

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AMBIENTES INTRAUTERINOS
NO COMPRIMENTO TELOMÉRICO DE RECÉM-NASCIDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MONIQUE CABRAL HAHN

Porto Alegre, Brasil
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AMBIENTES INTRAUTERINOS
NO COMPRIMENTO TELOMÉRICO DE RECÉM-NASCIDOS**

MONIQUE CABRAL HAHN

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Zubaran Goldani**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Mariana Bohns Michalowski**

Porto Alegre, Brasil
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Hahn, Monique Cabral

A influência de diferentes ambientes
intrauterinos no comprimento telomérico de recém-
nascidos / Monique Cabral Hahn. -- 2018.

78 f.

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani.

Coorientadora: Mariana Bohns Michalowski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Telômeros. 2. Ambiente Intrauterino. I.
Goldani, Marcelo Zubaran, orient. II. Michalowski,
Mariana Bohns, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

29 / 06 / 2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Guilherme Guaragna Filho
Departamento de Pediatria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Marcus Herbert Jones
Departamento de Pediatria
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Michael Everton Andrades
Centro de Pesquisa Experimental
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me recebido desde 2007 como aluna e desde 2009 como servidora.

À Faculdade de Medicina, pelo incentivo à capacitação dos seus funcionários.

Ao Hospital de Clínicas, por permitir a execução do projeto e aos laboratórios do Centro de Pesquisa Experimental, pela ajuda dos colegas pesquisadores.

Ao professor Marcelo Goldani, meu orientador, agradeço imensamente por ter me resgatado de uma atividade administrativa e ter me dado a grande oportunidade de trabalhar com pesquisa científica, o que sempre foi o meu sonho. Entrei imatura e idealizando a pesquisa. Hoje, mais consciente (e ainda em processo constante de amadurecimento e transformação - todos estamos) aprendi que a gente faz a revolução sim, com degrauzinhos na construção do conhecimento. Aprendi que fazer pesquisa no Brasil é um ato heroico, que exige alguns sacrifícios, resiliência e sobretudo bastante paixão. E que tem o seu lado prazeroso e gratificante. Por isso a minha reverência a todos que escolhem esse caminho. Agradeço ainda ao professor Marcelo pelo incentivo, pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento, pelas sacadas geniais, por mostrar o caminho, integrar as pessoas, enxergar adiante e por vezes em ser pioneiro em questionar algumas regras do sistema. Obrigada por me inspirar.

Agradeço à professora Mariana Michalowski, minha co-orientadora, pelo acompanhamento, prontidão e dedicação. Em todos os momentos em que pedi ajuda acadêmica, fui muito bem amparada. Obrigada por abraçar o laboratório e querer construir uma história junto com o grupo. A admiro por, ao longo da minha dissertação, saber o momento de ser firme, cobrar e direcionar, determinar as metas (a "pessoa das listas", que nem eu rsrs), e também saber o momento de acalmar e compreender. A admiro pela sensatez e postura em assuntos da vida, de religião a comportamento humano. Obrigada pelo acolhimento, por ser uma pessoa acessível, por também me inspirar.

Agradeço ao professor Clécio Homrich, que mesmo tendo ficado alheio à execução deste projeto, foi um grande incentivador do meu mestrado, e foi a pessoa que me deu o empurrão certo no momento certo. Lembro que eu estava com tudo "engatilhado" para começar o mestrado, mas ainda estava arredia para o compromisso. Foi então que numa manhã no CPC, após uma reunião do grupo, o professor Clécio me chamou para conversar, e foram uns 40 minutos de conversa sobre mestrado, oportunidades, significado, importância, momento. E depois daquilo tudo pareceu tão óbvio... foi como se o professor

Clécio tivesse ligado um interruptor na minha cabeça. Portanto, mesmo não tendo acompanhado este trabalho, agradeço pelo incentivo e por ter destinado boa parte do seu tempo naquela manhã para me dar o empurrão que eu precisava. Professor Clécio, a culpa desse mestrado também é sua rsrs.

Agradeço à equipe do Laboratório de Pediatria Translacional, às pessoas que já passaram e fizeram história, viraram amigas pra vida, e às novas que chegaram há pouco: obrigada por viabilizarem um ambiente de trabalho tranquilo, com ajuda mútua, trabalho em grupo e compreensão nos momentos em que é necessário introspecção. Obrigada pela amizade, pelas consultorias acadêmicas, pelas companhias no almoço e nas atividades extra-laboratoriais. E um agradecimento especial a Isabel Werlang, que me recebeu no LPT em 2013. Foi uma grande incentivadora do meu mestrado, foi comigo na Feevale, fez os contatos quando precisei de outros equipamentos, conseguiu os reagentes, padronizou a reação... fez tudo o que foi preciso até que eu conseguisse tocar os experimentos sozinha. E para além da dissertação, dividiu a vida, os dramas, as vitórias, as histórias e o coração. Obrigada pela dedicação e empenho no laboratório e pela tua amizade.

Agradeço pelo grupo de pesquisa NESCA, a todos os que já passaram, e aos que ainda estão, pelo suporte na parte clínica e pelas amostras coletadas, para que eu pudesse executar esse trabalho.

Agradeço ao Lucas Grun e à Dra Florencia Barbe Tuana, por compartilharem o conhecimento da metodologia desse trabalho, vocês foram fundamentais.

Agradeço ao professor Fernando Spilki e sua equipe na Feevale, por terem nos recebido para as tentativas de padronização das reações.

Agradeço à família, ao meu namorado e amigos por terem entendido e apoiado as demandas do mestrado e entendido os momentos de cansaço.

Obrigada a todos, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste mestrado.

RESUMO

Introdução: O comprimento telomérico é estudado em vários processos da relação saúde-doença, tais quais estresse oxidativo, processo inflamatório e estresse crônico e parece ser modulado por fatores genéticos e ambientais, além de estar associado a doenças como aterosclerose, doença de Alzheimer, insuficiência cardíaca e disqueratose congênita. Nosso estudo buscou entender a relação entre os telômeros de recém-nascidos e a gestação sob condições adversas.

Objetivo: avaliar o impacto da exposição a diferentes ambientes intrauterinos sobre o comprimento de telômeros dos recém-nascidos.

Métodos: o comprimento telomérico foi avaliado através do método de qPCR (Razão T/S) de células da mucosa oral de uma amostra conveniência de 239 pares de mãe e recém-nascido, divididos nos seguintes grupos de mães: diabéticas (DM) (n=39), hipertensas (HAS) (n=16), tabagistas (n=52), controle (n=99) e mães que tiveram filhos pequenos para a idade gestacional (PIG) (n=33).

Resultados: Em todos os grupos observamos uma correlação fraca entre o comprimento telomérico da mãe e da criança ($r= 0,229$) ($p<0,001$). Não houve diferença significativa no comprimento telomérico entre os grupos DM, HAS, PIG, Tabaco e Controle. Entretanto, dentro do grupo Tabaco houve diferença significativa numa relação dose-resposta inversa, de maior consumo de cigarro e comprimento telomérico menor, tanto para a mãe ($p=0,020$) quanto para o recém-nascido ($p=0,033$).

Conclusão: os achados deste estudo sugerem que o uso do tabaco na gestação pode exercer influência negativa sobre o comprimento dos telômeros tanto da mãe quanto do seu filho.

Palavras-chave: telômero, intrauterino, diabetes *mellitus*, tabagismo, pequeno para idade gestacional

ABSTRACT

Background: Telomere length has been studied in several health-disease processes, such as oxidative stress, inflammatory process and chronic stress. It seems to be influenced by genetic and environmental issues, and it is associated with diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's disease, heart failure and congenital dyskeratosis. Our study searched to understand the relationship between newborns telomeres and adverse intrauterine conditions.

Objective: to evaluate the impact of exposure to different intrauterine environments on the telomere length of newborns.

Methods: the telomere length was evaluated by qPCR (T/S ratio) on oral mucosa cells of a convenience sample of 239 pairs of mother and newborn, divided according to the following groups of mothers: diabetic (DM) (n = 39), hypertensive (HAS) (n = 16), tobacco (n = 52), controls (n = 99) and mothers who had small children for gestational age (SGA) (n = 33).

Results: In all groups we observed a weak correlation between the telomere of the mother and the son ($r = 0.229$) ($p < 0.001$). There was no significant difference in telomere size between DM, HAS, SGAG, Tobacco and Control groups. However, in the Tobacco group there was a significant difference in an inverse dose-response relationship: higher cigarette consumption and lower telomere length, both for the mother ($p = 0.020$) and for the newborn ($p = 0.033$).

Conclusion: the findings of this study suggest that tobacco use during gestation may induce a negative influence on the telomere length of both the mother and her child.

Keywords: telomere, intrauterine, diabetes mellitus, smoking, small for gestational age

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização dos telômeros e o encurtamento na divisão celular.....	18
Figura 2. Fragmentos de Okazaki na forquilha de replicação.....	19
Figura 3. Processo de perda de fragmentos na extremidade telomérica.....	20
Figura 4. T-Loop e proteínas da estrutura telomérica.....	21
Figura 5. Fluxograma de tamanho amostral.....	35
Figura 6. Comprimento telomérico mães e RNs (N total).....	43
Figura 7. Boxplot. Comprimento telomérico entre os grupos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da amostra.....	42
Tabela 2 - Comprimento telomérico dos recém-nascidos e mães por grupo.....	43
Tabela 3 - Correlação entre o telômero das mães e seus filhos.....	46
Tabela 4 - Comprimento telomérico de mães tabagistas na gestação (grupo TABACO) e dos seus filhos.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BPN - Baixo Peso ao Nascer

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DM - Diabetes *Mellitus*

DM 1 - Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM 2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2

DMG - Diabetes *Mellitus* Gestacional

DOHaD - *Developmental Origins of Health and Disease*

HAS - Hipertensão

IMC - Índice de Massa Corporal

IVAPSA - Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida

Kb - Quilobases

PIG - Pequeno para Idade Gestacional

Q-FISH - Hibridização de Fluorescência *in situ* quantitativa

qPCR - Reação em cadeia da Polimerase quantitativa

RCIU - Restrição de Crescimento Intrauterino

RNs - Recém-nascidos

RNA - Ácido Ribonucleico

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

STELA - *Single Telomere Length Analysis*

TERT - Transcriptase Reversa da Telomerase

TRF - Fragmento de restrição terminal

T/S - razão entre o comprimento dos telômeros e do gene cópia simples

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 - VARIAÇÕES DO AMBIENTE INTRAUTERINO.....	15
2.2 - AMBIENTES INTRAUTERINOS ADVERSOS.....	15
2.2.1 - Diabetes Mellitus	16
2.2.2 - Tabagismo	17
2.2.3 - Pequeno para a Idade Gestacional (PIG).....	18
2.2.4 - Hipertensão arterial.....	18
2.3 - A INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS EM EVENTOS GENÉTICOS.....	19
2.4 - TELÔMEROS.....	20
2.5 - CAUDA G DOS TELÔMEROS OU T-LOOP.....	21
2.6 - SHELTERIN	22
2.7 - REPLICAÇÃO DO DNA E O “PROBLEMA DO FINAL DA REPLICAÇÃO”.....	23
2.8 - TELOMERASE	25
2.9 - COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS	25
2.10 - OS TELÔMEROS COMO RELÓGIO BIOLÓGICO	26
2.11 - ENVELHECIMENTO CELULAR.....	27
2.12 - DOENÇAS RELACIONADAS AO TELÔMERO	28
2.13 - HÁBITOS DE VIDA E COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS	29
2.14 - QUANTIFICAÇÃO DOS TELÔMEROS	30
2.14.1 - Métodos Experimentais.....	30
2.14.2 - Métodos computacionais	33
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 - OBJETIVO PRINCIPAL	35
4.2 - OBJETIVO SECUNDÁRIO.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 - TIPO DE ESTUDO.....	36
5.2 - AMOSTRAGEM	36
5.2.1 - Critérios de inclusão	36
5.2.2 - Critérios de não inclusão.....	36
5.2.3 - Subgrupos	36
5.2.4 - Tamanho da Amostra.....	37
5.3 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	38
5.3.1 Coleta.....	38
5.3.2 - Extração de DNA	39
5.3.3 - Escolha do protocolo de PCR em Tempo Real	39
5.3.4 - Análise por PCR em tempo real.....	40
5.3.5 - Processamento dos dados	42
5.3.6 - Análise estatística.....	42
6. RESULTADOS	43
7. DISCUSSÃO	50
7.1 - DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	50
7.2 - A QUESTÃO DA HERDABILIDADE.....	54
7.3 - DOS MÉTODOS DE ANÁLISE	56

7.4 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	57
7.5 - PONTOS FORTES DO ESTUDO.....	57
8. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, alguns estudos têm observado que eventos perinatais podem impactar na saúde do indivíduo ao longo da vida, demonstrando que diferentes insultos durante a gestação e o período neonatal trazem consequências na vida adulta (FRICK *et al.*, 2016; KANNISTO *et al.*, 1997; ROSEBOOM *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem a existência de uma plasticidade fenotípica relacionada ao desenvolvimento: um genótipo pode gerar vários estados fisiológicos em reação a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Um dos potenciais mecanismos desta plasticidade seria a variação de comprimento telomérico. Alguns estudos conseguiram demonstrar a associação entre ambientes intrauterinos adversos e a variação no comprimento telomérico do recém-nascido (TELLECHEA *et al.*, 2015). Okuda e colaboradores em 2002 mostraram que a variabilidade no comprimento dos telômeros entre os recém-nascidos é em grande parte atribuída a determinantes genéticos e ambientais, os quais começam a exercer o seu efeito no útero, e repercutem na vida adulta. O comprimento telomérico no nascimento e na primeira infância pode ser um indicativo da extensão e qualidade do ciclo vital (HJELMBORG *et al.*, 2015), uma vez que os telômeros estariam relacionados ao envelhecimento celular e a algumas doenças.

O presente estudo, o qual está inserido em um projeto maior – IVAPSA, Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida - objetiva investigar a potencial interferência desses ambientes no comprimento dos telômeros dos cromossomos das mães e dos seus recém-nascidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - VARIAÇÕES DO AMBIENTE INTRAUTERINO

As variações no ambiente intrauterino são as alterações que podem acontecer na composição do líquido amniótico que envolve o feto, podendo ser a modificação na concentração de substâncias próprias daquele ambiente, assim como a presença de substâncias indesejáveis (tóxicas, mediadores celulares, fatores de inflamação ou microrganismos) capazes de atravessar a barreira placentária, interferindo no desenvolvimento da criança (EBERLE & AMENT, 2012). Ex.: doenças maternas [diabetes *mellitus* (DM), hipertensão (HAS) e depressão], presença ou não de tabagismo, e variações na nutrição materna (desnutrição, eutrofia ou obesidade). Além do período intrauterino, podem ocorrer variações no ambiente externo nos períodos neonatal e pós neonatal, os quais também são reconhecidos pela alta plasticidade no desenvolvimento (KHAZIPOV & LUHMANN, 2006).

2.2 - AMBIENTES INTRAUTERINOS ADVERSOS

O ambiente intrauterino adverso pode influenciar no desenvolvimento do feto, (EBERLE & AMENT, 2012) podendo levar a enfermidades de manifestação tardia, como doenças metabólicas, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, obesidade e problemas cardiovasculares (SEDAGHAT *et al.*, 2015), entre outros (PINHEIRO *et al.*, 2016). A nutrição e a oxigenação são os fatores mais importantes nessa programação intrauterina (FOWDEN *et al.*, 2006) na qual a restrição de micronutrientes pode levar o feto a sérias complicações (MAKHOUL *et al.*, 2004). O tempo de duração, a gravidade e o tipo de insulto durante o desenvolvimento fetal determinam um resultado fisiológico específico

(FOWDEN *et al.*, 2006; LANGLEY-EVANS & MCMULLEN, 2010), fazendo com que esses ambientes adversos possam induzir à adaptação para sobrevivência, e serem transmitido às gerações posteriores (SEDAGHAT *et al.*, 2015).

A linha de pesquisa “Origens Desenvolvimentistas da saúde e da doença” (DOHaD) investiga as influências de fatores ambientais ocorridos na vida fetal ou perinatal e o surgimento de doenças crônicas ao longo da vida (BARKER, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2007).

Dentre os ambientes intrauterinos adversos avaliados no projeto IVAPSA e que serão investigados no presente estudo estão: mães com hipertensão essencial ou gravídica, mães com diabetes gestacional, tabagistas, assim como mães de crianças pequenas para a idade gestacional sem associação com nenhuma das patologias anteriormente mencionadas (BERNARDI *et al.*, 2012). Estes grupos serão brevemente descritos abaixo

2.2.1 - Diabetes Mellitus

Diabetes *Mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos mecanismos (SBD, 2017). É uma doença não-transmissível com alta prevalência e ainda em ascensão, tendo causado 5 milhões de mortes e morbidade em 415 milhões de pessoas em 2015 (IDF, 2015). Este aumento é devido principalmente ao crescimento e envelhecimento da população, do aumento da obesidade e sedentarismo (CHO, *et al.*, 2013; SBD, 2015).

Dentre os principais tipos de Diabetes, estão o tipo 1 (DM1): inato, relacionado a predisposição genética, história familiar e distúrbios autoimunes; o tipo 2 (DM2):

relacionado a obesidade, sedentarismo, predisposição genética, idade materna e etnia, estilo de vida, tabagismo e consumo de álcool; e o Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG), transitório e relacionado à gravidez (KANGURU *et al.*, 2014).

É cada vez maior o número de mulheres com gestações complicadas em decorrência da obesidade e da DM (DABELEA *et al.*, 2008), o que pode trazer riscos tanto para a gestante quanto para o feto, tais como: pré-eclâmpsia, infecções, hemorragia pós-parto, parto prematuro, macrosomia, aborto espontâneo e anomalias congênitas. Para as mulheres há o risco de complicações diabéticas a longo prazo, como nefropatia e retinopatia (KANGURU *et al.*, 2014).

