Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica

Bruna Morais Faleiros de Paula

Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico

Ribeirão Preto
2021

Bruna Morais Faleiros de Paula

Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora

Área de concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Helio Vannucchi

Ribeirão Preto
2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Morais Faleiros de Paula

Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, área de concentração “Investigação Biomédica”, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutora.

_____ de _____ de_____.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Helio Vannucchi – Orientador
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –FMRP/USP

_____

Prof (a). Dr (a).

_____

Prof (a). Dr (a).

_____

Prof (a). Dr (a).

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

De Paula, Bruna Morais Faleiros
Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico, 2021.
98 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.
Orientador: Vannucchi, Helio.

1. Epigenética. 2. Metilação do DNA. 3. Expressão Gênica. 4. Ácido fólico. 5. Metabolismo Energético. 6. Inflamação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, e em especial ao meu pai Paulo César (*In Memorian*), por sempre me encorajar com carinho a não desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, a Nossa Senhora Aparecida e ao meu Anjo da Guarda por sempre me iluminarem e estarem presentes na minha vida, tanto nos obstáculos como nas alegrias, zelando com carinho a minha caminhada.

Agradeço intensamente ao meu pai Paulo César (*In Memorian*) pela pessoa atenciosa, amorosa e incrível que foi para mim, e por me fornecer toda sabedoria e ensinamento necessário para que, mesmo que existam os contratempos, jamais desistisse dos meus propósitos e sonhos.

Agradeço a minha mãe Ana Paula, mulher guerreira e de fé, que sempre esteve presente com suas orações, me incentivando com carinho e amor a prosseguir minha trajetória.

Ao meu esposo Vitor, por toda atenção, carinho, compreensão e paciência durante todo este período, que foram primordiais para o excelente desempenho deste trabalho.

Aos meus irmãos Breno e Brenda por todo afeto, companheirismo e cumplicidade que foram essenciais nessa fase.

À minha titia Claudia, e à minha vó Maria, por sempre me apoiarem e cuidarem de mim com afeição através das orações.

Ao meu orientador Dr. Helio Vannucchi, por desde o início confiar e acreditar na minha capacidade de realizar o doutorado; pelos ensinamentos, paciência e carinho, pois foram fundamentais tanto para meu crescimento pessoal como profissional.

Aos profissionais de outros laboratórios, que tiveram participação nesta fase para que o trabalho se concretizasse da melhor forma, à Lilian, Flávia, Sandra e Cici. À Flávia Siqueira pós doutoranda da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, por todo ensinamento.

Ao secretário Emerson que sempre esteve disposto a sanar todas as dúvidas burocráticas.

Às minhas amigas e amigos Letícia, Nathália, Fernanda, Bruno, Carol, Marcela, Flávia, Carol Welendorf, Cris, Bruno, Naty, por fazerem dos meus dias em Ribeirão Preto muito mais completos, referente aos aprendizados científicos e pelas orações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que me concedeu o Auxílio Regular (número processo: 2018/03291-0), o qual foi fundamental para a realização do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, que me concedeu a bolsa de doutorado, a qual foi possível custear minhas despesas.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

Albert Einstein

RESUMO

De Paula, B. M. F. **Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico** 2021. 98 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Indrodução – A epigenética nutricional envolve mecanismos que são essenciais para o adequado desenvolvimento embrionário dos mamíferos, sendo que, alterações neste estágio podem levar a vários distúrbios metabólicos. Em condições saudáveis existe um equilíbrio entre esses processos e adequado metabolismo energético, entretanto a interrupção e/ou desequilíbrio da homeostase metabólica pode acarretar em várias patologias, como resistência à insulina, doenças cardiovasculares, obesidade, dentre outras. **Objetivo –** Investigar os padrões metilação, expressão gênica e proteica de genes envolvidos na inflamação e no metabolismo energético na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico. **Materiais e métodos –** O estudo envolveu filhotes (n=40) machos e fêmeas de ratos Wistar que foram desmamados com a mesma dieta de suas respectivas mães. Esses animais foram randomizados em três grupos de tratamento: grupo controle (2,0 mg de ácido fólico/kg de ração), grupo deficiente (0,5 mg de ácido fólico/kg de ração) e grupo suplementado (8 mg de ácido fólico/kg de ração). O peso destes animais e o consumo das rações foram aferidos três vezes por semana durante todo o tratamento, que totalizou 13 semanas. Foram coletadas amostras do fígado, tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), a partir das quais foram extraídos RNA, DNA e proteína utilizando kits comerciais específicos. Com as referidas amostras biológicas foram realizadas análises de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase (PCR); metilação do DNA por Pirosequenciamento e expressão proteica por Western Blotting. **Resultados –** Observou-se que filhotes machos do grupo deficiente, e as fêmeas do grupo suplementado, apresentaram maiores peso e ingestão alimentar que seus respectivos grupos controle. No fígado, a expressão gênica e proteica de Tnf-α, Pparg e Sirt foram maiores no grupo suplementado comparado ao grupo controle; Il1-β apresentou maior expressão gênica e proteica no grupo deficiente comparado ao grupo suplementado. No TAB, a metilação de Foxo1 foi menor e a expressão gênica foi maior no grupo suplementado comparado com o grupo controle; a metilção de Pparg foi menor no grupo deficiente comparado com o grupo controle; Il6 e Tnf-α apresentaram maior expressão gênica e proteica no grupo suplementado comparado ao grupo controle; Il1-β apresentou maior expressão gênica e proteica no grupo deficiente comparado ao grupo suplementado. No TAM, a expressão gênica e proteica de SIRT1 foi maior no grupo deficiente comparado ao grupo controle e suplementado; Pparg apresentou menor expressão gênica e proteica nos grupos suplementado e deficiente comparado ao grupo controle; Il1-β apresentou maior expressão gênica no grupo suplementado comparado ao grupo controle. Todos os

resultados com nível de significância ≤ 0,05. **Conclusão** – A dieta suplementada com ácido fólico foi capaz de modular tanto os genes da inflamação quanto os do metabolismo energético na prole. Dessa forma, há a necessidade de mais estudos para fornecer melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à reprogramação epigenética fetal destes genes, bem como para o adequado fornecimento de ácido fólico durante o período de desenvolvimento embrionário/fetal e pós-desmame.

Palavras-chaves: Epigenética, Metilação do DNA, Expressão Gênica, Ácido fólico, Metabolismo Energético, Inflamação

ABSTRACT

De Paula, B.M. F. Methylation and gene expression patterns of inflammation and energy metabolism in offspring of female rats fed a folic acid supplemented diet 2021. 98 f. Thesis (Doctorate) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto.

Background – Nutritional epigenetics involves mechanisms that are essential for the proper embryonic development of mammals, and alterations at this stage can lead to various metabolic disorders. In healthy conditions, there is a balance between these processes and adequate energy metabolism; however, the interruption and/or imbalance of metabolic homeostasis can lead to numerous pathologies, such as insulin resistance, cardiovascular diseases, obesity, among others. **Objective** – To investigate the methylation patterns, gene and protein expression of genes involved in inflammation and energy metabolism in the offspring of female rats submitted to folic acid deficient and supplemented diets. **Materials and methods –** The study involved male and female offspring (n=40) of Wistar rats that were weaned on the same diet as their respective mothers. These animals were randomized into three treatment groups: control group (2.0 mg folic acid/kg feed), deficient group (0.5 mg folic acid/kg feed) and supplemented group (8 mg folic acid /kg of feed). The weight of these animals and feed consumption were measured three times a week throughout the treatment, which totaled 13 weeks. Liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) samples were collected, from which RNA, DNA and protein were extracted using specific commercial kits. With these biological samples, gene expression analyzes were performed by polymerase chain reaction (PCR); DNA methylation by Pyrosequencing and protein expression by Western Blotting. **Results –** It was observed that male offspring from the deficient group and females from the supplemented group had higher weight and food intake than their respective control groups. In liver, gene and protein expression of Tnf-α, Pparg and Sirt were higher in the supplemented group compared to the control group; Il1-β showed higher gene and protein expression in the deficient group compared to the supplemented group. In WAT, Foxo1 methylation was lower and gene expression was higher in the supplemented group compared to the control group; Pparg methylation was lower in the deficient group compared to the control group; Il6 and Tnf-α showed higher gene and protein expression in the supplemented group compared to the control group; Il1-β showed higher gene and protein expression in the deficient group compared to the supplemented group. In BAT, gene and protein expression of SIRT1 was higher in the deficient group compared to the control and supplemented groups; Pparg showed lower gene and protein expression in the supplemented and deficient groups compared to the control group; Il1-β showed higher gene expression in the supplemented group compared to the control group. All results with a significance level ≤ 0.05. **Conclusion –** The folic acid supplemented diet was able to modulate both inflammation and energy metabolism genes in offspring. Thus, there is a need for

further studies to provide a better understanding of the molecular mechanisms related to the fetal epigenetic reprogramming of these genes, as well as for the adequate supply of folic acid during the embryonic/fetal and post-weaning period.

Keywords: Epigenetics, DNA Methylation, Gene Expression, Folic Acid, Energy Metabolism, Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação epigenética 20

Figura 2 – Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína 23

Figura 3 – Citocinas pró-inflamatória na obesidade 25

Figura 4 – Protocolo de tratamento dos filhotes machos e fêmeas durante o estudo 33

Figura 5 - Integridade do DNA das amostras dos tecidos de fígado, TAB e TAM 36

Figura 6 - Integridade do RNA das amostras de TAM 38

Figura 7 – Continuação. Integridade do RNA das amostras de TAM 38

Figura 9 – Integridade do RNA das amostras de fígado 39

Figura 10 – Delineamento experimental do estudo 43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso corpóreo (g) dos filhotes machos e fêmeas 44
Gráfico 2 – Ingestão alimentar (g) dos filhotes machos e fêmeas 44
Gráfico 3 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes fêmeas 45
Gráfico 4 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes machos 46
Gráfico 5 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas 46
Gráfico 6 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes fêmeas 47
Gráfico 7 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes machos 47
Gráfico 8 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas 48
Gráfico 9 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes fêmeas 49
Gráfico 10 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes machos 49
Gráfico 11 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas 50
Gráfico 12 – Metilação do DNA (%) – Pparg no fígado dos filhotes fêmeas 51
Gráfico 13 – Metilação do DNA (%) – Pparg no fígado dos filhotes machos 52
Gráfico 14 – Metilação do DNA (%) – PPARG no fígado dos filhotes machos e fêmeas 52
Gráfico 15 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAB dos filhotes fêmeas 53
Gráfico 16 – Metilação do DNA (%) – PPARG1 no TAB dos filhotes machos 53
Gráfico 17 – Metilação do DNA (%) – PPARG no TAB dos filhotes machos e fêmeas 54
Gráfico 18 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAM dos filhotes fêmeas 54
Gráfico 19 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAM dos filhotes machos 55
Gráfico 20 – Metilação do DNA (%) – PPARG no TAM dos filhotes machos e fêmeas 55
Gráfico 21 – Expressão gênica de *Il6* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 56
Gráfico 22 – Expressão gênica de *Tnf-α* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 57
Gráfico 23 – Expressão gênica de *Il1-β* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 57
Gráfico 24 – Expressão gênica de *Sirt1* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 58

Gráfico 25 – Expressão gênica de *Pparg* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 58
Gráfico 26 – Expressão gênica de *Foxo1* no fígado dos filhotes machos e fêmeas 59
Gráfico 27 – Expressão gênica de *Il6* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 59
Gráfico 28 – Expressão gênica de *Tnf-α* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 60
Gráfico 29 – Expressão gênica de *Il1-β* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 61
Gráfico 30 – Expressão gênica de *Sirt1* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 61
Gráfico 31 – Expressão gênica de *Pparg* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 62
Gráfico 32 – Expressão gênica de *Foxo1* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas 62
Gráfico 33 – Expressão gênica de *Il6* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 63
Gráfico 34 – Expressão gênica de *Tnf-α* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 63
Gráfico 35 – Expressão gênica de *Il1-β* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 64
Gráfico 36 – Expressão gênica de *Sirt1* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 64
Gráfico 37 – Expressão gênica de *Pparg* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 65
Gráfico 38 – Expressão gênica de *Foxo1* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas 66
Gráfico 39 – Expressão proteica de Il6 no fígado dos filhotes machos e fêmeas 66
Gráfico 40 – Expressão proteica de Tnf-α no fígado dos filhotes machos e fêmeas 67
Gráfico 41 – Expressão proteica de Il1-β no fígado dos filhotes machos e fêmeas 67

Gráfico 42 – Expressão proteica de Sirt1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas 68
Gráfico 43 – Expressão proteica de Pparg no fígado dos filhotes machos e fêmeas 69
Gráfico 44 – Expressão proteica de Foxo1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas 69
Gráfico 45 – Expressão proteica de IL6 no TAB dos filhotes machos e fêmeas 70
Gráfico 46 – Expressão proteica de Tnf-α no TAB dos filhotes machos e fêmeas 71
Gráfico 47 – Expressão proteica de Il1-β no TAB dos filhotes machos e fêmeas 71
Gráfico 48 – Expressão proteica de Sirt1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas 72
Gráfico 49 – Expressão proteica de Pparg no TAB dos filhotes machos e fêmeas 72
Gráfico 50 – Expressão proteica de Foxo1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas 73
Gráfico 51 – Expressão proteica de IL6 no TAM dos filhotes machos e fêmeas 74
Gráfico 52 – Expressão proteica de Tnf-α no TAM dos filhotes machos e fêmeas 74
Gráfico 53 – Expressão proteica de Il1-β no TAM dos filhotes machos e fêmeas 75
Gráfico 54 – Expressão proteica de Sirt1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas 75
Gráfico 55 – Expressão proteica de Pparg no TAM dos filhotes machos e fêmeas 76
Gráfico 56 – Expressão proteica de Foxo1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas 77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Número de filhotes por grupo de intervenção 33
Quadro 2 – Quantidade dos ingredientes para o preparo da ração controle, deficiente e suplementada com ácido fólico 34
Quadro 3 – Anticorpos primários e secundários do estudo 42
Quadro 4 – Resumo dos resultados de metilação do DNA 77
Quadro 5 – Resumo dos resultados de metilação do DNA. Análise entre machos e fêmeas 78
Quadro 6 – Resumo dos resultados de expressão gênica 78
Quadro 7 – Resumo dos resultados de expressão gênica. Análise entre machos e fêmeas 79
Quadro 8 – Resumo dos resultados de expressão proteica 79
Quadro 9 – Resumo dos resultados de expressão proteica. Análise entre machos e fêmeas 79

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

® - Marca registrada

µl: microlitro

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

AgRP: Proteína relacionada ao Agouti

AIN-93: Instituto Americano de Nutrição – Recomendações dietéticas para animais

AMPK: proteína quinase

ANOVA: análise de variância

BSA: soro fetal bovino

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

CpG: Citosina-fosfato-Guanina

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNMT1: DNA metiltransferase 1

FMRP-USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HCy: homocisteína

IMC: índice de massa corporal

M: molar

miRNA: microRNA

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MTHF ou 5,10-MTHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase

MTR: metionina sintase

OMS: Organização Mundial da Saúde

rpm: rotações por minuto

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa quantitativa

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TAB: tecido adiposo branco

TAM: tecido adiposo marrom

TBS-T: Tampão Tris Salino com Tween

THF: tetrahidrofolato

™ - Marca comercial

V: volts

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO..... 20
EPIGENÉTICA..... 20
METILAÇÃO DO DNA..... 21
ÁCIDO FÓLICO..... 22
INFLAMAÇÃO..... 24
METABOLISMO ENERGÉTICO..... 26
2 JUSTIFICATIVA..... 30
3 OBJETIVOS..... 31
OBJETIVO GERAL..... 31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 31
4 MATERIAIS E METÓDOS 32
QUESTÕES ÉTICAS..... 32
ANIMAIS DO ESTUDO..... 32
PREPARO DA DIETA..... 33
SACRÍFICIO DOS ANIMAIS..... 34
EXTRAÇÃO DO DNA..... 35
QUANTIFICAÇÃO DO DNA..... 35
CONVERSÃO DO DNA..... 35
PADRONIZAÇÃO Q-SOLUTION..... 36
METILAÇÃO DO DNA..... 36
EXTRAÇÃO DO RNA..... 37
QUANTIFICAÇÃO DO RNA..... 37
INTEGRIDADE DO RNA..... 37
TRATAMENTO DO RNA..... 39
SÍNTESE DE cDNA..... 39
EXPRESSÃO GÊNICA..... 40
EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA..... 40
QUANTIFICAÇÃO DE PROTÉINA..... 40
WESTEN BLOTTING..... 41
ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 43
5 RESULTADOS..... 44
PESO CORPÓREO..... 44
CONSUMO DE RAÇÃO..... 44
METILAÇÃO DO DNA..... 45
EXPRESSÃO GÊNICA..... 56
EXPRESSÃO PROTEICA..... 66
RESUMO DOS RESULTADOS..... 77
6 DISCUSSÃO..... 81
7 CONCLUSÃO..... 87
8 REFERÊNCIAS..... 88
ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA..... 94

1 INTRODUÇÃO

EPIGENÉTICA

A palavra epigenética traz consigo diferentes definições no campo da pesquisa, todavia, a definição mais clara e empregada é “o estudo dos fenômenos e mecanismos que está limitado ao cromossomo, que causa mudanças hereditárias para expressão gênica que não são dependentes de alterações na sequência de DNA” [1].

A epigenética engloba três mecanismos distintos: metilação do DNA, modificação de histonas e microRNA, que atuam na regulação da expressão gênica, como mostrado na Figura 1. Estes fenômenos são uma característica essencial do desenvolvimento de mamíferos e tem um papel de grande relevância na programação fetal, uma vez que modificações neste estágio podem levar ao desenvolvimento de inúmeras doenças [2,3].

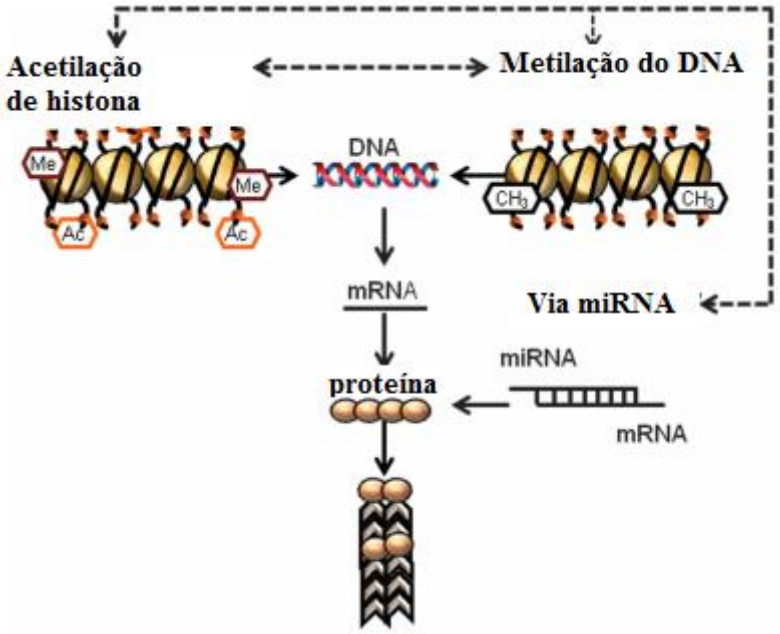


Figura 1. Regulação epigenética. Há três mecanismos distintos na regulação epigenética: 1) Metilação do DNA: grupos metil se ligam nas ilhas CpG e regulam a atividade do gene. A metilação torna o DNA inacessível e assim suprime a expressão gênica; 2) Modificação de histonas: metilação (Me) ou acetilação (Ac) de histonas determina a atividade do DNA envolvido em torno da histona; e 3) microRNA: moléculas de RNA não codificante que afeta o silenciamento do RNA e a regulação pós-transcricional da expressão gênica.
Fonte: modificada de [4].

METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético de regulação da expressão gênica que ocorre em dinucleotídeos CpG, esta modificação covalente contribui para a regulação transcricional e estrutura da cromatina interferindo com a afinidade de proteínas sensíveis à metilação que se ligam ao DNA e, desse modo, desempenham importante papel na expressão gênica tecido-específica, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X [5,6].

O mecanismo de metilação do DNA desempenha um papel importante, principalmente durante as fases embrionárias iniciais, pois é neste período que os padrões de metilação são apagados e, reestabelecidos de maneira linhagem-específica. Vale ressaltar que após seu estabelecimento, padrões tecido-específicos de metilação do DNA, geralmente, são mantidos com alta fidelidade por toda a vida. Vários estudos em humanos e em animais tem apresentado o impacto da alimentação materna, no período gestacional, sobre a metilação do DNA, principalmente em relação à ingestão de nutrientes doadores de grupo metil (envolvidos no metabolismo do carbono 1) como colina, betaína, ácido fólico, e vitaminas do complexo B, mostrando que a nutrição materna pode exercer grande influência nos padrões de metilação da prole, levando a um estado saudável e adequado de desenvolvimento na vida adulta [5,7].

O metabolismo do carbono-1 é uma rede de reações bioquímicas inter-relacionadas em que o carbono-1 de um doador é transferido para o tetrahidrofolato, para subsequente redução ou oxidação e/ou transferência do carbono para as vias bioquímicas essenciais para a síntese do DNA e reparo ou metilação. No metabolismo do carbono-1 a reação da metionina sintetase exerce um papel central por fornecer meios para que a homocisteína possa ser remetilada e, desse modo, haja a síntese de metionina. A metionina é, então, adenilada para formar S-adenosilmetionina, que por sua vez doa seu grupo metil para aproximadamente 80 reações de metilação, incluindo a metilação do DNA, RNA e de proteínas [8,9].

Desta forma, o metabolismo do carbono-1 é de grande importância na programação epigenética dos gametas de mamíferos e do embrião, visto que, perturbações neste período periconcepcional podem levar a alterações epigenéticas permanentes no DNA da prole [10].

