2015). Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no studies evaluating the association of *FTO* gene polymorphisms with the reproductive transition from the pre-pregnancy period to 4 years after pregnancy. As many authors reported a high risk of delivering large for gestational age (LGA) newborns among mothers who experienced excessive GWG (Drehmer et al., 2013; Ferraro et al., 2012; Haugen et al., 2014; Mastroeni, 2017), it seems essential to identify factors that help prevent an obesogenic state during the reproductive transition. The aim of this study was to examine the association of the *FTO*-rs9939609 polymorphism with excess body weight in women during this reproductive transition.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design and population

This prospective cohort study is part of the Predictors of Maternal and Infant Excess Body Weight (PREDI) Study initiated in 2012 in Joinville/SC, Brazil, a larger research project examining the determinants and related health outcomes of excess body weight in mothers and their children. An in-depth description of the overall study has been published previously (Mastroeni et al., 2016; Santos et al., 2015). Briefly, all women over 18 years of age who gave birth to a full-term singleton (between 37 and 42 weeks of gestation) and who did not follow any specific type of diet before or during pregnancy or at the time of delivery were invited to participate. Women with a diagnosis of preeclampsia, infectious contagious disease (acquired immune deficiency syndrome, hepatitis, syphilis, and toxoplasmosis), still birth and adoption plans immediately after delivery were excluded from the study.

Figure 1 shows the flow chart of the recruitment and selection of PREDI Study participants. A total of 435 women started the study in 2012. The subjects had been previously informed about the purpose of the study and gave written informed consent to participate. At the first and second follow-up time points, trained researchers took anthropometric measurements, and collected sociodemographic data in the residence of the participants. The 1st follow-up was performed in 2013/2014. After exclusions and losses, 314 women continued to participate in the study. The second follow-up was performed in 2016/2017, when 221 women agreed to continue in the study. Pregnant women, or women who

underwent bariatric surgery or other medical interventions for weight reduction, were not considered in the statistical analysis of anthropometric measurements for the first and second follow-ups. The PREDI study was approved by the Research Ethics Committee of Univille (Protocol No. 107/2011).

2.2 | Data collection

Data were collected using a previously tested, structured questionnaire administered by a trained health professional, which included information about age, marital status, education, household income, parity, smoking, height and weight on the occasion of the 3 data collections. Pre-pregnancy age and weight, parity at pregnancy and smoking before pregnancy were self-reported by the mothers at baseline. For this reason, the pre-pregnancy data are reported as “baseline pre-pregnancy”. Height was measured with a portable stadiometer at baseline and first and second follow-ups. Pre-pregnancy BMI was calculated based on each mother’s self-reported pre-pregnancy weight and immediate postpartum height, measured while still in the maternity unit. The BMI was calculated by dividing weight by height squared (kg/m^2), and was classified according to the BMI cut-offs recommended by the WHO (2000), which classify individuals with a BMI between 25 and $29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ as overweight and those with a BMI $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ as obese. Women with a BMI $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ were considered to have excess body weight. Height and weight were measured by the method of Gordon et al. (1988). The measurements were performed in duplicate and the means were used for analysis.

The GWG was obtained by subtracting self-reported pre-pregnancy weight from the immediate postpartum weight at baseline. Excessive GWG was defined when the mothers exceeded the recommended GWG according to the 2009 Institute of Medicine guidelines (Institute of Medicine, 2009).

2.3 | Genotyping

The genotyping method has been described previously (Kroll et al., 2017). Blood samples were collected by nurses in the pre-delivery room or immediately after delivery at the maternity unit and transferred to an FTA CloneSaver card (GE Healthcare, UK). Genomic DNA was extracted from the cards by an adaptation of the method described by Kline et al. (2002). *FTO*-rs9939609 genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The forward primer: 5'-AACTGGCTCTTGAATGAAATAGGATTCAGA-3' and the reverse primer: 5'-AGAGTAACAGAGACTATCCAAGTGCAGTAC-3' and the *Sal*I enzyme were used in the PCR/RFLP method (Lopez-Bermejo et al., 2008). Genotypes were defined by comparing the corresponding expected restriction patterns of the *FTO*

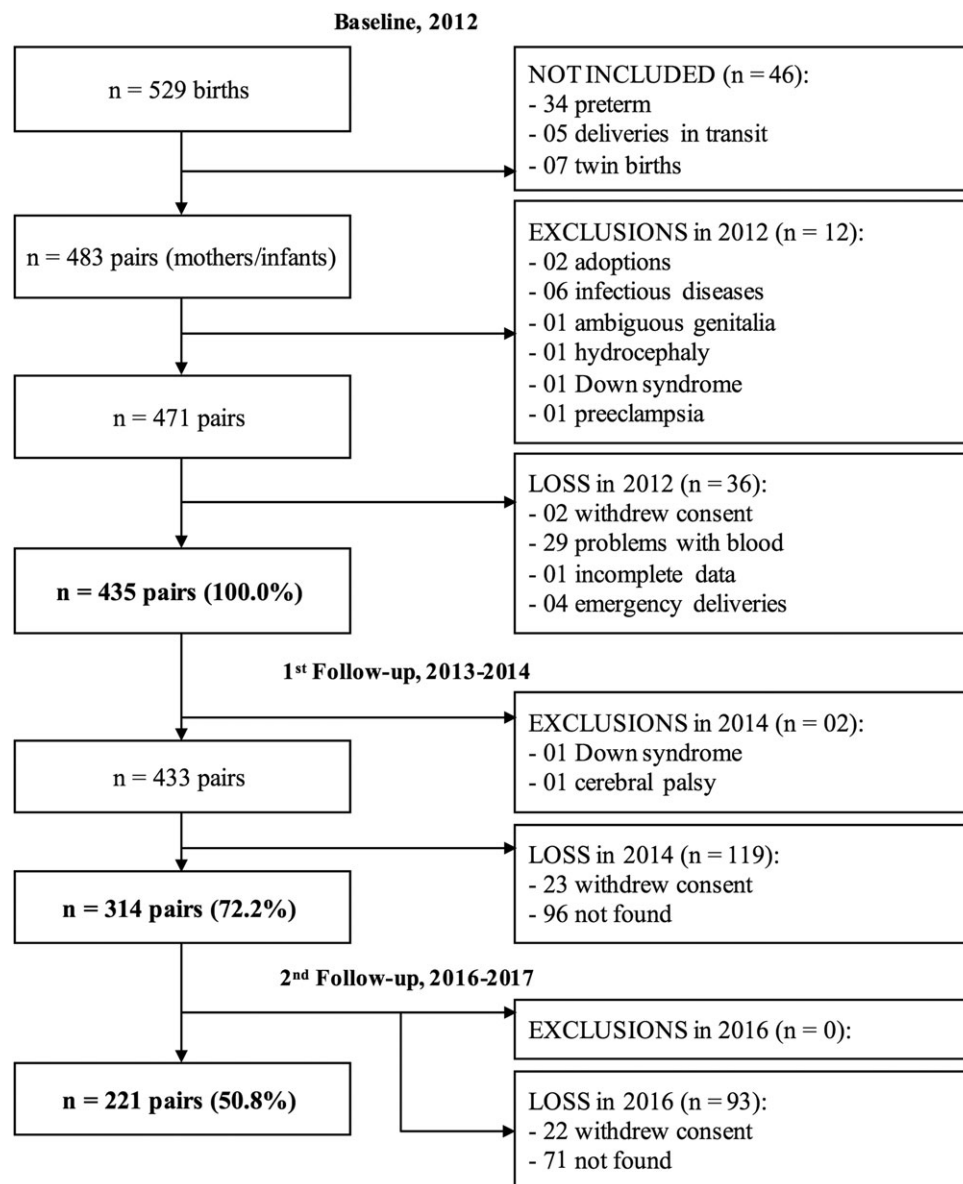


FIGURE 1 Flow chart of participants through the recruitment process. PREDI study, Joinville, Brazil (2012-2017)

gene polymorphism (182 bp for the wild-type allele T; 154 and 28 bp for the risk allele A) using a 50-bp ladder (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania), as described elsewhere (Lopez-Bermejo et al., 2008). Genotyping was performed in duplicate in 5% of randomly selected samples and the concordance rate was 100%. Triplicate samples of the 3 genotypes were Sanger sequenced to confirm the RFLP profiles using the automated AB 3500 Genetic Analyzer equipped with 50 cm capillaries and using POP7 polymer (Applied Biosystems, USA).

2.4 | Statistical analysis

Continuous variables are reported as means and SD for data with normal distribution and as median and interquartile range for data with non-normal distribution. Categorical variables are reported as absolute and relative frequencies. The agreement of the genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested by the chi-square test.

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean weight and BMI according to the *FTO* genotypes in a dominant model (wild-type genotype: TT vs genotypes with at least 1 risk allele: TA + AA).

To investigate the association between excess body weight and the *FTO*-rs9939609 genotypes at each follow-up, odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by logistic regression. An adjusted analysis was carried out to estimate the effect of each genotype on women with excess body weight compared to women of normal weight. We selected important confounders (age, parity, smoking, and GWG as categorical variables) to adjust the models in order to identify the independent polymorphic determinant of excess body weight.