2.2.2 – Tabagismo

A exposição ao cigarro durante a gravidez está associada ao parto prematuro, baixo peso ao nascer e morbidades tais como problemas respiratórios (NEUMAN *et al.*, 2012) e atraso no desenvolvimento neurológico (CHEN *et al.*, 2013) no recém-nascido e ao longo da infância (ROGERS, 2009; VOGELGESANG *et al.*, 2014). Ao fumar na gestação, a mãe expõe o feto aos componentes do cigarro, às mudanças na oxigenação e metabolismo da placenta. A nicotina e o monóxido de carbono são componentes do tabaco que interferem negativamente na gestação. A nicotina estimula a liberação de catecolaminas na corrente sanguínea materna, o que pode desencadear taquicardia, vasoconstrição periférica e redução do fluxo sanguíneo na placenta. O monóxido de carbono se combina com a hemoglobina materna e fetal, estabelecendo hipóxia na mãe e no feto, o que pode gerar sofrimento fetal crônico (ATES *et al.*, 2004; MACHADO & LOPES, 2009; VIGGIANO *et al.*, 1990).

2.2.3 - Pequeno para a Idade Gestacional (PIG)

O peso ao nascer é um bom indicador de saúde e de crescimento fetal, uma vez que reflete o estado de saúde materno e conseqüentemente o ambiente intrauterino (O'CONNOR *et al.*, 2013). Um recém-nascido é considerado com baixo peso quando nasce com menos de 2.500 gramas. Nos países desenvolvidos, o baixo peso ao nascer (BPN) geralmente ocorre devido ao parto prematuro, enquanto que nos países em desenvolvimento, ele é mais relacionado à restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (RASYD & BAKRI, 2016). Aqui cabe esclarecer uma diferença na nomenclatura utilizada: pequeno para a idade gestacional (PIG) e restrição de crescimento intrauterino (RCIU). Um recém-nascido é considerado PIG quando o peso ao nascer é menor que percentil 10 da curva de referência, relacionado à idade gestacional (EGO, 2013; MAYER e JOSEPH, 2013). Já o termo RCIU indica uma criança PIG que não alcançou o seu potencial de crescimento esperado ou determinado pelo seu potencial genético (EGO, 2013).

O crescimento intrauterino inadequado está relacionado a alguns fatores, entre eles: estatura materna, fumo na gravidez, baixo nível socioeconômico (ZAMBONATO *et al.*, 2004), hipertensão, pré-eclâmpsia e diabetes gestacional (VON BECKERATH *et al.*, 2013).

2.2.4 – Hipertensão arterial

O aumento da pressão sanguínea pode acontecer tanto pelo aumento do volume intravascular quanto pela maior resistência vascular periférica (RASYD & BAKRI, 2016).

O tamanho fetal é influenciado, entre outros fatores, pelo tamanho do espaço intrauterino disponível para a criança se desenvolver. Quando existem anormalidades

vasculares no útero, como pré-eclâmpsia e fatores de risco cardiovasculares (ex.: hipertensão arterial e tabagismo) há um risco maior da criança nascer com baixo peso (RASYD & BAKRI, 2016; HERSKOVITS *et al.*, 2007). Nosso grupo selecionou mães hipertensas que tiveram recém-nascidos sem baixo peso e nascidos a termo, no intuito de observar apenas o efeito do fator hipertensão no estudo. Fetos sujeitos à pré-eclâmpsia materna apresentam risco aumentado de hipertensão arterial (GEELHOED *et al.*, 2010), além de doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral ao longo da vida (BELLAMY *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2016).

2.3 - A INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS EM EVENTOS GENÉTICOS

A complexidade de nossas características é o resultado de efeitos combinados de genes, fatores ambientais, e suas interações (MANOLIO *et al.*, 2009). A interação genótipo-ambiente (GxA) resulta em diferentes respostas fenotípicas aos genótipos, de acordo com a influência ambiental (KIM *et al.*, 2014). É esta plasticidade fenotípica que produz um organismo com flexibilidade para se ajustar às condições ambientais presentes, o que representa uma vantagem adaptativa (VIA *et al.*, 1995; LANDE, 2009). Desta forma, a identificação de mecanismos pelos quais fatores ambientais específicos possam desativar ou exacerbar riscos genéticos pode levar à descoberta de alvos potenciais para intervenções preventivas (LEVE *et al.*, 2010; WATSON *et al.*, 2012). Essa interação pode ser vista no caso de gêmeos homozigóticos que, embora apresentem a mesma sequência do código genético, podem apresentar variações na expressão de alguns genes induzido por hábitos de vida diferentes, como quantidade de horas de sono, qualidade da alimentação e prática de exercícios, levando à manifestação de diferentes fenótipos (WATSON *et al.*, 2012). No caso dos telômeros, existe uma carga inicial constitutiva do indivíduo que sofrerá um

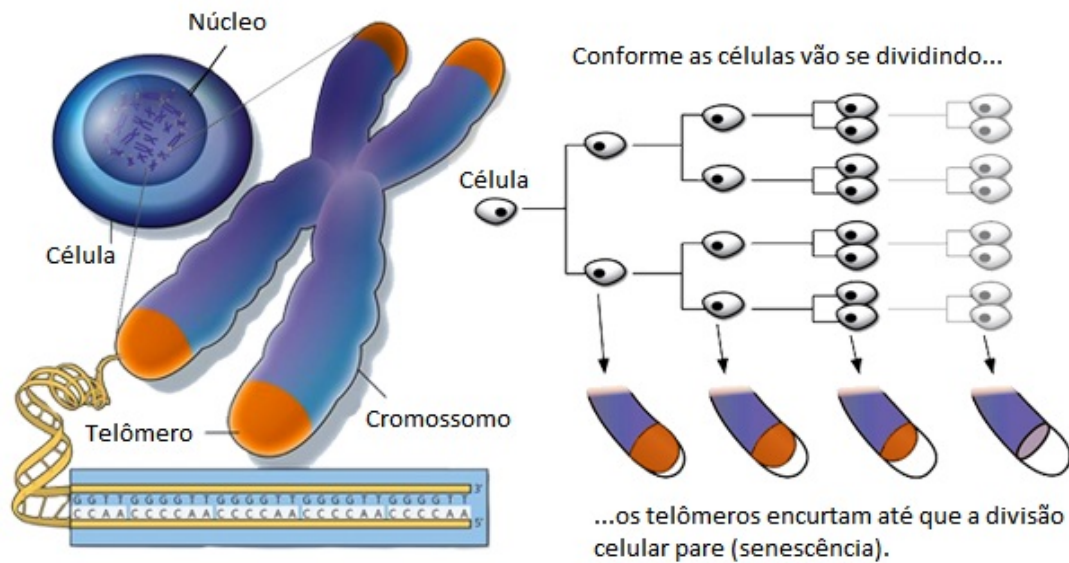
desgaste inevitável ao longo da vida por conta do próprio processo fisiológico de envelhecimento celular, mas que pode ser acelerado caso exista grande exposição ao estresse, processos oxidativos, citocinas inflamatórias, entre outros fatores (EPEL *et al.*, 2004; SAHIN & DEPINHO, 2010).

2.4 – TELÔMEROS

Os telômeros foram descobertos em 1930 em moscas pelo pesquisador Herman Muller (MULLER, 1938), e depois em milho, por Barbara McClintock (RAVINDRAN, 2012). Estes pesquisadores conseguiram diferenciar a extremidade de cromossomos quebrados dos intactos. Com isso, antes de Watson e Crick terem estudado e proposto a estrutura do DNA, em 1953, Muller e McClintock puderam inferir que deveria se tratar de uma estrutura diferenciada, já que cromossomos quebrados podiam se fundir, enquanto que cromossomos com os telômeros mantinham-se intactos (ZAKIAN, 2012).

A informação genética humana está reunida nos 23 pares de cromossomos presentes no núcleo de cada célula. Na extremidade desses cromossomos ficam localizados os telômeros. Estas estruturas, compostas pelas bases TTAGGG repetidas em sequência (MOYZIS *et al.*, 1988), não codificam nenhuma proteína e estendem-se muitas vezes até o final dos cromossomos, o que confere estabilidade e proteção ao genoma, evitando tanto a perda de informações genéticas importantes, quanto a fusão com outros cromossomos. A cada divisão celular os telômeros perdem um fragmento da sua porção terminal, o que é conhecido por “Problema do Final da Replicação”. Esse encurtamento ocorre naturalmente nas células somáticas até que esta entre no estado de senescência, determinando a parada do ciclo celular (BLACKBURN, 2001) (Figura 1).

Figura 1. Localização dos telômeros e o encurtamento na divisão celular. Adaptado de Weekly Global Research, 2016.

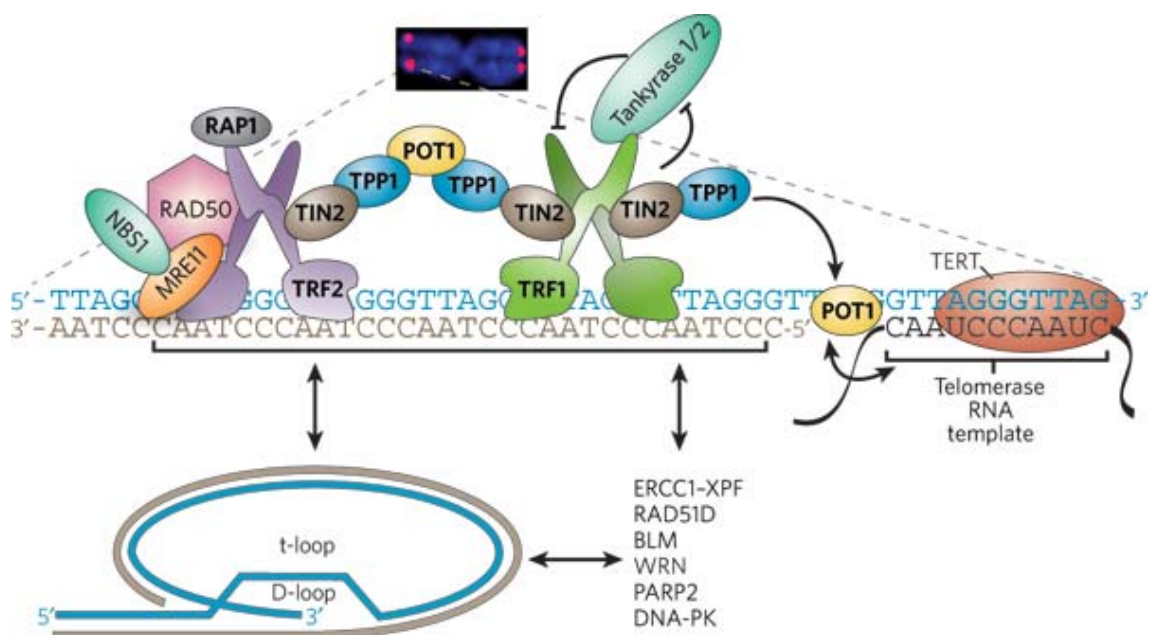


2.5 - CAUDA G DOS TELÔMEROS OU T-LOOP

A extremidade 3' da região telomérica é mais rica em guanina e mais longa que a sua fita complementar, formando assim uma cauda de fita simples, também chamada de T-Loop. Essas caudas protegem o DNA da degradação e de fusões, assim como dificultam a replicação cromossômica, uma vez que a polimerase, principal enzima da replicação do DNA, atua de forma linear (LINGNER *et al.*, 1995).

Alguns estudos têm mostrado a importância das proteínas de ligação e dos complexos não só na estabilização telomérica, mas também no momento da replicação. Essas proteínas protegeriam os telômeros dentro do complexo denominado “shelterin” (VERDUN & KARLSEDER, 2007).

Figura 2. T-Loop e proteínas da estrutura telomérica. Fonte: Verdun & Karlseder, 2007.



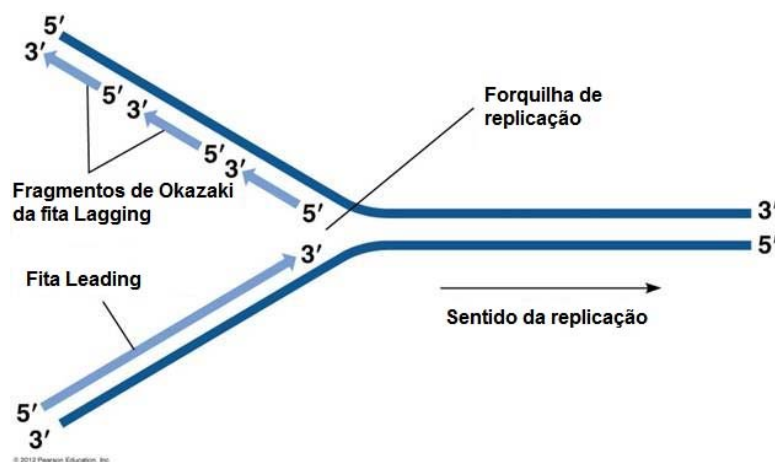
2.6 - SHELTERIN

A expressão *shelterin* se refere a um complexo de seis proteínas que protege os telômeros. A sequência telomérica é reconhecida pelas subunidades TRF1, TRF2 e POT1. Estas subunidades estão interligadas pelas proteínas TIN2, TPP1 e RAP1. O complexo permite que as células possam identificar e diferenciar os telômeros dos locais onde podem ocorrer danos ao DNA (DE LANGE, 2005). Uma vez atingido um encurtamento crítico, os telômeros são incapazes de acionar o complexo *shelterin*, resultando na perda do *loop* de nucleotídeos que exerce função protetora, o que acaba por conduzir a uma instabilidade genômica.

2.7 - REPLICAÇÃO DO DNA E O “PROBLEMA DO FINAL DA REPLICAÇÃO”

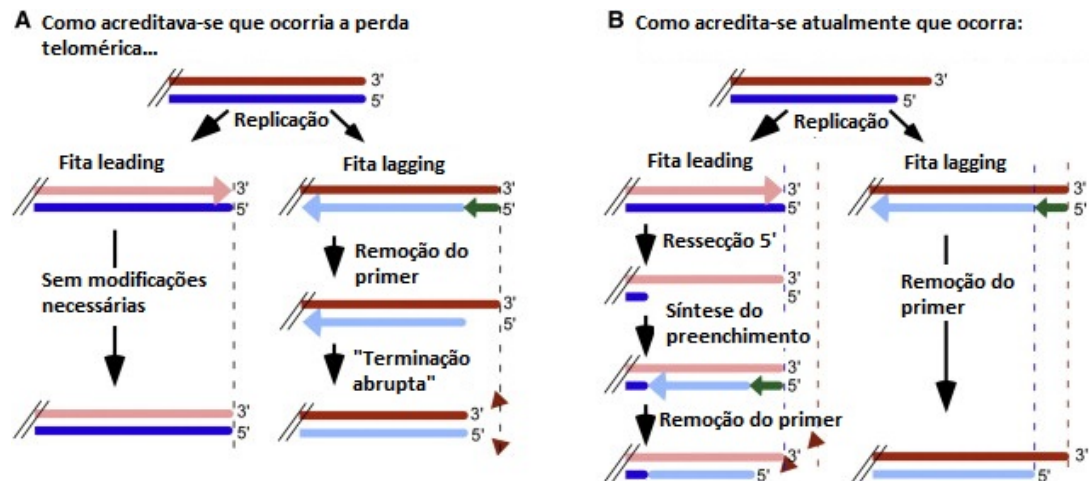
Organismos procariotos, tais como as bactérias, apresentam DNA circular - portanto sem extremidades que necessitem de um aparato complexo para a sua replicação. Já no caso de eucariotos, como animais e seres humanos, as fitas de DNA são lineares. A estrutura do DNA em dupla hélice, descrita por Watson e Crick em 1953, mostra que cada fita original de DNA serve como molde para guiar a síntese de uma "fita-filha". Este processo de replicação é também chamado de semiconservativo já que cada nova dupla hélice de DNA contém uma fita parental, e a outra complementar recém-sintetizada, formando cópias exatamente iguais ao cromossomo original. Esta duplicação se faz através da enzima DNA polimerase. Esta enzima sintetiza o DNA, adicionando as bases nitrogenadas correspondentes, sempre no sentido 5' para o 3'. Por isso, a chamada “fita *leading*” (no sentido 5' → 3') é replicada ininterruptamente. Já a chamada “fita *lagging*”, no sentido antiparalelo (3' → 5'), necessita ser copiada em partes. Para o início da síntese, é necessária a presença de um segmento de RNA iniciador, chamado *primer*. Este segmento se acopla na fita molde por complementariedade. Os Fragmentos de Okazaki são trechos curtos de DNA produzidos na fita de replicação descontínua (*lagging*), após a adição de *primers* de RNA (OKAZAKI *et al.*, 1968) (Figura 3).

Figura 3. Fragmentos de Okazaki na forquilha de replicação. Adaptado de SBI4U Resource Website.



Por muito tempo acreditava-se que a perda de bases na fita *lagging* em consequência da remoção do *primer* era a principal forma de encurtamento dos telômeros. Hoje já existem estudos mostrando que essa perda ocorre nas duas fitas (*leading* e *lagging*) e que existem etapas intermediárias envolvendo ressecção no DNA da fita parental, o que ao final do processo resulta em perda de bases na fita *leading* (WELLINGER, 2014) (Figura 4).

Figura 4. Processo de perda de fragmentos na extremidade telomérica. Adaptado de Wellinger, 2014.



Dessa forma, a cada nova replicação, o cromossomo perde de 30 a 200 pares de base (AUBERT & LANSDORP, 2008; ARMANIOS & BLACKBURN, 2012). Por muito tempo os pesquisadores não sabiam como a informação genética era copiada sem a perda das informações essenciais, pois após a replicação e o consequente encurtamento da fita, os genes e as células seriam danificados. Entretanto hoje sabe-se que os telômeros atuam como protetores e podem ser reconstituídos em situações fisiológicas através da ação da enzima telomerase.

2.8 – TELOMERASE

A telomerase é a enzima responsável por adicionar sequências de DNA repetitivas ao telômero reduzindo assim o desgaste do material genético nas células em proliferação (KUMAR *et al.*, 2016). A telomerase humana é constituída por duas subunidades: um molde de RNA (TERC, componente de RNA da telomerase) e a subunidade catalítica (hTERT, a telomerase humana transcriptase reversa), que sintetiza o novo DNA telomérico a partir do molde de RNA (ZHU *et al.*, 2011). Esta enzima é muito ativa no período embrionário. Os telômeros são fisiologicamente curtos no espermatozoide e no óvulo, assim como nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário até a fase de mórula, porém estão muito grandes no blastocisto. Presume-se que neste período intermediário, mais precisamente entre a mórula e o blastocisto, ocorra a ativação da telomerase (WRIGHT *et al.*, 1996). A telomerase normalmente está inativa ou mantém uma atividade basal muito baixa na maioria das células somáticas, mostrando-se mais ativa em células-tronco e na maioria dos tumores (JAGER E WALTER, 2016). Também ocorre maior atividade da telomerase em subpopulações de células com alta taxa de proliferação (como nos linfócitos B e T) ou em regeneração (como nos hepatócitos) (WENG *et al.*, 1996; SIRMA *et al.*, 2011).