Em um estudo com ratas, os micronutrientes (ácido fólico e vitamina B12) integrantes do metabolismo do carbono-1 apresentaram a função de reduzir a inflamação e estresse oxidativo na pré-eclâmpsia [11].

Outro estudo mostrou que os filhotes de ratos que receberam dieta com deficiência em ácido fólico no pós-desmame até a puberdade apresentaram aumento significativo da metilação do DNA genômico no fígado e este fenômeno persistiu até a vida adulta mesmo com o retorno da dieta controle na puberdade. Os autores sugerem, então, que o folato durante o desenvolvimento pós-natal, até o início da idade adulta pode desempenhar papel relevante na programação epigenética, que pode ter efeito permanente na vida adulta [12].

Desse modo, a metilação do DNA genômico pode ocorrer em outras fases da vida, todavia, são cruciais no início da fase gestacional. Outro exemplo, em ratos, mostra que os níveis de nutrientes doadores de grupo metil da dieta materna nos primeiros dias de gestação, já foram capazes de alterar a forma como a prole metaboliza a glicose [13].

ÁCIDO FÓLICO

Uma das vitaminas mais utilizadas por mulheres durante o período gestacional é o ácido fólico (também conhecida como vitamina B9). Esta vitamina é consumida, primeiramente, para evitar os defeitos no tubo neural na prole [14]. Todavia, esta suplementação também está envolvida com outros mecanismos, que podem trazer efeitos benéficos ou maléficos para os seus descendentes [15]. Um dos mecanismos é o efeito epigenético nutricional, na qual a suplementação com ácido fólico, que é um cofator no metabolismo do carbono-1, durante a gestação, pode afetar a programação fetal e modular o padrão de metilação do DNA genômico e, desse modo, causar a desregulação da expressão gênica [16,17]. O metabolismo do folato está ilustrado na Figura 2.

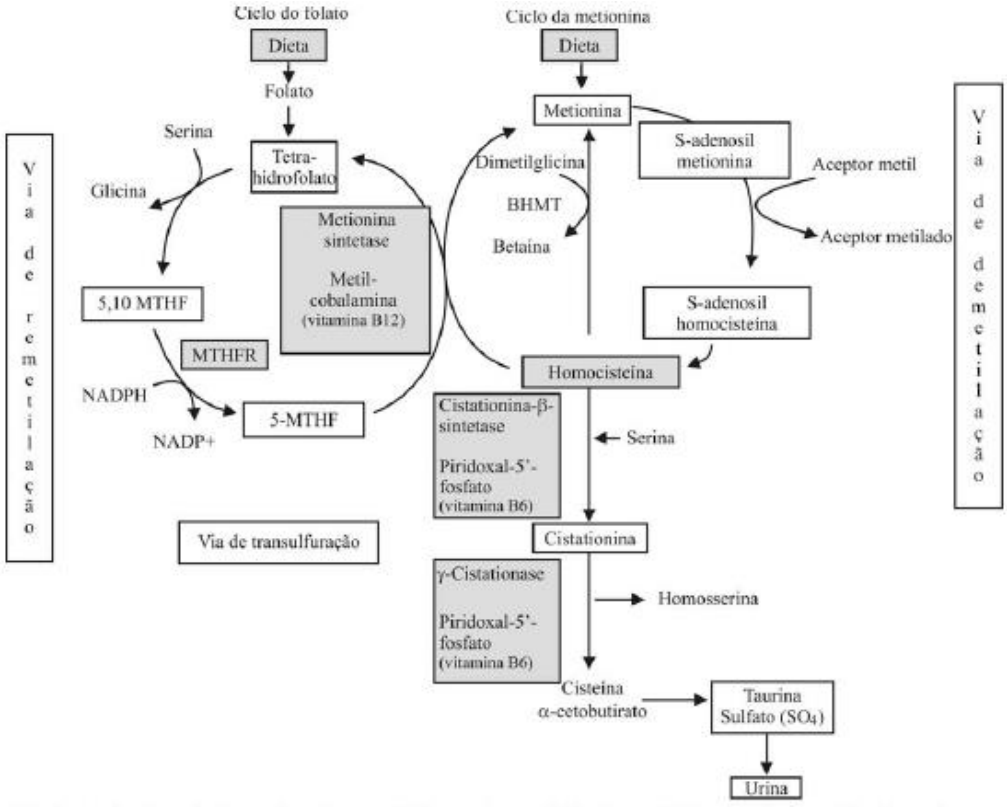


Figura 2. Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína. BHMT =betaína-homocisteína metltransferase; MTHF = metilenotetrahidrofolato; MTHFR = metilenotetrahidrofolato redutase; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida; NADP+ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
Fonte: VENÂNCIO; BURINI; YOSHIDA [8].

Interligado ao ciclo do folato, o ciclo da metionina também envolve vários mecanismos que influenciam na epigenética, visto que restrições em um dos seus componentes pode ocasionar em alterações na metilação do DNA e nos miRNAs [18,19]. Ademais, estudos mostraram que a metionina pode influenciar em vários aspectos benéficos na saúde de roedores como, resistência contra adiposidade, melhora no metabolismo lipídico e de glicose hepática, preservação da função cardíaca, diminuição do estresse oxidativo, além de reduzir o peso corpóreo [18].

Além disso, perturbações no metabolismo de folato, como mutação da enzima metionina sintetase redutase, apresentam herança epigenética transgeracional que são responsáveis pelo processo de desenvolvimento específico na prole [20]. Em um estudo observou-se que a suplementação com ácido fólico em ratas prenhas expostas a lipopolissacárideo atenuou

significativamente o retardo de crescimento intrauterino, ativação do fator nuclear-kβ (NF- kβ), ativação de ciclo-oxigenase (COX)-2 e reduziu os níveis de interleucina 6 (IL-6), sugerindo que este micronutriente apresenta ação anti-inflamatória [21].

Isto posto, é de grande relevância o estudo sobre a ingestão de ácido fólico para modular os padrões adequados de metilação do DNA e expressão gênica, visto que esta vitamina está envolvida com mecanismos que tem potencial impacto no desenvolvimento de doenças crônicas, portanto, seu consumo adequado acarreta no desenvolvimento e manutenção da saúde [22,23].

INFLAMAÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS [24], o sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo de gordura anormal e excessivo, podendo ser aferida pelo índice de massa corporal (IMC), sendo o peso de um indivíduo (em kg) dividido pelo quadrado de sua altura (em metros). Se a pessoa apresentar igual ou superior a 25 kg/m² é considerado excesso de peso, e se for igual ou acima de 30 kg/m² é classificado com obesidade.

A obesidade em ratos e em seres humanos está associada com a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, onde os adipócitos expressam citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6, fator de necrose tumoral α e interleucina 1β [25].

Desse modo, este excesso de gordura é caracterizado por uma inflamação crônica de baixo grau, que predispõe a resistência à insulina, levando ao quadro de diabetes *mellitus* tipo 2, complicações cardiovasculares, entre outras. Em relação aos órgãos que apresentam inflamação relevante na presença desta doença estão o tecido adiposo e o fígado [26,27]. O fígado e o tecido adiposo são importantes órgãos na investigação de marcadores inflamatórios, pois estes marcadores contribuem para investigação de futuras alterações, como a doença cardíaca [28].

O desenvolvimento da inflamação na obesidade se inicia principalmente no tecido adiposo, e consequentemente, com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, afetando outros órgãos, como o fígado. Pesquisas mostram que o aumento na produção destas citocinas, em ambos os órgãos, pode levar

ao desenvolvimento de doenças, inclusive de tumores, não somente relacionado ao fígado, mas em outros tecidos, como o cólon [29].

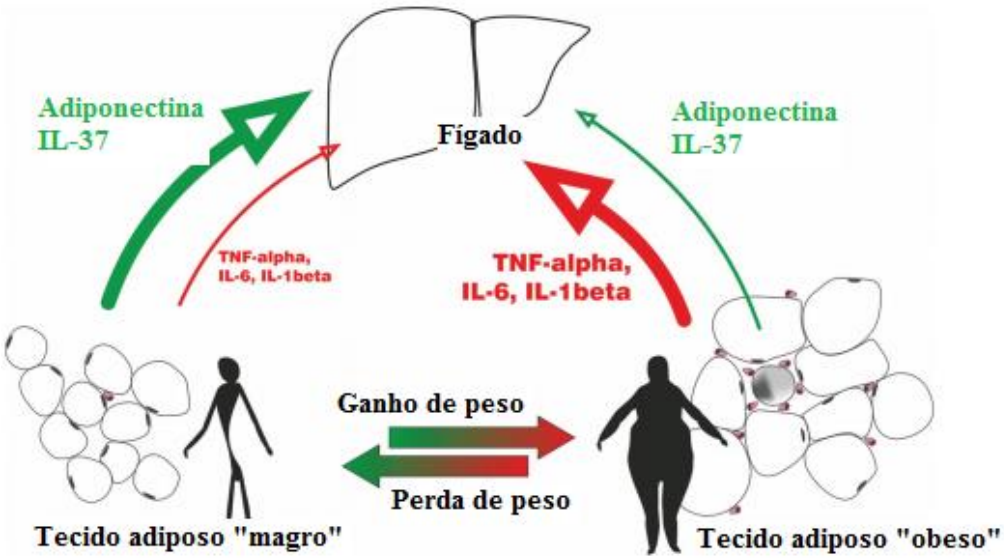


Figura 3. Citocinas pró-inflamatória na obesidade. Na obesidade grave o tecido adiposo produz de 100 a 1.000 vezes mais citocinas pró-inflamatória, como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF-α) e interleucina 1β (IL-1β) quando comparado com o fígado. Concomitantemente, a expressão dos mediadores anti-inflamatórios, como adiponectina ou interleucina 37 (IL-37) é reduzida neste tecido. O fígado é um dos principais alvo de mediadores derivados do tecido adiposo, e este desequilíbrio entre os mediadores pró- e anti-inflamatórios na obesidade, resulta em dano hepático. Notavelmente, a perda de peso inverte este perfil, onde ocorre a diminuição das citocinas pró-inflamatório e aumento das anti-inflamatórias.
Fonte: modificado de [29].

Um estudo realizado com camundongos mostrou que a inflamação no tecido adiposo e fígado induzida por obesidade pode ser revertida durante a gestação, visto que as mães obesas mostraram baixa inflamação nos dois tecidos estudados durante este período [30].

A dieta obesogênica materna em ratas tem efeito significativo no peso da prole e na expressão gênica no fígado, onde mais de 5% dos genes envolvidos com a inflamação são afetados [31].

Em indivíduos com sobrepeso e obesidade foi observada uma associação negativa da metilação de *TNF-α* com o consumo dietético de colesterol, ácido fólico, β-caroteno, carotenoides e retinol [32].

A dieta materna influencia fortemente o estado de obesidade e, consequentemente, na inflamação, da prole. O fígado é o principal órgão para o

armazenamento e metabolismo de folato, e a deficiência deste micronutriente leva a ocorrência de muitas doenças neste órgão. Além de poder afetar severamente o metabolismo celular, essa deficiência provoca alterações estruturais no DNA, doenças neurológicas, aumento do estresse oxidativo no tecido hepático, defeitos da membrana devido a hipometilação de fosfolipídios e aumento dos níveis de homocisteína [33].

Um estudo mostrou que a suplementação com ácido fólico durante a gestação de ratas ocasionou o fenótipo obesogênico na prole, contudo, este episódio foi corrigido quando a prole consumiu dieta suplementada com ácido fólico no pós-desmame. Desse modo, sugere-se que há efeito epigenético com a ingestão de folato não somente no útero, mas também após o nascimento [34].

A deficiência de folato pode causar aumento na resposta inflamatória por macrófagos, pois, em um estudo *in vitro* foi observado um aumento de 2 a 3 vezes na expressão de RNAm e de proteínas dos mediadores inflamatórios IL-1β, TNF-α e IL-6 ($p<0.01$), que levaria ao aumento do risco de desenvolvimento de doença vascular [35].

Um estudo com animais mostrou que os níveis plasmáticos de IL-6 estiveram maiores e IL-1β menor na prole de ratas que receberam dieta deficiente em vitamina B12 e folato. No tecido adiposo observou-se que, nos mesmos animais, os níveis de TNF-α e IL-6 estavam significativamente aumentados em comparação ao controle [36]. Em células de linhagem monocítica humana (THP-1) tratadas com ácido fólico e expostas a hipóxia para causar inflamação, demonstrou-se que este tratamento ocasionou diminuição dos níveis de proteína e RNAm de IL-1β e TNF-α, destacando o efeito anti-inflamatório deste micronutriente [37].

METABOLISMO ENERGÉTICO

O metabolismo energético é amplamente definido como o conjunto de reações químicas que se processam no organismo exigidas para manutenção da vida. As reações envolvidas nesse processo são categorizadas como de natureza catabólica ou anabólica. Em condições saudáveis existe um equilíbrio entre esses processos, logo, em condições patológicas, ocorre uma interrupção

da homeostase metabólica o que pode levar a um efeito dramático na morbidade e mortalidade [38].

Existem vários genes envolvidos no metabolismo energético, incluindo: sirtuína 1 (SIRT1) [38]; receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ) [39]; Forkhead box O1 (FOXO1) [40].

SIRT1

As Sirtuínas (SIRTs) caracterizam uma conservada família de enzimas com atividade desacetilase dependente de NAD+, encontrada em todos os domínios de vida e, que regulam as atividades de uma variedade de fatores de transcrição, co-reguladores e enzimas que melhoram a resistência à obesidade. Dentre as sirtuínas (SIRT1 a SIRT7), a SIRT1, é a mais estudada atualmente e emergiu como um sensor metabólico chave em vários tecidos metabólicos [41].

No fígado, a SIRT1 é um importante regulador do metabolismo da glicose. Durante a fase de jejum a curto prazo, SIRT1 inibi TORC2, um co-ativador de transcrição regulado por CREB que é importante para ativação mediada por cAMP/CREB de genes da gliconeogênese, levando a redução deste processo [42]. Entretanto, no jejum prolongado aumenta a desacetilação mediada por SIRT1 e a ativação de PGC1-α, resultando em aumento da oxidação de ácidos graxos e homeostase de glicose [43]. Com relação ao metabolismo lipídico, em jejum, a SIRT1 desacetila a Proteína de ligação *ao* elemento regulador de esterol (SREBP1), resultando na repressão da síntese de gordura e colesterol [44].

No tecido adiposo branco, em jejum, a *SIRT1* pode promover a mobilização de gordura do tecido adiposo, via *Pparg*, para impulsionar a utilização de lipídios no fígado e nos músculos. Por outro lado, o excesso de energia, que pode ser induzido por uma dieta rica em gorduras, causa a ativação da caspase I como parte do inflamassoma. Essa redução da SIRT1 no tecido adiposo branco contribui para a disfunção metabólica induzida por essa dieta. Em contrapartida, o aumento da atividade da SIRT1, ocorre a redução da diferenciação dos adipócitos [42,44].

Isto posto, a expressão aumentada do gene *Sirt1* é descrita como benéfica, pois tem a função de ativar vias metabólicas catabólicas e aumentar a longevidade [45].

Em experimento animal foi observado que filhotes machos de ratas que foram submetidas a dieta com restrição energética durante o período gestacional apresentaram menor expressão gênica de SIRT1, em amostras de tecido adiposo branco e fígado, quando comparados com o grupo controle. Sugerindo que há uma predisposição desses animais ao desenvolvimento de obesidade na vida adulta [46].

Em resposta a alimentação, uma dieta deficiente em nutrientes que são doadores de grupo metil, como ácido fólico e vitamina B12, durante a gestação e lactação, está relacionada com diminuição na expressão de PPAR-α e ERR-α, e hipometilação/hiperacetilação da proteína PGC1-α através da diminuição da expressão da arginina metiltransferase 1 (PRMT1) e SIRT1 na prole [47].

PPAR-γ

Os PPARs consistem em três membros: PPAR-α, PPAR-β e PPAR-γ. De modo geral, os PPARs apresentam a função de controlar a expressão de muitos genes envolvidos na homeostase metabólica, no metabolismo lipídico, da glicose e energético, adipogênese e inflamação. Desse modo, também estão envolvidos na patogênese de doenças metabólicas, como, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doença cardiovascular e doença hepática gordurosa não alcoólica [39,48].

No tecido adiposo desempenha um papel essencial na regulação da adipogênese, um processo pelo qual os pré-adipócitos precursores se diferenciam em adipócitos totalmente maduros. Nesse tecido, a ativação do Pparg aumenta pequenos adipócitos, aumentando assim o hormônio adiponectina sensível à insulina e reduzindo a resistina e fator de necrose tumoral (*TNF-α*), que induzem resistência à insulina. No entanto, a ativação parcial do Pparg leva a benefícios, principalmente mediada pelo aumento da expressão de adiponectina e diminuição da resistência à insulina [48].

A expressão gênica de *PPAR-γ* nos filhotes pode se comportar de maneiras distintas, dependendo da dieta materna nos períodos de gestação e lactação, e

do tecido em análise. Em um estudo, foi observado que a suplementação materna com ácido fólico resultou em alteração significativa na expressão gênica de *PPAR-γ* no fígado da prole, todavia, esta mudança não ocorreu no cérebro, rim e colo [49].

No estudo de Sie *et al.* [50] foi observado que filhotes de ratas que foram expostas a dieta suplementada com ácido fólico durante a gestação e lactação apresentaram diminuição significativa na metilação global e específica dos genes *PPAR-γ, ER-α, p53* e *Apc* no fígado. No entanto, quando a dieta suplementada com ácido fólico também foi fornecida para prole resultou em aumento significativo da metilação do DNA dos genes *PPAR-γ, p53 e p16*.

Em outro estudo, foi mostrado que a dieta deficiente em vitamina B12 no período de gestação e lactação ocasionou diminuição significativa da expressão de *PPAR-γ* e *PPAR-α* no fígado da prole [51].

FOXO1

O FOXO1, uma das quatros isoformas de FOXO, atua como regulador do metabolismo energético e está expresso abundantemente em todos os tecidos. No tecido adiposo branco FOXO1 regula a homeostase de nutrientes e energia, já no tecido adiposo marrom tem a função de promover o gasto de energia, aumentando a expressão de genes envolvidos na termogênese, como *PPAR-γ1* e *UCP1* [52]. No fígado, FOXO1 ativado promove a produção de glicose hepática através da indução das enzimas gliconeogênicas Pepck e G6pc. Em resposta a alimentação, FOXO1 é inibido pela insulina, e desse modo ocorre alteração no metabolismo da glicose para acetato para oxidação ou conversão em ácidos graxos [40].

Em um estudo, com animais, foi mostrado que a inibição da atividade de FoxO1 no tecido adiposo branco melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina e aumenta o gasto energético sob dieta normal bem como com alto teor de gordura [53].

Além da alimentação, a expressão de *FOXO1* também pode ser alterada em decorrência de outros fatores ambientais, como perturbações no sono. No estudo de Mutskov *et al.* [54] foi observado que ratas gestantes expostas a distúrbios no sono, como sono fragmentado, resultou em aumento do peso e

consumo alimentar da prole. Quanto a análise temporal de Foxo1 e seus alvos gliconeogênicos foi revelado que as anormalidades epigenéticas de Foxo1 precedem o fenótipo de síndrome metabólica. Todavia, a atividade física regular nesses filhotes no início da vida, mas não mais tarde, reverteu esse fenótipo na prole, mesmo expostos a distúrbios do sono na gestação.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, mais estudos que investiguem o efeito do ácido fólico na programação epigenética fetal focado no papel da metilação do DNA e na expressão de genes, principalmente envolvidos nas vias inflamatórias e no metabolismo energético responsáveis pela obesidade, poderão fornecer melhor compreensão e esclarecimento da manutenção da saúde e prevenção de doenças crônicas, abrindo um novo campo na pesquisa sobre os mecanismos envolvidos na homeostase, estudos epidemiológicos, avaliação de riscos e tratamentos para essas doenças.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar os padrões metilação, expressão gênica e proteica de genes envolvidos na inflamação e no metabolismo energético na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso corpóreo e o consumo alimentar da prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

- Investigar o padrão de expressão dos genes envolvidos na inflamação (*Il6, Tnf-α* e *Il1-β*) no fígado e tecidos adiposos (branco e marrom) na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

- Investigar o padrão de expressão e metilação dos genes envolvidos no metabolismo energético (*Sirt1*, *Pparg* e *Foxo1*) no fígado e tecidos adiposos (branco e marrom) na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

- Identificar e quantificar as proteínas envolvidas na inflamação e no metabolismo energético (*Il6, Tnf-α*, *Il1-β, Sirt1*, *Pparg* e *Foxo1*) no fígado e tecidos adiposos (branco e marrom) na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

4 MATERIAIS E METÓDOS

QUESTÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa intitulado “Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico” está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado em reunião no dia 29 de outubro de 2018, com número de protocolo 028/2017 (ANEXO).

ANIMAIS DO ESTUDO

Os animais utilizados foram ratos Wistar. Ao chegarem ao Biotério da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ FMRP, os animais foram separados por sexo e permaneceram em caixas plásticas (44cm de largura, 50cm de comprimento e 27cm de altura), sendo no máximo 3 animais por caixa. Os animais permaneceram em ambiente climatizado (22°C) com ciclo de 12 horas escuro, 12 horas claro e receberam a dieta e água *ad libitum.* O peso dos animais e o consumo das rações foram aferidos três vezes por semana durante todo o experimento. A princípio os animais foram submetidos ao consumo da ração comercial por três dias, para se ambientar com o novo local. Posteriormente, foi iniciado o consumo das dietas modificadas, e desta forma os animais foram divididos em três grupos distintos de tratamento, sendo grupo de dieta controle (GC), grupo de dieta deficiente em ácido fólico (GD) e grupo de dieta suplementada com ácido fólico (GS). Após uma semana, as fêmeas foram colocadas nas caixas junto com os machos para o acasalamento. Estes animais permaneceram juntos por, aproximadamente, uma semana e depois de confirmada a prenhez das fêmeas, foram separados novamente.