Generalized linear models were used for longitudinal analysis. Poisson regression with robust variance was used to demonstrate the association between genotypes (TT, TA, and AA) and excess body weight ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$) trajectory during the

**TABLE 1** Characteristics of the women included in the follow-ups according to *FTO*-rs9939609 polymorphism genotype

Characteristics	Baseline ^a 2012 (n = 406)			1st follow-up 2013/2014 (n = 295)			2nd follow-up 2016/2017 (n = 198)		
	Median, mean or n (IR, SD or %)			Median, mean or n (IR, SD or %)			Median, mean or n (IR, SD or %)		
	TT	TA	AA	TT	TA	AA	TT	TA	AA
Age (years)	24.0 (9.0) ^b	24.0 (11.0) ^b	25.5 (7.0) ^b	26.3 (8.5) ^b	27.2 (11.5) ^b	27.9 (8.0) ^b	30.0 (9.0) ^b	31.0 (12.0) ^b	33.0 (10.0) ^b
<20 ^c	50 (48.3)	52 (43.3)	10 (8.3)	3 (33.3)	5 (55.6)	1 (11.1)	0	0	0
20-29 ^c	91 (46.2)	79 (40.1)	27 (13.7)	99 (54.1)	69 (37.7)	15 (8.2)	47 (51.6)	37 (40.7)	7 (7.7)
≥ 30 ^c	33 (37.1)	47 (52.8)	9 (10.1)	43 (41.7)	48 (46.6)	12 (11.7)	50 (46.7)	44 (41.1)	13 (12.1)
Marital status									
Married/consensual union ^c	155 (46.1)	141 (42.0)	40 (11.9)	126 (48.3)	108 (41.4)	27 (10.3)	84 (50.0)	66 (39.3)	18 (10.7)
Other ^s	27 (38.6)	37 (52.9)	6 (8.6)	19 (55.9)	14 (41.2)	1 (2.9)	12 (42.9)	14 (50.0)	2 (7.1)
Education (years)	11.0 (3.0) ^b	9.8 (4.0) ^b	10.5 (4.0) ^b	11.0 (3.0) ^b	10.0 (3.0) ^b	11.0 (4.0) ^b	11.0 (4.0) ^b	11.0 (5.0) ^b	11.5 (4.0) ^b
≥ 12 ^c	29 (51.8)	22 (39.3)	5 (8.9)	37 (57.8)	20 (31.3)	7 (10.9)	43 (50.6)	32 (37.6)	10 (11.8)
9-12 ^c	99 (47.6)	81 (38.9)	28 (13.5)	73 (50.7)	57 (39.6)	14 (9.7)	38 (59.4)	20 (31.3)	6 (9.4)
< 9 ^c	54 (38.0)	75 (52.8)	13 (9.2)	35 (40.2)	45 (51.7)	7 (8.0)	15 (31.9)	28 (59.6)	4 (8.5)
Household income (MW) ^d	3.0 (2.0) ^b	3.0 (2.0) ^b	2.0 (3.0) ^b	2.9 (2.3) ^b	2.9 (2.5) ^b	2.9 (3.2) ^b	2.8 (2.0) ^b	2.7 (2.0) ^b	3.1 (2.0) ^b
≥ 5 ^c	41 (47.1)	38 (43.7)	8 (9.2)	24 (44.4)	24 (44.4)	6 (11.1)	9 (36.0)	12 (48.0)	4 (16.0)
3-5 ^c	61 (45.5)	60 (44.8)	13 (9.7)	34 (50.0)	28 (41.2)	6 (8.8)	28 (51.9)	20 (37.0)	6 (11.1)
< 3 ^c	72 (42.9)	72 (42.9)	24 (14.3)	90 (50.6)	72 (40.4)	16 (9.0)	59 (50.4)	48 (41.0)	10 (8.5)
Parity									
0 ^c	82 (49.4)	66 (39.8)	18 (10.8)	0	0	0	0	0	0
1 ^c	47 (41.2)	49 (43.0)	18 (15.8)	62 (56.4)	39 (35.5)	9 (8.2)	28 (57.1)	17 (34.7)	4 (8.2)
2 ^c	34 (42.5)	39 (48.8)	7 (8.8)	40 (45.5)	37 (42.0)	11 (12.5)	34 (46.6)	29 (39.7)	10 (13.7)
≥ 3 ^c	19 (41.3)	24 (52.2)	3 (6.5)	44 (45.4)	45 (46.4)	8 (8.2)	34 (45.9)	34 (45.9)	6 (8.1)
Smoking									
No ^c	152 (47.1)	136 (42.1)	35 (10.8)	129 (49.8)	104 (40.2)	26 (10.0)	87 (50.6)	67 (39.0)	18 (10.5)
Yes ^c	30 (36.1)	42 (50.6)	11 (13.3)	16 (44.4)	18 (50.0)	2 (5.6)	8 (36.4)	12 (54.5)	2 (9.1)
GWG ^e	14.0 (7.2) ^b	13.2 (7.3) ^b	14.0 (7.7) ^b	13.5 (8.0) ^b	13.0 (7.0) ^b	16.5 (7.4) ^b	14.0 (9.0) ^b	13.5 (7.0) ^b	14.0 (8.9) ^b
Non-excessive ^c	99 (44.6)	97 (43.7)	26 (11.7)	76 (49.4)	67 (43.5)	11 (7.1)	53 (48.2)	46 (41.8)	11 (10.0)
Excessive ^c	83 (45.1)	81 (44.0)	20 (10.9)	67 (51.1)	50 (38.2)	14 (10.7)	48 (51.6)	35 (37.6)	10 (10.8)
BMI (kg/m ^d)	23.5 (5.7) ^b	24.3 (6.5) ^b	24.5 (5.3) ^b	25.2 (5.0) ^f	26.2 (5.7) ^f	27.5 (6.5) ^f	26.7 (5.6) ^f	27.7 (5.8) ^f	29.3 (6.8) ^f
< 25 ^c	117 (47.0)	107 (43.0)	25 (10.0)	78 (52.7)	60 (40.5)	10 (6.8)	36 (51.4)	28 (40.0)	6 (8.6)
25-30 ^c	49 (47.6)	39 (37.9)	15 (14.6)	42 (51.2)	29 (35.4)	11 (13.4)	28 (50.0)	22 (39.3)	6 (10.7)
≥ 30 ^c	16 (29.6)	32 (59.3)	6 (11.1)	25 (41.0)	30 (49.2)	6 (9.8)	23 (41.1)	26 (46.4)	7 (12.5)
Weight (kg)	59.0 (16.0) ^b	62.0 (17.0) ^b	60.0 (19.8) ^b	63.5 (17.4) ^b	66.0 (18.5) ^b	64.4 (14.0) ^b	68.6 (15.8) ^f	72.2 (14.8) ^f	73.7 (20.4) ^f
Height (cm)	160.7 (6.5) ^f	161.9 (6.9) ^f	160.8 (7.2) ^f	160.9 (6.1) ^f	161.8 (6.3) ^f	161.6 (5.8) ^f	160.0 (6.1) ^f	161.4 (6.5) ^f	157.9 (5.5) ^f

PREDI study, Joinville, Brazil (2012-2017). Abbreviations: BMI, body mass index; IR, interquartile range; MW, minimum wage; SD, standard deviation.

^a Age, BMI, parity, smoking, weight and height data were considered at pre-pregnancy.

^b Data are reported as median and interquartile range.

^c Data are reported as number of subjects and percentage (%).

^d Monthly household income in MW at baseline, US\$ 355.00; at first follow-up, US\$ 306.00; at second follow-up, US\$ 291.00.

^e Data collected only at baseline.

^f Data are reported as mean and SD.

follow-ups, and an estimate of the relative risk (RR) and 95% CI are reported. Unadjusted analyses were performed and the multivariable analyses were adjusted for potential confounders (pre-pregnancy age, smoking before pregnancy, parity at pregnancy, and GWG as categorical variables). These variables were selected because they were collected at the 3 time points and have been well established as risk factors for BMI in the literature (Dare et al., 2015; Hajiahmadi et al., 2015; Li et al., 2016; Ma et al., 2015; Schimmel et al., 2015).

The variance inflator factor test with commonly applied cut-off values revealed little collinearity among the

independent variables. The results were considered to be statistically significant when $P < .05$. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 22.0, was used for statistical analysis.

3 | RESULTS

The overall characteristics of the women according to the *FTO*-rs9939609 genotypes in the 3 data collections are described in Table 1. The prevalence of excess body weight

**TABLE 2** Mean weight and body mass index of the participants at baseline and at the 2 follow-ups according to *FTO*-rs9939609 genotype

<i>FTO</i> -rs9939609 genotype	n	Weight (kg)		P	BMI (kg/m ²)		P
		Mean ^a	SD		Mean ^a	SD	
Baseline pre-pregnancy				.02			.03
TT	182	61.93	12.65		24.16	4.45	
TA + AA	224	65.15	14.82		25.20	5.25	
First follow-up				.02			.04
TT	145	65.19	14.06		25.16	5.03	
TA + AA	146	69.43	16.63		26.46	5.83	
Second follow-up				.10			.12
TT	87	68.60	15.78		26.75	5.54	
TA + AA	95	72.48	15.98		28.06	5.98	

Abbreviation: BMI, body mass index; SD, standard deviation. PREDI study, Joinville, Brazil (2012-2017).

^a ANOVA.

was 39, 49, and 62% at baseline pre-pregnancy, first follow-up and second follow-up, respectively. The medians/means of years of education (10.5, 11.0, and 11.5 years), household income (2.0, 2.9, and 3.1 MW), weight (60.0, 64.4, and 73.7 kg) and BMI (24.5, 27.5, and 29.3 kg/m²) were higher among the follow-ups in women carrying the AA genotypes. For parity ≥ 3 children (58.7, 54.6, and 54.0%) and smoking (63.9, 55.6, and 63.6%), the proportion of women carrying the risk allele (TA + AA) was higher than that of women carrying the TT genotype. The median GWG obtained at baseline was 14.0, 13.2, and 14.0 kg in women carrying the TT, TA, and AA genotypes, respectively.

The frequencies of the *FTO*-rs9939609 genotypes are shown in Supporting Information S1. The frequencies were 44.8, 50.2, and 49.0% for the TT genotype, 43.9, 41.0, and 40.9% for the TA genotype, and 11.3, 8.8, and 10.1% for the AA genotype at baseline (pre-pregnancy) and at first and second follow-ups, respectively. All frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 2 and Figure 2 show the mean weight and BMI values of the participants according to *FTO*-rs9939609 genotype. In the dominant model, the mean weight and BMI values were higher in women carrying the TA + AA genotypes than in women with the TT genotype among the follow-ups, although the difference was not statistically significant at the 2nd follow-up. At baseline pre-pregnancy, women with the TA + AA genotypes were 3.22 kg heavier ($P = .02$) and had a 1.04 kg/m² higher BMI ($P = .03$) than those with the wild-type genotype. At the 1st follow-up, the weight difference was greater: women with the TA + AA genotypes were 4.24 kg heavier ($P = .02$) and had a 1.30 kg/m² higher BMI ($P = .04$) than TT women.