2.9 – COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS

O comprimento dos telômeros varia muito entre as espécies, desde aproximadamente 300 pares de base em fungos (SHAMPAY *et al.*, 1984) a muitos kilobases em humanos (5 a 15 kb) e em camundongos (20 a 50 kb). O sangue de cordão umbilical humano, por exemplo, apresenta uma média de 10 kb (VAZIRI, 1993). Tanto em humanos quanto em ratos, o comprimento dos telômeros dos pais influencia o

comprimento telomérico nos filhos (ARMANIOS *et al.*, 2009; AVIV, 2012; GOLDMAN *et al.*, 2005). A hereditariedade é estimada em 44 a 80%, sendo altamente variável entre indivíduos (ZAKIAN, 2012).

Assim, a variedade no comprimento dos telômeros em indivíduos da mesma idade é determinada pela genética, mas também por fatores ambientais (JAGER E WALTER, 2016). O comprimento inicial dos telômeros pode variar entre indivíduos, mas a taxa de encurtamento reflete o esgotamento da replicação conforme ocorrem alterações ambientais ou envelhecimento (BERNARDOTTE *et al.*, 2016)

2.10 - OS TELÔMEROS COMO RELÓGIO BIOLÓGICO

A cada divisão celular, o telômero sofre um encurtamento em torno de 30 a 200 pares de base (AUBERT & LANSDORP, 2008; ARMANIOS & BLACKBURN, 2012) e isso ocorre, como descrito acima, devido à incapacidade da DNA polimerase em replicar o DNA até o final (BLACKBURN, 2001) – o chamado “problema do final da replicação” (MARTINEZ & BLASCO, 2011).

Essa observação sugere que os telômeros podem atuar como uma espécie de “relógio biológico”, estimando o potencial de replicações que a célula poderá efetuar (ALLSOPP *et al.*, 1992).

Em razão do comprimento dessas regiões protetoras pode-se inferir se as células de um indivíduo têm maior ou menor potencial de replicação. Porém, não é apenas a replicação a responsável por encurtar essas estruturas. Alguns estudos têm demonstrado que o encurtamento telomérico também pode ocorrer em consequência de estresse oxidativo, processo inflamatório e estresse crônico (EPEL *et al.*, 2004; SAHIN & DEPINHO, 2010). Danos ao DNA podem ser causados por processos metabólicos

celulares endógenos, tais como a hidrólise, oxidação e desemparelhamentos de bases de DNA, assim como por fontes exógenas, incluindo raios ultravioletas (UV), radiação ionizante, e agentes químicos. Em consequência, o DNA danificado, quando não for devidamente reparado poderá levar à instabilidade genômica (JIA E HER, 2015).

2.11 - ENVELHECIMENTO CELULAR

O envelhecimento replicativo é programado e natural para todas as células. Quando ocorre o encurtamento telomérico a um nível crítico, o ciclo celular para. Assim, o número total de divisões celulares, quando a telomerase é inexistente ou pouco ativa, é limitado por um tamanho específico denominado Limite de Hayflick (BERNADOTTE et al, 2016). Este limite refere-se à capacidade proliferativa das células, até apresentarem o fenótipo senescente, quando então há o desencadeamento de respostas celulares que induzem à apoptose (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961).

O envelhecimento é um processo complexo que inclui alteração na morfologia celular, declínio funcional, assim como mudanças na expressão gênica e metabolismo. A senescência das células humanas pode ser mediada por mecanismos relacionados com o estresse (por fatores endógenos e exógenos) e através do envelhecimento replicativo, induzido pelo encurtamento dos telômeros. Os vários gatilhos da senescência interagem e induzem vias de sinalização que podem se sobrepor (JAGER E WALTER, 2016).

Em modelos animais nos quais os genes responsáveis pela manutenção dos telômeros foram deletados ou inativados, é possível observar o fenótipo dos organismos mais envelhecidos (BLACKBURN *et al.*, 2015). Em camundongos que tiveram os genes da telomerase silenciados ou proteínas protetoras inativadas, uma vez que os telômeros tinham encurtado o suficiente, ficou evidenciado um fenótipo de envelhecimento acelerado

(ARMANIOS E BLACKBURN, 2012). Entretanto, ainda nesses modelos animais que apresentavam deficiência de telomerase, era preciso várias gerações antes que o encurtamento telomérico atingisse o ponto de fenótipos caracterizados como doentios (BLASCO *et al.*, 1997). Da mesma forma, para que uma doença relacionada aos telômeros manifeste-se em humanos, é preciso sucessivas gerações de portadores da mutação, sendo que as doenças ainda podem apresentar características diferentes, chegando ao extremo de morte precoce apenas em gerações bem posteriores (GLOUSKER *et al.*, 2015).

A disfunção dos telômeros pode interagir com outras etiologias e pode contribuir para as características de doenças humanas que se originam a partir de outras causas primárias. Além da questão da ausência ou inatividade da telomerase, a senescência celular pode ser acelerada pelos danos oxidativos acumulados com a idade (BLACKBURN *et al.*, 2015; KAWANISHI & OIKAWA, 2004)

2.12 - DOENÇAS RELACIONADAS AO TELÔMERO

Algumas patologias relacionadas com a idade e síndromes de envelhecimento precoce são caracterizadas por encurtamento dos telômeros (BLASCO, 2005). Esse desgaste dos telômeros mostrou-se como fator causal no desenvolvimento de várias doenças relacionadas com a idade como: aterosclerose (BENETOS *et al.*, 2004), infarto do miocárdio (BROUILLETTE *et al.*, 2003), mal de Alzheimer (PANOSSIAN *et al.*, 2003), síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (CALADO, 2009) e insuficiência cardíaca (OESEBURG *et al.*, 2010). Há ainda outras doenças como disqueratose congênita (CARROLL, 2009) e fibrose pulmonar idiopática (ARMANIOS, 2012) que podem levar à morte celular precoce devido a falhas em células tronco, e agora estão também

relacionadas a mutações na subunidade da enzima telomerase ou em proteínas que se ligam aos telômeros ou à RNA telomerase (SAVAGE & BERTUCH, 2010).

2.13 - HÁBITOS DE VIDA E COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS

Existem vários estudos mostrando que mudanças no estilo de vida (no âmbito físico, emocional e/ou social) e a prática de comportamentos saudáveis, inclusive por curto prazo – meses - podem agir na manutenção dos telômeros, aumentando a atividade basal mínima da telomerase e até mesmo aumentando os telômeros (EPEL & BLACKBURN, 2017).

Um hábito já relacionado a telômeros mais compridos é ter mais de sete horas de sono por noite (LEE *et al.*, 2014) e sono de qualidade. Em pesquisa realizada com grávidas, 30% apresentavam sintomas de apneia do sono. Quando os seus filhos nasceram, os telômeros do sangue do cordão umbilical eram mais curtos. Também praticar atividades físicas parece ser favorável: um estudo com 1200 pares de gêmeos mostrou que aqueles que eram mais ativos tinham telômeros mais longos do que o seu irmão gêmeo menos ativo (CHERKAS *et al.*, 2008). Outros fatores relacionados à redução do comprimento telomérico são: depressão (MUNDSTOCK *et al.*, 2015), gordura abdominal (WEISCHER *et al.*, 2014), alimentação com alto consumo de carnes vermelhas ou processadas e refrigerante (LEE *et al.*, 2015). Até mesmo a qualidade do bairro pode influenciar nos telômeros. Pessoas que vivem em bairros com maior qualidade tinham telômeros mais compridos do que moradores de bairros com qualidade moderada ou ruim, expostos à insegurança (PARK *et al.*, 2015).

2.14 - QUANTIFICAÇÃO DOS TELÔMEROS

Os métodos existentes para mensuração dos telômeros podem ser divididas em experimentais e computacionais (NERSISYAN, 2016).

2.14.1 - Métodos Experimentais

Fazem a avaliação do comprimento médio dos telômeros totais da célula ou de alguns cromossomos específicos. Incluem: Análise do Fragmento de Restrição Terminal (TRF), Reação em cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), Análise de Comprimento Único de Telômeros (STELA) e Hibridização de Fluorescência in situ quantitativa (qFISH) (AUBERT *et al.*, 2012).

TRF:

A TRF foi o primeiro método desenvolvido para medir o comprimento telomérico. Por ter sido utilizado em vários estudos e considerado como referência para os métodos mais recentes, é classificado como o padrão ouro. A técnica necessita de grande quantidade de DNA íntegro. São utilizadas enzimas de restrição que cortam o DNA em várias partes, mas mantêm a sequência telomérica intacta. Os fragmentos teloméricos restantes, maiores que os demais, são separados por eletroforese em gel de agarose e em seguida analisados por Southern blot utilizando uma sonda específica para telômeros. Os resultados dessa técnica podem variar em função das enzimas utilizadas, cálculos da intensidade do sinal e densidade do gel (KIMURA *et al.*, 2010).

qPCR:

O qPCR, utilizado neste trabalho, é uma técnica menos laboriosa que a TRF. Ela utiliza *primers* específicos para a região telomérica, os quais permitem aumentar o número de cópias da sequência de interesse (amplicons), que é quantificada pelo aparelho (AUBERT *et al.*, 2012). Como o telômero é uma região com uma sequência de DNA repetida *in tandem*, quanto maior for o telômero analisado, maior será a disponibilidade de alvos para o *primer* anelar e mais amplicons serão gerados. O número de cópias de DNA obtido pode variar em função da quantidade de DNA inicial, inclusive por variação na pipetagem, dada a sensibilidade do aparelho. Para diminuir esses erros, é feita uma reação de qPCR para um gene de cópia simples, que será comparada ao telômero quantificado. A razão entre quantidade telomérica e gene cópia simples mostra a quantidade de vezes em que a sequência telomérica foi copiada. Esta relação pode ser comparada com a média da população em estudo. Essa técnica é dependente das etapas iniciais de calibração, e, portanto, os resultados obtidos a partir de experiências diferentes podem ser difíceis de comparar (NERSISYAN, 2016).

Em um qPCR tradicional, cada reação utiliza um par de *primers* específico, e o sinal lido pelo aparelho será referente a um tipo de amplicon. No caso da mensuração telomérica comparada com um gene cópia simples, ocorrem duas reações diferentes, com características diferentes (tempo, temperatura e número de ciclos) em placas diferentes. E depois uma é posta em relação à outra para avaliar as quantidades obtidas. Porém, duas reações diferentes, em momentos e placas diferentes estão sujeitas a mais erros, inclusive de pipetagem (EISENBERG *et al.*, 2015). Na tentativa de amenizar esse viés, e com a vantagem da economia de reagentes, Cawthon e colaboradores (2009) desenvolveram uma técnica de qPCR Multiplex, que utiliza dois pares de *primers* na mesma reação, um para telômeros e outro para gene cópia simples de referência, com duas leituras de sinal em

etapas e temperaturas diferentes que contemplam as duas reações. Essa técnica tem algumas especificidades que comprometem a sua reprodutibilidade, e embora citada em trabalhos posteriores, sempre foi realizada com modificações. Essa questão será melhor abordada na discussão deste trabalho.

STELA

Uma outra técnica derivada da PCR é a Análise de Comprimento Único de Telômeros (do inglês, Single Telomere Length Analysis). Esta metodologia é cromossomo-específica e usa *primers* para a região subtelomérica, que anelam a uma distância conhecida da região telomérica, o que a torna mais específica que a TRF. Com a vantagem de conseguir mensurar telômeros curtos, essa técnica é importante em estudos de envelhecimento induzido por encurtamento telomérico (BAIRD *et al.*, 2003). E por medir em cromossomos determinados (e não a média de todos os telômeros da célula, como acontece nas outras reações de qPCR), ela é importante para acompanhar a variabilidade intra-espécie ou entre gerações.

A desvantagem é que não há *primers* específicos para todos os cromossomos existentes, pois a variabilidade de sequência na maior parte das regiões subteloméricas só permite capturar telômeros nos braços dos cromossomos Xp, Yp, 2p, 11q, 12q e 17p. Uma outra desvantagem é que a STELA não consegue capturar telômeros muito longos (normalmente acima de 8 kb) (BRITT-COMPTON *et al.*, 2006).

Q-FISH

O Q-Fish é uma técnica que permite medir comprimentos dos telômeros nos cromossomos em metáfase, através da ligação de sondas fluorescentes específicas. A intensidade do sinal obtido é comparada com um padrão de comprimento telomérico

conhecido. Por utilizar sonda, este método é bastante preciso, porém apresenta dificuldades na quantificação de telômeros extremamente curtos (O'SULLIVAN *et al.*, 2005).

Há uma grande variedade de técnicas novas que se propõem a medir os telômeros, entretanto a dificuldade de compará-las torna extremamente importante as calibrações na execução, para diminuir a variabilidade inerente aos métodos (NERSISYAN, 2016).

2.14.2 - Métodos computacionais

O surgimento de técnicas de sequenciamento de nova geração permitiu a obtenção de dados do genoma inteiro, transcriptoma e epigenoma (AUBERT *et al.*, 2012). O comprimento telomérico pode ser obtido a partir de dados de sequenciamento do genoma, que são apresentados na forma de fragmentos curtos de leitura (20 a 150 pb). As primeiras tentativas de mensuração dos telômeros por sequenciamento foram baseadas na leitura de fragmentos que continham um número mínimo de repetições TTAGGG intactas (NERSISYAN, 2016).

Um dos softwares utilizados para sequenciamento é o TelSeq. Essa metodologia funciona muito bem para um limiar mínimo de 7 repetições TTAGGG em leituras de 100 pb, mas não faz boas leituras para comprimentos menores que 50 pb ou superiores a 100 pb. Além disso, os resultados estão sujeitos a erros de sequenciamento, o que facilmente pode alterar a repetição telomérica e assim alterar a estimativa do comprimento.

Já o sequenciamento feito pelo software Computel alinha leituras curtas a uma referência telomérica. Uma das principais limitações do Computel, assim como do TelSeq, é que esses softwares não contam o comprimento dos telômeros nos cromossomos individuais (HEMANN *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

O presente estudo busca avaliar a relação entre diferentes grupos de exposição intrauterina e o encurtamento dos telômeros nos cromossomos de mães e filhos. Em razão da escassez de trabalhos na literatura que abordem este tema, sendo que a maioria dos artigos disponíveis aborda apenas um ou dois ambientes intrauterinos estressores ao mesmo tempo, este trabalho trata de uma investigação inédita na literatura biomédica, com relevância na compreensão do processo saúde-doença de humanos, dentro de uma perspectiva desenvolvimentista.

4. OBJETIVOS

4.1 - OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o impacto da exposição a diferentes ambientes intrauterinos sobre o comprimento de telômeros dos recém-nascidos e de suas mães.

4.2 - OBJETIVO SECUNDÁRIO

Verificar a associação entre características maternas e do recém-nascido, tais como IMC pré-gestacional, consumo de cigarros, número de filhos anteriores, escolaridade, renda familiar, atividade física moderada e peso ao nascer da criança com o comprimento telomérico entre os diferentes grupos (intergrupo) e na relação entre os comprimentos teloméricos materno ou fetal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional prospectivo, utilizando uma amostra de conveniência de pares de mães e seus recém-nascidos.

5.2 - AMOSTRAGEM

Os pares mãe/RN foram incluídos de acordo com os critérios do Projeto IVAPSA, como segue:

5.2.1 - Critérios de inclusão

Puérperas atendidas no Grupo Hospitalar Conceição/Hospital Fêmeina (GHC) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que residiam na cidade de Porto Alegre, RS.

5.2.2 - Critérios de não inclusão

Puérperas com teste positivo para HIV, RNs gemelares, RNs que apresentaram doenças congênitas ou que necessitaram de internação hospitalar.

5.2.3 - Subgrupos

A amostra está dividida em cinco grupos causais de ambientes intrauterinos:

- Grupo 1 - Diabéticas: puérperas que tiveram diagnóstico de DM gestacional (DMG).
- Grupo 2 - Hipertensas: puérperas que tiveram pré-eclâmpsia, hipertensão crônica ou hipertensão gestacional.

- Grupo 3 - Tabagistas: puérperas que responderam a questão de fumo na gestação afirmativamente, independentemente do número de cigarros, da frequência e da duração do hábito de fumar.
- Grupo 4 - mães de RN PIGs idiopáticos: mães cujas crianças a termo estiveram abaixo do percentil 5 segundo os parâmetros da curva de Alexander.
- Grupo 5 - Controles: as puérperas que não apresentaram hipertensão ou diabetes na gestação, não eram tabagistas e que seus RN não se enquadraram no parâmetro do grupo PIG.

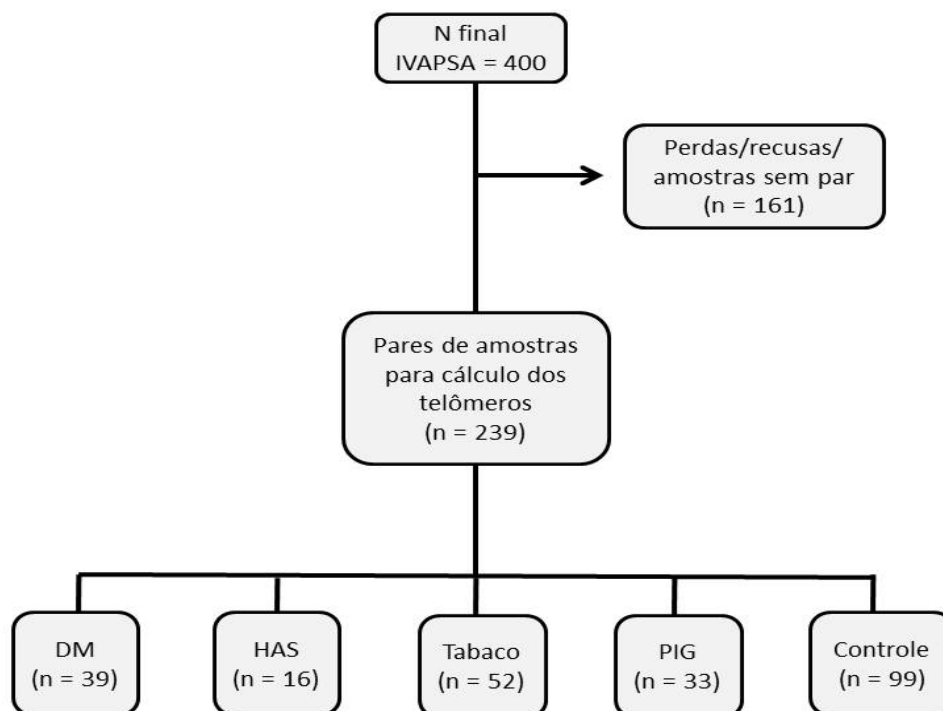
As mães que se encaixavam em mais de uma classificação eram consideradas grupo misto, e foram retiradas das análises. Todos os recém-nascidos eram a termo.