Durante o período de gestação e lactação que durou aproximadamente 42 dias (sendo 21 dias cada) as mães mantiveram o consumo da dieta modificada. O quadro 1 mostra o número de filhotes referente ao grupo de intervenção proposto:

Número de filhotes		
Grupo Controle (n=16)	**Filhotes machos**	7
	Filhotes fêmeas	9
Grupo Deficiente (n=13)	**Filhotes machos**	8
	Filhotes fêmeas	5
Grupo Suplementado (n = 11)	**Filhotes machos**	5
	Filhotes fêmeas	6
TOTAL de filhotes **(n= 40)**		

Quadro 1. Número de filhotes por grupo de intervenção.

Após o desmame os filhotes também foram submetidos ao consumo das dietas modificadas por três meses, dando sequência da mesma dieta consumida por suas respectivas mães. A figura 1 mostra o desenho do estudo:

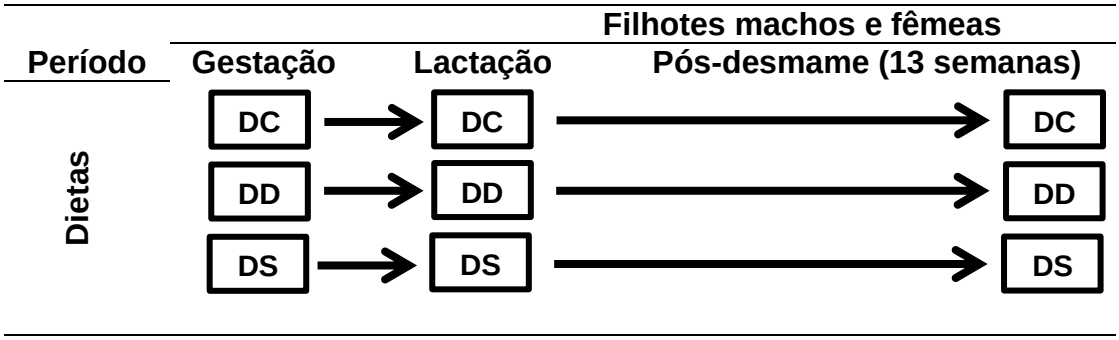


Figura 4. Protocolo de tratamento dos filhotes machos e fêmeas durante o estudo. Dieta Controle (DC); Dieta Deficiente (DD); Dieta Suplementada (DS).

PREPARO DA DIETA

A dieta oferecida para os animais foi baseada na AIN 96 – *American Institute of Nutrition* [55] que fornece todos os macros e micronutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento normal. O único ingrediente da dieta que foi alterado no mix de vitaminas foi o ácido fólico, o qual se encontrava na dieta controle numa concentração de 2,0 mg/Kg ração, na dieta deficiente a 0,5 mg/Kg ração e na dieta suplementada a 8,0 mg/Kg ração. O quadro 2 mostra os ingredientes e suas quantidades utilizadas para o preparo da ração.

Ingredientes	Quantidade (g/kg) Dieta controle	Quantidade (g/kg) Dieta deficiente	Quantidade (g/kg) Dieta suplementada
L-Cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5
Mix de vitaminas – contendo ácido fólico	10 (fornecendo 2 mg de ácido fólico/kg)	10 (Fornecendo 0,5 mg de ácido fólico/kg)	10 (Fornecendo 8 mg de ácido fólico/kg)
Mix de minerais	35	35	35
Celulose microfina	50	50	50
Sacarose	100	100	100
Caseína	140	140	140
Amido dextrinizado	155	155	155
Amido de milho	465,69	465,69	465,69
Ditert butil-hidroquinona	0,008	0,008	0,008
Óleo de Soja	40	40	40
Água	1.750 ml	1.750 ml	1.750 ml

Quadro 2. Quantidade dos ingredientes para o preparo da ração controle, deficiente e suplementada com ácido fólico.

Todos os ingredientes foram pesados individualmente, misturados (sempre os volumes menores eram misturados primeiros e logo após os de volumes maiores eram acrescentados) e homogeneizados manualmente em uma bacia. Em seguida, essa massa foi peletizada em um peletizador. Posteriormente, essa ração foi levada para estufa para secagem à 45°C por te 24 horas. Após a secagem, a ração foi colocada em sacos plásticos identificados e armazenada em freezer horizontal até o momento do consumo.

SACRÍFICIO DOS ANIMAIS

Após o tratamento de todos os filhotes (n = 40), que durou três meses, os animais foram eutanasiados por anestesia com 300 mg/kg de quetamina e 30 mg/kg de xilazina, e em seguida decapitados, respeitando as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP de Ribeirão Preto/SP. Subsequentemente, foram coletadas amostras do fígado, tecido adiposo marrom (retirado da região

cervical) e tecido adiposo branco (retirado da região abdominal - visceral) de cada animal, totalizando 120 amostras para serem analisadas.

Para retirada dos tecidos foram utilizadas tesouras e pinças cirúrgicas autoclavadas e, em seguida as amostras foram colocadas individualmente em tubos com nitrogênio líquido e logo depois armazenadas no freezer a menos 80°C para as análises posteriores.

EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA a partir das amostras de fígado, TAB e TAM foi realizada através do Kit DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen™). A eluição final foi de 200 µl em tampão AE (do kit). Em seguida, para ver a integridade do DNA, correu-se um gel de agarose 1% em tampão TAE, em 90V por 30 minutos; o marcador utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder da Invitrogen (ThermoFisher™). O gel foi analisado no aparelho com sistema de captação de imagem acoplado ao transiluminador de UV. Todos os DNAs de todos os tecidos se mostraram íntegros.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA de cada amostra foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) com o Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™). Todas as amostras apresentaram quantidades de DNA satisfatória para realização das análises de conversão e subsequentemente, metilação do DNA.

CONVERSÃO DO DNA

Para a conversão do DNA pelo bissulfito seguiu-se o protocolo: Conversão de bissulfito de sódio de citocinas não metiladas no DNA do Kit Epitec Bisulfite Kit (Qiagen™), utilizando o aparelho Termociclador Veriti® 96 well thermal cycler (Applied Biosystem™). A quantidade de DNA utilizada para conversão foi de 1.500 ng para as amostras de fígado, 150 ng para as amostras de TAM e 100 ng para as amostras de TAB, devido a quantidade que apresentou cada tecido.

PADRONIZAÇÃO Q-SOLUTION

Antes de passar para próxima etapa, utilizamos o PyroMark® PCR Kit (Qiagen™), para observarmos se teria ou não a necessidade da utilização do reagente Q-solution (que vem junto ao Kit), que é um novo aditivo que permite a amplificação eficiente de modelos "difíceis" (por exemplo, ricos em GC). Para essa etapa de padronização utilizamos 1 amostra de cada tecido, e essas foram testadas com os primers Foxo1 (181 pb) e Pparg (183 pb). Após o teste, optamos em utilizar o reagente Q-solution do Kit PyroMark® PCR Kit (Qiagen™), que é um kit especificamente otimizado para análise de pirosequenciamento para amplificação altamente específica do DNA convertido. Nessa etapa, foi utilizado para todas as amostras a quantidade de 3 µl de DNA convertido, para um volume final de 25 µl da reação. Foi utilizado o aparelho Termociclador Veriti® 96 well thermal cycler (Applied Biosystem™) para a realização, seguindo a ciclagem do protocolo do Kit. Em seguida, correu-se um gel de agarose 1% com todas as amostras, em tampão TAE, 90 V por 30 minutos. Depois, o gel foi analisado no aparelho com sistema de captação de imagem acoplado ao transiluminador de UV. Foi observada a integridade de todas as amostras, como mostrado nos géis a seguir.

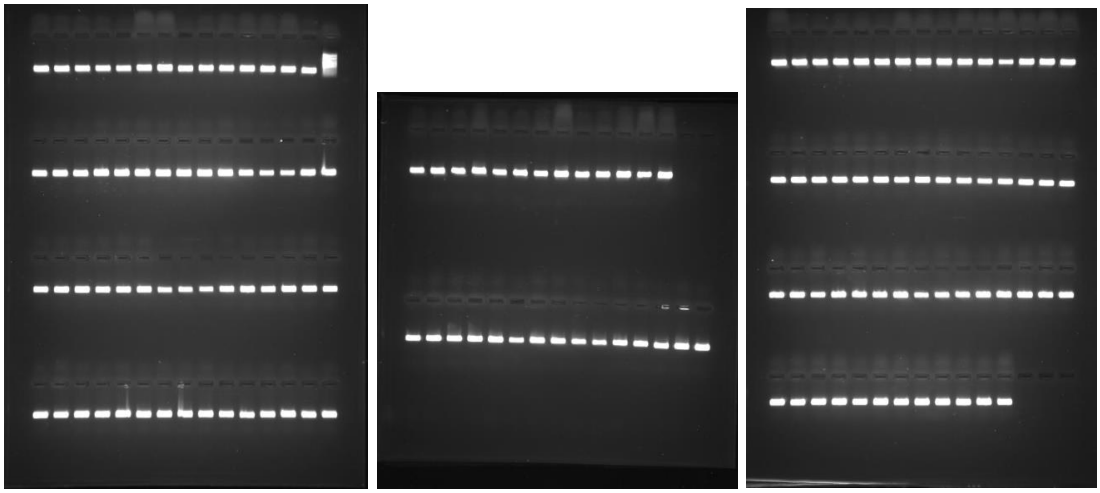


Figura 5. Integridade do DNA das amostras dos tecidos de fígado, TAB e TAM.

METILAÇÃO DO DNA

Para as análises de metilação do DNA foi utilizado os primers comercializados da Qiagen™ PyroMark CpG Assay: Pparg (Rn_Pparg_03PM) –

GeneGlobe Cat. n° PM00549535; Gene ID: 25664 ; tamanho do amplicon de 183; localizado no cromossomo 4; número de ilhas CpGs (6); e Foxo1 (Rn_Foxo1_03PM) – GeneGlobe Cat. n°PM00521199; Gene ID: 84482; tamanho do amplicom de 181; localizado no cromossomo 2, número de ilhas CpGs (7).

Essa análise foi realizada no Centro de Sequenciamento CTO/ICES, através da parceria com a rede PREMiUM da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP (FMUSP). Para essa etapa as amostras foram preparadas, e assim, foram utilizados os seguintes reagentes: tampão de anelamento (PyroMark Annealing Buffer – Qiagen™), tampão de ligação (PyroMark Binding Buffer – Qiagen™), solução desnaturante (PyroMark Denaturation Sol. – Qiagen™), tampão de lavagem (PyroMark Wash Buffer – Qiagen™) e enzima, substrato (PyroMark Gold Q24 Reagents – Qiagen™), seguindo o protocolo do fabricante e realizada no aparelho Pirosequenciador PyroMark Q24 (Qiagen™).

EXTRAÇÃO DO RNA

A extração do RNA a partir das amostras foi realizada através do TRIzol® Reagent da Life Technologies, seguindo o protocolo do fabricante. Para completa solubilização dos tecidos foi utilizado o aparelho TissueLyser (Qiagen®). Ao final deste procedimento a ressuspensão do RNA *pellet* foi em 20µl de água livre de RNase.

QUANTIFICAÇÃO DO RNA

Para quantificar o RNA de cada amostra utilizou-se o aparelho Nanodrop 2000.

INTEGRIDADE DO RNA

Para avaliação da integridade do RNA corremos géis de agarose. Para casa poço colocamos as amostras de RNA em uma concentração de 1.000 ng; 2 µl de loading buffer; 1 µl de GelRed. A corrida foi em cuba de eletroforese horizontal na seguinte voltagem: 70 V/ 300mA/ 50w por 1 hora. Em seguida, cada gel foi analisado no aparelho com sistema de captação de imagem acoplado ao

transiluminador de UV. Todos os RNAs de todas as amostras (fígado, tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB)) se mostraram íntegros. Como mostrado nas imagens a seguir:

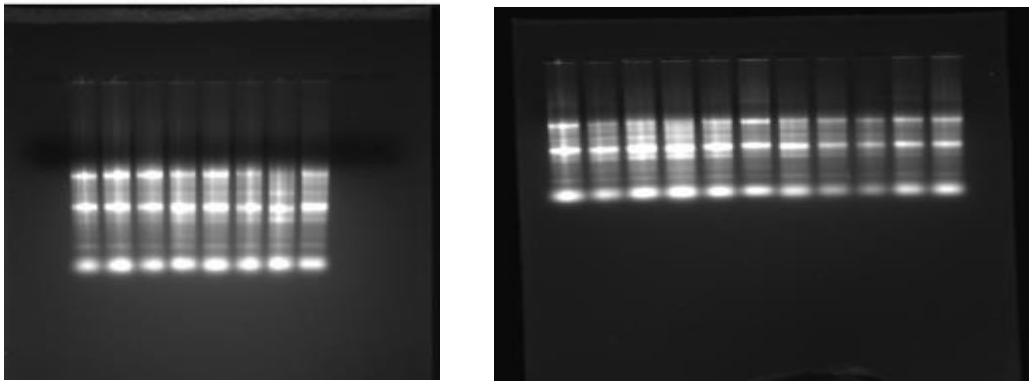


Figura 6. Integridade do RNA das amostras de TAM

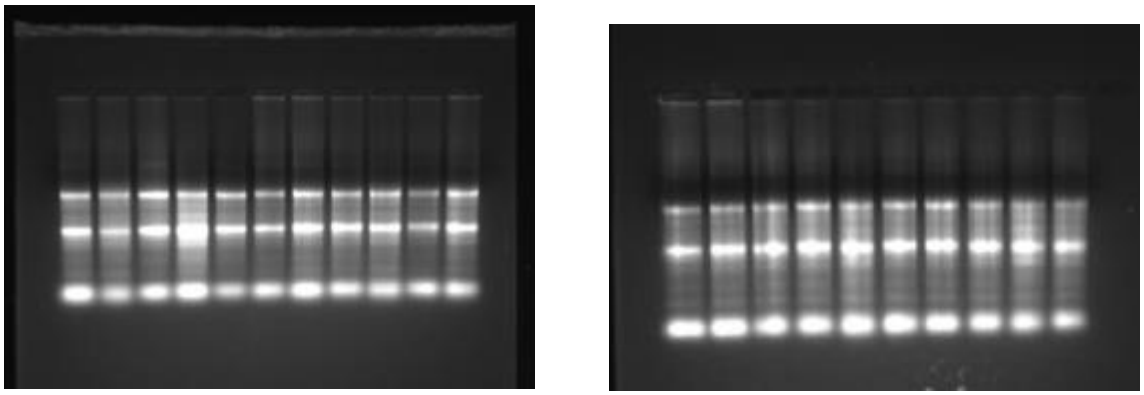


Figura 7. Continuação. Integridade do RNA das amostras de TAM

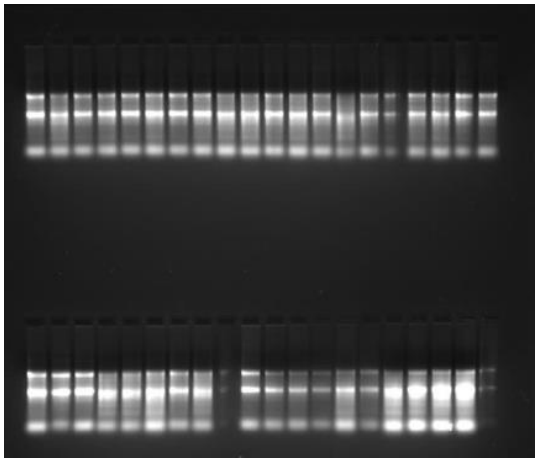


Figura 8. Integridade do RNA das amostras de TAB

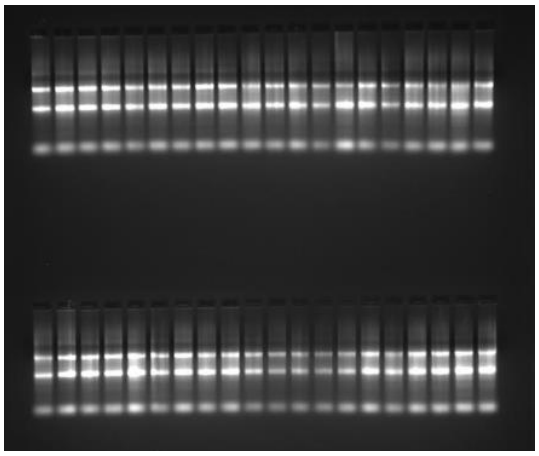


Figura 9. Integridade do RNA das amostras de fígado

TRATAMENTO DO RNA

O RNA foi tratado com a enzima RQ1 RNase-Free DNase® (Promega™) para evitar qualquer tipo de contaminação com DNA genômico, seguindo o protocolo do fabricante.

Neste protocolo a quantidade final da reação é de 10µl. Então, pegou-se se 1µl de RQ1 RNase-Free DNase tampão; mais 1,5µl de RQ1 RNase-Free DNase; mais o RNA das amostras (foi padronizado que seria retirado de cada amostra de RNA uma concentração de 1.500ng. Desta forma, apenas algumas amostras que apresentaram um valor acima deste precisou ser diluída para chegar na quantidade desejava) e acrescentava a água livre de RNase (ThermoFisher®) para 10µl. Posteriormente essa reação foi realizada em Termociclador Veriti® 96 well thermal cycler (Applied Biosystem™) seguindo a ciclagem: incubação à 37°C por 30 minutos. Para interromper a reação foi adicionado 1µ de RQ1 DNase Stop Solution® e, em seguida incubação a 65°C por 10 minutos para inativação da DNase.

SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi por meio do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies®) seguindo o protocolo do fabricante, utilizando o aparelho Termociclador Veriti® 96 well thermal cycler (Applied Biosystem™). Para essa etapa utilizou-se 9 µl de RNA tratado (concentração de 1.227 ng) de cada amostra, seguindo a ciclagem: temperatura de 37°C por 60 minutos; 95°C por 5 minutos; e para finalizar 4°C.

EXPRESSÃO GÊNICA

Realizou-se a quantificação relativa de expressão dos genes: *Sirt1* (Rn01428096_m1), *Pparg* (Rn00440945_m1), *Foxo1* (Rn01494868_m1) *Tnf-α* (Rn99999017_m1), *IL1-β* (Rn00580432_m1) e *IL6* (Rn01410330_m1) pelo método de PCR em tempo real que foi realizado em aparelho 7500 Fast (Appied Biosystem®) utilizando as sondas supracitadas, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em duplicatas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen [56]. Os genes de referência utilizados foram beta-actina (Rn00667869_m1) e hipoxantina fosforibosiltransferase-1 (Hprt1-Rn01527840_m1).

A concentração do cDNA utilizado para a expressão gênica foi de 25 ng para cada amostra para 20 µl de volume final da reação.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A extração de proteína dos três tecidos foi realizada por meio do protocolo RIPA Buffer (Sigma-Aldrich®). Para cada amostra foi utilizado a quantidade de 100 mg de tecido para 400 µl de tampão RIPA tratado com 4 µl do inibidor de protease e fosfatase da Halt™ Protease and Phosphatase Inibidor Cocktail (ThermoFisher Scientic®). Para homogeneização e completa solubilização das amostras foi utilizado o aparelho TissueLyser (Qiagen®). Logo após, essas amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante, contendo a proteína da amostra, foi transferido para um novo tubo eppendorf e armazenado no freezer a -20°C até a próxima etapa do experimento.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTÉINA

Para quantificação da proteína de cada amostra seguiu-se o protocolo do Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Utilizou-se o espectrofotômetro SpectraMax® M3 (Molecular Devices), onde as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e realizadas as leituras com comprimento de onda de 562nm. Todas as amostras apresentaram quantidades de proteína satisfatória para realização das análises de *Western Blotting*.

WESTEN BLOTTING

Para realizar a eletroforese utilizou-se o gel 4-15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad) e o tampão de corrida Tris-Glicina-SDS (10X) para separação da proteína. No primeiro poço do gel acrescentou-se 5µl do marcador do peso molecular Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (Bio-Rad) e nos demais poços continham 12,5 µg de proteína em um volume final de 25µl. A corrida iniciou com 80V (volts) por 10 minutos e em seguida passou para 100V por 1 hora e 20 minutos.

Posteriormente, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose TransBlot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad) através do aparelho Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Nas seguintes condições: 1.3A, 25V, por 7 minutos. Após, para verificar a eficiência da transferência houve uma breve coloração dos plots com coloração vermelha, com o Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich®). Estas membranas foram então bloqueadas com solução salina tamponada com Tris (TBS-1X) contendo 5% de leite Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad), durante 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas overnight (16 horas) a 4°C com os anticorpos primários (Quadro 3). Após esse período, foram realizadas as lavagens das membranas com TBS-T (solução salina tamponada com Tris, contendo Tween-20 0,1%), cinco vezes por 5 minutos cada, e as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com seu respectivo anticorpo secundário conjugado HRP e com o revelador do marcador do peso molecular, o Precision Protein Strep Tactin-HRP Conjugate (1610381 – Bio-Rad). Em seguida, novamente, foram realizadas as lavagens das membranas com TBST, cinco vezes por 5 minutos cada, e uma última lavagem com TBS-1X. Logo, as membranas foram expostas a 1 ml (500 µl da solução A + 500 µl da solução B) do revelador Amersham™ ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) por 5 minutos em temperatura ambiente. Assim, as membranas foram reveladas através do aparelho ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) e as intensidades das bandas foram quantificadas usando o software Image Studio Lite (v.3.3.1). Os níveis relativos de expressão proteica foram normalizados para referência à proteína Beta-actina, que foi realizada na concentração 1:20.000, e secundário Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719) - Abcam® na concentração 1:10.000.

A seguir (Quadro 3) estão todos os anticorpos (ThermoFisher™) primários

utilizados no estudo com seus respectivos secundários, concentrações e número de catálogo. Vale ressaltar que para cada anticorpo foi realizado diversos testes para que se chegasse a essa concentração final utilizada no estudo.