Table 3 shows the logistic regression of the risk of excess body weight according to *FTO*-rs9939609 genotype. Even though the results were not statistically significant in any of the unadjusted or adjusted models, the chances for excess body weight increased according to the presence of the risk allele at each follow-up. This increase was mainly observed from baseline to the 1st follow-up. Unadjusted and

adjusted analyses (Models 1-4) showed that the presence of the AA genotype increased the likelihood of women having excess body weight at baseline pre-pregnancy and at the first follow-up (OR = 1.51, 95% CI 0.79-2.91 to OR = 1.98, 95% CI 0.85-4.62, models 1 and 3, respectively; OR = 1.44, 95% CI 0.73-2.84 to OR = 1.98, 95% CI 0.79-4.95, models 2 and 4, respectively).

Table 4 shows the longitudinal analysis of excess body weight and *FTO*-rs9939609 genotypes during the follow-up periods. The results of unadjusted analyses revealed that the risk of excess body weight increased with the presence of the risk allele when compared with the wild-type genotype (model 1, TA genotype, $\beta = 1.08$, 95% CI 0.82-1.41; AA genotype, $\beta = 1.22$, 95% CI 0.84-1.78), despite the difference being non-significant. After adjustment for potential confounders (pre-pregnancy age, smoking before pregnancy, parity at pregnancy, and GWG), the results showed a slight decrease in RR, demonstrating a risk of excess body weight only for the AA genotype (model 2: TA genotype, $\beta = 1.02$, 95% CI 0.79-1.32; AA genotype, $\beta = 1.20$, 95% CI 0.85-1.68).

4 | DISCUSSION

Our results showed a significant increase in weight and BMI during a reproductive transition in women carrying the TA + AA genotypes of the *FTO*-rs9939609 polymorphism compared to women carrying the TT genotype. Women carrying the risk allele (A) were up to 4 kg heavier and had a 1 kg/m² higher BMI compared to women carrying the wild-type genotype (TT). We also demonstrated a subtle increase in the risk of having excess body weight in women with the A allele, although without statistical significance. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the association and the effects of the *FTO*-rs9939609 polymorphism in a reproductive transition cohort study. From a public health perception, the determination of genetic variants associated with weight status during a reproductive transition is important to help prevent the gain of excess body

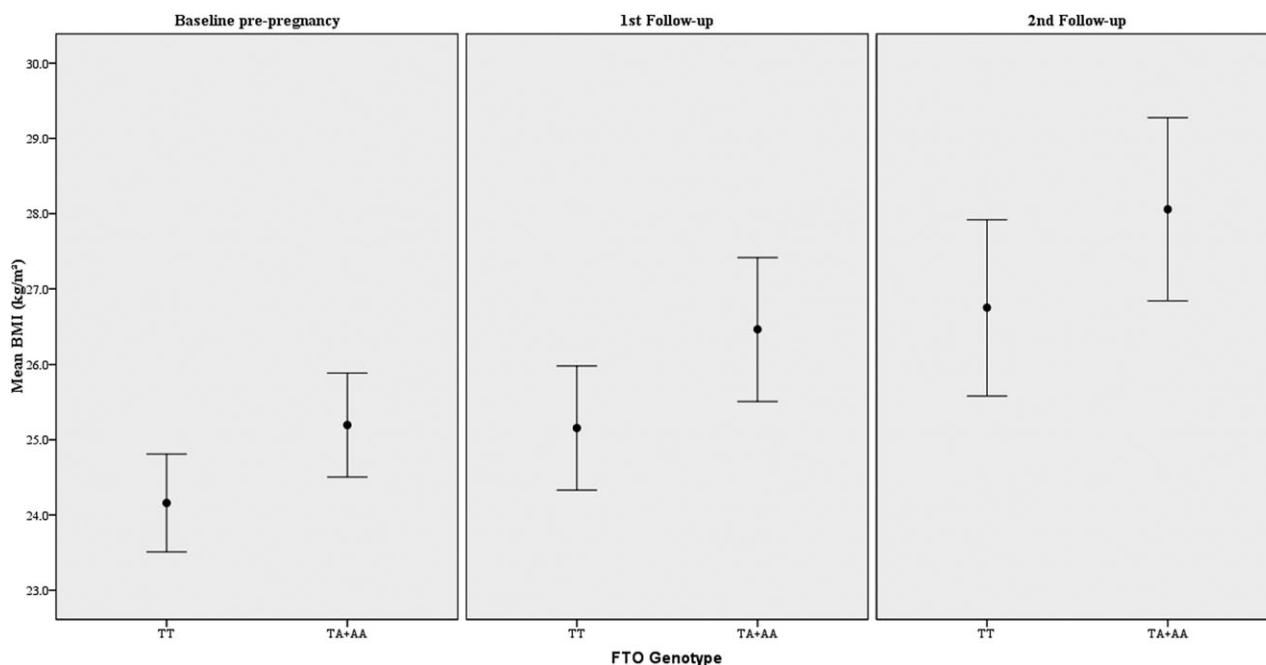


FIGURE 2 Mean BMI according to *FTO*-rs9939609 genotype at baseline and at the 2 follow-ups. Error bars represent the CI for the mean. PREDI study, Joinville, Brazil (2012-2017)

weight by changing family behaviors. The *FTO*-rs9939609 polymorphism has been strongly associated with excess body weight in individuals with different characteristics, including different sex and age groups (Celis-Morales et al., 2016; Emond et al., 2017; Frayling et al., 2007; Liu et al., 2010; Lopez-Bermejo et al., 2008; Oyeyemi et al., 2017; Peng et al., 2011; Ramos et al., 2012; Yang et al., 2012).

Some hypotheses have been raised in an attempt to elucidate the association between the *FTO* gene and weight status. The product of the *FTO* gene is 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase (Gerken et al., 2007), which is particularly expressed in the brain and hypothalamic nuclei, and is involved in the regulation of food intake (Gerken et al., 2007). Although the precise mechanism responsible for the effect of the *FTO* gene on obesity is still unclear, many studies have reported the effect of a risk allele (A) of *FTO*-rs9939609 on energy intake and on the reduction of satiety (den Hoed et al., 2009; Emond et al., 2017; McCaffery et al., 2012; Oyeyemi et al., 2017; Rutters et al., 2010; Sonestedt et al., 2011; Wardle et al., 2008). In addition to having greater energy intake, individuals carrying the risk allele also consume a high-fat diet with less fiber (Ahmad et al., 2010; Moleres et al., 2012; Steemburgo et al., 2013). Furthermore, homozygous AA individuals are more prone to an elevated post-prandial appetite level, which is linked to an interaction between the *FTO* genotype and circulating levels of ghrelin, a key mediator of digestive behavior (Karra et al., 2013). Other studies also suggest an effect of *FTO* on the regulation of proteins in pathways involved in energy intake, such as leptin levels (Labayen et al., 2011) and leptin sensitivity (Wang et al., 2011), and other signaling proteins (Lin et al., 2014; Rask-Andersen et al., 2011). The *FTO*-rs9939609 genotype is also associated with some

metabolites, with evidence having been obtained of changes in phospholipid and amino acid metabolisms that may be linked to obesity and type 2 diabetes in A allele carriers (Kim et al., 2016). *FTO* may also interact epistatically with other variants of other genes, including those encoding the leptin receptor and DNA methyl transferase 3B (den Hoed et al., 2009), and with the environment (Yang et al., 2012).

Regarding the pre-pregnancy period, other authors have also reported higher weight and BMI among women carrying the AA genotype (Lawlor et al., 2011; Martins et al., 2016; Wehby and von Hinke Kessler Scholder, 2013). A study that investigated the association between maternal characteristics and the AA genotype of *FTO*-rs9939609 gene polymorphism in 136 Brazilian women showed 8.9 kg higher weight and 3.4 kg/m² higher BMI (Martins et al., 2016). Our results showed that women carrying the risk allele were 3.22-4.24 kg heavier among the follow-ups than those carrying the wild-type genotype, values higher than those reported in other studies (Celis-Morales et al., 2016; Liu et al., 2010). One study involving 13 cohorts found that individuals with the AA genotype were 3.0 kg heavier than those carrying the wild-type genotype (Frayling et al., 2007). Considering the same AA genotype, a study involving young European and African-American subjects showed that they were 2.18-2.60 kg heavier than those carrying the TT or TA genotypes (Celis-Morales et al., 2016; Liu et al., 2010). The same studies also demonstrated an association between the presence of the A allele and BMI, which increased 0.36-0.54 kg/m² per allele (Celis-Morales et al., 2016; Frayling et al., 2007; Liu et al., 2010). Interestingly, a study in the Nigerian population demonstrated a higher weight and BMI in subjects carrying the risk genotype

**TABLE 3** Effect of the *FTO*-rs993960 genotypes on the risk of excess body weight in women

<i>FTO</i> genotype	Baseline pre-pregnancy (<i>n</i> = 406)				1st follow-up (<i>n</i> = 291)				2nd follow-up (<i>n</i> = 182)			
	Model 1 ^c		Model 2 ^a		Model 3 ^c		Model 4 ^b		Model 5 ^c		Model 6 ^b	
	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>
TT	Reference		Reference		Reference		Reference		Reference		Reference	
TA	1.19 (0.78, 1.83)	.41	1.11 (0.71, 1.72)	.65	1.15 (0.70, 1.86)	.59	1.14 (0.66, 1.97)	.64	1.21 (0.64, 2.28)	.55	1.25 (0.62, 2.54)	.54
AA	1.51 (0.79, 2.91)	.22	1.44 (0.73, 2.84)	.29	1.98 (0.85, 4.62)	.11	1.98 (0.79, 4.95)	.15	1.53 (0.53, 4.40)	.43	1.65 (0.53, 5.17)	.39

PREDI study, Joinville, Brazil (2012–2017). CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^a Model 2: adjusted for age, parity and smoking.