5.2.4 - Tamanho da Amostra

No presente estudo foram analisadas amostras de DNA de células da mucosa oral contidas na saliva de mães e RNs, coletadas do projeto original IVAPSA (registrado no HCPA nº 11-0097) no período de 2011 a 2015, o qual contou com um n final de 400 pares mãe-criança. Em alguns casos houve perda do seguimento e recusa de participação. Algumas amostras de DNA tiveram baixa qualidade de extração e não puderam ser recoletadas, deixando alguns pares incompletos, em que apenas um indivíduo tinha a amostra de DNA disponível e com qualidade para análise. Esses casos foram excluídos (n excluído= 161).

Assim, o n disponível para análise dos telômeros foi de 239 duplas, sendo 39 do grupo DM; 16 do grupo HAS; 52 do grupo TABACO; 33 do grupo PIG e 99 do grupo CONTROLE.

Figura 5 – Fluxograma de tamanho amostral



5.3 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS

5.3.1 Coleta

As células da mucosa oral com a saliva da mãe e da criança foram coletadas com o auxílio de swabs estéreis. Após a coleta, as amostras foram devidamente transportadas em tubos e armazenadas a -20°C no Laboratório de Pediatria Translacional / NESCA, localizado no Centro de Pesquisa Experimental – HCPA.

5.3.2 - Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada por meio de protocolo previamente estabelecido (BERNARDI *et al.*, 2012) e sua quantificação foi realizada em aparelho NanoDrop. O material foi armazenado a -20°C até sua análise.

5.3.3 - Escolha do protocolo de PCR em Tempo Real

Em sua primeira técnica desenvolvida para quantificação dos telômeros por PCR em tempo real, em 2002, Cawthon e colaboradores propuseram o cálculo de uma relação entre o número de cópias de dois genes diferentes: o dos telômeros e o de um gene de cópia simples. Em 2002, o autor trabalhou com duas reações de PCR separadas, com temperaturas e número de ciclos diferentes, sendo específicas para cada par de *primers* utilizado, e posteriormente era feito o cálculo da razão T/S entre essas placas. Porém, dessa forma a técnica estava sujeita a erros de pipetagem e diferenças entre as placas.

Para resolver este problema, Cawthon propôs em 2009 uma técnica unificada, utilizando os dois pares de *primers* (modificados e especificamente desenhados para esse fim) em uma mesma reação. Seria necessário, portanto, duas leituras de sinal em uma mesma reação, o que, segundo o autor, foi viável no aparelho iQ5 da Bio-Rad.

Tentamos inicialmente implementar a metodologia de Cawthon 2009 nos aparelhos de PCR em tempo real disponíveis no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA. Não conseguimos obter as duas leituras de sinal em uma mesma reação. Acreditando tratar-se de uma limitação do aparelho, procuramos reproduzir a técnica no mesmo aparelho utilizado pelo autor do artigo. Assim, buscamos junto ao representante da Bio-Rad no Rio Grande do Sul, quais instituições que possuíam aquele aparelho, e assim entramos em contato com o professor Dr. Fernando Spilki, da FEEVALE em Novo Hamburgo. O aparelho era exatamente da mesma marca e modelo utilizados por Cawthon (2009), mas

ainda assim não foi possível reproduzir a técnica. Após testar os pares de *primers* em reações separadas e correr curvas de eficiência, fizemos várias tentativas de obter as duas leituras de sinal na mesma reação, o que não foi possível. Entramos em contato com o autor, mas não tivemos retorno. Observamos também que todos os artigos posteriores que citavam este método possuíam alguma mudança no protocolo, e referenciavam “Cawthon 2009, com modificações”.

Sendo assim, e ao entrar em contato com outros pesquisadores da UFRGS que trabalhavam com análise de telômeros, optamos por utilizar o protocolo de Cawthon 2002 com modificações de Barbé-Tuana (2016), o qual já estava implementado e vinha sendo utilizado há algum tempo no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFRGS (GRUN, 2015; BARBÉ-TUANA *et al.*, 2016).

Assim, utilizamos o equipamento de PCR em tempo real do serviço de Endocrinologia da UFRGS (Applied Biosystems 7500). Padronizamos a reação e iniciamos as análises dos 239 pares de mãe-criança da coorte do projeto IVAPSA.

5.3.4 - Análise por PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real para os telômeros contém: 2 µL de SYBR Green (I nucleic acid gel stain – Invitrogen, EUA. Estoque 10.000X – diluído em DMSO para 100x; posteriormente diluído em água para 1x para uso); 2 µL de Tampão 10x PCR MgCl₂ (Invitrogen, EUA); 0,8 µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen, EUA); 0,04 µL de dNTP 100 mM (Invitrogen, EUA); 0,1 µL de *Primer F* 50 µM; 0,2 µL de *Primer R* 50 µM (Invitrogen, EUA); 0,08 µL de *Taq Platinum* (Invitrogen, EUA) e 12,28µL de água estéril autoclavada. As reações, tanto para os telômeros quanto para o 36B4 continham 25ng de

DNA extraído (2,5 µL de DNA na concentração 10 ng/ µL). O volume final da reação foi de 20µL.

Na reação para o gene 36B4 a quantidade de *primer* F é de 0,12 µL por amostra, e o volume final de água estéril por amostra é de 12,26 µL. Tanto para o gene dos telômeros quanto do 36B4 os *primers*, *Foward* e *Reverse* possuíam concentração de 50 µM para uso.

Sequência de *primers* para análise de telômeros:

Foward (5'→3'): GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT

Reverse (3'→ 5'): TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA

Sequência de *primers* para análise de 36B4:

Foward (5'→3'): CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC

Reverse (3'→5'): CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

O gene 36B4 é autossômico de cópia simples e foi utilizado como controle endógeno da reação para determinação do número de cópias do genoma por amostra (BOULAY et al., 1999; GRUN, 2015).

Os experimentos foram realizados no aparelho de PCR em tempo real 7500 da Applied Biosystems. Para a reação dos telômeros foi utilizado o seguinte perfil térmico: Estágio 1: 10 min a 95°C; Estágio 2: 20 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 54°C por 2 minutos, seguido da curva de dissociação. Já para a amplificação do gene 36B4 foi utilizado o seguinte perfil: Estágio 1: 10 min a 95°C; Estágio 2: 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto, seguido da curva de dissociação. O protocolo, incluindo os *primers* utilizados, foi baseado no trabalho de Cawthon e col. (2002), padronizado por GRUN em 2015.

5.3.5 - Processamento dos dados

Foi comparada a taxa de amplificação dos fragmentos de PCR do telômero e do gene cópia simples, obtida pelo cálculo $[2^{CT(\text{telômeros})}/2^{CT(36B4)}]^{-1}$, denominado razão T/S (CAWTHON, 2002 com modificações de BARBÉ-TUANA *et al.*, 2016). A variação da razão T/S é indicativa se há encurtamento do comprimento dos telômeros.

5.3.6 - Análise estatística

Os dados foram inseridos em banco por meio do programa SPSS versão 18.0. Os valores dos telômeros possuem distribuição assimétrica. Após a transformação em logaritmo, os valores ficaram normais, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os testes foram feitos com logaritmo, e ao final convertidos para média geométrica e intervalo de confiança. Foi utilizada ANOVA para comparação das médias dos telômeros entre os grupos e ANCOVA para as comparações com ajuste. Utilizou-se teste t para amostras independentes e foram feitas correlações de Pearson e Spearman para verificar a associação entre variáveis maternas e da criança e o comprimento telomérico.

5.4 – ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto é um segmento do projeto intitulado “IVAPSA - Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Recém-Nascido nos Primeiros Seis Meses de Vida” previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob os números 11-027 e 11-0097, respectivamente.

6. RESULTADOS

Os resultados contaram com amostras de 239 duplas, divididas por grupo: Diabetes (DM) (n=39); Hipertensão (HAS) (n=16); Tabaco (n=52); Pequenos para a Idade Gestacional (PIG) (n=33) e Controle (n=99).

As amostras analisadas apresentaram diferença significativa ($p = 0,001$) entre os grupos, em relação à idade, entre o grupo DM e PIG, e entre PIG e HAS: as mães dos grupos DM e HAS apresentaram idades maiores, quando comparadas às do grupo PIG. Em relação ao peso ao nascer, e validando a seleção da nossa amostra, o grupo PIG diferiu de todos os demais. Na situação conjugal, houve diferença entre os grupos TABACO e Controle: as mães do grupo TABACO eram as que menos viviam com seus companheiros, quando comparado ao grupo Controle; o mesmo também foi observado para a renda familiar: as mães do grupo TABACO tinham menor renda familiar, em comparação ao grupo Controle. Para o IMC materno, não houve diferença entre os grupos DM e HAS, e entre os grupos TABACO, PIG E Controle. Entretanto, os grupos DM e HAS apresentaram as maiores médias de IMC pré-gestacional quando comparado aos demais grupos. Para as variáveis sexo da criança, escolaridade e tipo de parto não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0.05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características maternas e dos recém-nascidos entre os grupos de estudo

Variáveis	DM (n=39)	HAS (n=16)	TABACO (n=52)	PIG (n=33)	CONTROLE (n=99)	Total (n=239)	p* valor
Idade (anos) [mediana, P25 – P75]	29 [24 – 34] ^a	29 [24 – 35] ^{ac}	23 [20 – 29] ^{bc}	22 [20 – 28] ^b	25 [20 – 31] ^{bc}	25 [20 – 31]	0,001
Sexo da criança: n (%)							0,478
Feminino	19(48,7)	10 (62,5)	23 (44,2)	20 (60,6)	55 (55,6)	127 (53,1)	
Masculino	20 (51,3)	6 (37,5)	29 (55,8)	13 (39,4)	44 (44,4)	112 (46,9)	
Peso ao nascer da criança (g) ($\bar{x} \pm DP$)	3447 \pm 442 ^b	3355 \pm 488 ^b	3212 \pm 341 ^b	2500 \pm 182 ^a	3412 \pm 420 ^b	3245 \pm 495	<0,001
Situação Conjugal: n (%)							0,004
Com companheiro	33 (84,6) ^{ab}	13 (81,3) ^{ab}	32 (61,5) ^a	28 (84,8) ^{ab}	86 (86,9) ^b	192 (80,3)	
Sem companheiro	6 (15,4)	3 (18,8)	20 (38,5)	5 (15,2)	13 (13,1)	47 (19,7)	
Escolaridade (anos de estudo) [mediana, P25 – P75]	10 [7 – 11]	11 [7 – 11]	8,5 [7 – 11]	10 [8 – 11]	10 [8 – 11]	10 [8 – 11]	0,145
Renda da Família: [mediana, P25 – P75]	1500 [975 – 2900] ^{ac}	1500 [1000 – 2300] ^{ac}	1227,50 [800 – 1800] ^a	1750 [1042,50 – 3000] ^{ac}	2000 [1200 – 2500] ^{bc}	1600 [1000 – 2500]	<0,001
Tipo de Parto: n (%)							0,076
Cesárea	17 (44,7)	9 (56,3)	10 (19,2)	10 (30,3)	31 (31,3)	77 (32,4)	
Vaginal	21 (55,3)	7 (43,8)	42 (80,8)	23 (69,7)	68 (68,7)	161 (67,6)	
IMC mat pré-gest (média)	30,30 ^b	31,69 ^b	25,08 ^a	24,29 ^a	25,02 ^a	26,24	<0,001

Legenda: DM: Diabetes *Mellitus*; HAS: Hipertensão; PIG: Pequeno para a Idade Gestacional; IMC: Índice de Massa Corporal; DP: Desvio Padrão; P: Percentil. * ANOVA *post hoc* de Tukey para variáveis paramétricas; *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de Dunn para as variáveis não paramétricas. Letras distintas representam médias ou proporções diferentes.

Os telômeros são uma variável assimétrica, não possuindo distribuição normal na população. Sendo assim, os valores foram convertidos em logaritmo, para que fosse possível trabalhar com análise de variância e testes posteriores. Ao reconverter uma análise com logaritmo, observa-se a média geométrica e o intervalo de confiança.

Tabela 2 – Comprimento telomérico (razão T/S) dos recém-nascidos e mães por grupo

GRUPO	N	Recém-nascidos		Mães	
		Média geométrica	IC 95%	Média geométrica	IC 95%
DM	39	1,096	[0,913 - 1,317]	0,748	[0,634 - 0,885]
HAS	16	1,130	[0,852 - 1,500]	0,764	[0,591 - 0,990]
TABACO	52	1,183	[1,012 - 1,383]	0,914	[0,792 - 1,054]
PIG	33	0,966	[0,793 - 1,176]	0,753	[0,629 - 0,901]
CONTROLE	99	1,247	[1,115 - 1,398]	0,802	[0,723 - 0,889]
Total	239				
p* valor		0,239		0,352	

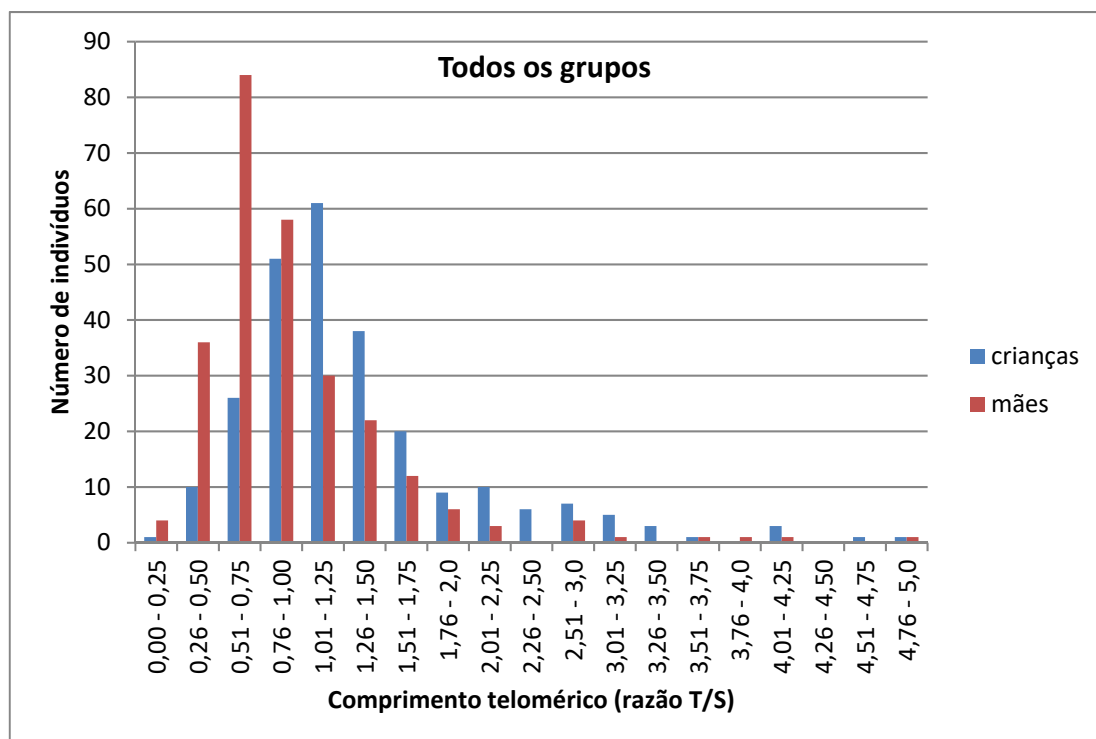
Recém-nascidos e mães: média geométrica ajustada pela idade materna. Legenda: DM: Diabetes *Mellitus*; HAS: Hipertensão; PIG: Pequeno para Idade Gestacional; IC: Intervalo de Confiança. *ANCOVA = Análise de Covariância.

Não houve diferença significativa entre o comprimento telomérico dos grupos das crianças ($p=0,239$). Embora não tenha sido significativo, o grupo PIG apresenta as menores médias de telômeros.