Código	**Descrição**	**Diluição primário**	**Secundário**	**Diluição secundário**
MA523741	TNF alpha Monoclonal Antibody (45418)	1:2.000	Anti-Mouse*	1:5.000
MA535338	PPAR gamma Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (ARC0155)	1:1.000	Anti-Rabbit**	1:10.000
MA532114	FOXO1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (SU33-01)	1:2.000	Anti-Rabbit**	1:5.000
ARC0962	IL-6 Antibody Monoclonal (10 E5)	1:2.000	Anti-Mouse*	1:10.000
710206	IL-1-beta Recombinant Polyclonal Antibody (14HCLC)	1:250	Anti-Rabbit**	1:5.000
MA527217	SIRT1 Monoclonal Antibody (OTI5B2)	1:500	Anti-Mouse*	1:10.000

Quadro 3. Anticorpos primários e secundários do estudo.
*Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719) - Abcam®
**Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718) - Abcam®

Tanto os anticorpos primários, como os secundários, foram diluídos em TBS-T e leite Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad) 5%.

Na figura 2, encontra-se o delineamento experimental do atual estudo.

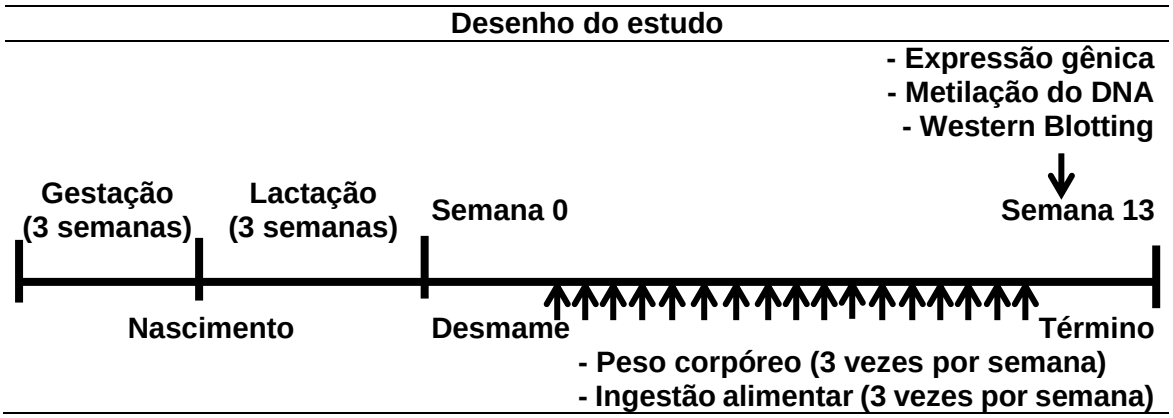


Figura 10. Delineamento experimental do estudo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado a estatística descritiva baseada em média e desvio-padrão. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Utilizou-se o teste One-Way ANOVA para comparação dos valores de peso, consumo de ração, expressão gênica, expressão proteica e metilação do DNA entre os grupos. Quando houve diferença significativa entre os grupos, utilizou-se o teste *post hoc* de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 20), adotando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados de peso, consumo alimentar, metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica dos três grupos do estudo (controle, deficiente e suplementado) nos três tecidos propostos: fígado, TAB e TAM.

Legenda dos resultados:

GC: grupo controle

GD: grupo deficiente

GS: grupo suplementado

PESO CORPÓREO

Observou-se que os filhotes machos do GD apresentaram maior peso (p= 0,00) do que os do GC. Já os filhotes fêmeas, do GS apresentaram maior peso (p= 0,04) do que o GC. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que todos os grupos (GC; GD; GS) dos filhotes machos pesaram significativamente (p= 0,00) a mais do que todos os grupos (GC; GD; GS) dos filhotes fêmeas (Gráfico 1).

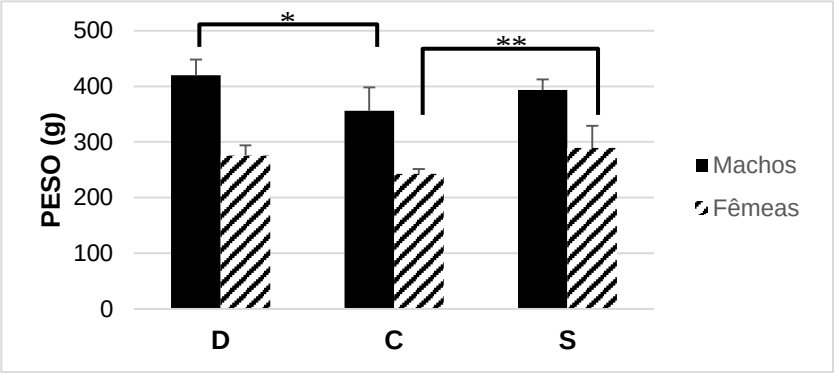


Gráfico 1 – Peso corpóreo (g) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. Todos os filhotes machos pesaram mais do que as fêmeas (p= 0,00). *p= 0,00; **p= 0,04.

CONSUMO DE RAÇÃO

Verificou-se que os filhotes machos do GD apresentaram maior consumo de ração do que o GC (p= 0,03) e GS (p= 0,02). Por outro lado, as fêmeas do GS apresentaram maior consumo (p= 0,00) do que o GC. Quando comparado

os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes machos do GD consumiram significativamente (p= 0,00) a mais do que os filhotes fêmeas do GC (Gráfico 2).

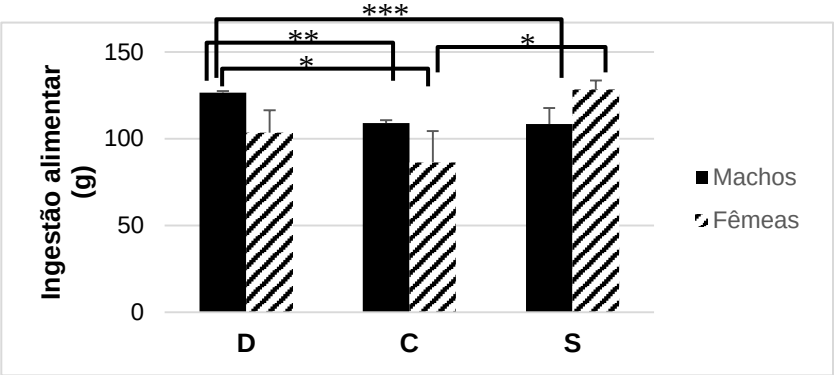


Gráfico 2 – Ingestão alimentar (g) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,03; ***p= 0,02.

METILAÇÃO DO DNA

Apresentaremos os resultados da metilação do DNA com a metilação das ilhas (CpGs) (FOXO1 – 7 posições de ilhas e PPARG – 6 posições de ilhas) dos primers separadas e em seguida as ilhas juntas.

Com o intuito dos gráficos não ficarem poluídos, não apresentaram neles as diferenças estatísticas significativas, apenas apresentada aqui de forma descritiva. Para descrever os resultados das ilhas separadas, utilizaremos as seguintes abreviações: FD – Fêmeas deficiente; FC – Fêmeas controle; FS – Fêmeas suplementada; MC – Machos controle; MD – Machos deficiente; MS – Machos suplementado.

FÍGADO – METILAÇÃO FOXO1

No fígado dos filhotes fêmeas foi observado que as FD, FC e FS (posição 7), FD (posição 3, 4 e 6) e FS (posição 4) apresentaram menor (p= 0,00) metilação de FOXO1 comparadas as FC (posição 2). Ainda, as FD (posição 4 e 7) apresentaram significativamente (p = 0,01) menor metilação comparadas com as FS (posição 2). As FD (posição 7) apresentaram menor (p= 0,02) metilação que as FC (posição 5) (Gráfico 3).

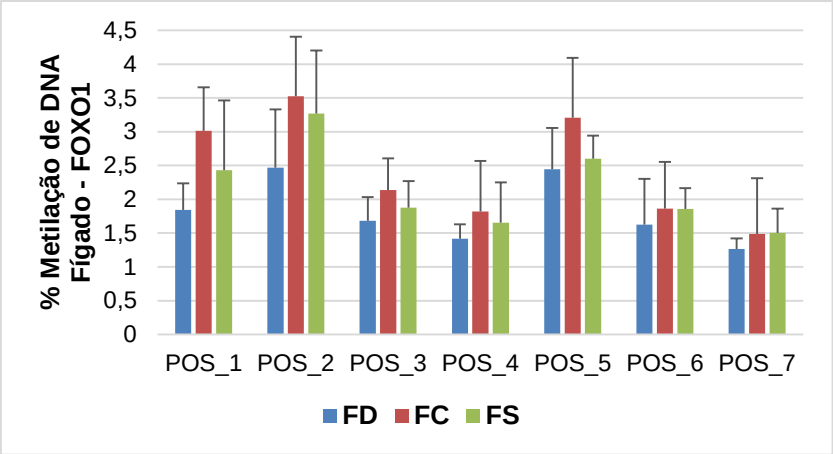


Gráfico 3 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Entre os filhotes machos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos e entre as ilhas (CpGs) (Gráfico 4).

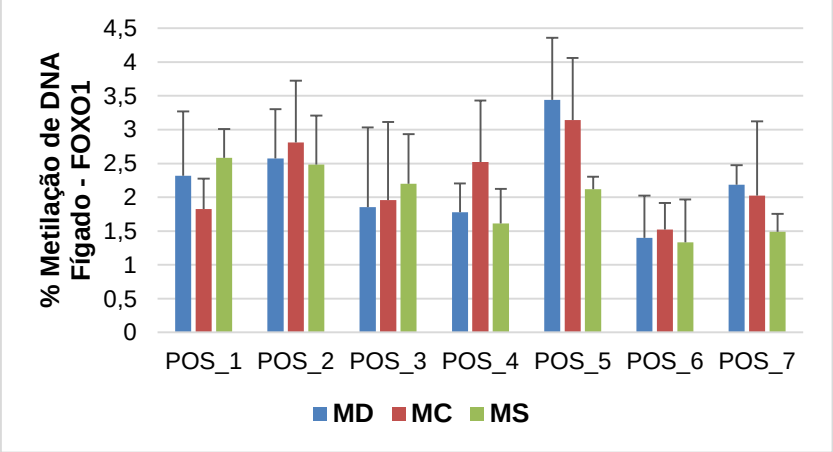


Gráfico 4 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Quando comparadas as ilhas juntas, machos e fêmeas não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Gráfico 5).

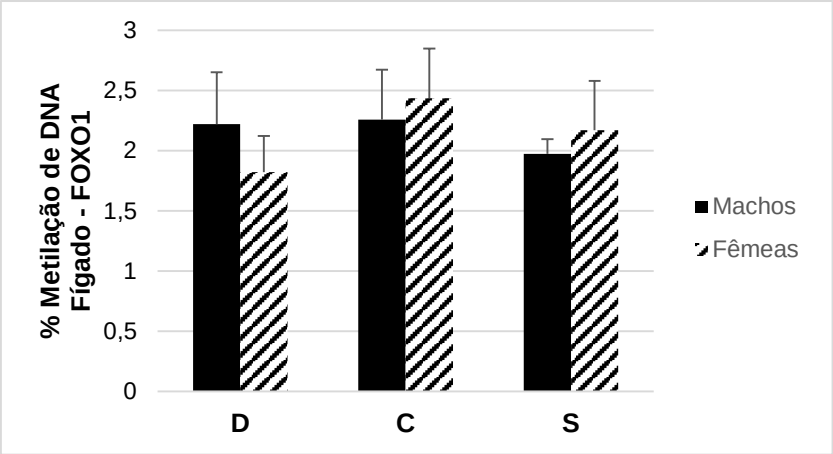


Gráfico 5 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

TAB – METILAÇÃO FOXO1

No TAB foi observado que a metilação de FOXO1 foi significativamente (p= 0,04) menor nas FD (posição 4, 6 e 7) comparadas as FC (posição 1). As FD e FS (posição 7) e FS (posição 1) apresentaram menor (p= 0,03) metilação do que as FC (posição 2) (Gráfico 6).

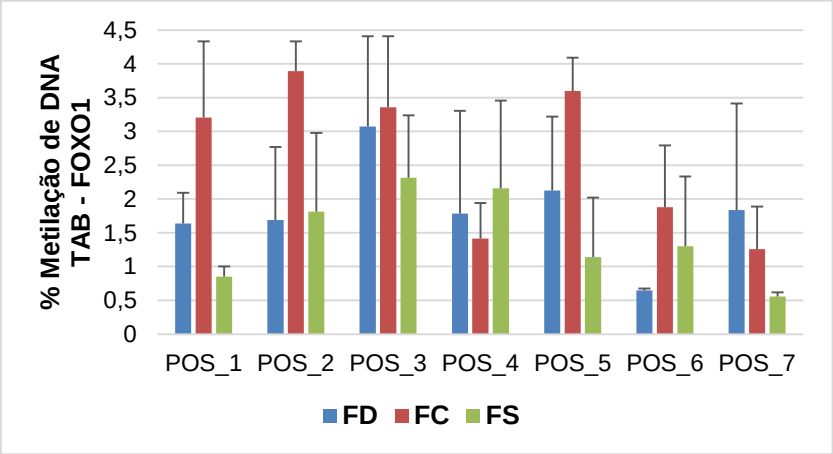


Gráfico 6 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Entre os filhotes machos, foi observado que os MD (posição 4) e os MS (posição 1, 3, 4 e 6) apresentaram significativamente (p= 0,03) menor metilação de FOXO1 comparados aos MC (posição 2) (Gráfico 7).

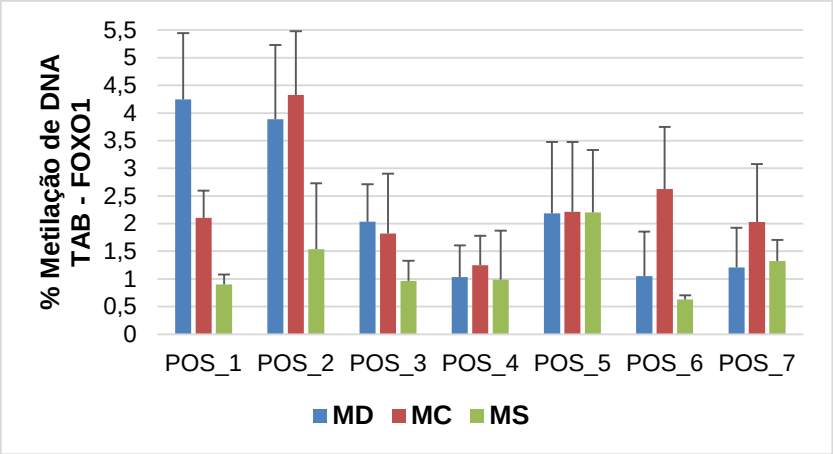


Gráfico 7 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Quando comparado as ilhas (CpGs) juntas, foi observado que, entre os filhotes fêmeas, as do GS apresentaram significativamente (p= 0,00) menor metilação de FOXO1 comparadas ao GC. Entre os filhotes machos, os do GS também apresentaram menor (p= 0,02) metilação comparado ao GC. Ainda, o GS apresentou menor (p= 0,03) metilação do que o GD. Quando comparado macho e fêmea, observou-se menor (p= 0,00) metilação do GS dos filhotes machos comparado ao GC dos filhotes fêmeas (Gráfico 8).

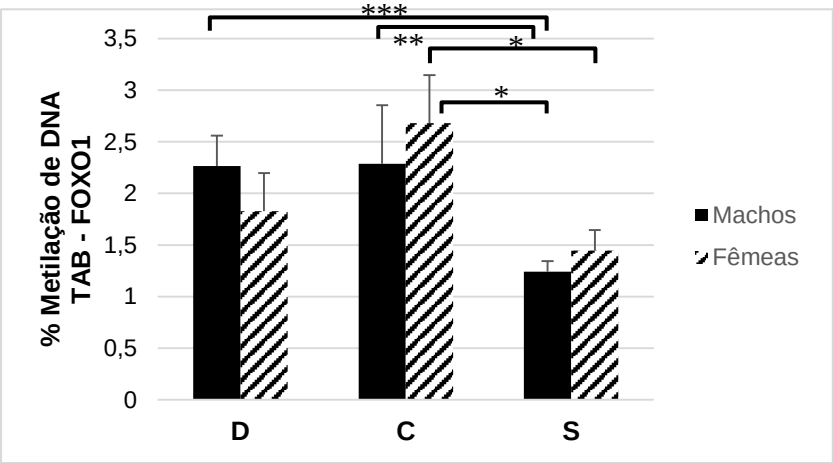


Gráfico 8 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02; ***p= 0,03.

TAM – METILAÇÃO FOXO1

No TAM, entre os filhotes fêmeas, foi observado que as FD (posição 3 e 6), FC (posição 3 e 4) e FS (posição 4, 6 e 7) apresentaram significativamente (p= 0,01) menor metilação de FOXO1 comparadas as FC (posição 2). Ainda, foi observado que, as FD (posição 3, 4, 5, 6 e 7), FC (posição 3, 4, 5 e 6) e FS (posição 4, 6 e 7) foram significativamente (p= 0,00) menos metiladas do que as FS (posição 2) (Gráfico 9).

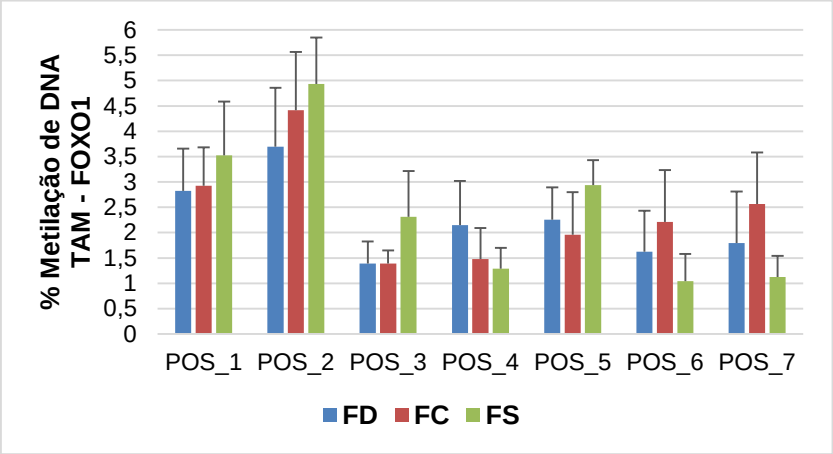


Gráfico 9 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Entre os filhotes machos, foi observado que os MS (posição 2) apresentaram significativamente (p= 0,00) maior metilação comparado com todos os grupos e de todas as ilhas (CpGs). Ainda, os MD (posição 2) foram mais metilados do que os MC (posição 6) e MD (posição 7) (Gráfico 10).

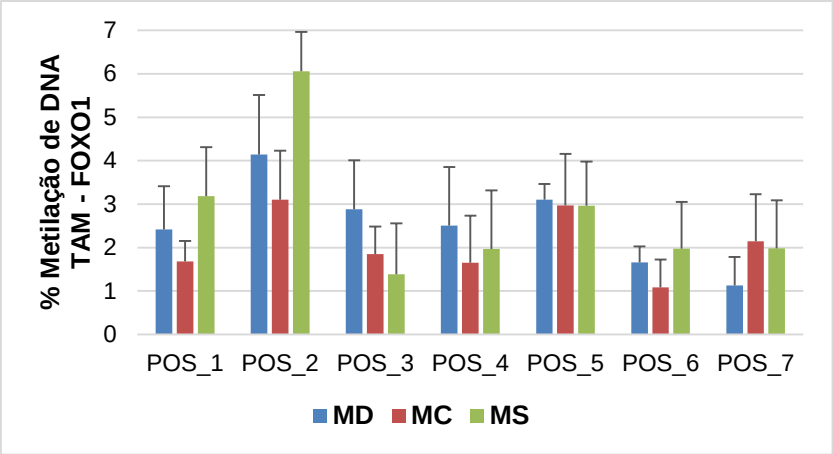


Gráfico 10 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 7).

Quando comparadas as ilhas juntas, machos e fêmeas não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Gráfico 11).

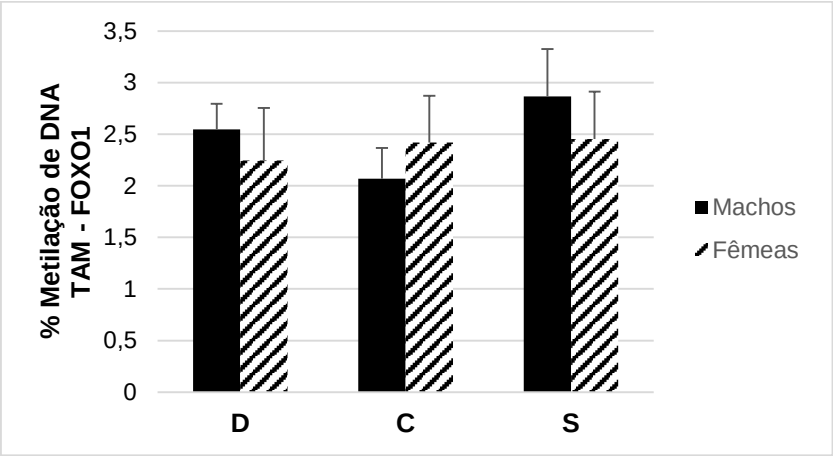


Gráfico 11 – Metilação do DNA (%) – FOXO1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

FÍGADO – METILAÇÃO PPARG

No fígado, a metilação de Pparg foi significativamente (p= 0,00) maior nas FS (posição 5) comparadas as FC (posição 1, 2, 3, 4, 5 e 6), FD (posição 1, 2, 3, 4 e 6) e FS (posição 1, 2, 3 e 4). As FS (posição 6) apresentaram maior (p= 0,00) metilação do que as FC (posição 2, 3 e 4), FD (posição 2, 3 e 4) e FS (posição 3). As FS (posição 1) apresentaram maior (p= 0,01) metilação comparadas as FC (posição 2 e 3) e as FD (posição 2 e 3). Ainda, as FD (posição

5) apresentaram maior (p= 0,01) metilação do que as FC (posição 2, 3 e 4) e as FD (posição 2, 3 e 4). As FD (posição 6) apresentaram maior (p= 0,01) metilação comparadas as FD (posição 3). Por fim, as FC (posição 2 e 3) e as FD (posição 2 e 3) apresentaram menor (p= 0,00) metilação do que as FC (posição 5), e as FC (posição 3) e as FD (posição 3) apresentaram menor (p= 0,00) metilação comparada as FC (posição 6) (Gráfico 12).