^b Model 4 and 6: adjusted for age, parity, smoking, and GWG.

^c Models 1, 3, and 5: unadjusted ORs.

(6.79 kg and 2.75 kg/m², respectively) (Oyeyemi et al., 2017). In our study, women with at least 1 risk allele had a higher BMI, up to 1.30 kg/m² in TA + AA. This significant association was not confirmed in the 2nd follow-up, possibly due to the smaller number of participants in that study period.

An important finding of this study is that the odds for excess body weight increase per occurrence of risk allele, which may double in women carrying the AA genotype compared to the wild-type genotype. A similar result was also reported in a meta-analysis of population-based studies which showed an increase of 1.31 and 1.18 times the odds of being overweight and obese when carrying the A allele, respectively (Frayling et al., 2007). Celis-Morales et al. (2016) demonstrated that European adults with the risk *FTO* allele had significantly higher odds of being overweight (OR = 1.27) or obese (OR = 1.41). Frayling et al. (2007) also showed a 1.67-fold increase in the odds of obesity in *FTO* allele carriers compared to individuals without the risk allele. From policy and practice perspectives, as women carrying the AA genotype are more likely to gain excess body weight during pregnancy, this also increases the risk of these women giving birth to an LGA infant.

However, our longitudinal analysis showed a low (β = 1.22) and statistically nonsignificant effect of the AA genotype on excess body weight even after adjustment for potential confounders (β = 1.20). Furthermore, no effect on excess body weight was found among people inheriting the heterozygous genotype (β = 1.03, *P* = .84). The limited or negligible effect of the *FTO*-rs9939609 variant on weight status was also detected by other authors, who suggested a potential effect of physical activity on the risk allele (Jacobsson et al., 2009),

despite the well-known high memory bias of this self-reported risk factor (Prince et al., 2008). Another study involving 2 different longitudinal cohorts found no association between the *FTO*-rs993960 polymorphism and BMI in African American individuals (Hallman et al., 2012).

In our study, we attributed the non-significant effect of the *FTO* gene on weight status to the lower number of participants in the 2nd follow-up, mainly in the AA genotype group, which was the group with the smallest number of participants from the beginning. Moreover, the minor allele frequencies (MAFs) in our cohort study (baseline pre-pregnancy: 0.33, first follow-up: 0.29, and second follow-up: 0.31) were lower than those found in other studies conducted on pregnant women (Marginean et al., 2016; Martins et al., 2016) and Brazilian individuals (Ramos et al., 2012) and in other cohort studies (Celis-Morales et al., 2016; Frayling et al., 2007; Hallman et al., 2012; Qi et al., 2008). The low MAF may reduce the ability to see the real effect of the polymorphism due to the smaller number of women carrying at least 1 copy of the risk allele.

Another important finding of this study was the high prevalence of excess body weight among the follow-up periods. From 2011 to 2017, the women gained more weight and consequently increased their BMI. The prevalence of excess body weight ranged from 39% in 2011 to 62% in 2017, a value 22% higher than the worldwide prevalence reported for women by the WHO in 2016 (WHO, 2017). This finding shows that women of reproductive age are a high risk group for accelerated weight gain and obesity (Harrison et al., 2017). Furthermore, critical time windows such as pre-partum, pregnancy, and postpartum involve an intensified increase in weight gain (Harrison et al., 2017). Hence, studies including genetic predisposition to the development of obesity may be especially helpful in mothers, as these women need to take care of themselves as well as their children in terms of diet and life style over a period of many years. Therefore, the sooner we identify the potential genetic predictors of excess body weight, the sooner will it be possible to apply specific interventions such as adequate diets (even during pregnancy), physical activity, and psychological support to avoid the increasing rates of overweight and obesity. For instance, individuals carrying the risk allele might be advised to control the impulse of eating high-fat

TABLE 4 Longitudinal analysis of excess body weight and *FTO*-rs9939609 genotypes in women during the follow-ups

<i>FTO</i> genotype	Model 1 ^a		Model 2 ^b	
	β (95% CI)	<i>P</i>	β (95% CI)	<i>P</i>
TT	Reference		Reference	
TA	1.08 (0.82, 1.41)	.60	1.02 (0.79, 1.32)	.87
AA	1.22 (0.84, 1.78)	.28	1.20 (0.85, 1.68)	.30

PREDI study, Joinville, Brazil (2012–2017).

^a Unadjusted analysis.

^b Adjusted analysis for pre-pregnancy age, smoking before pregnancy, parity at pregnancy and GWG.



foods and to include more fiber in their diet to increase satiety. In addition, some studies indicate that a high level of physical activity diminishes the obesity-promoting effect of *FTO* (Bjornland et al., 2017; Kilpeläinen et al., 2011; Ruiz et al., 2010). A fat intake of <30% (Labayen et al., 2016) and low-protein intake (Qi et al., 2015) may attenuate the genetic predisposition to obesity in the risk allele carriers.

The investigation of the association and the effect of the *FTO*-rs9939609 polymorphism on women's weight status in a reproductive transition is the significant strength of this study. Four years of prospective data collection and the ability to adjust for several important confounding factors are also important strengths of the study. Additionally, many of the same researchers collected the data, including anthropometric measurements at baseline and follow-ups, therefore reducing possible biases.

On the other hand, some limitations should be considered. First, the inclusion of the self-reported pre-pregnancy weight variable makes estimates vulnerable to reporter biases. Nevertheless, a previous study demonstrated that pre-pregnancy weight classification based on self-reports was valid (Shin et al., 2014). Second, our results were obtained from a relatively small cohort of mothers living in Brazil, thereby limiting their comparability to results from other populations. Moreover, the attrition rate at the last time point of data collection was 50.8% from baseline. On the other hand, there was a loss to follow-up of approximately 25% of participants at each time point, a reasonable rate when compared to the >30% loss found in most cohort studies. Third, as is the case with most longitudinal studies, a degree of measurement error may have occurred and affected the accuracy of both the pre- and post-partum variables used in the study. Fourth, the small number of carriers of the AA genotype may have affected the statistical power of the study to detect a significant effect of the polymorphism on weight status among the follow-ups. This fact also affected the possibility of performing interaction analyses. Finally, as we did not analyze ancestry markers in our study, we cannot affirm that the relatively small number of women carrying the risk allele was influenced by racial/ethnic background. Some authors have suggested that the racial/ethnic group may potentially contribute to variations in adiposity levels (Cardel et al., 2011; Lins et al., 2012). Genetic admixture estimates have been used to understand the genetic influence of ethnic variation on body composition parameters (Fernández et al., 2013).

In conclusion, these findings indicate that women carrying the TA + AA genotype of the *FTO*-rs9939609 polymorphism gained more weight and had a higher increase in BMI from the pre-pregnancy period to 4 years after pregnancy. However, these increases had no significant effect on the trajectory of excess body weight in the longitudinal analysis. The real effect of the *FTO*-rs9939609 polymorphism on female excess body weight will

certainly be better investigated in longitudinal studies and with a larger number of participants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the University of Joinville Region for financial support, the Brazilian Federal Agency for Postgraduate Education (CAPES) for the fellowship granted, and Kerstin Markendorf for the English revision.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors read and approved the final version of the article.

Analyzed the data: Kroll, Mastroeni

Designed the study and supervised its implementation and data collection: Mastroeni

Collected the data and drafted the article: Kroll

Edited the article for intellectual content and provided critical comments on the article: Mastroeni, de França

ORCID

Caroline Kroll  <http://orcid.org/0000-0003-4373-5990>

Paulo Henrique Condeixa de França  <https://orcid.org/0000-0002-1750-9132>

Marco Fabio Mastroeni  <http://orcid.org/0000-0001-9276-8866>

REFERENCES

- Ahmad, T., Chasman, D. I., Mora, S., Pare, G., Cook, N. R., Buring, J. E., ... Lee, I. M. (2010). The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. *American Heart Journal*, 160(6), 1163–1169.
- Azarbad, L., & Gonder-Frederick, L. (2010). Obesity in women. *The Psychiatric Clinics of North America*, 33(2), 423–440.
- Bjornland, T., Langaas, M., Grill, V., & Mostad, I. L. (2017). Assessing gene-environment interaction effects of *FTO*, *MC4R* and lifestyle factors on obesity using an extreme phenotype sampling design: Results from the HUNT study. *PLoS One*, 12(4), e0175071.
- Cardel, M., Higgins, P. B., Willig, A. L., Keita, A. D., Casazza, K., Gower, B. A., & Fernandez, J. R. (2011). African genetic admixture is associated with body composition and fat distribution in a cross-sectional study of children. *International journal of obesity* (2005), 35(1), 60–65.
- Celis-Morales, C., Marsaux, C. F., Livingstone, K. M., Navas-Carretero, S., San-Cristobal, R., O'Donovan, C. B., et al. (2016). Physical activity attenuates the effect of the *FTO* genotype on obesity traits in European adults: The Food4Me study. *Obesity (Silver Spring, Md)*, 24(4), 962–969.
- Dare, S., Mackay, D. F., & Pell, J. P. (2015). Relationship between smoking and obesity: A cross-sectional study of 499,504 middle-aged adults in the UK general population. *PLoS One*, 10(4), e0123579.
- den Hoed, M., Westerterp-Plantenga, M. S., Bouwman, F. G., Mariman, E. C., & Westerterp, K. R. (2009). Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in *FTO*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1426–1432.
- Drehmer, M., Duncan, B. B., Kac, G., & Schmidt, M. I. (2013). Association of second and third trimester weight gain in pregnancy with maternal and fetal outcomes. *PLoS One*, 8(1), e54704.