Ao avaliarmos o telômero das mães ajustado pela idade também não observamos diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,352$)

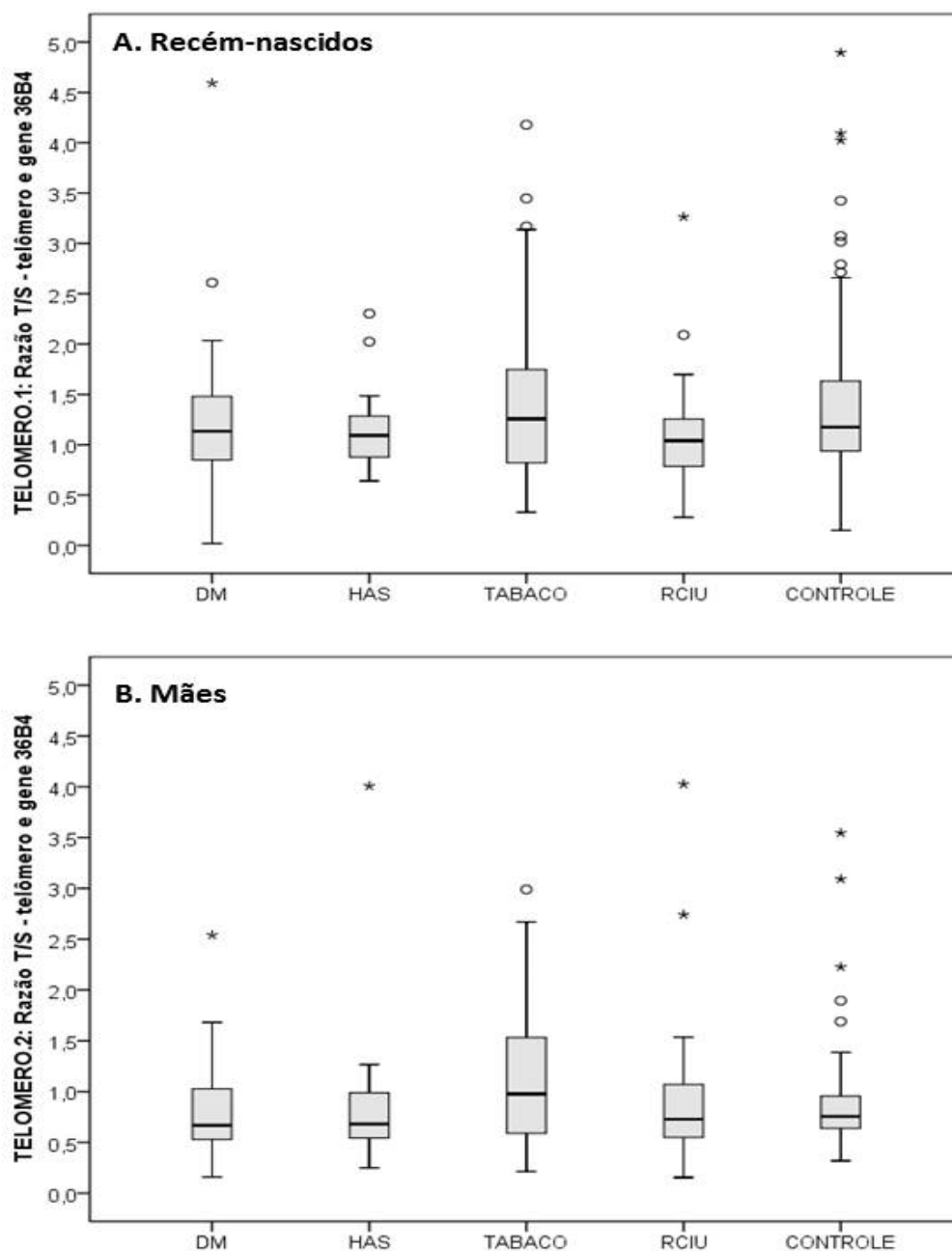
O comprimento telomérico das mães e das crianças está representado na Figura 6 em número absoluto. As mães possuem maior quantidade de telômeros menores (Figura 6), enquanto entre as crianças a curva normal está levemente deslocada para a direita, indicando maior quantidade de telômeros maiores.

Figura 6 - Comprimento telomérico mães e RNs (N total)



A mediana da relação telomérica das crianças e das mães não variou entre os grupos (Figura 7).

Figura 7 – Boxplot. Comprimento telomérico (razão T/S) entre os grupos. Figura A: telômeros das crianças. Figura B: telômero das mães.



Foi feita uma análise entre as duplas mãe-criança, e foi encontrada uma associação ainda que fraca entre os telômeros das mães e dos seus filhos, presente em todos os grupos (0,237) (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação entre o telômero das mães e seus filhos

		TELOMERO RECÉM NASCIDOS	TELOMERO MÃE
TELÔMERO RECÉM NASCIDOS	Correlação de Pearson	1	0,237**
	Correlação		
	Sig. (bicaudal)		0,000
	N	239	239

** Correlação é significativa no nível 0.01 (bicaudal).

O grupo TABACO foi estratificado por quantidade de cigarro (Tabela 4), e relacionado ao comprimento dos telômeros de mães e filhos. Os valores foram ajustados pela idade da mãe.

Tabela 4 – Comprimento telomérico (razão T/S) de mães tabagistas na gestação (grupo TABACO) e dos seus filhos.

		<i>Recém-nascidos</i>		<i>Mães</i>	
Quantidade de cigarros	N	Média geométrica	Intervalo de Confiança 95%	Média geométrica	Intervalo de Confiança 95%
1 - 5 cigarros	16	1,622	[1,207 - 2,178] ^a	1,285	[0,955 - 1,727] ^a
6-20 cigarros	31	1,000	[0,809 - 1,235] ^b	0,764	[0,617 - 0,944] ^b
21 - 60 cigarros	5	1,330	[0,786 - 2,253] ^{ab}	1,050	[0,619 - 1,781] ^{ab}
F=4,236; gl 2,48; p=0,020			F=3,674; gl 2,48; p=0,033		

*ANCOVA, ajustado por *Bonferroni*.

Houve diferença entre os grupos, para o primeiro e segundo grupos ($p = 0,020$): quanto maior o consumo de cigarros na gestação, menor o telômero da mãe. No terceiro grupo a diferença não foi encontrada, provavelmente devido ao número pequeno de indivíduos avaliados ($n=5$). O mesmo acontece com o telômero das crianças do grupo tabagista: houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,033$), e quanto maior o consumo de cigarros pela mãe na gestação, menor o telômero das crianças ao nascimento.

Não houve associação entre o IMC pré gestacional das mães e os seus telômeros. Também não houve correlação entre o peso ao nascer da criança e o comprimento do telômero da criança, mesmo para o grupo PIG. Não houve correlação entre telômero materno e número de filhos anteriores, nem entre atividade física moderada ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Vários estudos analisaram a influência do comprimento telomérico nos padrões de saúde e doença das pessoas. Apesar disso, poucos dados são encontrados na literatura descrevendo influências precoces tais como fatores pré-natais. Nosso estudo, buscou após extensa revisão sistemática da literatura, recentemente publicada (Anexo 2), avaliar a importância de ambientes intrauterinos estressores nos telômeros de crianças, conhecendo também o comprimento telomérico de suas mães.

A distribuição do comprimento telomérico é heterogênea na população, inclusive nas mães deste estudo. Conforme ocorre a replicação celular e o envelhecimento, os telômeros vão encurtando, podendo esse processo ser acelerado por agentes estressores endógenos ou exógenos. Assim, o ambiente intrauterino reflete características maternas, as quais, dentro de um padrão persistente, podem interferir sobre os telômeros das mães. Dessa forma, um ambiente intrauterino adverso reflete condições da mãe, frequentemente anteriores à gestação, que podem ser responsáveis pela maior velocidade de atrito dos seus telômeros, e conseqüentemente da carga telomérica repassada aos descendentes.

Para análise adequada dos resultados obtidos, três aspectos principais devem ser tomados em consideração: 1. a definição dos grupos (critérios de inclusão). 2. a herdabilidade do telômero e 3. o método laboratorial de análise.

7.1 - DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

As 239 duplas de amostras, foram classificadas conforme os grupos: Diabetes (n=39), Hipertensão (n=16), Tabaco (n=52), Pequeno para a Idade Gestacional (n=33) e Controle (n=99).

O grupo Hipertensão (HAS) que avaliamos contou com somente 16 amostras, sendo: 4 puérperas com hipertensão crônica, 5 com pré-eclâmpsia e 7 com hipertensão gestacional. Como os telômeros não possuem distribuição normal na população, o *n* dos subgrupos é pouco expressivo para se fazer uma comparação. Por ser heterogêneo e possuir um *n* pequeno (16), decidimos excluir o grupo HAS e refazer as análises: não houve alteração significativa nos resultados. A falta de homogeneidade nesse grupo pode ter contribuído para o não aparecimento de diferença significativa nas análises. Em um estudo transversal publicado em 2002, Okuda e colaboradores não encontraram diferença significativa no comprimento telomérico de recém-nascidos cujas mães tiveram hipertensão gestacional (n=27) ou pré-eclâmpsia (n=17) comparadas às mães do grupo controle (n=138). Esse estudo contou apenas com recém-nascidos com peso superior a 3000g e idade gestacional superior a 38 semanas. De forma semelhante, Xu e colegas em 2014 também não observaram diferença significativa entre o telômeros de filhos de mulheres com hipertensão gestacional (n=15) ou pré-eclâmpsia (n=45) em relação aos filhos do grupo controle (n=65); todas as crianças nasceram por cesárea; foram selecionados apenas neonatos saudáveis de tamanho adequado para a idade gestacional no grupo controle. No entanto, em relação à idade gestacional, o grupo pré-eclâmpsia apresentou média de 33.4 semanas – o que difere das nossas amostras, pois selecionamos apenas recém-nascidos a termo (maior que 37 semanas) em todos os grupos. Em relação ao peso ao nascer, o grupo pré-eclâmpsia apresentou média 2.533 ±739g. As nossas amostras incluíam apenas crianças que nasceram com peso superior a 2.500g. Resultados parecidos com os de Sukenik-Halevy e colaboradores em 2016: não houve diferença no comprimento telomérico do cordão umbilical de filhos de mulheres com pré-eclâmpsia severa comparados com o grupo controle. Esse estudo contou com 9 amostras de pacientes com pré-eclâmpsia sem restrição de crescimento intrauterino, e

14 amostras do grupo controle, portanto um n pequeno, uma vez que os telômeros apresentam grande variabilidade de comprimento na população. Nosso grupo selecionou mães hipertensas que tiveram recém-nascidos sem baixo peso e nascidos a termo, no intuito de observar apenas o efeito do fator hipertensão no estudo. Talvez a condição de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia não influencie tanto nos telômeros do feto por ser uma situação tardia: o diagnóstico se dá a partir de 20 semanas de gestação. Por outro lado, porém relacionado à hipertensão arterial sistêmica, Tellechea e colegas (2015) realizaram um trabalho no qual a pressão arterial mais alta durante a gravidez, assim como o histórico de hipertensão prévia, estavam associados a telômeros menores.

O grupo Tabaco inclui mães que responderam "SIM" para a questão do fumo na gestação, independentemente do número de cigarros. Como as mães que se encaixavam em mais de um grupo eram classificadas como grupo Misto e excluídas das análises, no grupo Tabaco, mães com crianças PIG não foram coletadas. Julgamos que este pode ser um critério de seleção que implicou em nossos resultados. Independente deste fator, na análise estratificada por quantidade de cigarro, aquelas mães que fumaram de 1 a 5 cigarros por dia ($n = 16$) possuíam telômeros maiores do que aquelas que fumaram de 6 a 20 cigarros por dia ($n = 31$) ($p < 0,05$). Não houve diferença em relação ao terceiro grupo, das mães que fumavam de 21 a 60 cigarros por dia, provavelmente devido ao n pequeno (5). O mesmo efeito foi observado em relação às crianças: aquelas cujas mães fumaram de 6 a 20 cigarros por dia, tinham telômeros menores do que os filhos de mães que fumaram de 1 a 5 cigarros por dia. No terceiro grupo também não houve diferença. Sendo assim, nosso estudo indica que quanto mais uma mãe fuma, menor é o seu telômero e o do seu filho. Isto demonstra que o ambiente intrauterino de mães tabagistas pode interferir no telômero da prole numa relação dose-resposta inversa. Estes resultados são condizentes com o descrito na literatura. Em um estudo de coorte feito

por Salihu e colaboradores em 2015, utilizando sangue do cordão umbilical de recém-nascidos a termo, foi observado que filhos de mulheres não fumantes tinham telômeros maiores do que aqueles de mães fumantes passivas, e estes por sua vez, tinham telômeros maiores que crianças de fumantes ativas.

No que se refere ao Grupo DM, também confirmamos dados previamente descritos na literatura. Nosso grupo Diabetes tinha como critério de seleção no projeto original a inclusão de mães com diabetes tipo 1, tipo 2 e gestacional, porém a nossa amostra contou apenas com mães com diabetes gestacional. Em nosso estudo não observamos nenhuma diferença entre o comprimento telomérico das mães ou das crianças deste grupo em relação ao controle ou em relação aos demais grupos. Cross e colaboradores em 2010 também não encontraram diferença significativa no telômero do sangue do cordão umbilical de mães com diabetes tipo 1, tipo 2 ou gestacional, quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, em uma pesquisa liderada por Okuda (2002), não houve diferença significativa entre o telômero de mães com diabetes pré-gestacional (n=7) e o grupo controle (n=158). Em contrapartida, no trabalho feito por Xu e colegas, o qual também avaliou mães com pré-eclâmpsia, o telômero fetal do grupo diabetes gestacional (n=82) foi significativamente menor do que o do grupo controle (n=65). Nossos dados corroboram o que já é em parte descrito na literatura.

Em nosso estudo, no grupo PIG não houve diferença significativa entre os telômeros das mães comparado aos outros grupos. Em relação às crianças, apesar de parecer haver uma diferença, com média de comprimento telomérico menor que as crianças dos outros grupos, esta diferença não foi significativa. Este resultado também confirma dados da literatura (TELLECHEA et al., 2015; AKKAD et al., 2005).

Embora possa existir variação de metabolismo, o encurtamento telomérico está presente em todos os tecidos. Os tipos de amostra mais encontrados na literatura são sangue e saliva, e frequentemente mostram resultados correspondentes.

Não houve diferença significativa nas médias dos telômeros das crianças entre os grupos. Isso pode ser explicado pela ação da telomerase no período embrionário. Sabe-se que a enzima que restitui os telômeros está mais ativa na fase de formação do embrião (WRIGHT et al., 1996), ficando pouco ativa no indivíduo adulto, sendo reativada apenas em situações especiais, como na reparação de tecidos e em tumores (JAGER E WALTER, 2016). É possível que a gestação ofereça uma espécie de proteção contra danos aos bebês em formação, e que a telomerase, em razão da sua atividade no período, consiga atenuar os eventuais desgastes que poderiam impactar nos telômeros das crianças. No entanto, outra perspectiva a ser considerada é que as condições diabetes, hipertensão e pequeno para a idade gestacional são resultantes de alterações fisiológicas puramente endógenas no corpo da mãe, enquanto que o grupo tabaco sofreu a ação de um agente externo. Quando avaliado dentro do grupo Tabaco, por estratificação, é possível observar um maior consumo de cigarro relacionado ao comprimento telomérico menor. Essa mesma análise intra-grupo não foi feita para os grupos HAS (avaliação dos níveis de pressão) e grupo DM (avaliação dos níveis glicêmicos) porque nestes dois grupos os pacientes estavam submetidos a tratamento.

7.2 - A QUESTÃO DA HERDABILIDADE

Na análise vertical, nosso estudo mostrou que nas duplas mãe-criança, há uma correlação, fraca mas significativa, entre telômeros das mães e dos seus filhos, presente em todos os grupos analisados.

Sabe-se que os telômeros são influenciados também no aspecto genético. Parte do telômero é devido a uma carga inicial, constitutiva do indivíduo, que é passada para a próxima geração pelos gametas, parte é devida à herança da telomerase e sua boa funcionalidade para a manutenção dos telômeros, e parte é influenciada pelo ambiente: hábitos de vida e situações externas às quais o indivíduo está exposto, assim como pelo ambiente celular – fatores de inflamação e estresse oxidativo (TURNER & HARTSHORNE, 2013; EPEL & BLACKBURN, 2017). Estas três fontes, em conjunto, determinam se a criança nascerá com telômeros maiores ou menores, sendo, especialmente as situações do ambiente (externo e interno) que determinarão uma maior ou menor velocidade de desgaste telomérico. Nosso estudo apresenta a fragilidade de não incluir o telômero paterno na análise, já que o material biológico se origina de um projeto em que não era prevista a coleta paterna. Segundo alguns trabalhos, o telômero do pai pode influenciar até mesmo mais que o da mãe na herança genética da criança (NORDFJÄLL et al., 2010). Sendo assim, a análise vertical da passagem telomérica, dos pais para o filho, não foi fidedigna por contar apenas com um genitor da criança.

Em adultos, assim como os telômeros podem sofrer maior desgaste por estresse crônico, inflamação celular, estresse oxidativo, condições do ambiente como exposição à violência e hábitos de vida nocivos, estas estruturas também podem se reestabelecer em pequenas quantidades, quando as pessoas conseguem adotar hábitos de vida mais saudáveis, melhorando a qualidade do sono e da alimentação e reduzindo os níveis de estresse (EPEL & BLACKBURN, 2017). Ou seja, existe uma flutuação da carga telomérica que responde aos estímulos ambientais. Resta descobrir qual é o limiar do estímulo que torna um dano permanente e irrecuperável biologicamente, ou quando este se torna mais intenso e mais frequente do que a capacidade da célula de se recuperar.

7.3 - DOS MÉTODOS DE ANÁLISE

Embora o PCR em tempo real venha sendo cada vez mais adotado para análise dos telômeros, por ser uma técnica menos laboriosa que o TRF - até então tido como padrão ouro - e que necessita de pouca quantidade de DNA, esta metodologia tem algumas características que dificultam a sua reprodutibilidade e comparação com outras amostras. Por ser uma técnica altamente sensível, o PCR em tempo real está sujeito à variação de erros de pipetagem, sobretudo pela técnica de Cawthon (2002) utilizar duas reações separadas, para genes diferentes, com temperaturas e números de ciclos diferentes. O gene cópia simples (no nosso caso, o 36B4) é um normalizador do número de cópias da sequência telomérica, e o Ct dos controles positivos regulam a variação interplacas. Ainda assim, podem ocorrer variações na leitura do equipamento (por isso a importância das amostras manterem a mesma localização na placa para os dois genes diferentes) e calibração. Portanto, ao tentar comparar dois estudos diferentes, ou duas populações diferentes, é importante usar a mesma marca e modelo de equipamento, o mesmo gene normalizador, mesma programação no termociclador e até reagentes da mesma marca, para diminuir a possibilidade de viés.

Outro ponto a ser levado em conta é que o PCR em tempo real faz uma média de todos os telômeros existentes na célula. Sendo assim, uma célula somática normal conta com 23 pares de cromossomos, ou seja com 92 telômeros. É possível que algumas doenças estejam relacionadas a telômeros pequenos em cromossomos específicos, e não apenas à média da célula, no entanto, a metodologia mais específica para telômeros de cromossomos individuais, STELA - Análise de Comprimento Único de Telômeros (do inglês, Single Telomere Length Analysis) conta com apenas alguns *primers* específicos, pois a variabilidade de sequência na maior parte das regiões subtelo méricas só permite

capturar telômeros nos braços dos cromossomos Xp, Yp, 2p, 11q, 12q e 17p (BRITT-COMPTON *et al.*, 2006).

7.4 - LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Ausência de amostra biológica (células da mucosa oral) do pai da criança, para análise vertical da carga telomérica;
- Critérios de seleção ao excluir do grupo Tabaco e HAS as crianças com tamanho pequeno para a idade gestacional (PIG);
- Heterogeneidade do grupo Hipertensão e número pequeno de pacientes neste grupo.