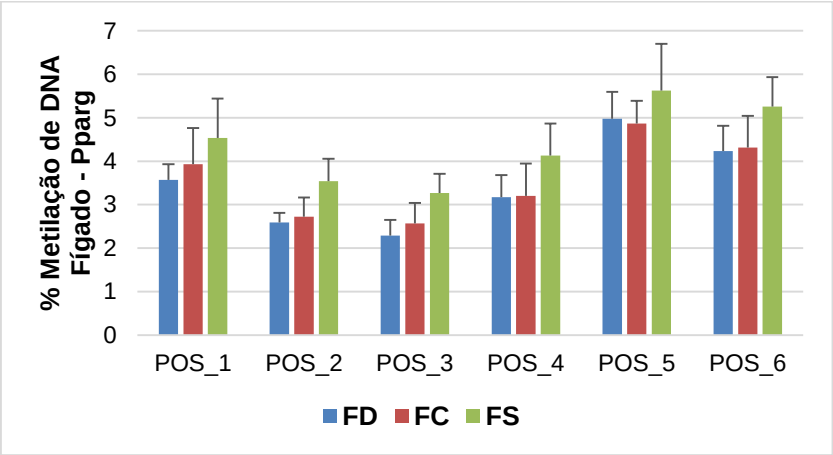


Gráfico 12 – Metilação do DNA (%) – Pparg no fígado dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Entre os filhotes machos, foi observado que os MS (posição 5) foram significativamente (p= 0,00) mais metilados do que os MC (posição 2, 3 e 4), os MD (posição 1, 2 e 3) e os MS (posição 2, 3 e 4). Os MS (posição 6) apresentaram maior (p= 0,00) metilação comparado aos MC (posição 3), aos MD (posição 2) e aos MS (posição 2 e 3). Os MD (posição 5) foram mais (p= 0,00) metilados do que os MC (posição 2, 3 e 4), MD (posição de 1 a 4) e MS (posição 2, 3 e 4). Os MD (posição de 1 a 4), MC (posição 2, 3 e 4) e MS (posição 2, 3 e 4) foram significativamente (p= 0,00) menos metilados do que os MC (posição 5). Ainda, os MD (posição 2 e 3), MC (posição 2 e 3) e MS (posição 2 e 3) apresentaram menor (p= 0,00) metilação comparados aos MC (posição 6). Por fim, os MD (posição 6) foram significativamente (p= 0,00) maior do que os MD (posição 2) (Gráfico 13).

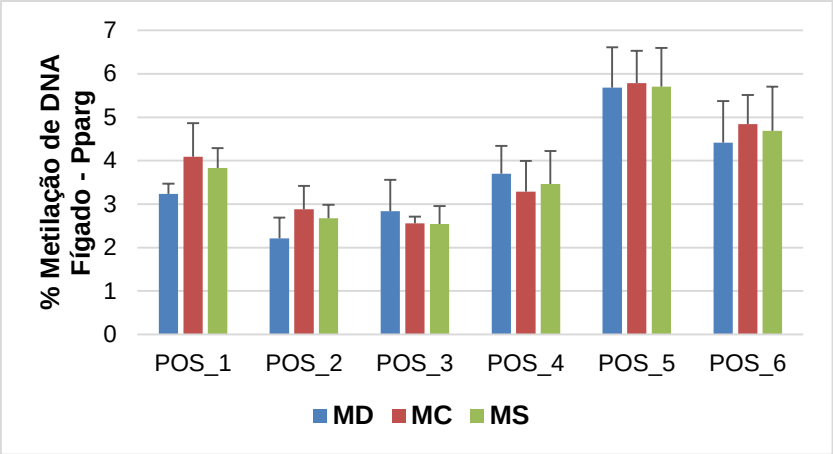


Gráfico 13 – Metilação do DNA (%) – Pparg no fígado dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Quando comparadas as ilhas (CpGs) juntas, machos e fêmeas não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Gráfico 14).

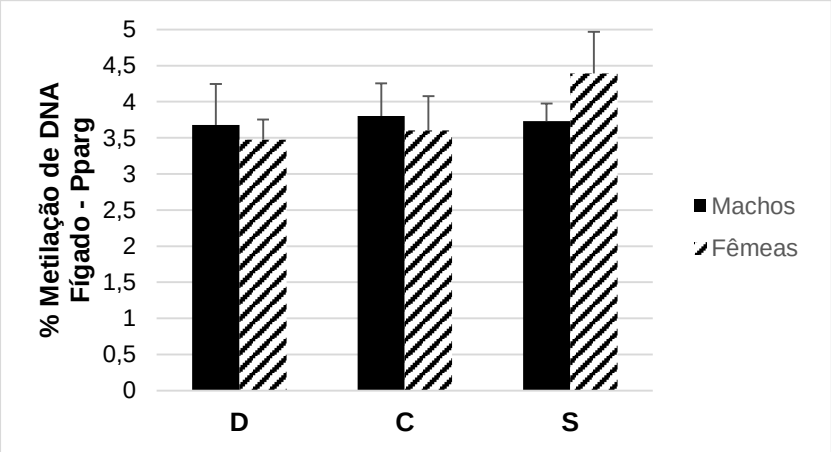


Gráfico 14 – Metilação do DNA (%) – PPARG no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

TAB – METILAÇÃO PPARG

No TAB, entre os filhotes fêmeas, foi observado que a metilação de Pparg foi significativamente (p= 0,02) menor nas FD (posição 1, 2 e 3) e FS (posição 1 e 3) comparadas as FC (posição 5) (Gráfico 15).

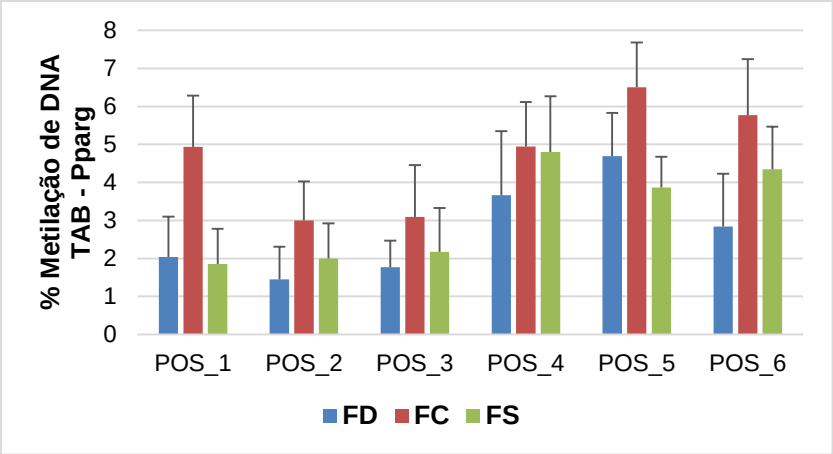


Gráfico 15 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAB dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Entre os filhotes machos, foi observado que a metilação de Pparg nos MD (posição 2) e nos MS (posição 2 e 4) foi significativamente (p= 0,03) menor comparados com os MC (posição 5) (Gráfico 16).

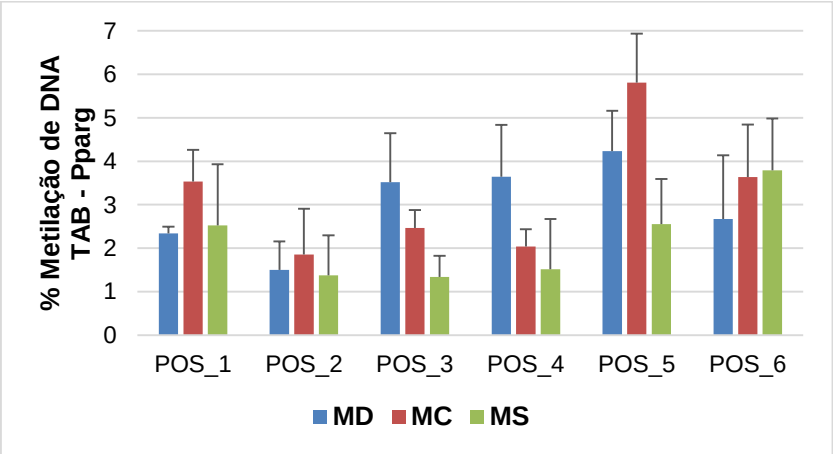


Gráfico 16 – Metilação do DNA (%) – PPARG1 no TAB dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Quando comparadas as ilhas (CpGs) juntas, entre os filhotes fêmeas, observou-se que a metilação de Pparg no GD foi significativamente menor (p= 0,02) comparado ao GC. Entre os filhotes machos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo. Quando comparado machos

e fêmeas foi observado que os machos do GS foram significativamente (p= 0,00) menos metilados comparados as fêmeas do GC (Gráfico 17).

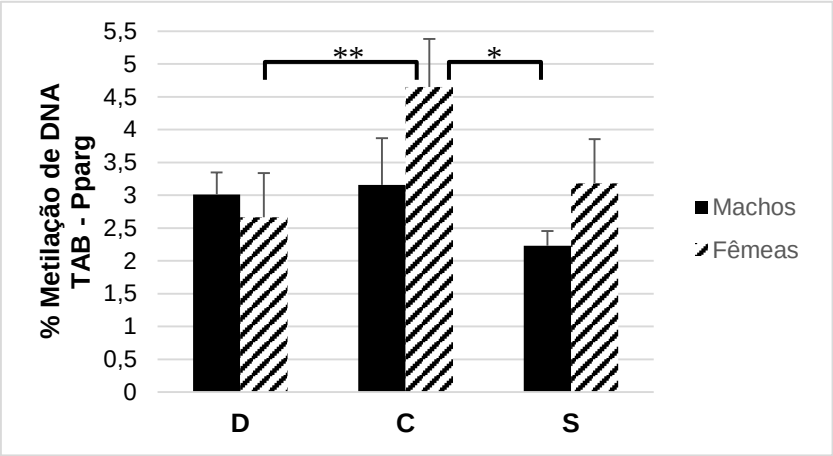


Gráfico 17 – Metilação do DNA (%) – PPARG no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02.

TAM – METILAÇÃO PPARG

A metilação de Pparg no TAM, entre as fêmeas, foi significativamente (p= 0,01) menor nas FD (posição 2 e 3) e nas FS (posição 2 e 3) em comparação com as FC (posição 5). Ainda, as FD (posição 2) apresentou menor (p= 0,03) metilação do que as FD (posição 5) e FC (posição 6) (Gráfico 18).

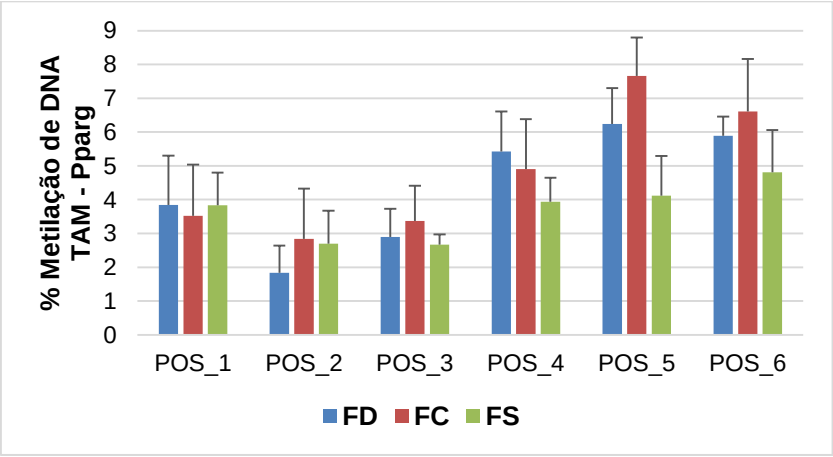


Gráfico 18 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAM dos filhotes fêmeas dos três grupos de tratamento: fêmeas deficiente (FD), fêmeas controle (FC) e fêmeas suplementada (FS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Entre os filhotes machos, foi observado que a metilação de Pparg foi significativamente (p= 0,00) maior nas FD (posição 5) comparado com as FC (posição 2 e 3), FD (posição 2) e FS (posição 2 e 3). Ainda, as FS (posição 6) e FC (posição 5) foram mais (p= 0,03) metiladas do que as FC (posição 2) (Gráfico 19).

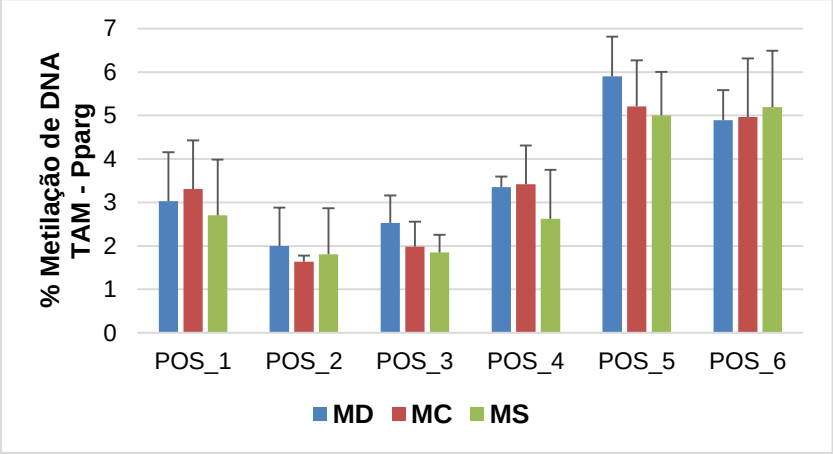


Gráfico 19 – Metilação do DNA (%) – Pparg no TAM dos filhotes machos dos três grupos de tratamento: machos deficiente (MD), machos controle (MC) e machos suplementado (MS) em ácido fólico. POS_ (posição da ilha CpG, de 1 a 6).

Quando comparadas as ilhas (CpGs) juntas, não houve diferença estatística significativa entre os filhotes machos e fêmeas. No entanto, quando comparado machos e fêmeas, observou-se que os machos do GS apresentaram menor (p= 0,04) metilação do que as fêmeas do GC (Gráfico 20).

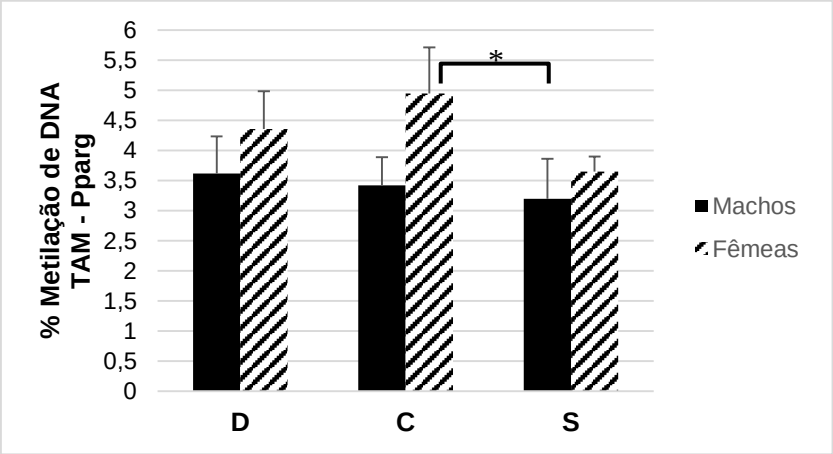


Gráfico 20 – Metilação do DNA (%) – PPARG no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,04.

EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados das análises da expressão dos genes propostos serão apresentados na seguinte ordem: análise da expressão gênica no fígado, TAB e TAM.

FÍGADO

A expressão gênica de *Il6* no fígado não apresentou diferença estatística significativa entre os machos, entre as fêmeas, e nem quando os gêneros foram analisados juntos (Gráfico 21).

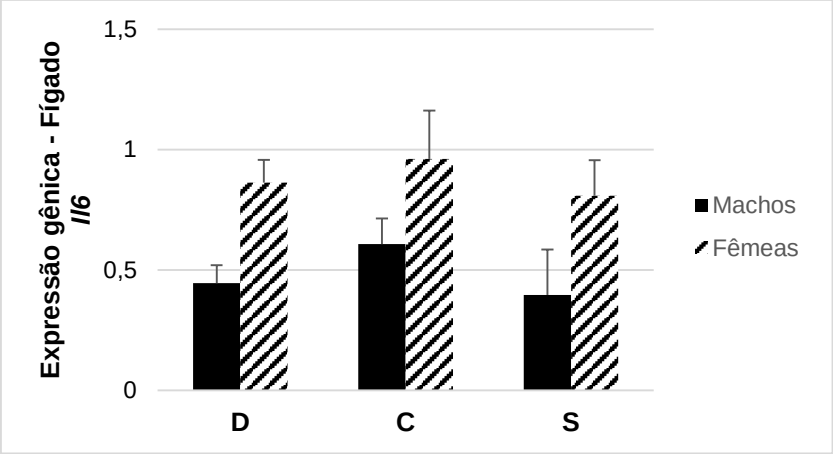


Gráfico 21 – Expressão gênica de *Il6* no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

Entre os filhotes fêmeas, foi observado que a expressão gênica de *Tnf-α* foi significativamente maior nas do GD (p= 0,00) e no GS (p= 0,02) comparado ao GC. Entre os filhotes machos, observou-se que os do GS apresentou maior expressão gênica comparados com o GC (p= 0,02) e com o GD (p= 0,01). Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD (p= 0,00) e do GS (p= 0,02) apresentaram significativamente maior expressão gênica do que os filhotes machos do GC e GD; e os filhotes machos do GS apresentaram maior (p= 0,01) expressão gênica do que os filhotes fêmeas do GC (Gráfico 22).

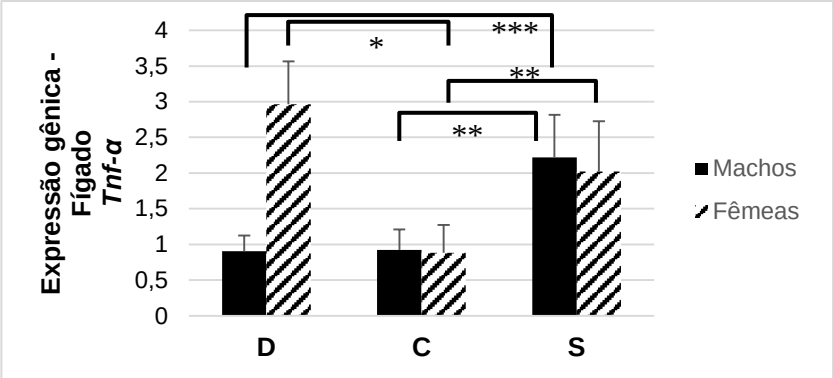


Gráfico 22 – Expressão gênica de *Tnf-α* no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02; ***p= 0,01.

Com relação a expressão de *Il1-β* no fígado, foi observado que entre os filhotes fêmeas não houve diferença estatística entre os grupos. Porém, entre os filhotes machos, foi observado maior (p= 0,02) expressão gênica no GD comparado ao GS. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD e GS apresentaram significativamente (p=0,00) maior expressão de *Il1-β* do que os filhotes machos do GS (Gráfico 23).

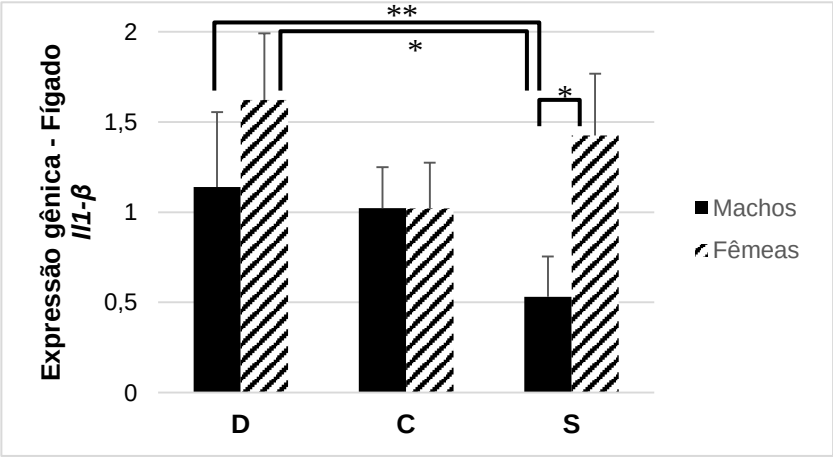


Gráfico 23 – Expressão gênica de *Il1-β* no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02.

A expressão do gene *Sirt1* foi significativamente maior nas fêmeas do GS em relação as do GC (p= 0,00) e GD (p= 0,02). Entre os machos, não houve diferença significativa. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi

observado que os filhotes fêmeas do GS apresentaram significativamente (p= 0,00) maior expressão gênica de *Sirt1* do que todos os grupos (GC; GD; GS) dos filhotes machos (Gráfico 24).

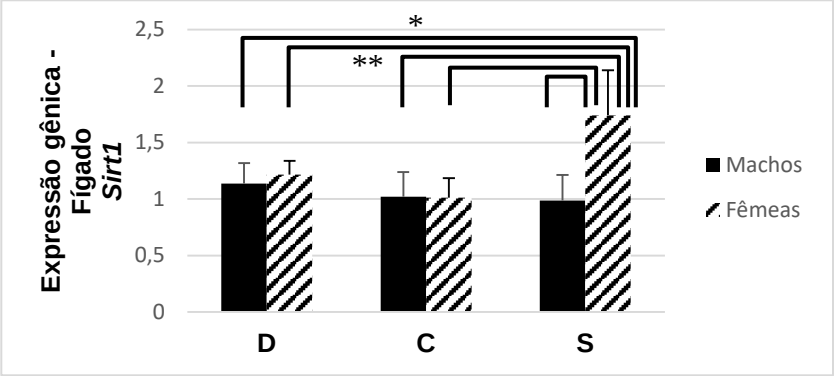


Gráfico 24 – Expressão gênica de *Sirt1* no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02.