- Emond, J. A., Tovar, A., Li, Z., Lansigan, R. K., & Gilbert-Diamond, D. (2017). FTO genotype and weight status among preadolescents: Assessing the mediating effects of obesogenic appetitive traits. *Appetite*, 117, 321–329.
- Fernández, J. R., Pearson, K. E., Kell, K. P., & Brown, M. M. B. (2013). Genetic admixture and obesity: Recent perspectives and future applications. *Human Heredity*, 75(2–4), 98–105. <https://doi.org/10.1159/000353180>.
- Ferraro, Z. M., Barro wman, N., Prud'homme, D., Walker, M., Wen, S. W., Rodger, M., & Adamo, K. B. (2012). Excessive gestational weight gain predicts large for gestational age neonates independent of maternal body mass index. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*, 25(5), 538–542.
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., et al. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5826), 889–894.
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., et al. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5855), 1469–1472.
- Gordon, C. C., Chumlea, W. C., & Roche, A. F. (1988). Stature, recumbent Length, and weight. In *Anthropometric Standardization Reference Manual* (pp. 3–8). Champaign, IL: Human Kinetics Books.
- Groth, S. W., & Morrison-Beedy, D. (2015). GNB3 and FTO polymorphisms and pregnancy weight gain in black women. *Biological Research for Nursing*, 17(4), 405–412.
- Hajiahmadi, M., Shafi, H., & Delavar, M. A. (2015). Impact of parity on obesity: A cross-sectional study in Iranian women. *Medical Principles and Practice : International journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 24(1), 70–74.
- Hallman, D. M., Friedel, V. C., Eissa, M. A. H., Boerwinkle, E., Huber, J. C., Harrist, R. B., ... Berenson, G. S. (2012). The association of variants in the FTO gene with longitudinal body mass index profiles in non-Hispanic white children and adolescents. *International Journal of Obesity* (2005), 36(1), 61–68.
- Harrison, C. L., Skouteris, H., Boyle, J., & Teede, H. J. (2017). Preventing obesity across the preconception, pregnancy and postpartum cycle: Implementing research into practice. *Midwifery*, 52, 64–70.
- Haugen, M., Brantsaeter, A. L., Winkvist, A., Lissner, L., Alexander, J., Oftedal, B., ... Meltzer, H. M. (2014). Associations of pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with pregnancy outcome and postpartum weight retention: A prospective observational cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 14, 201.
- Institute of Medicine (2009). National Research Council Committee to reexamine, I. O. M. Pregnancy weight guidelines. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In K. M. Rasmussen & A. L. Yaktine (Eds.), *Weight Gain during Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington, DC: National Academies Press (US). National Academy of Sciences.
- Jacobsson, J. A., Riserus, U., Axelsson, T., Lannfelt, L., Schioth, H. B., & Fredriksson, R. (2009). The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920–1924. *BMC medical genetics*, 10(131).
- Karra, E., O'Daly, O. G., Choudhury, A. I., Yousseif, A., Millership, S., Neary, M. T., et al. (2013). A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3539–3551.
- Kilpeläinen, T. O., Qi, L., Brage, S., Sharp, S. J., Sonestedt, E., Demerath, E., et al. (2011). Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: A meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Medicine*, 8(11), e1001116.
- Kim, Y. J., Lee, H. S., Kim, Y. K., Park, S., Kim, J. M., Yun, J. H., ... Kim, B. J. (2016). Association of Metabolites with obesity and type 2 diabetes based on FTO genotype. *PLoS One*, 11(6), e0156612.
- Kline, M. C., Duewer, D. L., Redman, J. W., Butler, J. M., & Boyer, D. A. (2002). Polymerase chain reaction amplification of DNA from aged blood stains: Quantitative evaluation of the "suitability for purpose" of four filter papers as archival media. *Analytical Chemistry*, 74(8), 1863–1869.
- Kroll, C., Mastroeni, S. S., Veugelers, P. J., & Mastroeni, M. F. (2017). Association of ADIPOQ, LEP, and FTO gene polymorphisms with large for gestational age infants. *American Journal of Human Biology*, 29:e22893, 1–9.
- Labayen, I., Ruiz, J. R., Huybrechts, I., Ortega, F. B., Arenaza, L., Gonzalez-Gross, M., et al. (2016). Dietary fat intake modifies the influence of the FTO rs9939609 polymorphism on adiposity in adolescents: The HEL-ENA cross-sectional study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 26(10), 937–943.
- Labayen, I., Ruiz, J. R., Ortega, F. B., Dallongeville, J., Jimenez-Pavon, D., Castillo, M. J., et al. (2011). Association between the FTO rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: A possible link with energy balance control. The HELENA study. *International Journal of Obesity* (2005), 35(1), 66–71.
- Lawlor, D. A., Fraser, A., Macdonald-Wallis, C., Nelson, S. M., Palmer, T. M., Davey Smith, G., & Tilling, K. (2011). Maternal and offspring adiposity-related genetic variants and gestational weight gain. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 149–155.
- Li, W., Wang, Y., Shen, L., Song, L., Li, H., Liu, B., ... Wang, Y. (2016). Association between parity and obesity patterns in a middle-aged and older Chinese population: A cross-sectional analysis in the Tongji-Dongfeng cohort study. *Nutrition & Metabolism*, 13, 72.
- Lin, L., Hales, C. M., Garber, K., & Jin, P. (2014). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Human Molecular Genetics*, 23(12), 3299–3306.
- Lins, T. C., Pires, A. S., Paula, R. S., Moraes, C. F., Vieira, R. G., Vianna, L. G., ... Pereira, R. W. (2012). Association of serum lipid components and obesity with genetic ancestry in an admixed population of elderly women. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 575–582.
- Liu, G., Zhu, H., Lagou, V., Gutin, B., Stallmann-Jorgensen, I. S., Treiber, F. A., ... Snieder, H. (2010). FTO variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European- and African-American youth. *BMC Medical Genetics*, 11, 57.
- Lopez-Bermejo, A., Petry, C. J., Diaz, M., Sebastiani, G., de Zegher, F., Dunger, D. B., & Ibanez, L. (2008). The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(4), 1501–1505.
- Ma, D., Szeto, I. M., Yu, K., Ning, Y., Li, W., Wang, J., ... Wang, P. (2015). Association between gestational weight gain according to prepregnancy body mass index and short postpartum weight retention in postpartum women. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 34(2), 291–295.
- Marginean, C., Marginean, C. O., Iancu, M., Melit, L. E., Tripon, F., & Banescu, C. (2016). The FTO rs9939609 and LEPR rs1137101 mothers-newborns gene polymorphisms and maternal fat mass index effects on anthropometric characteristics in newborns: A cross-sectional study on mothers-newborns gene polymorphisms-the FTO-LEPR study (STROBE-compliant article). *Medicine*, 95(49), e5551.
- Martins, M. C., Trujillo, J., Farias, D. R., Struchiner, C. J., & Kac, G. (2016). Association of the FTO (rs9939609) and MC4R (rs17782313) gene polymorphisms with maternal body weight during pregnancy. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*, 32(11–12), 1223–1230.
- Mastroeni, M. F. (2017). Breast-feeding duration for the prevention of excess body weight of mother-child pairs concurrently: A 2-year cohort study. *Maternal & Child Nutrition*, 20(14), 2537–2548.
- Mastroeni, M. F., Czamobay, S. A., Kroll, C., Figueiredo, K. B., Mastroeni, S. S., Silva, J. C., ... Veugelers, P. J. (2016). The independent importance of pre-pregnancy weight and gestational weight gain for the prevention of large-for gestational age Brazilian newborns. *Maternal and Child Health Journal*, 21(4), 705–714.
- McCaffery, J. M., Papandonatos, G. D., Peter, I., Huggins, G. S., Raynor, H. A., Delahanty, L. M., ... Wing, R. R. (2012). Obesity susceptibility loci and dietary intake in the look AHEAD trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(6), 1477–1486.
- Moleres, A., Ochoa, M. C., Rendo-Urteaga, T., Martinez-Gonzalez, M. A., Azcona San Julian, M. C., Martinez, J. A., & Marti, A. (2012). Dietary fatty acid distribution modifies obesity risk linked to the rs9939609 polymorphism of the fat mass and obesity-associated gene in a Spanish case-control study of children. *The British Journal of Nutrition*, 107(4), 533–538.
- Oyeyemi, B. F., Ologunde, C. A., Olaoye, A. B., & Alamukii, N. A. (2017). FTO Gene Associates and interacts with obesity risk, physical activity, energy intake, and time spent sitting: Pilot study in a Nigerian population. *Journal of Obesity*, 2017, 3245270.