7.5 - PONTOS FORTES DO ESTUDO

- Este é o primeiro estudo de coorte que analisa 5 ambientes intrauterinos ao mesmo tempo e o desgaste telomérico em recém-nascidos;
- Buscamos selecionar grupos puros, ao excluir mães com características que se enquadravam em mais de uma classificação, e ao incluir apenas crianças nascidas a termo em todos os grupos (>37 semanas).
- Nosso número amostral para cada grupo ainda foi maior do que o de alguns estudos já publicados.

8. CONCLUSÃO

Pouco se sabe sobre as influências que os telômeros do indivíduo podem sofrer durante o período fetal. A literatura traz poucos trabalhos e ainda é controversa em relação ao impacto que alguns ambientes intrauterinos podem exercer na criança.

Nosso estudo encontrou que o uso do tabaco pode exercer influência significativa no comprimento do telômero, tanto da mãe quanto do feto, numa relação dose-resposta inversa.

Para os demais ambientes intrauterinos - de mães diabéticas, hipertensas e aquelas que tiveram filhos pequenos para a idade gestacional, num contexto de crianças que não apresentavam situação de risco e nem foram internadas, portanto, híginas - não houve diferença significativa, o mesmo encontrado em outras pesquisas. Algumas hipóteses podem ser formuladas. A atuação da enzima telomerase nessa fase seria capaz de reverter os prováveis danos ocorridos no período? Ou a atuação de um agente externo (nesse caso, o tabaco) tem maior impacto no desgaste telomérico do que alterações fisiológicas mesmo que patológicas no corpo da mãe? Este é o primeiro estudo de coorte que analisa 5 ambientes intrauterinos ao mesmo tempo e o desgaste telomérico em recém-nascidos. Através dele abrimos novas perspectivas de pesquisa dentro da linha de nosso laboratório: a compreensão da origem da relação saúde-doença na infância.

REFERÊNCIAS

AKKAD, A. et al. Telomere length in small-for gestational-age babies. **BJOG.**, v.113, p.318–323, 2005.

ALLSOPP, R. C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 21, p. 10114–10118, 1992.

ARMANIOS, M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. **Mutat.**, v. 730, p. 52–58, 2012.

ARMANIOS, M. et al. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. **Am J Hum Genet.**, v. 85, n. 6, p. 823–832, 2009.

ARMANIOS, M.; BLACKBURN, E. H. The telomere syndromes. **Nat Rev Genet.**, v. 13, n. 10, p. 693–704, 2012.

ATES, U. et al. Acute effects of maternal smoking on fetal hemodynamics. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 87, p. 14-18, 2004.

AUBERT, G.; HILLS, M.; LANSDORP, P. M. Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. **Mutat Res.**, v. 730, p. 59–67, 2012.

AUBERT, G.; LANSDORP, P. M. Telomeres and aging. **Physiological Reviews.**, v. 88, p. 557–579, 2008.

AVIV, A. Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis. **Mutat Res.**, v. 730, p. 68–74, 2012.

BAIRD, D. M. et al. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. **Nat Genet.**, v. 33, p. 203-207, 2003.

BARKER, D. J. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatr Suppl**, v. 93, n. 446, p. 26-33, 2004.

BARBE-TUANA, FM. et al. Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 38, n. 4, p. 281-286, 2016.

BELLAMY, L. et al. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 335, 2007.

BENETOS, A. et al. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. **Hypertension**, v. 43, p. 182–185, 2004.

BERNARDI, J. R. et al. Impact of Perinatal Different Intrauterine Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life--IVAPSA Birth Cohort: rationale, design, and methods. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 2, p. 12-25, 2012.

BERNADOTTE, A.; MIKHELSON, V. A.; SPIVAK, I. M. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. **AGING**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 2016.

BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v. 106, p. 661–673, 2001.

BLACKBURN, E. H.; EPEL, E. S.; LIN, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. **Science**, v. 4, p. 1193-1198, 2015.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. **Nat Rev Genet.**, v. 6, p. 611–622, 2005.

BLASCO, M. A. et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. **Cell**, v. 91, n. 1, p. 25-34, 1997.

BOULAY, J. L. et al. Gene dosage by quantitative real-time PCR. **Biotechniques**, v. 27, n. 2, p. 228-30, 232, Aug 1999.

BRITT-COMPTON, B. et al. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. **Hum Mol Genet.** v. 15, n. 5, p. 725–33, 2006.

BROUILLETTE, S. et al. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 842–846, 2003.

CALADO, R. T. Telomeres and marrow failure. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2009, p. 338–343, 2009.

CARROLL, K. A.; LY, H. Telomere dysfunction in human diseases: The long and short of it! **Int J Clin Exp Pathol**, v. 2, p. 528–543, 2009.

CAWTHON, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, 2009.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e47, 2002.

CHEN, R. et al. Is exposure to secondhand smoke associated with cognitive parameters of children and adolescents?--a systematic literature review. **Ann Epidemiol**, v. 23, n. 10, p. 652-61, 2013.

CHERKAS L. F. et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. **Arch Intern Med.**, v. 2, n. 168, p. 154-8, 2008.

CHO, N. H. et al. **IDF Diabetes Atlas**. Sixth Edition. International Diabetes Federation: 160 p. 2013.

CROSS, J. A. et al. Cord blood telomere length, telomerase activity and inflammatory markers in pregnancies in women with diabetes or gestational diabetes. **Diabet Med.**, v. 27, n. 11, p. 1264-70, 2010.

DABELEA, D. et al. Association of intrauterine exposure to maternal diabetes and obesity with type 2 diabetes in youth: the SEARCH Case-Control Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1422-1426, 2008.

DAN, T. A. et al. Delayed paternal age of reproduction in humans is associated with longer telomeres across two generations of descendants. **PNAS**, v. 109, n. 26, 2012.

DANIALI, L. et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. **Nat Commun.**, v. 2013, n. 4, p. 1597, 2013.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes Dev.**, v. 19, p. 2100–2110, 2005.

EBERLE, C.; AMENT, C. Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. **Pediatr.**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

EGO, A. Definitions: small for gestational age and intrauterine growth retardation. **J Gynecol Obstet Biol Reprod.**, v. 42, n. 8, p. 872-94, 2013.

EPEL, E. S. et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 17312–17315, 2004.

EPEL, E.; BLACKBURN, E. **O Segredo Está nos Telômeros: Receita Revolucionária Para Manter a Juventude, Viver Mais e Melhor**. Ed. 1. Brasil: Planeta do Brasil, 2017.

EISENBERG, D. T. A.; KUZAWA, C. W.; HAYES, M. G. Improving qPCR telomere length assays: controlling for well position effects increases statistical power. **Am J Human Biol.**, v. 27, n. 4, p. 570-575, 2015.

FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, D. A.; FORHEAD, A. J. Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences. **Physiology**, v. 21, p. 29-37, 2006.

FRICK, A. P. et al. Prediction of large for gestational age neonates: Screening by maternal factors and biomarkers in the three trimesters of pregnancy. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 47, n. 3, p. 332-339, 2016.

GEELHOED, J. J. et al. Preeclampsia and gestational hypertension are associated with childhood blood pressure independently of family adiposity measures: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **Circulation**, v. 122, p. 1192-1199, 2010.

GLOUSKER, G. et al. Unraveling the pathogenesis of Hoyerdal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. **Br J Haematol.**, v. 170, n. 4, p. 457-71, 2015.

GOLDMAN, F. et al. The effect of TERC haploinsufficiency on the inheritance of telomere length. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 102, n. 47, p. 17119–17124, 2005.

GRUN, L. K. **Padronização da Técnica de PCR em Tempo Real para a Determinação do Comprimento Relativo de Telômeros em Diferentes Desordens Associadas ao Envelhecimento**. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res.**, v. 25, p. 585-621, 1961.

HEMANN, M. T. et al. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. **Cell**, v. 107, n. 1, p. 67–77, 2001.

HERSKOVITS, D. et al. Fetal programming of adult kidney disease; Cellular and molecular mechanism. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 2, p. 334-342, 2007.

HJELMBORG, J. B., et al., The Heritability of Leucocyte Telomere Length Dynamics, **Journal of Medical Genetics**, n.5, p. 52, 2015.

IDF. **Diabetes atlas. 7th ed.** Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.

JÄGER, K.; WALTER, M. Therapeutic Targeting of Telomerase. **Genes**, v. 7, n. 39, 2016.

JIA, P.; HER, C.; CHAI, W. DNA excision repair at telomeres. **DNA Repair (Amst)**, v. 36, p. 137-145, 2015.

KANGURU, L. et al. The burden of diabetes *mellitus* during pregnancy in low- and middle-income countries: a systematic review. **Glob Health Action**, v. 7, 2014.

KANNISTO, V.; CHRISTENSEN, K.; VAUPEL, J. W. No increased mortality in later life for cohorts born during famine. **Am J Epidemiol.**, v. 145, n.11, p. 987-94, 1997.

KAWANISHI, S., OIKAWA, S. Mechanism of Telomere Shortening by Oxidative Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1019, p.278-84, 2004.

KHAZIPOV R, LUHMANN HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. **Trends Neurosci.**, n. 29, p. 414-8, 2006.

KIM, J. et al. Genotype-environment interactions for quantitative traits in Korea Associated Resource (KARE) cohorts. **BMC Genet.**, v. 4, p. 15-18, 2014.

KIMURA, M. et al. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. **Nat Protoc.**, v. 5, n. 9, p. 1596–607, 2010.

KUMAR, M.; LECHER, A.; GÜNE, Ç. Telomerase: The Devil Inside. **Genes**, v. 7, n. 8, p. 43, 2016.

LANDE, R. Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. **J. Evol. Biol.**, v. 22, p. 1435–1446, 2009.

LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Developmental Origins of Adult Disease. **Med Princ Pract.**, v. 19, p. 87-98, 2010.

LEE, J. Y. et al. Association between dietary patterns in the remote past and telomere length. **Eur J Clin Nutr.**, v. 9, n. 69, p. 1048-52, 2015.

LEE, Kathryn A. et al. Telomere Length Is Associated with Sleep Duration But Not Sleep Quality in Adults with Human Immunodeficiency Virus. **Sleep**, n. 37, p.157–166, 2014.

LEVE, L. D. et al. Infant pathways to externalizing behavior: evidence of Genotype × Environment interaction. **Child Dev.**, v. 81, n. 1, p. 340–356, 2010.

LINGNER, J.; COOPER, J. P.; CECH, T. R. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? **Science**, v. 269, p. 1533–1534, 1995.

LIU, L. et al. An Essential Role for Functional Telomeres in Mouse Germ Cells during Fertilization and Early Development. **Developmental Biology**, v. 249, p. 74–84, 2002.

MACHADO, J. B.; LOPES, M. H. I. Abordagem do tabagismo na gestação. **Scientia Medica**, v. 19, p. 75-80, 2009.

MAKHOUL, I. R. et al. Selenium concentrations in maternal and umbilical cord blood at 24-42 weeks of gestation: basis for optimization of selenium supplementation to premature infants. **Clin Nutr.**, v. 23, p. 373-381, 2004.

MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 2009.

MARTINEZ, P. ; BLASCO, M. A. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. **Nat Rev Cancer**, v. 11, p. 161–176, 2011.

MAYER, C.; JOSEPH, K. S. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. **Ultrasound Obstet Gynecol.**, v.41, n.2, p.136-45, 2013.

MOYZIS, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 6622–6626, 1988.

MULLER, H. J. The remaking of chromosomes. **Collecting Net.**, v. 13, p. 181–195, 1938.

MUNDSTOCK, E. et al. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. **Obesity**, n. 23, p. 2165–2174, 2015.

NERSISYAN, L. Integration of Telomere Length Dynamics into Systems Biology Framework: A Review. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 10, p. 35-42, 2016.

NERSISYAN, L.; ARAKELYAN, A. Computel: computation of mean telomere length from whole-genome next-generation sequencing data. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

NEUMAN, A. et al. Maternal smoking in pregnancy and asthma in preschool children: a pooled analysis of eight birth cohorts. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 186, n. 10, p. 1037- 43, 2012.

NORDFJÄLL, K. et al. Large-scale parent–child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p.385-389, 2010.

O'CONNOR, C. et al. A review of contemporary modalities for identifying abnormal fetal growth. **J Obstet Gynaecol**, v. 33, n. 3, p. 239-45, 2013.

OESEBURG, H. et al. Telomere biology in healthy aging and disease. **Pflgers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 459, p. 259–268, 2010.

OKAZAKI, R. et al. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 59, p. 598–605, 1968.

OKUDA, K. et al. Telomere length in the newborn. **Pediatr Res.**, v. 52, n. 3, p. 377-81, 2002.

O’SULLIVAN, J. N. et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization (QFISH) of telomere lengths in tissue and cells. **Curr Protoc Cytom.**, cap. 12, unid. 12.6, 2005.

PANOSSIAN, L. A. et al. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimers disease status. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 77–84, 2003.

PARK, M. et al. Where You Live May Make You Old: The Association between Perceived Poor Neighborhood Quality and Leukocyte Telomere Length. **PLoS One**, v. 6, n. 10, 2015.

PINHEIRO, T. G. et al. Fetal programming: A systematic review of medium and long term health outcomes after intrauterine exposure to maternal hypertensive disorders during pregnancy. **Pregnancy Hypertension**, v. 6, p.188-189, 2016.

RASYD, H.; BAKRI, S. Intra-uterine Growth Retardation and Development of Hypertension. **Acta Med Indones**, v. 48, p. 320-324, 2016.

RAVINDRAN, S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 109, n. 50, p.20198–20199, 2012.

ROGERS, J. M. Tobacco and pregnancy. **Reprod Toxicol**, v. 28, p. 152–160, 2009.

ROSEBOOM, T. J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 185, n. 1-2, p. 93-8, 2001.

SAHIN, E.; DEPINHO, R. A. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. **Nature**, v. 464, p. 520–528, 2010.

SALIHU, H. M. et al. Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 212, 2015.

SAVAGE, S. A.; BERTUCH, A. A. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 12, p. 753–764, 2010.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2014-2015. Grupo editorial nacional. São Paulo: 2015.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2017-2018. Grupo editorial nacional. São Paulo: 2017.

SEDAGHAT, K.; ZAHEDIASL, S.; GHASEMI, A. Intrauterine programming. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 18, n. 3, p. 212-220, 2015.

SHAMPAY, J.; SZOSTAK, J. W.; BLACKBURN, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. **Nature**, v. 310, p. 154–157, 1984.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J. Pediatr.**, v. 83, n. 6, p. 494-504, 2007.

SIRMA, H. et al. The promoter of human telomerase reverse transcriptase is activated during liver regeneration and hepatocyte proliferation. **Gastroenterology**, v. 141, p. 326–337, 2011.

SUKENIK-HALEVY, R. et al. Telomere homeostasis in trophoblasts and in cord blood cells from pregnancies complicated with preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 214, n.2, p. 283, 2016.

TELLECHEA, M. Telomere length in the two extremes of abnormal fetal growth and the programming effect of maternal arterial hypertension. **Sci Rep.**, v.5, 2015.

TURNER, S. & HARTSHORNE, G.M. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 19, n. 8, 2013.

VAZIRI, H. et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. **Am J Hum Genet.**, v. 52, p. 661–667, 1993.

VERDUN, R. E.; KARLSEDER, J. Replication and protection of telomeres. **Nature**, v. 447, p. 924-931, 2007.

VIA, S. et al. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends Ecol. Evol.**, v. 10, p. 212–217, 1995.

VIGGIANO, M. G.; CAIXETA, A. M.; BARBACENA, M. L. Fumo e gravidez: repercussões sobre o conceito e placenta. **J Bras Ginecol**, v. 100, p. 147-152, 1990.

VOGELGESANG, A. et al. Cigarette Smoke Exposure during Pregnancy Alters Fetomaternal Cell Trafficking Leading to Retention of Microchimeric Cells in the Maternal Lung. **PLoS One**, v. 9, 2014.

VON BECKERATH, A. K. et al. Perinatal complications and long-term neurodevelopmental outcome of infants with intrauterine growth restriction. **Am J Obstet Gynecol**, v. 208, n. 2, p. 130-131, 2013.

WATSON, N. F. et al. Sleep Duration and Body Mass Index in Twins: A Gene-Environment Interaction. **Sleep**, v. 35, n. 5, p. 597-603, 2012.

WEISCHER, M.; BOJESEN S.E.; NORDESTGAARD B.G. Telomere Shortening Unrelated to Smoking, Body Weight, Physical Activity, and Alcohol Intake: 4,576 General Population Individuals with Repeat Measurements 10 Years Apart. **PLoS Genet.**, v. 3, n. 10, 2014

WELLINGER, R. In the End, What's the Problem? **Mol Cell Previews.**, v. 53, p. 855-6, 2014.

WENG, N. P. et al. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 2471–2479, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Maternal and perinatal health. Disponível em: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/maternal/maternal_perinatal/en/ Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

WRIGHT, W. E. et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. **Dev Genet.**, v. 18, p. 173–179, 1996.

XU, J. et al. Reduced fetal telomere length in gestational diabetes. **PLoS One**, v. 22, n. 9, 2014.

YAMADA-FUKUNAGA, T. et al. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, n. 108, 2013.

ZAKIAN, V. A. Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. **Experimental Cell Research**, v. 318, p. 1456–1460, 2012.

ZAMBONATO, A. M. K. et al. Risk factors for small-for-gestational age births among infants in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 1, p. 24-29, 2004.

ZHU, H.; BLECHER, M.; VAN DER HARST, P. Healthy aging and disease: Role for telomere biology? **Clin. Sci.**, v. 120, p. 427–440, 2011.

Exposure to different intrauterine environments: implications for telomere attrition in early life.

Isabel Cristina Ribas Werlang^{1,2}, Monique Cabral Hahn^{1,2}, Juliana Rombaldi Bernardi^{1,2,3}, Martha Nast^{4,5}, Marcelo Zubarán Goldani^{1,2,6}, Mariana Bohns Michalowski^{1,6*}

¹ *Laboratório de Pediatria Translacional / Núcleo de Estudos em Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar, Porto Alegre, RS, Brazil*

³ *Departamento de Nutrição – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar, Porto Alegre, RS, Brazil*

⁴ *Research Center, Dr. von Hauser Children's Hospital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany*

⁵ *Department of Pediatric Cardiology and Intensive Care, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany*

⁶ *Departamento de Pediatria – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author- mmichalowski@hcpa.edu.br; +55 51 33598019

Exposure to different intrauterine environments: implications for telomere attrition in early life.