Entre os filhotes fêmeas, observou-se que o GS apresentou maior expressão de *Pparg* quando comparado com o GC (p= 0,03) e GD (p= 0,03). E ainda, a expressão no GD foi menor (p= 0,02) comparado ao GC. Com relação aos filhotes machos, a expressão de *Pparg* foi significativamente maior no GS em comparação com o GC (p= 0,03) e GD (p= 0,03). Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GS apresentaram significativamente (p= 0,04) maior expressão do que os filhotes machos do GC e GD. E os filhotes machos do GS apresentaram significativamente (p= 0,02) maior expressão do que os filhotes fêmeas do GC e GD (Gráfico 25).

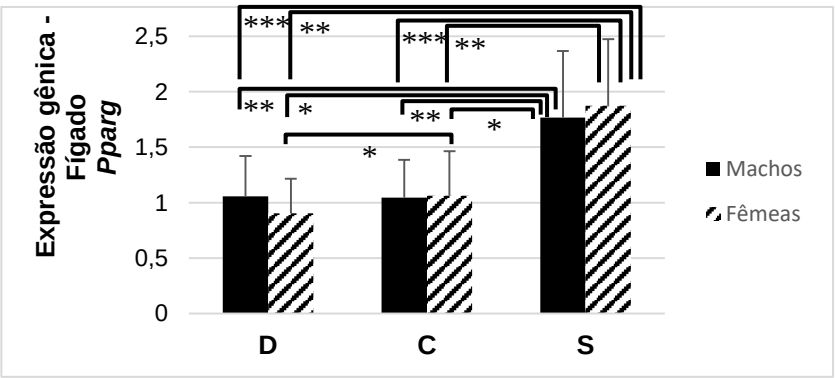


Gráfico 25 – Expressão gênica de *Pparg* no fígado dos filhotes

machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,02; **p= 0,03; ***p= 0,04.

A expressão do gene *Foxo1* não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos e entre os filhotes machos e fêmeas (Gráfico 26).

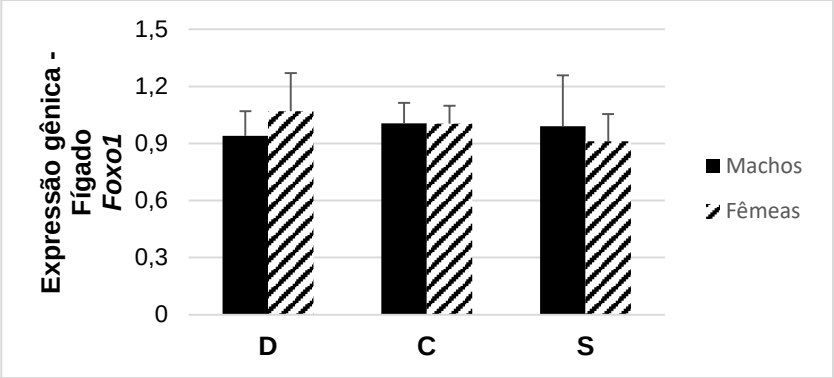


Gráfico 26 – Expressão gênica de *Foxo1* no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

TECIDO ADIPOSO BRANCO

No TAB, foi observado entre os filhotes machos, que os do GS apresentaram maior expressão gênica de *Il6* do que os do GC (p= 0,02) e GD (p= 0,01). Entre os filhotes fêmeas e quando os filhotes machos e fêmeas foram comparados juntos, não houve diferença estatística significativa (Gráfico 27).

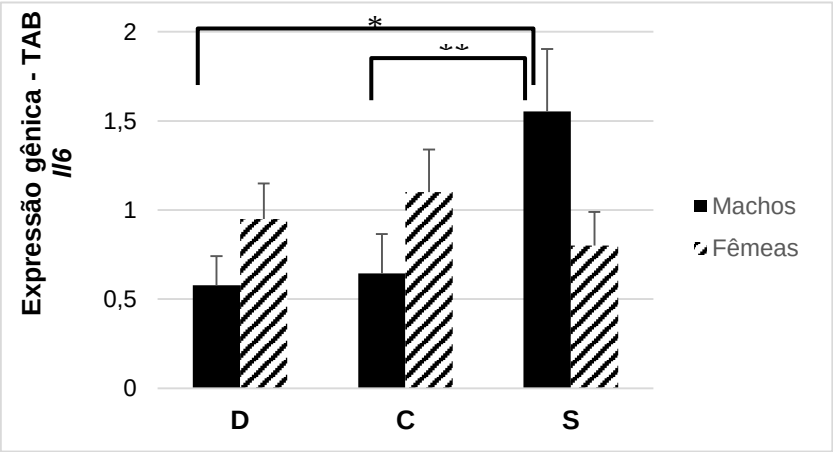


Gráfico 27 – Expressão gênica de *Il6* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01; **p= 0,02.

Entre os filhotes fêmeas, a expressão gênica de *Tnf-α* foi significativamente maior no GD (p= 0,02) e GS (p= 0,00) comparado com o GC. Entre os filhotes machos, não foi observado diferenças significativas. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD e do GS apresentaram significativamente (p= 0,00) maior expressão gênica do que todos os grupos (GD, GC e GS) dos filhotes machos (Gráfico 28).

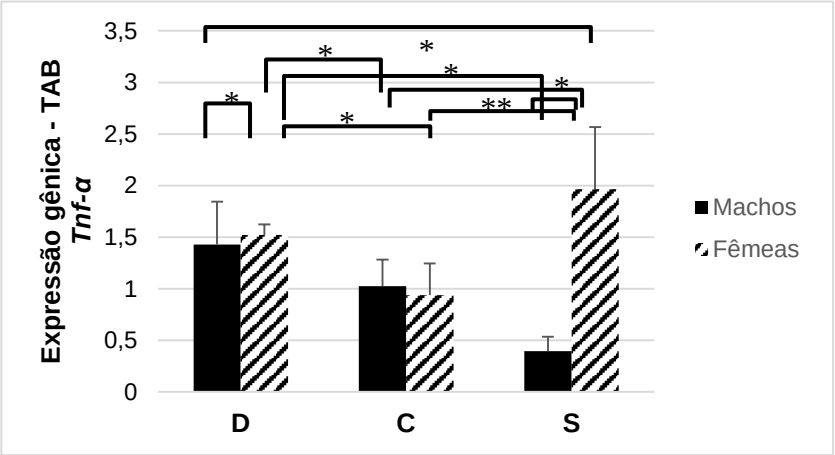


Gráfico 28 – Expressão gênica de *Tnf-α* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02.

Em relação a expressão gênica de *Il1-β*, foi observado, entre os filhotes fêmeas, que as do GS expressou significativamente (p= 0,01) a mais do que as do GC. Entre os filhotes machos, foi observado que os do GD apresentaram maior (p= 0,03) expressão gênica comparado ao GS. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GS apresentaram maior expressão gênica do que os filhotes machos do GC (p= 0,01) e do GS (p= 0,00); ainda, os filhotes fêmeas do GD apresentaram maior (p= 0,04) expressão gênica do que os filhotes machos do GS (Gráfico 29).

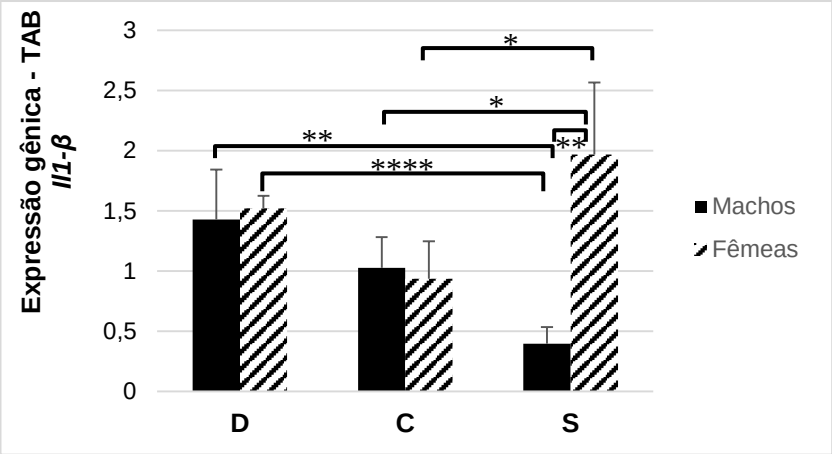


Gráfico 29 – Expressão gênica de *Il1-β* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01; **p= 0,00; ***p= 0,03; ****p= 0,04.

A expressão do gene *Sirt1* foi significativamente maior (p= 0,01) nos filhotes fêmeas do GS comparado ao GD, assim como menor expressão, do GD (p= 0,04) comparado ao GC. Não houve diferença significativa entre os filhotes machos. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, também não foi observado diferença significativa entre os grupos (Gráfico 30).

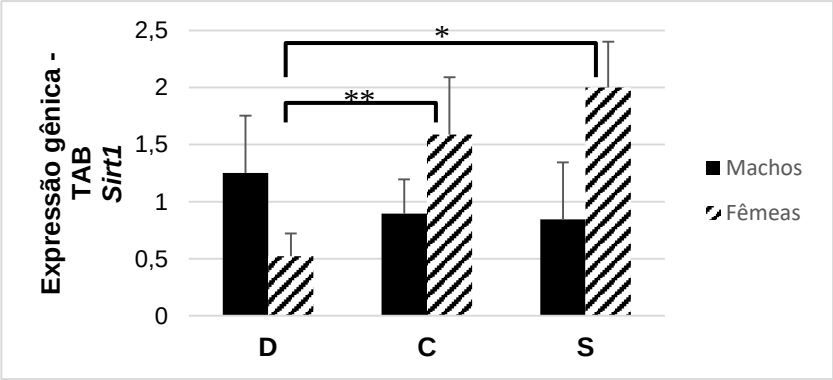


Gráfico 30 – Expressão gênica de *Sirt1* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01; **p= 0,04.

Observou-se menor expressão do gene *Pparg* (p= 0,00) nos filhotes fêmeas do GD comparado ao GC. Já entre os filhotes machos, não houve diferença significativa entre os grupos. Quando comparou-se filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD apresentou

significativamente (p= 0,00) menor expressão de *Pparg* comparado aos filhotes machos do GC (Gráfico 31).

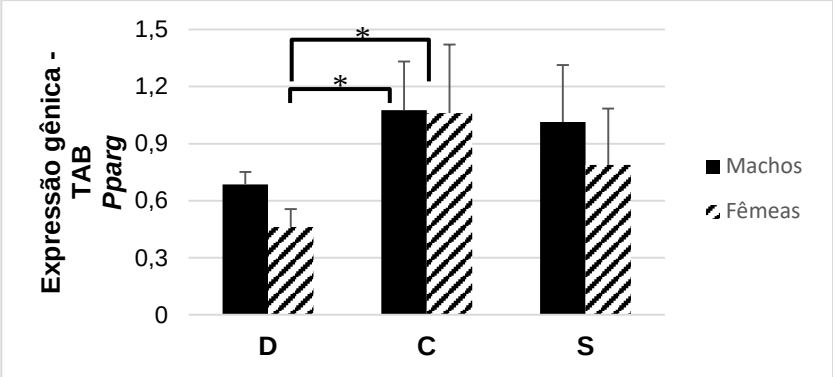


Gráfico 31 – Expressão gênica de *Pparg* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão gênica de *Foxo1* foi maior (p= 0,01) nos filhotes fêmeas do GS comparado com o GD. Ainda, observou-se maior expressão de *Foxo1* (p= 0,01) nos filhotes machos dos GS e GD comparado ao GC. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes machos dos GD e GS apresentaram significativamente (p= 0,01) maior expressão do que os filhotes fêmeas do GD e GC (Gráfico 32).

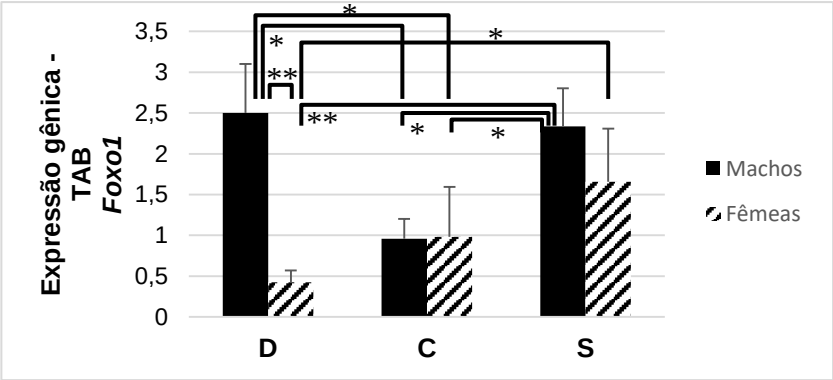


Gráfico 32 – Expressão gênica de *Foxo1* no tecido adiposo branco (TAB) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01; **p= 0,00.

TECIDO ADIPOSO MARROM

No TAM, entre os filhotes machos, fêmeas e quando machos e fêmeas foram analisados juntos, não apresentaram diferenças estatísticas significativas na expressão gênica de *Il6* (Gráfico 33) e *Tnf-α* (Gráfico 34) entre os grupos.

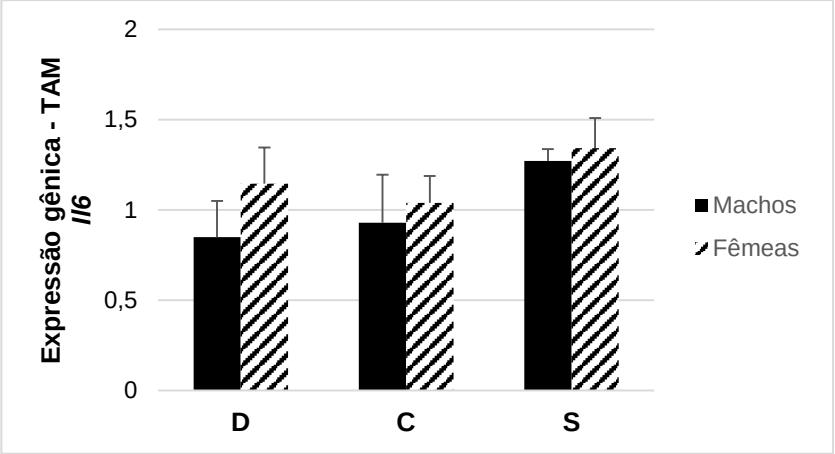


Gráfico 33 – Expressão gênica de *Il6* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

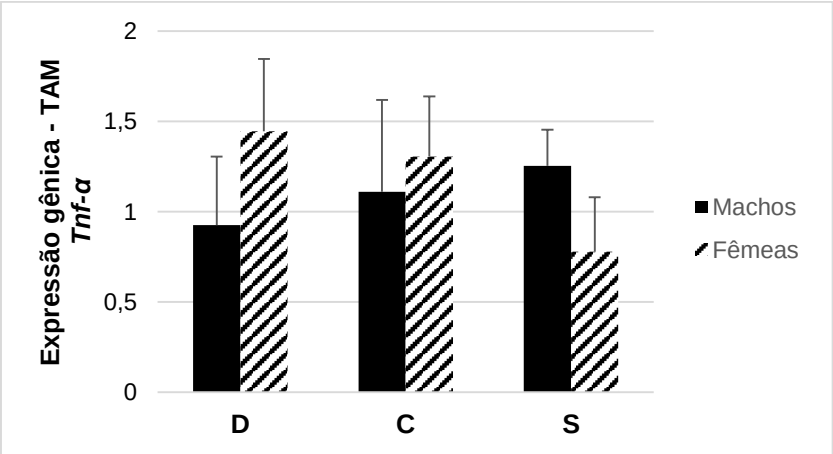


Gráfico 34 – Expressão gênica de *Tnf-α* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

A expressão de *Il1-β* no TAM foi significativamente maior (p= 0,02) nos filhotes fêmeas do GD comparado ao GC. Entre os filhotes machos, a expressão de *Il1-β* foi significativamente maior no GS comparado ao GC (p= 0,01) e ao GD

(p= 0,00). Quando comparado os filhotes machos e fêmeas foi observado que os filhotes fêmeas do GD e do GS apresentaram maior expressão de *Il1-β* comparados aos filhotes machos do GC (p= 0,01) e GD (p= 0,00) (Gráfico 35).

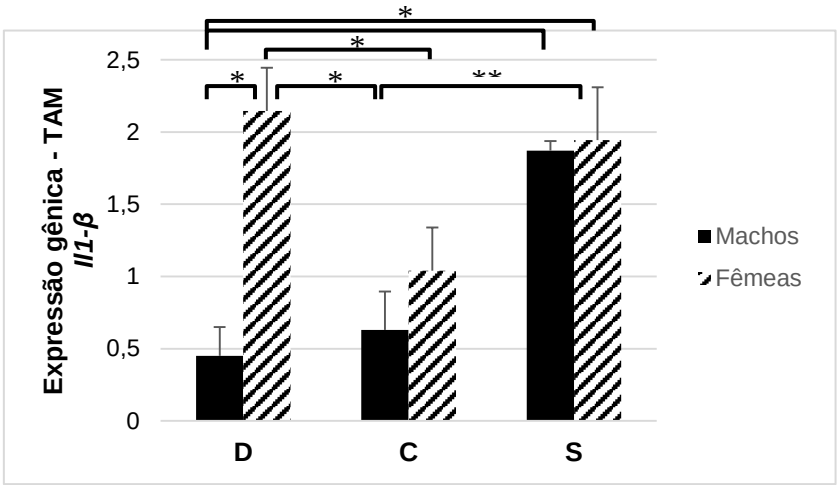


Gráfico 35 – Expressão gênica de *Il1-β* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,01.

Entre os filhotes fêmeas, a expressão do gene *Sirt1* no TAM não apresentou diferença estatística significativa. Entre os filhotes machos, foi observado maior (p= 0,00) expressão gênica no GD comparado ao GC e GS. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes machos do GD apresentaram significativamente (p= 0,00) maior expressão gênica do que os filhotes fêmeas do GC, GD e GS (Gráfico 36).

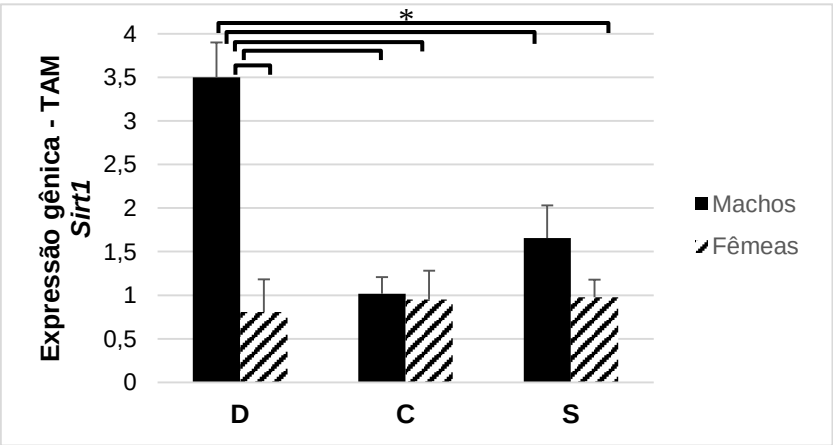


Gráfico 36 – Expressão gênica de *Sirt1* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão gênica de *Pparg* no TAM apresentou-se significativamente menor no GD (p= 0,00) e no GS (p= 0,03) dos filhotes fêmeas comparada ao GC. Entre os filhotes machos não houve diferença estatística significativa. Quando comparado os filhotes machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD apresentaram menor (p= 0,04) expressão gênica do que o GC dos filhotes machos (Gráfico 37).

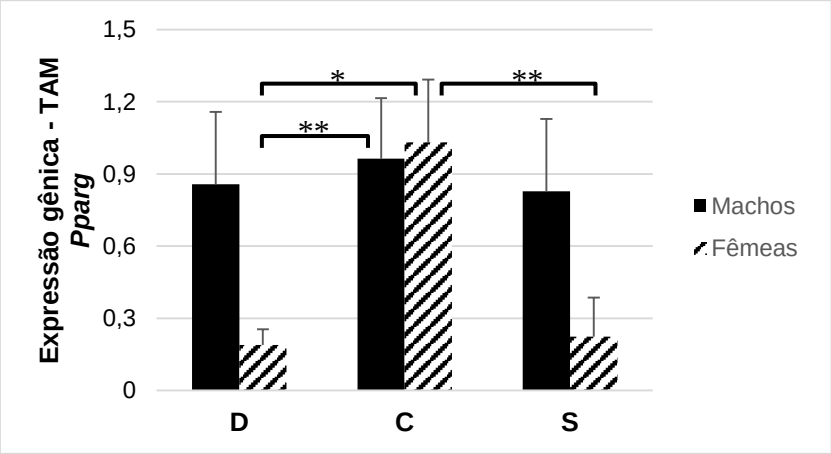


Gráfico 37 – Expressão gênica de *Pparg* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,03; **p= 0,04.

A expressão de *Foxo1* no TAM entre os filhotes machos, fêmeas e quando machos e fêmeas foram analisados juntos, não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Gráfico 38).