- Peng, S., Zhu, Y., Xu, F., Ren, X., Li, X., & Lai, M. (2011). FTO gene polymorphisms and obesity risk: A meta-analysis. *BMC Medicine*, 9, 71.
- Prince, S. A., Adamo, K. B., Hamel, M. E., Connor Gorber, S., & Tremblay, M. A. (2008). comparison of direct versus self-report measures for assessing physical activity in adults: a systematic review. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*, 5(56).
- Qi, L., Kang, K., Zhang, C., van Dam, R. M., Kraft, P., Hunter, D., ... Hu, F. B. (2008). Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: Longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes*, 57(11), 3145–3151.
- Qi, Q., Downer, M. K., Kilpeläinen TO, Taal, H. R., Barton, S. J., Ntalla, I., et al. (2015). Dietary intake, FTO genetic variants, and adiposity: A combined analysis of over 16,000 children and adolescents. *Diabetes*, 64(7), 2467–2476.
- Ramos AV, Bastos-Rodrigues L, Resende BA, Friedman E, Campanha-Versiani L, Miranda DM, Sarquis M, De Marco L. 2012. The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. *BMC Medical Genetics*, 13(101), 1–9.
- Rask-Andersen, M., Almen, M. S., Olausen, H. R., Olszewski, P. K., Eriksson, J., Chavan, R. A., ... Schiöth, H. B. (2011). Functional coupling analysis suggests link between the obesity gene FTO and the BDNF-NTRK2 signaling pathway. *BMC Neuroscience*, 12, 117.
- Ruiz, J. R., Labayen, I., Ortega, F. B., Legry, V., Moreno, L. A., Dallongeville, J., ... HELENA Study Group. (2010). Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: The HELENA study. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 164(4), 328–333.
- Rutters, F., Lemmens, S. G., Born, J. M., Bouwman, F., Nieuwenhuizen, A. G., Mariman, E., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2010). Genetic associations with acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. *Patient Education and Counseling*, 79(3), 367–371.
- Santos, D. D., Contarato, A. A. P. F., Czarnobay, S. A., Kroll, C., Mastroeni, M. F., Mastroeni, S. S. D. B. S., ... Bertoli, M. (2015). Neck circumference as a complementary measure to identify excess body weight in children aged 13–24 months. *Rev bras saúde matern infant*, 15(3), 301–307.
- Schimmel, M. S., Bromiker, R., Hammerman, C., Chertman, L., Ioscovich, A., Granovsky-Grisaru, S., ... Elstein, D. (2015). The effects of maternal age and parity on maternal and neonatal outcome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 291(4), 793–798.
- Shin, D., Chung, H., Weatherspoon, L., & Song, W. O. (2014). Validity of pre-pregnancy weight status estimated from self-reported height and weight. *Maternal and Child Health Journal*, 18(7), 1667–1674.
- Sonestedt, E., Gullberg, B., Ericson, U., Wirfalt, E., Hedblad, B., & Orho-Melander, M. (2011). Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in FTO. *International journal of obesity* (2005), 35(8), 1041–1049.
- Steemburgo, T., Azevedo, M. J., Gross, J. L., Milagro, F. I., Campion, J., & Martinez, J. A. (2013). The rs9939609 polymorphism in the FTO gene is associated with fat and fiber intakes in patients with type 2 diabetes. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 6(2), 97–106.
- Wang, P., Yang, F. J., Du, H., Guan, Y. F., Xu, T. Y., Xu, X. W., ... Miao, C. Y. (2011). Involvement of leptin receptor long isoform (LepRb)-STAT3 signaling pathway in brain fat mass- and obesity-associated (FTO) downregulation during energy restriction. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*, 17(5–6), 523–532.
- Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C. M., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S., & Plomin, R. (2008). Obesity associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(9), 3640–3643.
- Wehby, G. L., & von Hinke Kessler Scholder, S. (2013). Genetic instrumental variable studies of effects of prenatal risk factors. *Biodemography and Social Biology*, 59(1), 4–36.
- WHO. 2000. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO consultation. Author. Report nr 0512–3054 (Print); 0512–3054 (Linking). p. 894.
- WHO. 2014. World Health Organization. Global Status Reported on Noncommunicable Diseases 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- WHO. 2017. World Health Organization. Obesity and overweight. . Media centre.
- Yang, J., Loos, R. J., Powell, J. E., Medland, S. E., Speliotes, E. K., Chasman, D. I., et al. (2012). FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature*, 490(7419), 267–272.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Zhao, Y. L., & Yang, Y. G. (2014). FTO and obesity: Mechanisms of association. *Current Diabetes Reports*, 14(5), 486.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Kroll C, de França PHC, Mastroeni MF. Association between *FTO* gene polymorphism and excess body weight in women from before to after pregnancy: A cohort study. *Am J Hum Biol*. 2018:e23164. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23164>

Apêndice F – Sintaxe das análises estatísticas realizadas

MODELOS ESTATÍSTICOS ARTIGO MULHERES x *FTO*

Regressão Logística ajustada para cada período da coorte

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES PrepregBMI_WHO1997Cat2
/METHOD=ENTER FTO_mother Age_pregpregnancy_Cat Parity_Before_Pregnancy_Cat
SmokeBeforePreg
/CONTRAST (FTO_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (Age_pregpregnancy_Cat)=Indicator(1)
/CONTRAST (Parity_Before_Pregnancy_Cat)=Indicator(1)
/CONTRAST (SmokeBeforePreg)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Mother_WHO_1997Cat_P2
/METHOD=ENTER FTO_mother AgeMotherCat3_P2 SmokeAfterPreg_P2 ExcessiveGWG
Parity_P2_Cat
/CONTRAST (FTO_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (AgeMotherCat3_P2)=Indicator(1)
/CONTRAST (SmokeAfterPreg_P2)=Indicator(1)
/CONTRAST (ExcessiveGWG)=Indicator(1)
/CONTRAST (Parity_P2_Cat)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Mother_P4_Cat_3
/METHOD=ENTER FTO_mother Mothers_Age_Cat_2_P4 Smoking_P4 ExcessiveGWG
Parity_P4_Cat
/CONTRAST (FTO_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (Mothers_Age_Cat_2_P4)=Indicator(1)
/CONTRAST (Smoking_P4)=Indicator(1)
/CONTRAST (ExcessiveGWG)=Indicator(1)
/CONTRAST (Parity_P4_Cat)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

Regressão de Poisson ajustada com análise robusta

```
GENLIN Excessive_BMI_until_P4 BY FTO_mother Age_pregpregnancy_Cat
Parity_Before_Pregnancy_Cat_3 SmokeBeforePreg ExcessiveGWG (ORDER=DESCENDING)
/MODEL FTO_mother Age_pregpregnancy_Cat Parity_Before_Pregnancy_Cat_3
SmokeBeforePreg ExcessiveGWG
INTERCEPT=YES
DISTRIBUTION=POISSON LINK=LOG
/CRITERIA METHOD=FISHER(1) SCALE=1 COVB=ROBUST MAXITERATIONS=100
MAXSTEPHALVING=5
PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012 ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95
CITYPE=WALD
LIKELIHOOD=FULL
/MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE
/PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION (EXPONENTIATED).
```

MODELOS ESTATÍSTICOS ARTIGO CRIANÇAS x *LEP/ADIPOQ*

Regressão Logística ajustada para cada período da coorte

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Weigth_Intergrowth_Centile_Cat_2  
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn Age_at_Birth FamilyIncomeMS  
PrepregnancyBMI Parity  
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/CONTRAST (LEP_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/PRINT=CI(95)  
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Child_WHO_Cat_P2  
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn BMI_Mother_P2 AgeMother_P2  
FamilyIncomeMS_P2 Parity_P2 BF_days  
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/CONTRAST (LEP_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/PRINT=CI(95)  
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Child_P4_WHO_2006_Cat  
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn BMI_Mother_P4 Mothers_Age_P4  
Family_Income_MS_P4 Parity_P4 BF_days  
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/CONTRAST (LEP_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/PRINT=CI(95)  
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Child_P6_WHO_2007_Cat_2  
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn BMI_Mother_P6 Mothers_Age_P6  
Family_Income_MS_P6 Parity_P6 BF_days  
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/CONTRAST (LEP_Cat_newborn)=Indicator(1)  
/PRINT=CI(95)  
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

Regressão de Poisson ajustada com análise robusta

```
GENLIN Overweight_Children_untilP6 BY ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn  
(ORDER=DESCENDING) WITH Age_at_Birth FamilyIncomeMS Parity PrepregnancyBMI BF_days  
/MODEL ADIPOQ_Cat_newborn LEP_Cat_newborn Age_at_Birth FamilyIncomeMS Parity  
PrepregnancyBMI BF_days INTERCEPT=YES  
DISTRIBUTION=POISSON LINK=LOG  
/CRITERIA METHOD=FISHER(1) SCALE=1 COVB=ROBUST MAXITERATIONS=100  
MAXSTEPHALVING=5 PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012  
ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95 CITYPE=WALD LIKELIHOOD=FULL  
/MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE  
/PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION (EXPONENTIATED).
```

MODELOS ESTATÍSTICOS ARTIGO MULHERES *LEP/ADIPOQ*

Regressão Logística ajustada para cada período da coorte

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES PrepregBMI_WHO1997Cat2
/METHOD=ENTER Age_pregpregnacy Parity_Before_Pregnancy ADIPOQ_Cat_mother
LEP_Cat_mother
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (LEP_Cat_mother)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Mother_WHO_1997Cat_P2
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_mother LEP_Cat_mother AgeMother_P2 Parity_P2
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (LEP_Cat_mother)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Mother_P4_Cat_3
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_mother LEP_Cat_mother Mothers_Age_P4 Parity_P4
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (LEP_Cat_mother)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES BMI_Mother_P6_Cat_3
/METHOD=ENTER ADIPOQ_Cat_mother LEP_Cat_mother Mothers_Age_P6 Parity_P6
/CONTRAST (ADIPOQ_Cat_mother)=Indicator(1)
/CONTRAST (LEP_Cat_mother)=Indicator(1)
/PRINT=CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