Objective: Studies focusing on telomere attrition in newborns and what factors could be involved in this issue are sparse; most reports have been in adult populations. Thereby, the aim of this study was to present an overview of what is currently known about the relationship between environmental exposure of the fetus during pregnancy and telomere length outcomes in early life. Methods: The MEDLINE (via PubMed) and Bireme databases were searched for studies published until June 1, 2016. Studies that reported telomere length measurement from birth to age 1 year were included. Results: Fifteen articles were selected that evaluated possible relationships between maternal smoking, hyperglycaemia, hypertension, sleep apnoea, psychological stress, folate concentration in early pregnancy, and radiation, in addition to small-for-gestational-age status and preterm birth. We found that sleep apnoea, psychological stress, and folate concentration in early pregnancy were associated with telomere shortening in the newborn. No association was found with radiation, small-for-gestational-age status, or preterm birth. Results for maternal smoking, hyperglycaemia, and hypertension were conflicting, and further studies should be considered. Conclusion: The actual clinical implications of these findings have yet to be investigated.

Keywords: intrauterine environment, telomere attrition, early life, newborn, pregnancy.

Introduction

Telomeres are noncoding sequences of deoxyribonucleic acid (DNA) that are located at the terminal ends of chromosomes [1]. These sequences extend through several kilobases at each chromosome end and protect coding genes from degradation and fusion with other chromosomes. They shorten by approximately 30 to 200 base pairs with each cell division [2]. This process may occur 50–70 times before the telomere reaches a critically short length that may induce cellular death, known as the Hayflick limit. For this reason, some authors have proposed that TL may work as a ‘molecular clock’ [3].

In humans, parental TL influences offspring TL [4], with heritability ranging from 44% to 80%. In other words, TL is highly variable between individuals [5]. Studies about leukocyte TL (LTL) heritability have found conflicting results, with some reporting that LTL inheritance correlates more frequently with maternal TL [6,7], others correlate it with paternal TL [8,9] or both [10].

Females have been shown to have longer telomeres than males [6,10,11] and differences in TL have been noted among different racial and ethnic groups [12,13]. Whereas telomeres shorten with age, men older than 75 years and women older than 80 years tended to have had longer telomeres when they were younger compared to their contemporaries. This suggests that individuals who survive longer than their contemporaries have had longer telomeres since youth [12].

Few studies have focused on the influence of events occurring during the gestational period on neonatal TL. In this systematic review, we will describe what is currently known about environmental exposures during pregnancy and their influence on offspring TL in early life.

Methods

The review is reported in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines.

Literature search strategy

We searched the MEDLINE (via PubMed) and Bireme databases using combinations of the following terms: [newborn OR fetal OR child] AND [telomer*]. The search was limited to studies published until June 1, 2016. We also hand-searched the reference lists of articles identified by this strategy, looking for additional papers (snowball method).

Selection of articles

General inclusion criteria for the studies were as follows: published in English, human subjects, intrauterine environments as independent variable, and TL measured at birth to 1 year of life as dependent variable. The exclusion criteria included TL measurement in placental tissue and review articles.

After removal of duplicates from the results of the two database searches, four authors independently and blindly reviewed the titles, abstracts, and, finally, full papers, selecting only those that met all inclusion criteria. At each step, a fifth reviewer was asked to adjudicate on disagreements regarding the inclusion or exclusion of papers.

Data extraction

Data were extracted and compiled into a table designed to collect information on: title, authors, year, country, study design, sample size, predictor variable, age of the subjects at outcome assessment, analysis technique, outcome measurements, statistical adjustment for confounders and mediators, summary of the findings, and quality grade.

Quality assessment

Four authors independently and blindly performed quality assessment of the included studies. Again, a fifth author was asked to rule on disagreements. We applied a three-category summary grading system (A, B, C) to each study, as proposed by Ip et al [14].

Category A (good) studies had the least bias and exhibited the following characteristics: clear description of population, setting, and comparison groups; appropriate measurement and description of outcomes; appropriate statistical analyses and reporting of findings; honest and clear description of bias and weaknesses; <20% dropout; clear reporting of dropouts; and adjustment for potential confounders. Their results were considered valid. Studies in category B (moderate) were susceptible to some bias, but not enough to invalidate their results. They did not meet all criteria for category A because of some deficiencies, none of which was likely to cause major biases. Finally, studies rated as category C (poor) had significant biases that may invalidate their results; these studies either did not consider potential confounders or did not adjust for them appropriately.

Results

The literature search identified 556 potentially relevant citations in PubMed/MEDLINE and 2650 in Bireme (Figure 1).

[Figure 1 here]

After screening for duplicate articles, irrelevant titles, and abstracts and full texts which did not meet the inclusion criteria, 15 studies were included in this review. The maternal-fetal exposures covered in these studies were: smoking, hyperglycaemia, hypertension, sleep apnoea, psychological stress, folate concentration in early pregnancy, and radiation, in addition to small-for-gestational-age (SGA) status and

preterm birth. A summary of the included papers, including their quality ratings, is displayed in Table 1.

[Table 1 here]

Smoking

Nicotine exposure during pregnancy continues to be a widespread public health problem, impacting both fetal and postnatal health [15]. Two of the studies included in this review (one category A and one category B, both prospective birth cohorts) investigated the influence of maternal smoking during gestation on newborn TL.

Almanzar et al. [16] analysed peripheral lymphocyte subpopulations in smoking (n=111) and non-smoking mothers (n=58) by T-cell-receptor-excision-circles (TRECs), as well as relative TL and cytokine concentrations in their newborns. Analyses were adjusted for maternal and gestational age at delivery, infant sex, birthweight, birth length, head circumference, and Apgar score at 1 and 5 minutes. The authors found that offspring of smoking mothers had significantly longer telomeres than newborns of non-smoking mothers. However, cytokine concentrations were similar in the two groups. The authors suggested that this finding of elongated TL may reflect potential harm to lymphocytes, such as cytogenetic damage induced by smoking, as shown in a previous study [17].

In the second study, carried out in Florida, USA, the authors found an inverse relationship between smoking and fetal TL in a dose-response pattern [18]. TL was longer in children of non-smoking women (n=25) than in children of passive smokers (n=31), who, in turn, had longer TL than children of active smokers (n=30). The authors did not show clearly whether analyses were adjusted for confounders; however, maternal age at birth and gestational age did not differ across groups. This study provided the first evidence of a correlation between umbilical cord blood telomere shortening and smoking during pregnancy. However, its small sample size means that larger studies are required to confirm these findings and to provide more generalizable results.

Hyperglycaemia

According to the international diagnostic criteria and classification [19], hyperglycaemia in pregnancy includes gestational diabetes mellitus and total diabetes in pregnancy, which comprises both known diabetes in pregnant women and previously undiagnosed diabetes that manifests during pregnancy. This metabolic disorder has been associated with adverse outcomes for offspring, such as macrosomia [20] and increased risk of childhood obesity and type 2 diabetes mellitus [21,22].

Our search strategy retrieved three articles that investigated hyperglycaemia in the gestational period, all rated as category A (good). As did the studies related to smoking, all reported divergent results. Okuda et al. [23] found no differences in terminal restriction fragment (TRF) lengths in cord blood between a pre-gestational diabetes group (n=7) and controls (n=158) ($P=0.66$). Likewise, Cross et al. [24] found no significant difference in cord blood TL in mothers with type 1 diabetes (n= 26), those with type 2 diabetes, (n=20) or those with gestational diabetes (n=71) compared with controls (n=127). Pregnancies were carefully matched for maternal and gestational age. In contrast, Xu et al. [25] found that TL was significantly shorter ($P=0.028$) in cord blood of mothers with gestational diabetes (n=82) than in those with normal pregnancies (n=65). A multivariate regression analysis demonstrated a significant association between fetal TL and intrauterine exposure to gestational diabetes ($P=0.027$) even after adjustment for maternal and gestational age, birthweight, and fetal sex. These authors hypothesized that the intrauterine milieu of gestational diabetes

exposes the fetus to oxidative stress, which is possibly involved in fetal telomere attrition, thus leading to TL shortening.

Hypertension

Fetuses exposed to maternal preeclampsia carry an increased risk of hypertension [26], ischemic heart disease, and stroke in later life [27]. Since hypertension in pregnancy exposes the fetus to adverse conditions, a role of this disorder in fetal telomere attrition has been hypothesized. Four studies considering this approach were found in our literature search. Three were classified as category A (good) and one as category B (moderate).

A cross-sectional study published by Okuda et al. [23] showed no differences in TRF lengths in cord blood between newborns whose mothers were diagnosed with hypertension during pregnancy (n=27) or preeclampsia (n=17) and those born to control mothers (n=138). Likewise, Xu et al. [25] found no significant differences in fetal TL between women with gestational hypertension (n=15) and those with normal pregnancies (n=65) ($P=0.561$), nor between those with preeclampsia (PE) (n=45) and those with normal pregnancies ($P=0.841$). In addition, TL was not significantly different in fetuses of women with mild vs. severe PE ($P=0.726$). Sukenik-Halevy et al. [28] also found no difference in TL in cord blood cells between PE pregnancies (n=9) and controls (n=14), despite the difference ($P=0.007$) in gestational age at birth between groups.

In contrast to these reports, Tellechea et al. [29] found that leukocyte TL at birth was significantly associated not only with higher maternal blood pressure during current pregnancy (n=11; $P=0.03$), but also with a history of arterial hypertension in previous pregnancies.

Sleep apnoea

Obstructive sleep apnoea in pregnancy has been shown to be associated with preeclampsia, Caesarean delivery, neonatal intensive care admission, preterm birth, impaired fetal growth, low birthweight, SGA status, and low Apgar score [30,31]. While some studies have linked sleep apnoea to TL in adults [32,33], research on the effects of maternal sleep apnoea during pregnancy on fetal TL has been sparse. We found only one study addressing this issue, which was classified as category A (good).

Salihu et al. [34], in a study designed to assess the impact of maternal sleep dysfunctions on fetal TL in a cohort of 67 mother-newborn pairs, demonstrated that fetuses born to mothers at high risk for sleep apnoea (n=21) had shorter fetal TL than their counterparts born to those at low risk for sleep apnoea (n=46) ($P<0.05$). This was the first study to demonstrate telomere shortening among fetuses exposed to a maternal sleep disorder, and suggests sleep-disordered breathing as a possible mechanism of accelerated chromosomal aging.

Psychological stress

Maternal psychosocial stress exposure has been associated with increased risk of adverse pregnancy and birth outcomes related to preterm birth and low birth weight/SGA status [35, 36]. Furthermore, such exposure may result in increased long-term risk for a range of negative physiological and cognitive health outcomes [37]. We found two studies investigating this issue on newborn TL, both classified as category A (good).

Entringer et al. [38] found a significant, independent, and linear effect of pregnancy-specific stress on cord blood leukocyte TL ($P=0.04$) after adjustment for gestational age, birthweight, sex, and exposure to antepartum obstetric complications. This result corroborates a previous finding on TL in young adults, reported by the same

research group [37]. They used a pregnancy-specific stress scale adapted from a 10-item version that was specifically developed for use in pregnancy research [39].

Recently, Marchetto et al. [40] conducted a prospective cohort study in which they assessed maternal psychosocial stress, measured with the Holmes and Rahe Stress Scale questionnaire, in 24 mother-newborn pairs. The authors found a significant negative association between maternal stress and newborn TL ($\beta=-0.463$, $P=0.04$). Newborns whose mothers experienced a high level of stress during pregnancy had significantly shorter TL (6.98 ± 0.41 kb) compared to newborns of mothers with low stress (8.74 ± 0.24 kb; $t=-3.99$, $P=0.003$).

Folate concentration

Folate concentration represents an important nutritional parameter because it plays crucial roles in fetal development, specifically DNA synthesis, cell proliferation, and neural tube development [41]. An animal study has demonstrated an association of maternal folate intake during pregnancy with methylation status and related offspring phenotype [42].

Our literature search found one study investigating the association of maternal folate concentration during pregnancy with newborn TL. The authors found that maternal total folate concentration in early pregnancy was significantly and positively associated with newborn cord blood TL. Specifically, a 10 ng/ml increase in total folate was associated with a 5.8% increase in median TL (95% CI 0.5–11.3%; $P=0.03$). This effect persisted even after adjusting for a number of other potential determinants of newborn TL [43].

Radiation

Epidemiological studies have been conducted during the last 25 years to evaluate the health effects of life in high natural background radiation areas (HNBRA), mainly in India and China [44]. One study investigated radiation exposure in gestational period and its influence on newborn TL. The authors found no differences in TL between newborns from HLNRA ($n=128$) and newborns from normal-level natural radiation areas ($n=43$) [45].

Small-for-gestational age status

Lower birthweight has been associated with several unfavourable outcomes such as obesity, hypertension, insulin and leptin resistance [46-48]. Thereby, it has been hypothesized that prenatal stress caused by impaired intrauterine growth could lead to accelerated telomere attrition and shortened telomeres at birth. We found two articles addressing this issue, both of which were classified as category A (good).

Akkad et al. [7] investigated 72 women who delivered at 35-42 weeks of gestation, of whom 34 delivered SGA babies (birthweight less than or equal to the third centile) and 38 had appropriately grown babies (birthweight greater than the tenth centile). The authors found a significant correlation between maternal and newborn mean TRF length ($P<0.0001$), which is consistent with the strong genetic influence on TL. However, there was no correlation between birthweight and overall mean fetal TRF length. The small sample size might have precluded detection of small differences in TL between groups.

A second study, performed by Tellechea et al. [29], included 45 newborns with appropriate weight for gestational age (AGA), 12 small for gestational age (SGA), and 12 large for gestational age (LGA). The authors found that LTL was significantly shorter in LGA than in SGA newborns ($P<0.005$). Accordingly, LTL was also correlated significantly and inversely with anthropometric variables, such as head circumference, in the newborn. Consistently with the findings of Akkad et al. [7], LTL in SGA babies was not significantly different from that of AGA babies, suggesting that

the molecular mechanisms underpinning fetal growth restriction are unrelated to telomere biology.

Preterm birth

Preterm birth is considered a major complication of pregnancies worldwide, and identification of women at risk is an essential aspect of prematurity prevention strategies [49].

Two studies included in the present review, with quality ratings of Category B (moderate) and Category A (good), respectively, addressed this factor. The first, a cross-sectional study, found no differences in LTL (measured by TRF) between 15 preterm and 11 full-term neonates ($P=0.06$), using a gestational age of 37 weeks as the cut-off [50]. The second report compared fetal LTL in three groups of newborns with different birth categories: preterm prelabour rupture of membranes (pPROM), spontaneous preterm birth with intact membranes, and full-term birth. Statistical analyses were adjusted for potential confounding factors such as maternal smoking during pregnancy and marital status. The authors found that TL was significantly shorter in the pPROM group than in the spontaneous preterm birth with intact membranes group, but was comparable to that of the full-term birth group. The authors also found that, in normal pregnancies with intact membranes, fetal TL was inversely proportional to gestational age: mean TL decreased as gestation progressed [51].

Discussion

The extent of telomere loss varies over time. Studies have confirmed that rates of telomere attrition vary markedly at different ages [52] and that telomere length shortening occurs faster in the first 3 years of life [53]. This has provided information important to understanding the progression and course of many diseases during childhood [54]. Little is known about changes in TL during human fetal development or which factors can influence it. Our literature search yielded 15 studies that investigated different maternal conditions and newborn telomere attrition.

Maternal sleep apnoea [34], psychological stress [37,40], and folate concentration in early pregnancy [43] have been positively associated with telomere attrition in early life. In contrast, no association has been found for radiation [45], SGA [7, 29], or preterm birth [50,51]. As demonstrated in the Results section, some studies presented conflicting results about TL in relation to exposure (smoking, hyperglycaemia, and hypertension).

Recently, prenatal tobacco exposure has been associated with telomere shortening in children younger than 15 years, with a negative dose-response relationship [55]. A similar outcome was found by Salihu et al. [18] regarding newborn TL, in contrast to Almanzar et al. [16], who demonstrated longer TL in newborns of smoking mothers. These studies recruited racially different populations and measured cotinine in different substrates (saliva and blood), which may have contributed to their distinct outcomes. Almanzar et al. [16] suggested that their finding may reflect potential harm on lymphocyte replication, such as cytogenetic damage induced by smoking.

Concerning prenatal hyperglycaemia, two studies showed no significant difference in cord blood TL in diabetic or gestational diabetic pregnancies compared with control pregnancies [23,24]. This finding is consistent with a study that found no difference in TL between young adult offspring of mothers with pre-gestational type 1 diabetes and offspring of control women [56]. Contradicting these studies, Xu et al. [25] found that newborn TL was significantly shorter in offspring of women with gestational diabetes than offspring of control women. Okuda et al. [23] used the TRF method, while Cross et al. [24] used an FCM-based method and Xu et al. [25] used a quantitative PCR-

based method. The samples of these studies were heterogeneous in terms of ethnicity; subjects were from various races in the first report, predominantly White in the second, and entirely Han Chinese in the third. Distinct approaches in subjects and methods may contribute to addressing this question, even if the reasons for different outcomes could not be determined.

The association of hypertensive disorders during pregnancy and newborn TL was investigated by four research groups. Three of these studies showed no differences in newborn TL between women with gestational hypertension, those with preeclampsia, and those with normal pregnancies [23,25,28]. Particularly, Sukenik-Halevy et al. [28] aimed to assess mechanisms of telomere shortening in trophoblasts from pregnancies complicated with PE and assess TL in cord blood cells. The authors found alterations in telomere homeostasis in PE trophoblasts, and suggested it may be linked to increased cell senescence. The lack of telomere shortening, modified telomere homeostasis mechanisms, and increased senescence in cord blood they observed suggests that these processes are likely restricted primarily to the placenta. Counteracting these reports, Tellechea et al. [29] showed a significant association between hypertension during pregnancy and newborn telomere attrition, although in a small sample. This is a novel finding and warrants further investigation.

Our review has two main limitations. First, we were not able to find any longitudinal study that evaluated the influence of telomere alterations due to prenatal influence on long-term child health, as well as no evaluation of telomere length through life. As telomere length is inherited and also influenced by environment this data would be important. Second, there are a limited number of studies for each specific situation and some have conflicting results.