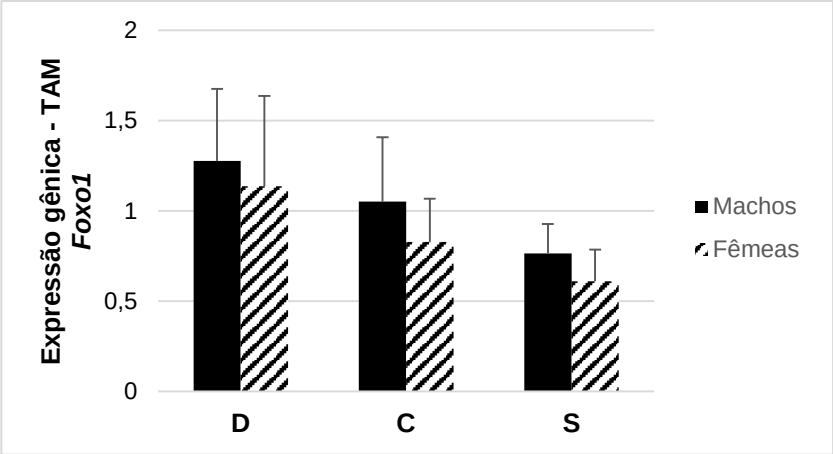


Gráfico 38 – Expressão gênica de *Foxo1* no tecido adiposo marrom (TAM) dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

EXPRESSÃO PROTEICA – WESTERN BLOTTING

FÍGADO

No fígado, não houve diferença significativa da expressão proteica de Il6 entre os filhotes machos e fêmeas nos grupos do estudo (Gráfico 39).

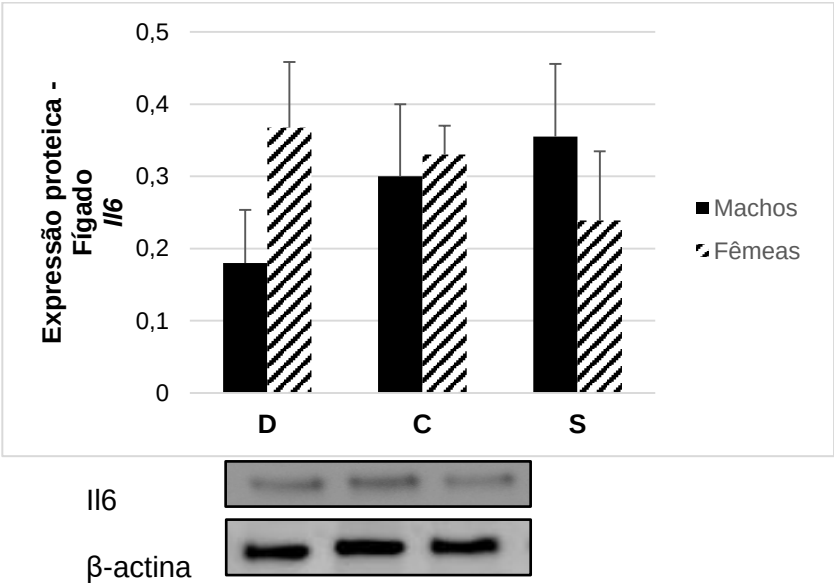


Gráfico 39 – Expressão proteica de Il6 no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

Entre os filhotes machos, a expressão proteica de Tnf-α foi significativamente (p= 0,00) maior no GS comparado com os GC e GD. Entre as fêmeas, a expressão proteica foi maior (p= 0,01) no GS do que no GC, e maior

(p= 0,01) no GD comparado com os GC e GS. Quando comparado machos e fêmeas, foi observado que os filhotes fêmeas do GD apresentaram maior (p= 0,00) expressão proteica de Tnf-α do que os machos dos GC e GD. A expressão proteica nas fêmeas do GS foi maior (p= 0,02) do que nos machos do GC, e os machos do GS apresentaram maior (p=0,00) expressão proteica do que as fêmeas dos GC e GS (Gráfico 40).

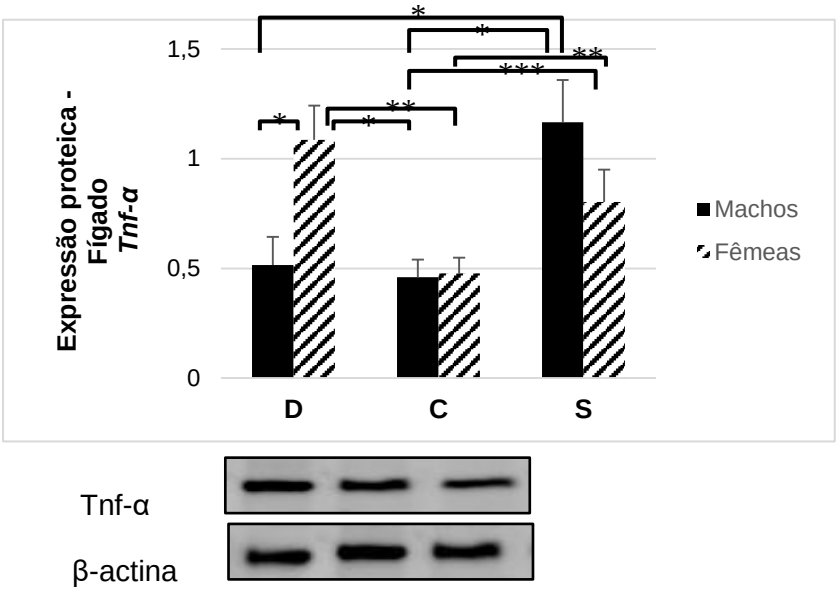
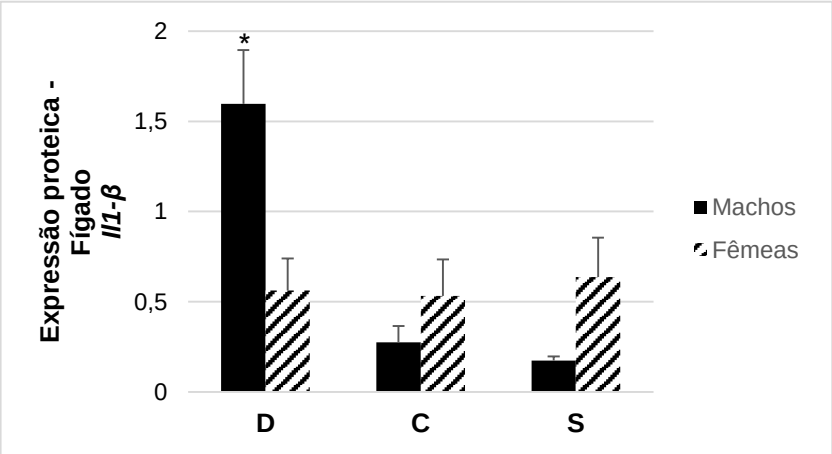


Gráfico 40 – Expressão proteica de Tnf-α no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,01; ***p= 0,02.

A expressão proteica de Il1-β no fígado foi significativamente (p= 0,00) maior nos machos do GD comparado com os machos do GC e GS e com as fêmeas de todos os grupos (GD, GC e GS). Entre as fêmeas não foi observado diferença estatística significativa (Gráfico 41).



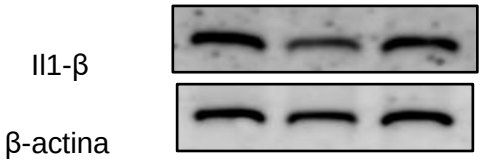
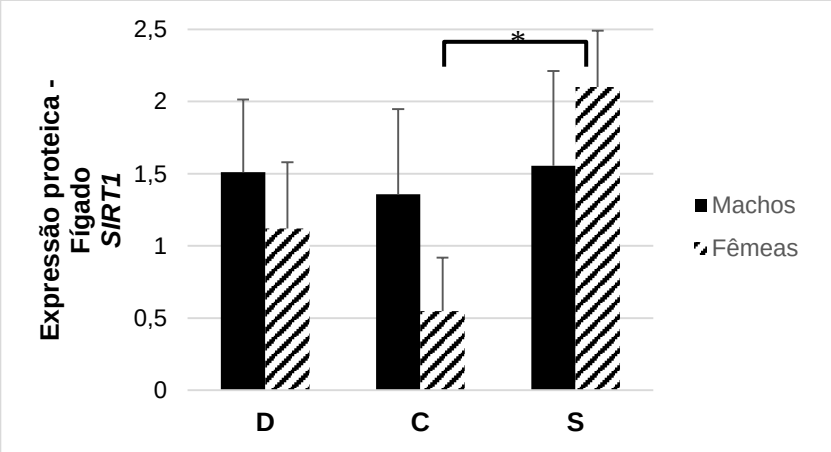


Gráfico 41 – Expressão proteica de Il1-β no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão proteica de Sirt1, entre as fêmeas foi significativamente (p= 0,02) maior no GS comparado com o GC. Entre os filhotes machos, e quando fêmeas e machos foram comparados, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos do estudo (Gráfico 42).



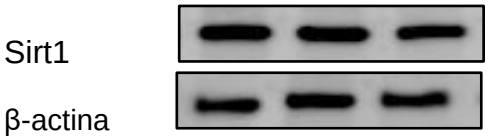


Gráfico 42 – Expressão proteica de Sirt1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,02.

Entre os filhotes machos, foi observado que a expressão proteica de Pparg nos machos dos GD e GS foram significativamente (p= 0,00) maiores do que os do GC. Entre as fêmeas, a expressão proteica foi maior (p= 0,00) naquelas do GD e GS, comparadas com as do GC. Ainda, a expressão proteica nas fêmeas do GS foi maior (p= 0,00) do que no GD. Quando comparado machos e fêmeas, foi observado que os filhotes machos do GD e GS apresentaram maior

(p= 0,00) expressão proteica que as fêmeas do GC. Os machos do GS foram maiores (p= 0,00) do que as fêmeas do GD. As fêmeas do GS foram maiores (p= 0,00) do que os machos do GC. E por fim, os machos do GS foram maiores (p= 0,00) do que as fêmeas do GS (Gráfico 43).

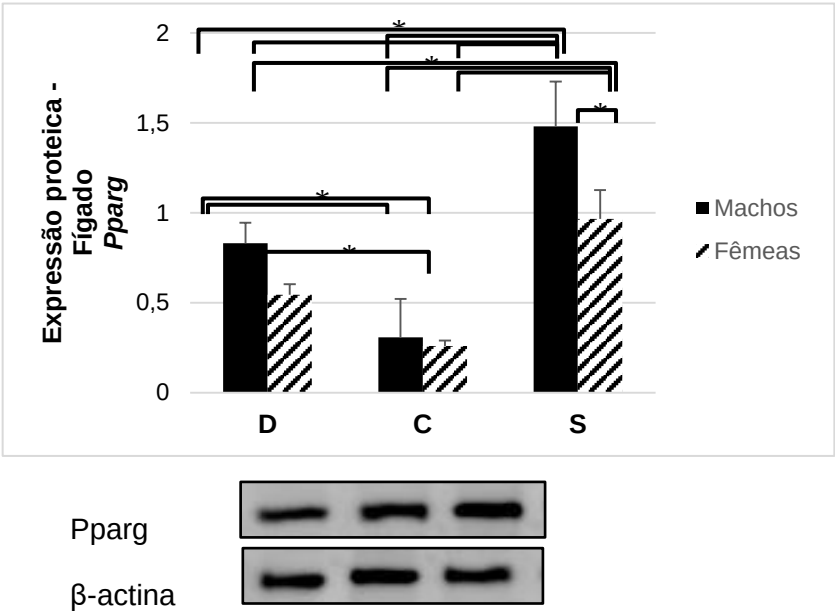
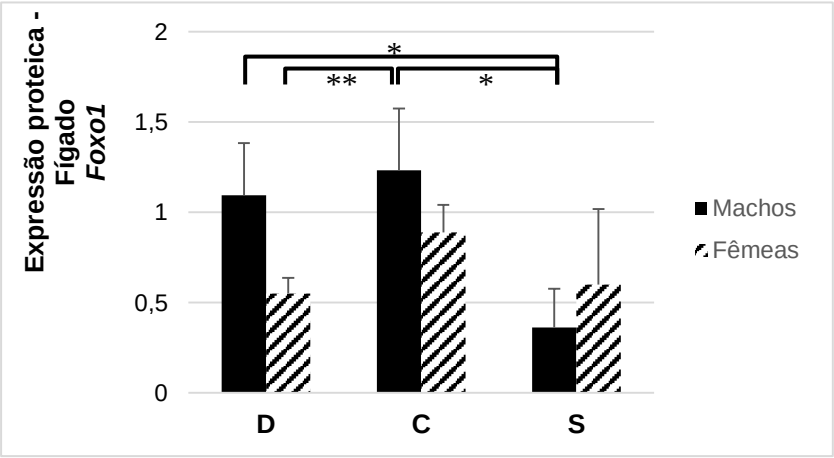


Gráfico 43 – Expressão proteica de Pparg no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão proteica de Foxo1, entre os filhotes machos foi significativamente (p= 0,01) menor nos machos do GS comparados aos GD e GC. Entres as fêmeas, não houve diferença estatística significativa. Já quando comparado macho e fêmea, foi observado que as fêmeas do GD apresentaram menor (p= 0,04) expressão proteica do que os machos do GC (Gráfico 44).



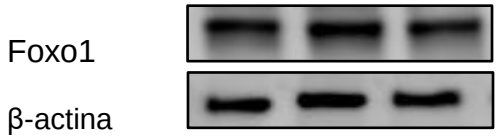
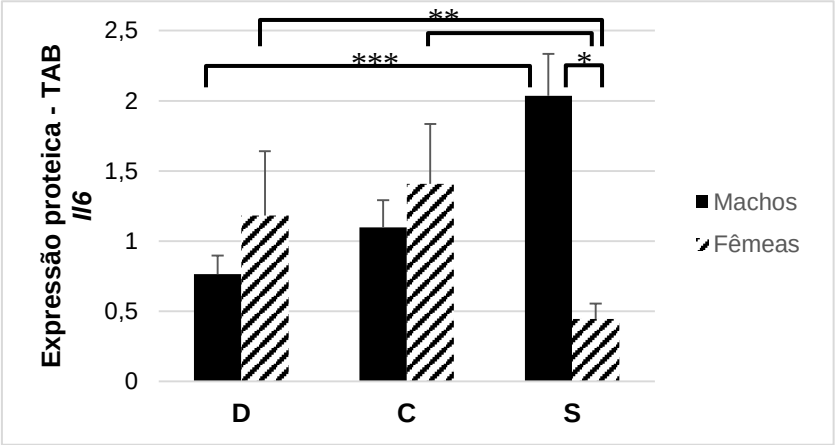


Gráfico 44 – Expressão proteica de Foxo1 no fígado dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01; **p= 0,04.

TECIDO ADIPOSO BRANCO

No TAB, foi observado que, entre os filhotes machos, a expressão proteica de Il6 foi significativamente (p= 0,03) maior nos machos do GS comparado aos do GD. Entre as fêmeas, a expressão proteica foi menor (p= 0,02) nas do GS do que os GD e GC. Quando comparado machos e fêmeas, foi observado maior (p= 0,00) expressão nos machos do GS do que nas fêmeas do mesmo grupo (Gráfico 45).



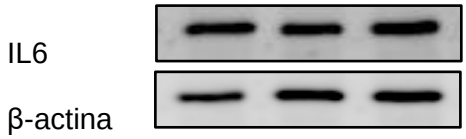


Gráfico 45 – Expressão proteica de IL6 no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,02; ***p= 0,03.

A expressão proteica de Tnf-α foi significativamente (p= 0,01) maior nas fêmeas do GS comparado ao GC. Entre os machos e em comparação machos e fêmeas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Gráfico 46).

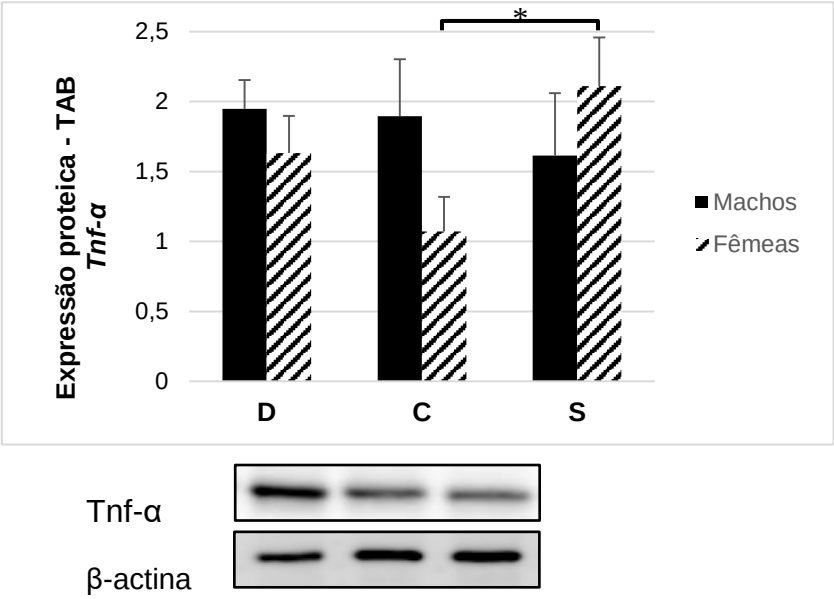


Gráfico 46 – Expressão proteica de Tnf-α no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,01.

Em relação a expressão proteica de Il1-β foi observado que, os machos do GD expressaram significativamente (p= 0,00) mais comparado ao GS. Entre as fêmeas, não apresentou diferença estatística significativa. Quando comparado machos e fêmeas, foi observado que os machos do GD apresentaram significativamente (p= 0,00) maior expressão proteica que as fêmeas do GD e DS (Gráfico 47).

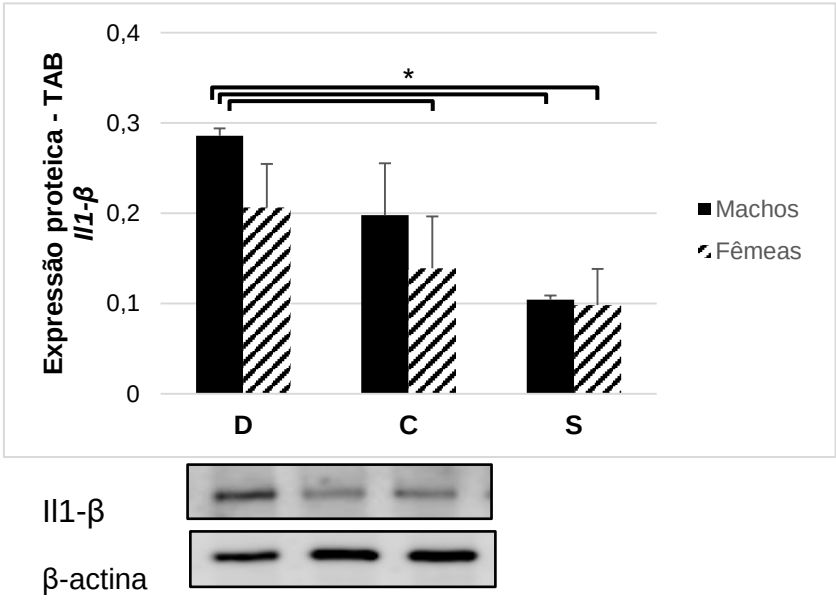


Gráfico 47 – Expressão proteica de Il1-β no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

Entre os filhotes machos e fêmeas, e em comparação de machos e fêmeas, não houve diferença estatística significativa na expressão proteica de Sirt1 entre os grupos do estudo (Gráfico 48).

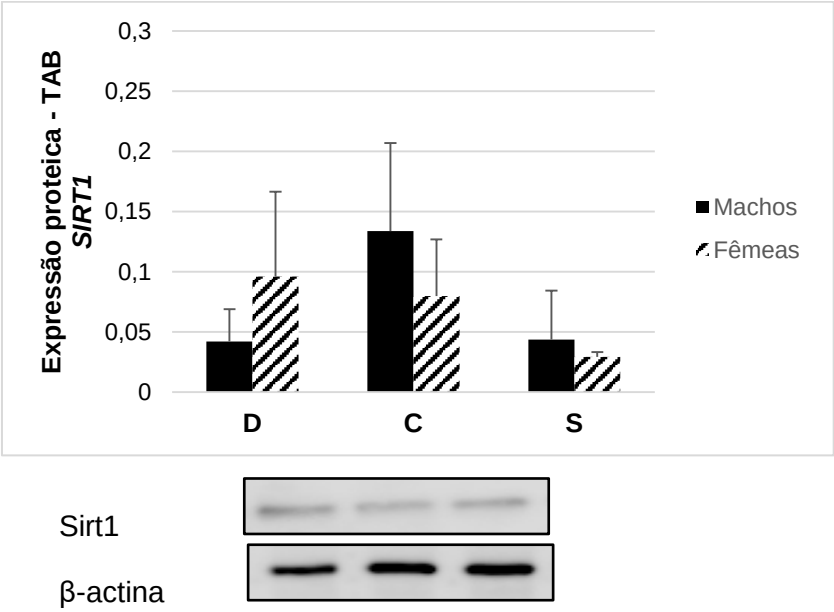
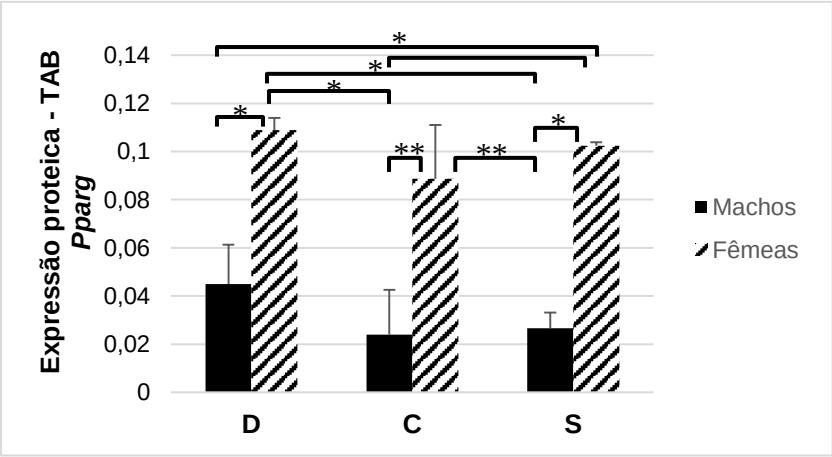


Gráfico 48 – Expressão proteica de Sirt1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

Entre os filhotes machos e fêmeas não houve diferença estatística significativa na expressão proteica de Pparg no TAB. No entanto, quando os machos e fêmeas foram comparados, foi observado que as fêmeas do GD e GS apresentaram significativamente (p= 0,00) maior expressão proteica do que os machos de todos os grupos (C, D e S). Ainda, os machos dos GD e GS foram menores (p= 0,01) do que as fêmeas do GC (Gráfico 49).