Regressão de Poisson ajustada com análise robusta

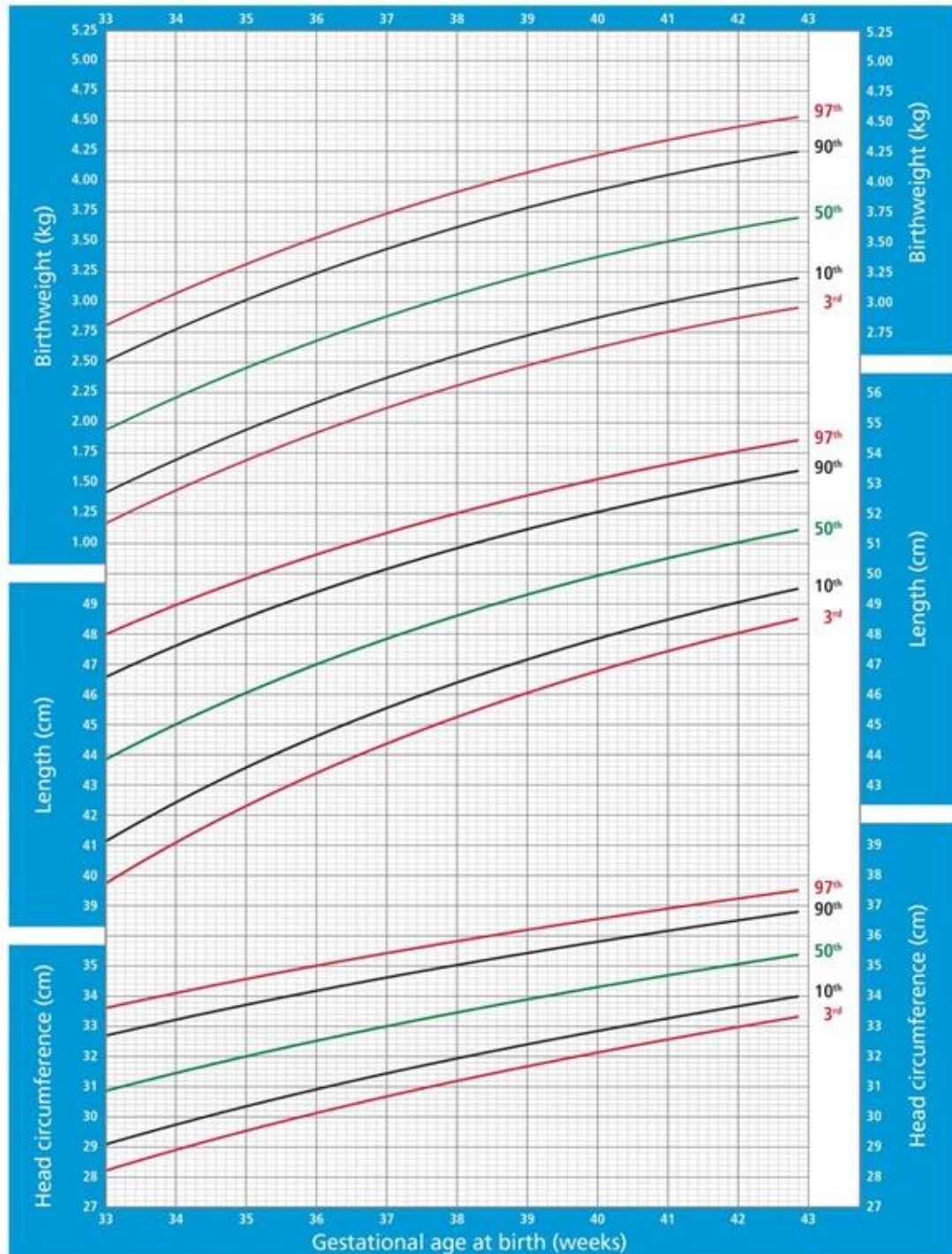
```
GENLIN Overweight_mothers_untilP6 BY LEP_Cat_mother ADIPOQ_Cat_mother
(ORDER=DESCENDING) WITH Age_pregpregnacy
/MODEL LEP_Cat_mother Age_pregpregnacy ADIPOQ_Cat_mother INTERCEPT=YES
DISTRIBUTION=POISSON LINK=LOG
/CRITERIA METHOD=FISHER(1) SCALE=1 COVB=ROBUST MAXITERATIONS=100
MAXSTEPHALVING=5 PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012
ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95 CITYPE=WALD LIKELIHOOD=FULL
/MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE
/PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION (EXPONENTIATED) COVB
CORB LMATRIX GEF HISTORY(1).
```

```
GENLIN Overweight_mothers_untilP6 BY LEP_Cat_mother ADIPOQ_Cat_mother
(ORDER=DESCENDING) WITH Age_pregpregnacy Parity_Before_Pregnancy
/MODEL LEP_Cat_mother ADIPOQ_Cat_mother Age_pregpregnacy Parity_Before_Pregnancy
INTERCEPT=YES
DISTRIBUTION=POISSON LINK=LOG
/CRITERIA METHOD=FISHER(1) SCALE=1 COVB=ROBUST MAXITERATIONS=100
MAXSTEPHALVING=5 PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012
ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95 CITYPE=WALD LIKELIHOOD=FULL
/MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE
/PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION (EXPONENTIATED) COVB
CORB LMATRIX GEF HISTORY(1).
```

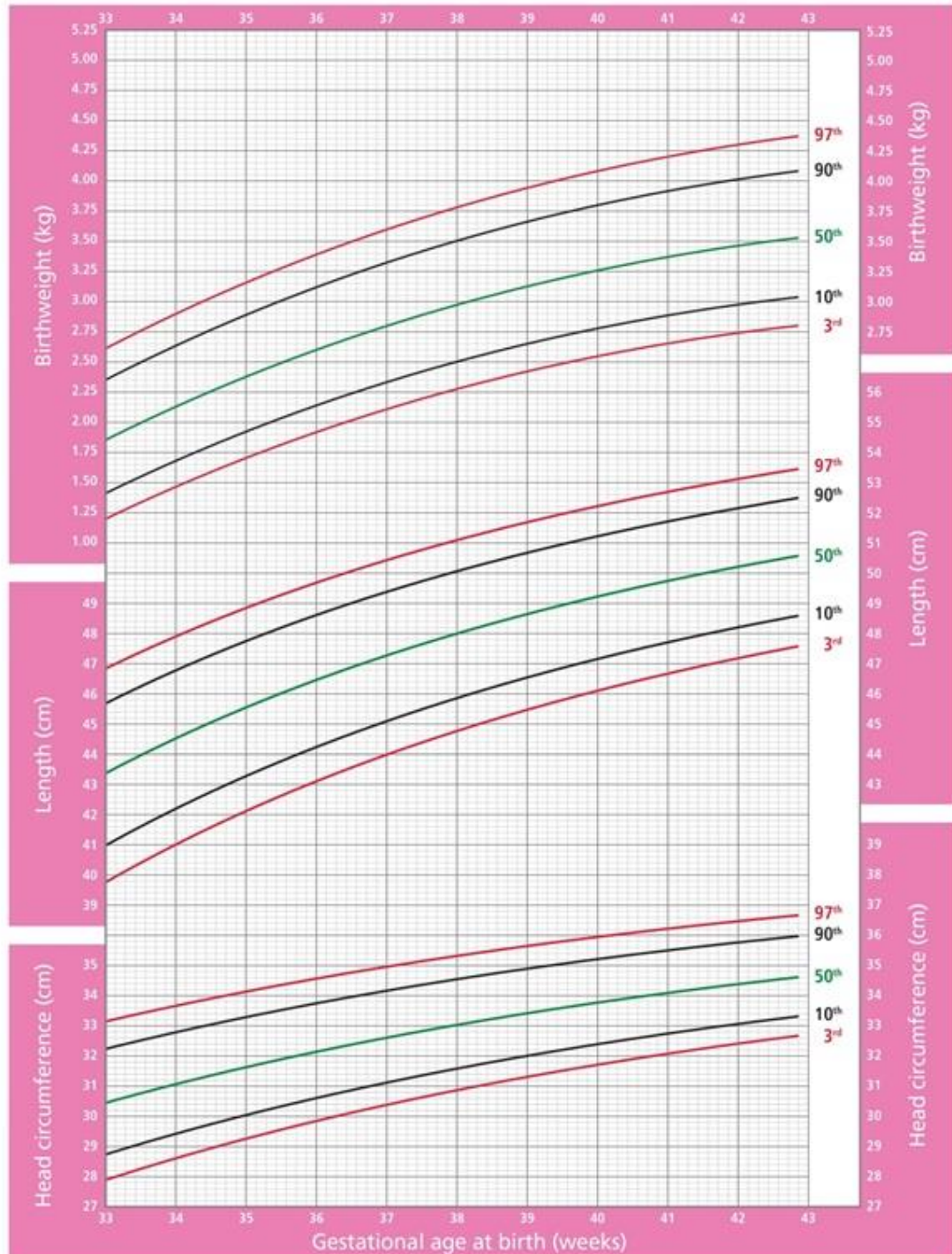
ANEXOS

**Anexo A – Curvas de crescimento fetal e neonatal INTERGROWTH-21st para
meninos e meninas**

International Standards for Size at Birth (Boys)



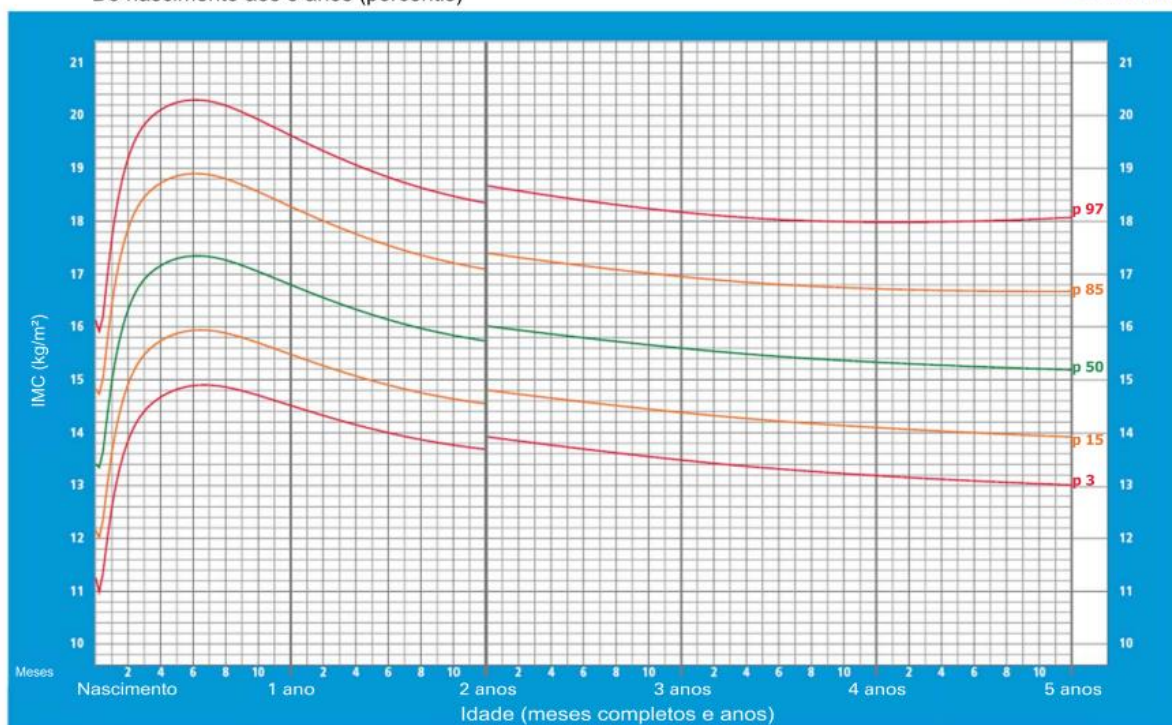
International Standards for Size at Birth (Girls)