As shown in this review, different stressors can be responsible for telomere shortening either in the context of a disease, in psychological stress, or depending on the lifestyle habits of the mother during pregnancy. The actual clinical implications of these findings have yet to be investigated.

Acknowledgements

Financial support was provided by Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Support Fund (FIPE-HCPA) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest.

References

1. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:6622-6.
2. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008;88:557-79.
3. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10114-8.
4. Goldman F, Bouarich R, Kulkarni S, et al. The effect of TERC haploinsufficiency on the inheritance of telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(47):17119-24.
5. Zakian VA. Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Exp Cell Res*. 2012;318:1456-60.

6. Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, et al. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet*. 2004;363:507–10.
7. Akkad A, Hastings R, Konje JC, et al. Telomere length in small-for-gestational-age babies. *BJOG*. 2006;113:318–23.
8. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, et al. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:12135–9.
9. Nordfjäll K, Svenson U, Norrback KF, et al. Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *Eur J Hum Genet*. 2010;18:385–9.
10. Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K, et al. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics*. 2016;137(4).pii:e20153927.
11. Hjelmborg JB, Dalgård C, Möller S, et al. The heritability of leucocyte telomere length dynamics. *J Med Genet*. 2015;52(5):297–302.
12. Schaefer C, Sciortino S, Kvale M, et al. The Kaiser Permanente/UCSF Genetic Epidemiology Research Study on Adult Health and Aging: Demographic and behavioral influences on telomeres and relationship with all-cause mortality. The American Society of Human Genetics Annual Meeting; 2012 Nov 6-8; San Francisco, CA.
13. Zanni GR, Wick JY. Telomeres: Unlocking the mystery of cell division and aging. *Consult Pharm*. 2011;26(2):78-90.
14. Ip S, Chung M, Raman G, et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2007;153:1–186.
15. Wong MK, Barra NG, Alfaidy N, et al. Adverse effects of perinatal nicotine exposure on reproductive outcomes. *Reproduction*. 2015;150(6):R185-93.
16. Almanzar G, Eberle G, Lassacher A, et al. Maternal cigarette smoking and its effect on neonatal lymphocyte subpopulations and replication. *BMC Pediatr*. 2013;18(13):57.
17. Kareli DE, Pouliliou SE, Nikas IH, et al. Cytogenetic evaluation of pre-pregnancy smoking in maternal and newborn lymphocytes. *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol*. 2012;165:205–9.
18. Salihu HM, Pradhan A, King L, et al. Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(2):205.e1-8.
19. World Health Organization. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy; 2013. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85975/1/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf.
20. Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 2:14-20.
21. Baptiste-Roberts K, Nicholson WK, Wang NY, et al. Gestational diabetes and subsequent growth patterns of offspring: the National Collaborative Perinatal Project. *Matern Child Health J*. 2012;16:125–32.
22. Ehrlich SF, Rosas LG, Ferrara A, et al. Pregnancy glycemia in Mexican-American women without diabetes or gestational diabetes and programming for childhood obesity. *Am J Epidemiol*. 2013;177:768–75.
23. Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, et al. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res*. 2002;52(3):377-81.
24. Cross JA, Temple RC, Hughes JC, et al. Cord blood telomere length, telomerase activity and inflammatory markers in pregnancies in women with diabetes or gestational diabetes. *Diabet Med*. 2010;27(11):1264-70.

25. Xu J, Ye J, Wu Y, et al. Reduced fetal telomere length in gestational diabetes. *PLoS One*. 2014;9(1):e86161.
26. Geelhoed JJ, Fraser A, Tilling K, et al. Preeclampsia and gestational hypertension are associated with childhood blood pressure independently of family adiposity measures: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Circulation*. 2010;122(12):1192-9.
27. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007;335(7627):974.
28. Sukenik-Halevy R, Amiel A, Kidron D, et al. Telomere homeostasis in trophoblasts and in cord blood cells from pregnancies complicated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(2):283.e1-7.
29. Tellechea M, Gianotti TF, Alvarinañas J, et al. Telomere length in the two extremes of abnormal fetal growth and the programming effect of maternal arterial hypertension. *Sci Rep*. 2015;5:7869.
30. Chen YH, Kang JH, Lin CC, et al. Obstructive sleep apnea and the risk of adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206:136:e1-5.
31. Fung AM, Wilson DL, Lappas M, et al. Effects of maternal obstructive sleep apnea on fetal growth: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2013;8(7):e68057.
32. Savolainen K, Eriksson JG, Kajantie E, et al. The history of sleep apnea is associated with shorter leukocyte telomere length: the Helsinki Birth Cohort Study. *Sleep Med*. 2014;15(2):209-12.
33. Boyer L, Audureau E, Margarit L, et al. Telomere Shortening in Middle-Aged Men with Sleep-disordered Breathing. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(7):1136-43.
34. Salihu HM, King L, Patel P, et al. Association between maternal symptoms of sleep disordered breathing and fetal telomere length. *Sleep*. 2015;38(4):559-66.
35. Khashan AS, Everard C, McCowan LM, et al. Second-trimester maternal distress increases the risk of small for gestational age. *Psychol Med*. 2014; 44(13):2799-2810.
36. Rose MS, Pana G, Premji S. Prenatal Maternal Anxiety as a Risk Factor for Preterm Birth and the Effects of Heterogeneity on This Relationship: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8312158.
37. Entringer S, Buss C, Wadhwa PD. Prenatal stress and developmental programming of human health and disease risk: concepts and integration of empirical findings. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(6):507-16.
38. Entringer S, Epel ES, Lin J, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(2):134.e1-7.
39. Rini CK, Dunkel-Schetter C, Wadhwa PD, et al. Psychological adaptation and birth outcomes: the role of personal resources, stress, and sociocultural context in pregnancy. *Health Psychol*. 1999;18(4):333-45.
40. Marchetto NM, Glynn RA, Ferry ML, et al. Prenatal stress and newborn telomere length. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(1):94.e1-8.
41. Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:598S-603S.
42. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*. 2005;135(6):1382-6.
43. Entringer S, Epel ES, Lin J, et al. Maternal Folate Concentration in Early Pregnancy and Newborn Telomere Length. *Ann Nutr Metab*. 2015;66(4):202-8.

44. Hendry JH, Simon SL, Wojcik A, et al. Human exposure to high natural background radiation: what can it teach us about radiation risks? *J Radiol Prot.* 2009;29(2A):A29-42.
45. Das B, Saini D, Seshadri M. No evidence of telomere length attrition in newborns from high level natural background radiation areas in Kerala coast, south west India. *Int J Radiat Biol.* 2012;88(9):642-7.
46. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49(2):270-283.
47. Coupe B, Grit I, Hulin P, et al. Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS One.* 2012;7(1):e30616.
48. Putzker S, Bechtold-Dalla Pozza S, Kugler K, et al. Insulin resistance in young adults born small for gestational age (SGA). *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(3-4):253-9.
49. Koullali B, Oudijk MA, Nijman TA, et al. Risk assessment and management to prevent preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(2): 80-8.
50. Friedrich U, Schwab M, Griese EU, et al. Telomeres in neonates: new insights in fetal hematopoiesis. *Pediatr Res.* 2001;49:252-6.
51. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One.* 2012;7(2):e31136.
52. Frenck RW Jr, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(10):5607-10.
53. Zeichner SL, Palumbo P, Feng Y, et al. Rapid telomere shortening in children. *Blood.* 1999;93(9):2824-30.
54. Regéczy N, Valent S, Kormos L, Hajdu M, Gopcsa L, Pálóczi K. Telomere length analysis on cord blood cells by the flow-FISH method. *Haematologia (Budap).* 2002;32(3):265-9.
55. Ip P, Chung BH, Ho FK, et al. Prenatal Tobacco Exposure Shortens Telomere Length in Children. *Nicotine Tob Res.* 2017;19(1):111-8.
56. Cross JA, Brennan C, Gray T, et al. Absence of telomere shortening and oxidative DNA damage in the young adult offspring of women with pre-gestational type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(2):226-34.

Figure 1. Flow chart of study search.

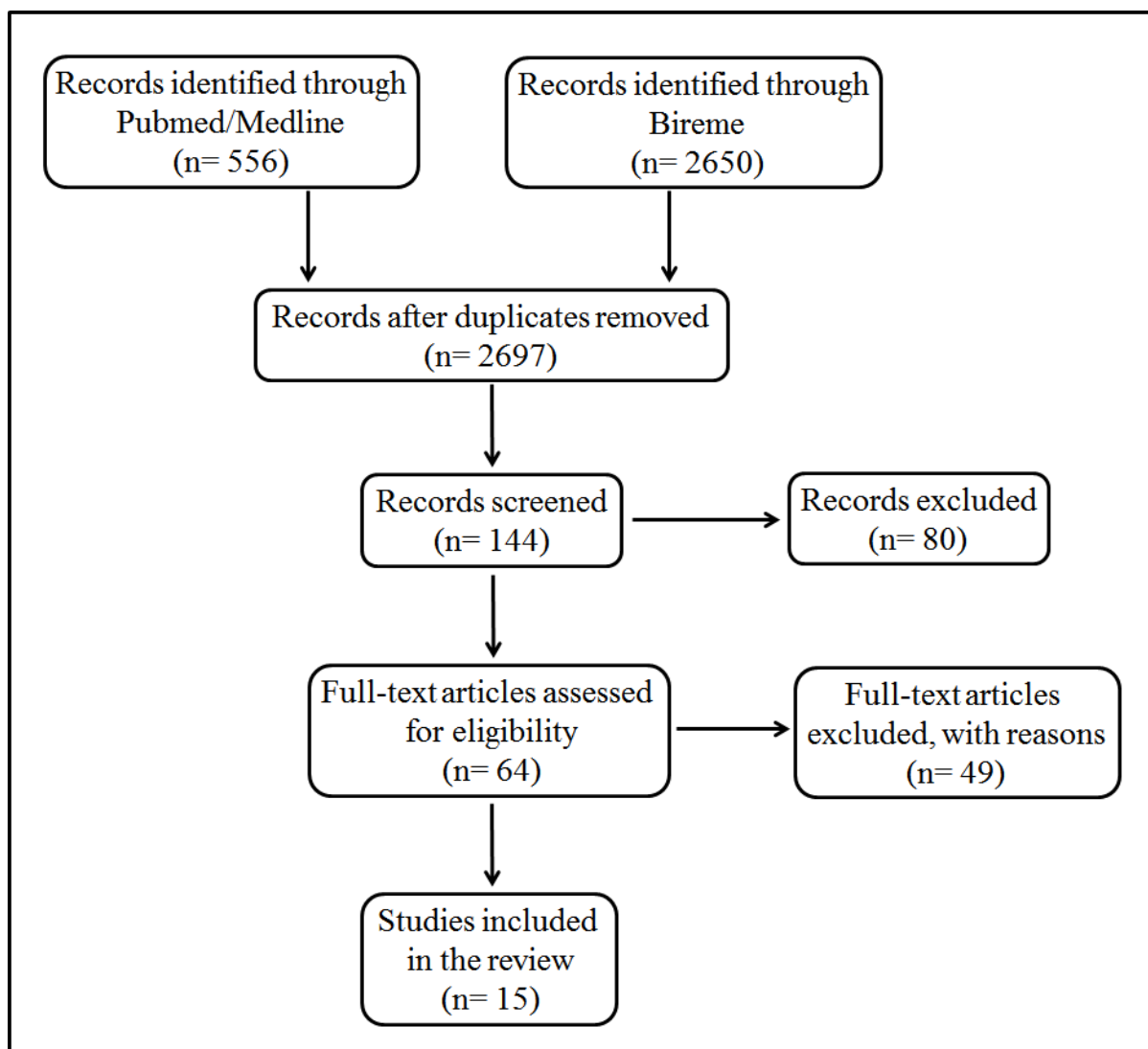


Table 1. Summary of articles included in the review.

Exposure subgroup	Authors, year, country, and quality rating	Study groups (n)	Analysis technique	Results	Control for confounding factors
Smoking	Almanzar et al. 2013 [16] Austria Category A	Non-smoking mothers (111) Smoking mothers (58)	qPCR	Newborns of smoking mothers had significantly longer telomeres than newborns of non-smoking mothers ($P<0.01$).	Age of mother at birth, gestational week, gender, birthweight, birth length, head circumference, and Apgar score at 1 and 5 minutes.
	Salihu et al. 2015 [18] USA Category B	Non-smoker mothers (25) Passive smoker mothers (31) Active smoker mothers (30)	qPCR	There was an inverse relationship between smoking and fetal telomere length, with a dose-response pattern.	Not reported.
Hyperglycaemia	Okuda et al. 2002 [23] USA Category A	Pre-gestational diabetes (7) No pre-gestational diabetes (158)	TRF	There were no differences in TRF lengths in cord blood between newborns of mothers with pre-gestational diabetes and newborns of control mothers.	-
	Cross et al. 2010 [24] United Kingdom Category A	Type 1 diabetes (26) Type 2 diabetes (20) Gestational diabetes (71) Control (no diabetes) (127)	MESF (flow-FISH)	There were no significant differences in cord blood telomere length between any diabetes group and matched control subjects in any cell population studied.	-
	Xu et al. 2014 [25] China Category A	Gestational diabetes (GD) (82) Normal pregnancy (65)	qPCR	Newborn telomere length was significantly shorter in the GD group than in the normal pregnancy group ($P=0.027$)	Maternal age, gestational age at delivery, birthweight, and fetal sex.
	Okuda et al. 2002 [23] USA Category A	Hypertension during pregnancy (27) Preeclampsia (17) Normal pregnancy (138)	TRF	There were no differences in TRF lengths in cord blood between newborns of mothers with hypertension or preeclampsia and newborns of mothers who did not exhibit those complications.	-

Hypertension	Xu et al. 2014 [25] China Category A	Preeclampsia (45) Gestational hypertension (23) Normal pregnancy (65)	qPCR	There were no significant differences in fetal telomere length between preeclampsia and normal pregnancy ($P=0.841$) or between gestational hypertension and normal pregnancy ($P=0.561$).	-
	Tellechea et al. 2015 [29] Argentina Category A	Gestational hypertension (11) Normal blood pressure (58)	qPCR	Neonatal LTL was significantly and inversely correlated with maternal history of hypertension in previous pregnancies ($P<0.03$) and significantly influenced by the blood pressure status of their mothers in current pregnancy ($P<0.05$).	Not reported.
	Sukenik-Halevy et al. 2016 [28] Israel Category B	Preeclampsia without IUGR (PE) (9) Control (14)	FISH	No difference was observed in telomere length in cord blood cells between PE pregnancies and controls.	-
Sleep apnea	Salihu et al. 2015 [34] USA Category A	Low risk for sleep apnoea (46) High risk for sleep apnoea (21)	qPCR	Fetuses born to mothers at high risk for sleep apnoea had shorter fetal telomere length than their counterparts born to those at low risk for sleep apnoea ($P<0.05$).	Maternal age, gestational age, number of previous pregnancies, maternal BMI, birthweight, head circumference at birth, marital status, race/ethnicity, type of insurance, and smoking status.
Psychological stress	Entringer et al. 2013 [38] USA Category A	Mothers to whom a pregnancy-specific stress scale had been administered (27)	qPCR	There was a significant, independent, linear effect of pregnancy-specific stress on newborn LTL that accounted for 25% of the variance in adjusted LTL ($\beta=-0.099$; $P=0.04$).	Gestational age at birth, weight, sex, and exposure to antepartum obstetric complications.
	Marchetto et al. 2016 [40] USA Category A	Low stress (18) High stress (6)	TRF	The offspring of mothers who experienced high levels of maternal stress had mean cord blood telomeres shorter than the offspring of mothers who experienced lower levels of stress during pregnancy ($P=0.003$).	Maternal age, gestational age at birth, and birthweight (adjusted for gestational age).

Folate concentration	Entringer et al. 2015 [43] USA Category A	Mothers in whom folate measurements were obtained in the first trimester of pregnancy (119)	qPCR	Each 10-ng/mL increase in maternal total folate was associated with a 5.8% increase in median TL ($P=0.03$). The median TL in newborns of mothers in the lowest quartile of total folate levels was approximately 10% shorter than that of newborns of mothers in the highest folate quartile.	Maternal socioeconomic status, race, maternal pre-pregnancy BMI, presence of obstetric complications, maternal age, infant sex, gestational age at birth, and birthweight.
Radiation	Das et al. 2012 [45] India Category B	Normal-level natural radiation area (NLNRA) (43) High-level natural radiation area (HLNRA) (128)	qPCR	The average telomere length observed in HLNRA newborns (1.03 ± 0.01) was not significantly different from that of NLNRA newborns (1.10 ± 0.03).	-
SGA	Akkad et al. 2006 [7] United Kingdom Category A	SGA babies (less than or equal to the third birthweight centile) (34) Appropriately grown babies (greater than the tenth centile) (38)	TRF	Intrauterine events associated with impaired fetal growth did not appear to be associated with increased telomere shortening ($P=0.93$).	Birthweight centiles were adjusted for maternal parity and BMI and fetal sex.
	Tellechea et al. 2015 [29] Argentina Category A	SGA (12) LGA (12) AGA (45)	qPCR	LTL was significantly shorter in LGA newborns compared with SGA ($P<0.005$) and AGA babies ($P<0.05$); LTL of SGA babies was not significantly different from that of AGA babies.	Birthweight centiles were adjusted for gestational age and fetal sex.
Preterm birth	Friedrich et al. 2001 [50] Germany Category B	Preterm neonates (<37 weeks of gestation) (5) Full-term neonates (>37 weeks of gestation) (11)	TRF	No differences in mean TRF between preterm and full-term neonates ($P=0.06$) were found.	-
	Menon et al. 2012 [51] USA Category A	Preterm prelabour rupture of membranes (pPROM) (28) Spontaneous preterm birth with intact membranes (PTB) (69) Control: uncomplicated full term births (35)	qPCR	pPROM group had telomere lengths that were significantly shorter than gestational age-matched PTB group ($P=0.04$), but comparable to full-term births ($P=0.31$).	Maternal smoking during pregnancy and marital status.

IUGR, intrauterine growth restriction; SGA, small for gestational age; LGA, large for gestational age; AGA, appropriate weight for gestational age; qPCR, quantitative PCR; TRF, Terminal Restriction Fragment assay; FISH, fluorescence in situ hybridization; MESF, molecules of equivalent soluble fluorescence; LTL, leukocyte telomere length.