**Anexo B – Curva de crescimento de acordo com o IMC por idade para meninos
e para meninas menores de 5 anos**

IMC por Idade MENINOS

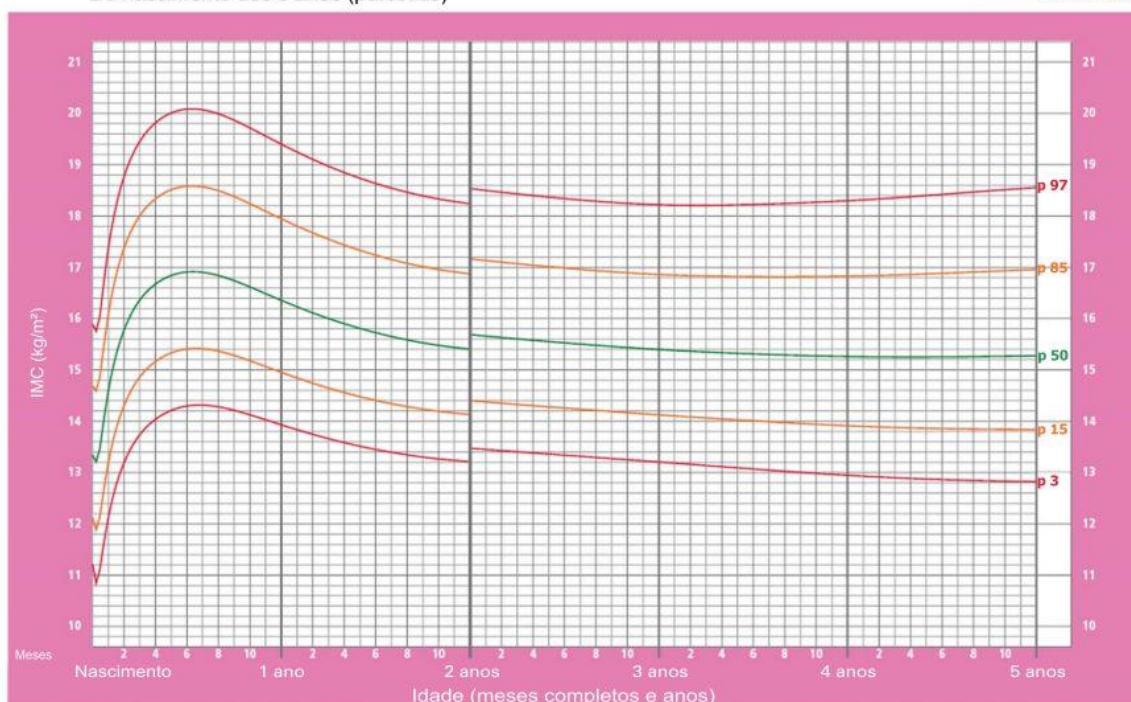
Do nascimento aos 5 anos (percentis)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

IMC por Idade MENINAS

Do nascimento aos 5 anos (percentis)

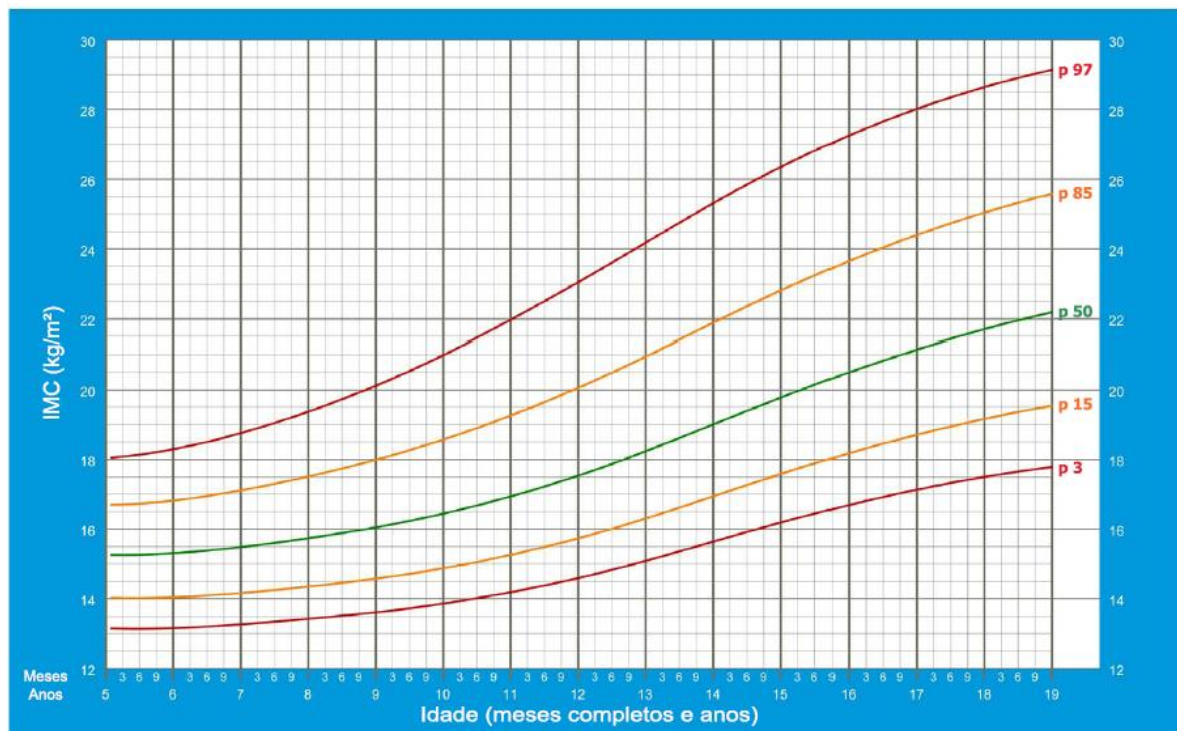


Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

**Anexo C – Curva de crescimento de acordo com o IMC por idade para meninos
e para meninas de 5 a 19 anos**

IMC por idade MENINOS

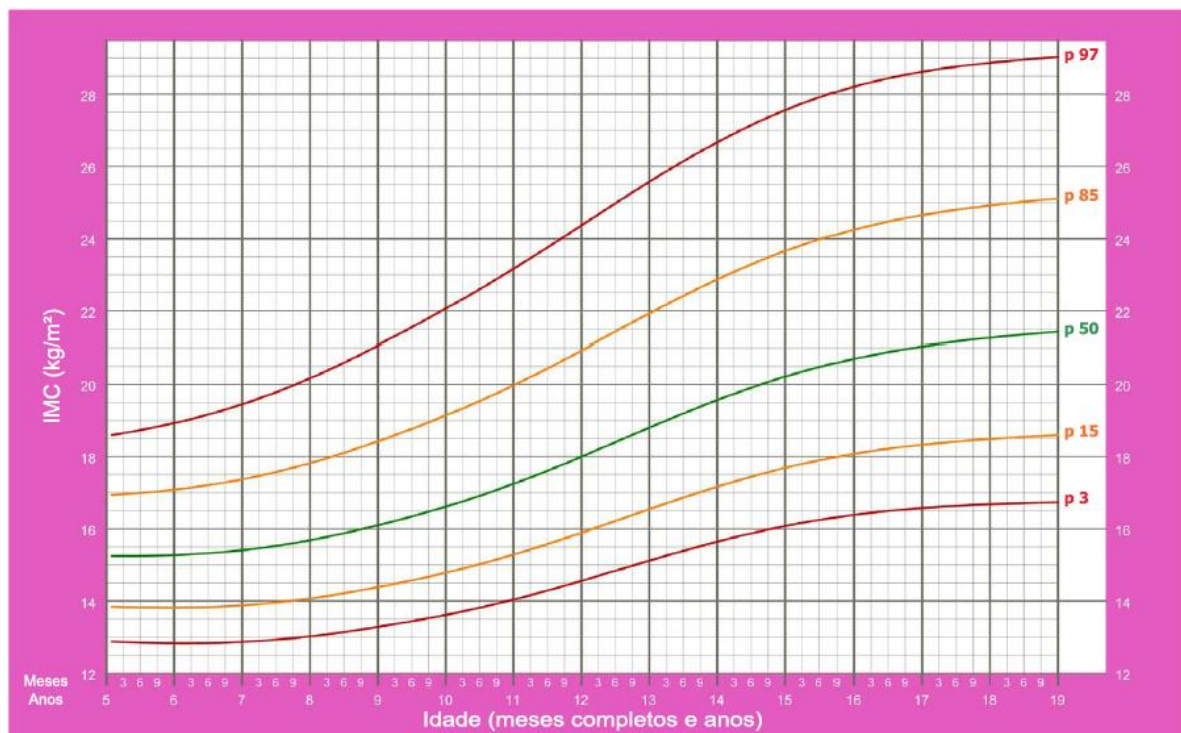
Dos 5 aos 19 anos (percentis)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

IMC por idade MENINAS

Dos 5 aos 19 anos (percentis)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

AUTORIZAÇÃO

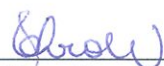
Nome do autor: Caroline Kroll

RG: 4627373

Título da Tese: "Efeito das Variantes Genéticas ADIPOQ-rs2241766, LEP-rs7799039 e FTO-rs9939609 no Estado Nutricional de Mães e seus Filhos: Coorte de Nascimento, Seis Anos"

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da Tese de minha autoria.

Joinville, 31 de janeiro de 2020.



Caroline Kroll