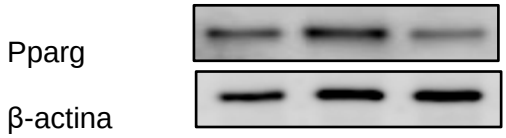
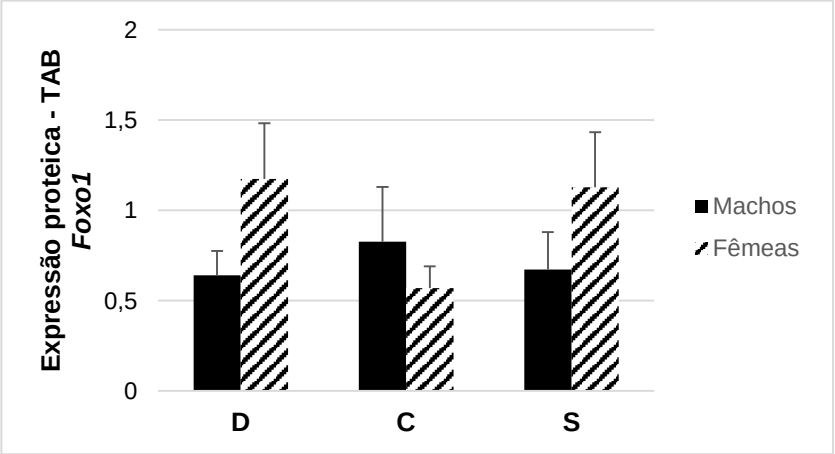


Gráfico 49 – Expressão proteica de Pparg no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00; **p= 0,01.

Entre os filhotes machos e fêmeas, e em comparação de machos e fêmeas, não houve diferença estatística significativa na expressão proteica de Foxo1 entre os grupos do estudo (Gráfico 50).



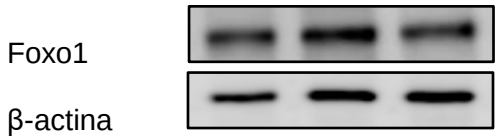
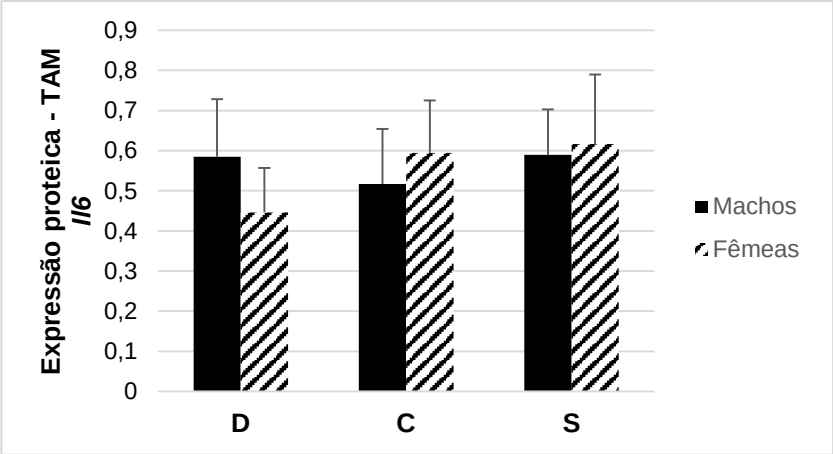


Gráfico 50 – Expressão proteica de Foxo1 no TAB dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

TECIDO ADIPOSO MARROM

No TAM, não foi observada diferença estatística significativa na expressão proteica de Il6 (Gráfico 51), Tnf-α (Gráfico 52) Il1-β (Gráfico 53), entre os filhotes machos e fêmeas, e quando machos e fêmeas foram comparados.



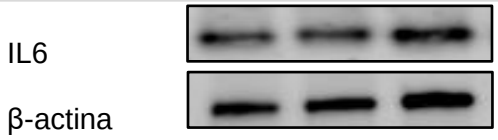
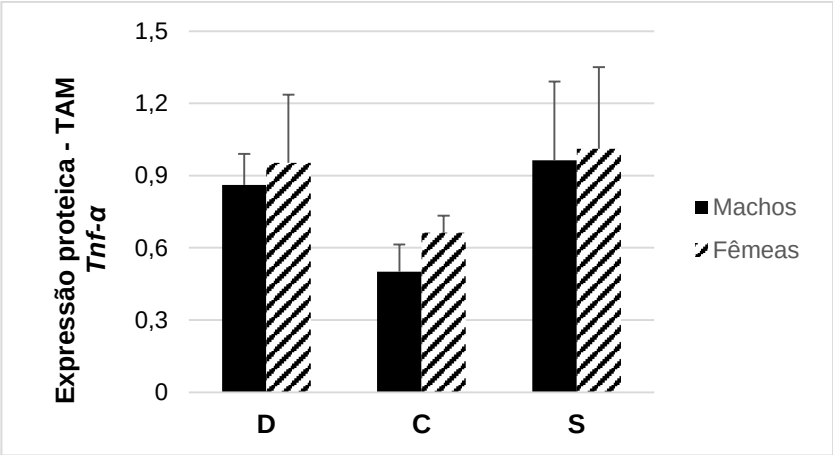


Gráfico 51 – Expressão proteica de IL6 no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.



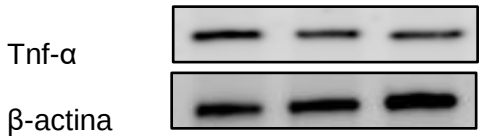


Gráfico 52 – Expressão proteica de Tnf-α no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

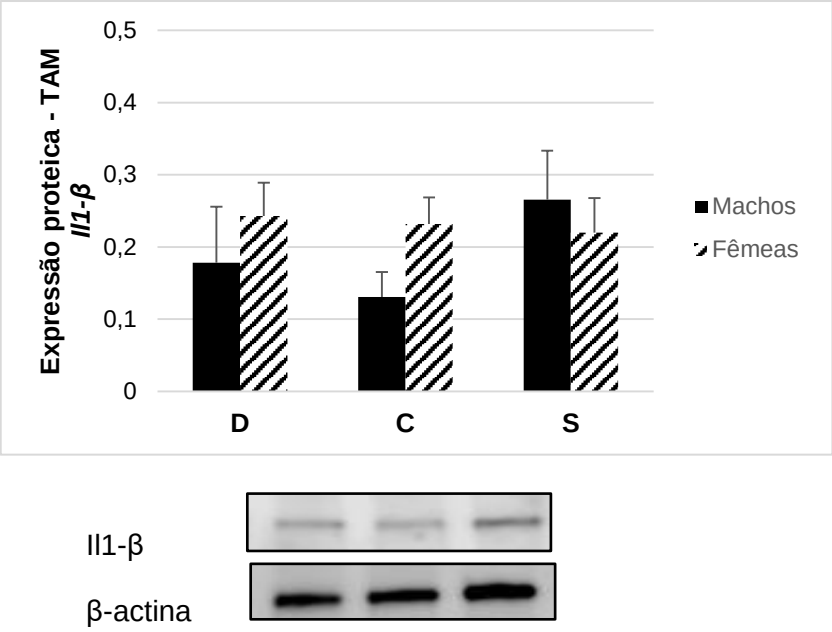
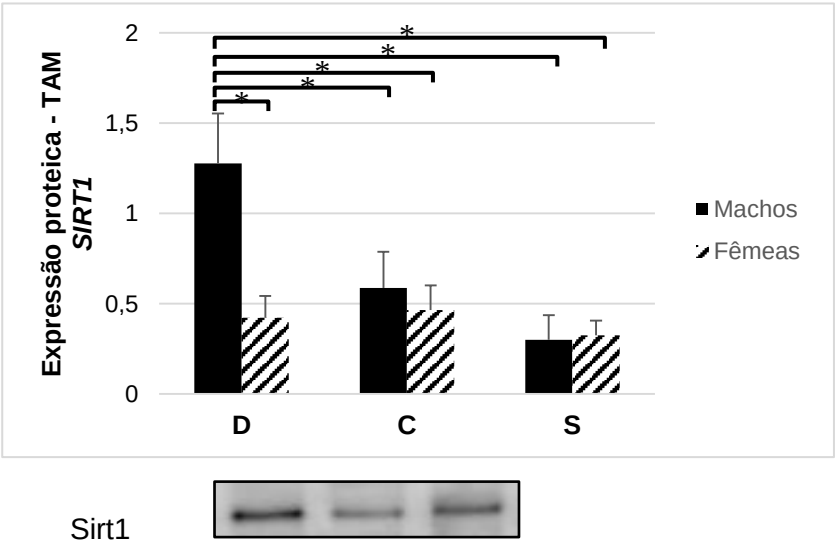


Gráfico 53 – Expressão proteica de Il1-β no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

A expressão proteica de Sirt1, entre os filhotes machos, foi significativamente (p= 0,00) maior no GD comparado aos GC e GS. Entre os filhotes fêmeas, não houve diferença significativa entre os grupos do estudo. Quando comparado machos e fêmeas, foi observado que os machos do GD apresentaram maior (p= 0,00) expressão proteica do que as fêmeas dos GC, GD e GS (Gráfico 54).



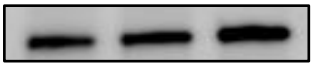
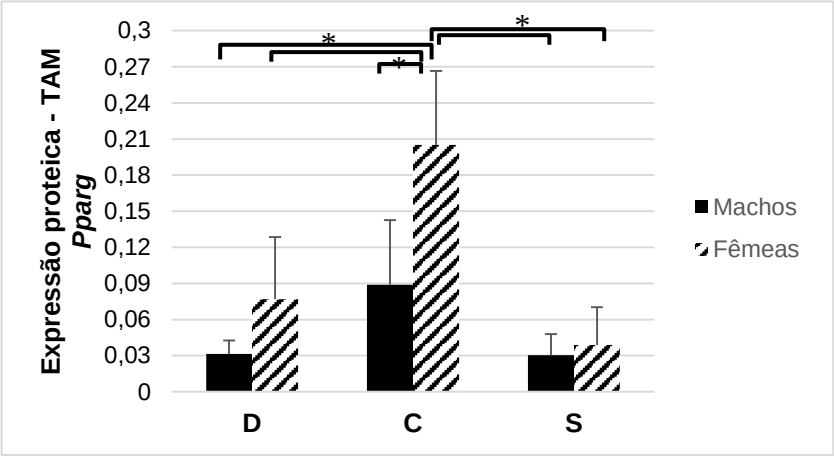
β-actina 

Gráfico 54 – Expressão proteica de Sirt1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão proteica de Pparg, entre os filhotes machos, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Entre as fêmeas, foi observado que as fêmeas dos GD e GS apresentaram menor (p= 0,00) expressão proteica comparadas as do GC. Quando comparado machos e fêmeas foi observado que os machos dos GC, GD e GS foram menos (p= 0,00) expressos do que as fêmeas do GC (Gráfico 55).



Pparg

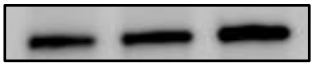
β-actina 

Gráfico 55 – Expressão proteica de Pparg no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico. *p= 0,00.

A expressão proteica de Foxo1 não apresentou diferença estatística significativa entre os filhotes machos e fêmeas, e quando machos e fêmeas foram comparados (Gráfico 56).

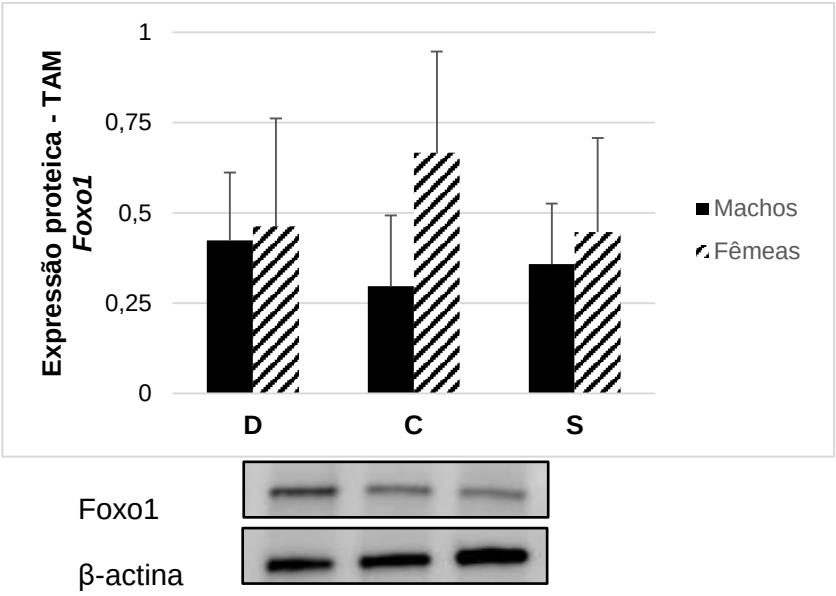


Gráfico 56 – Expressão proteica de Foxo1 no TAM dos filhotes machos e fêmeas dos três grupos de tratamento: deficiente (D), controle (C) e suplementado (S) em ácido fólico.

RESUMO DOS RESULTADOS

Para facilitar e ficar mais compreensivo os resultados, realizou-se resumos dos resultados de metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica, dos machos e fêmeas, e entre os gêneros, como mostrado a seguir.

METILAÇÃO DO DNA – Ilhas juntas

Machos e Fêmeas

TECIDOS	**FÍGADO**		**TAB**		**TAM**	
GENES	**Machos**	**Fêmeas**	**Machos**	**Fêmeas**	**Machos**	**Fêmeas**
Foxo1	Não houve ≠	Não houve ≠	S < C e D	S < C	Não houve ≠	Não houve ≠
Pparg	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠	D < C	Não houve ≠	Não houve ≠

Quadro 4 – Resumo dos resultados de metilação do DNA
Legenda:
Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
C: grupo controle
D: grupo deficiente
S: grupo suplementado

Análise entre machos e fêmeas

GENES	FÍGADO	TAB	TAM
	Machos e Fêmeas	Machos e Fêmeas	Machos e Fêmeas
Foxo1	Não houve ≠	MS < FC	Não houve ≠
Pparg	Não houve ≠	MS < FC	MS < FC

Quadro 5 – Resumo dos resultados de metilação do DNA. Análise entre machos e fêmeas

Legenda:
Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
FC: Filhotes fêmeas do grupo controle
FD: Filhotes fêmeas do grupo deficiente
FS: Filhotes fêmeas do grupo suplementado
MC: Filhotes machos do grupo controle
MD: Filhotes machos do grupo deficiente
MS: Filhotes machos do grupo suplementado

EXPRESSÃO GÊNICA

Machos e Fêmeas

TECIDOS	FÍGADO		TAB		TAM	
GENES	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Il6	Não houve ≠	Não houve ≠	S > C e D	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠
Tnf-α	S > C e D	D e S > C	Não houve ≠	D e S > C	Não houve ≠	Não houve ≠
Il1-β	D > S	Não houve ≠	D > S	S > C	S > C e D	D > C
Sirt1	Não houve ≠	S > C e D	Não houve ≠	S > D D < C	D > C e S	Não houve ≠
Pparg	S > C e D	S > C e D D < C	Não houve ≠	D < C	Não houve ≠	S e D < C
Foxo1	Não houve ≠	Não houve ≠	S e D > C	S > D	Não houve ≠	Não houve ≠

Quadro 6 – Resumo dos resultados de expressão gênica

Legenda:
Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
C: grupo controle
D: grupo deficiente
S: grupo suplementado

Análise entre machos e fêmeas

GENES	FÍGADO	TAB	TAM
	Machos e Fêmeas	Machos e Fêmeas	Machos e Fêmeas
Il6	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠
Tnf-α	FD e FS > MC e MD MS > FC	FD e FS > MC/ MD/ MS	Não houve ≠

Il1-β	FD e FS > MS	FS > MC e MS FD > MS	FS e FD > MC e MD
Sirt1	FS > MC/ MD/ MS	Não houve ≠	MD > FC/ FD/ FS
Pparg	FS > MC e MD MS > FC e FD	FD < MC	FD < MC
Foxo1	Não houve ≠	MD e MS > FD e FC	Não houve ≠

Quadro 7 – Resumo dos resultados de expressão gênica. Análise entre machos e fêmeas

Legenda:

Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
FC: Filhotes fêmeas do grupo controle
FD: Filhotes fêmeas do grupo deficiente
FS: Filhotes fêmeas do grupo suplementado
MC: Filhotes machos do grupo controle
MD: Filhotes machos do grupo deficiente
MS: Filhotes machos do grupo suplementado

EXPRESSÃO PROTEICA

Machos e Fêmeas

TECIDOS	**FÍGADO**		**TAB**		**TAM**	
GENES	**Machos**	**Fêmeas**	**Machos**	**Fêmeas**	**Machos**	**Fêmeas**
Il6	Não houve ≠	Não houve ≠	S > D	S < D e C	Não houve ≠	Não houve ≠
Tnf-α	S > C e D	S > C D > S e C	Não houve ≠	S > C	Não houve ≠	Não houve ≠
Il1-β	D > C e S	Não houve ≠	D > S	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠
Sirt1	Não houve ≠	S > C	Não houve ≠	Não houve ≠	D > C e S	Não houve ≠
Pparg	S e D > C	S e D > C S > D	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠	D e S < C
Foxo1	S < D e C	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠	Não houve ≠

Quadro 8 – Resumo dos resultados de expressão proteica

Legenda:

Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
C: grupo controle
D: grupo deficiente
S: grupo suplementado

Análise entre machos e fêmeas

GENES	**FÍGADO**	**TAB**	**TAM**
	Machos e Fêmeas	**Machos e Fêmeas**	**Machos e Fêmeas**
Il6	Não houve ≠	MS > FS	Não houve ≠
Tnf-α	FD > MC e MD FS > MC	Não houve ≠	Não houve ≠

	MS > FC e FS		
Il1-β	MD > FC/ FD/ FS	MD > FC e FS	Não houve ≠
Sirt1	Não houve ≠	Não houve ≠	MD > FC/ FD/ FS
Pparg	MS e MD > FC MS > FD FS > MC MS > FS	FD e FS > MC/ MD/ MS MD e MS < FC	MD/ MC/ MS < FC
Foxo1	FD < MC	Não houve ≠	Não houve ≠

Quadro 9 – Resumo dos resultados de expressão proteica. Análise entre machos e fêmeas

Legenda:

Não houve ≠: não houve diferença estatística significativa
FC: Filhotes fêmeas do grupo controle
FD: Filhotes fêmeas do grupo deficiente
FS: Filhotes fêmeas do grupo suplementado
MC: Filhotes machos do grupo controle
MD: Filhotes machos do grupo deficiente
MS: Filhotes machos do grupo suplementado

6 DISCUSSÃO

O atual estudo mostrou que os resultados de peso corporal, consumo alimentar, metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica obtidos, foram alterados quando expostos as diferentes concentrações de ácido fólico da dieta, e diferiram em seus efeitos na inflamação e no metabolismo energético, nos tecidos propostos e no gênero dos animais.

Em referência ao peso corpóreo e consumo alimentar dos filhotes do presente estudo, foi observado que os machos que se alimentaram de dieta deficiente e as fêmeas que se alimentaram de dieta suplementada com ácido fólico, comeram e pesaram mais do que os seus respectivos grupos controle. Esses resultados, referente aos filhotes machos, corroboram, em parte, com os resultados do trabalho de Cho et al. [34] visto que, filhotes machos que mantiveram o consumo da mesma dieta (suplementada com ácido fólico) que suas respectivas mães, mostraram redução de 7% da ingestão alimentar e 9% do peso corpóreo em relação ao grupo controle, na vigésima nona semana pós desmame.

Outro trabalho que também concorda com nosso achado foi o de Jadavji et al. [57], que também mostraram que os filhotes machos de mães alimentadas com dieta deficiente em ácido fólico (0,3 mg/kg) consumiram e pesaram significativamente a mais que aqueles de mães alimentadas com dieta controle (2 mg de ácido fólico/kg).

Já Cho et al. [58] mostraram que filhotes machos de mães que receberam dieta contendo dez vezes mais a quantidade do mix multivitamínico (contendo ácido fólico) durante a gestação e desmamados com dieta rica em gordura, apresentaram redução de 5% da ingestão da dieta e redução de 4% do peso corpóreo comparados aos filhotes de mães que consumiram a dieta contendo dez vezes mais a quantidade do mix multivitamínico (sem ácido fólico) e também desmamados com dieta rica em gordura. Sugerindo que à suplementação de ácido fólico durante gestação na prole apresenta efeito protetor do fenótipo obesogênico, mostrando dessa forma a plasticidade epigenética do hipotálamo em relação à resposta da dieta suplementada com ácido fólico [58].

No entanto, observou-se que o peso corpóreo e consumo alimentar, entre os filhotes fêmeas, não apresentou este efeito protetor do ácido fólico, visto que

os filhotes que receberam dieta suplementada em ácido fólico na gestação e no pós desmame apresentaram maior consumo e maior ganho de peso. Todavia, o estudo de Penailillo et al. [59] mostrou que filhotes fêmeas de mães alimentadas com dieta suplementada com ácido fólico (8mg/kg) tiveram peso corpóreo ao nascer de 6% a mais do que aquelas que receberam dieta controle.

É de grande relevância notar que o fenótipo da prole não depende apenas da dieta materna durante o período gestacional, mas também no pós-desmame, através da própria dieta do filhote. Todavia, ainda não está claro o motivo da diferença entre os sexos. Os resultados de metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica do atual estudo também apresentaram algumas respostas divergentes em relação ao gênero dos filhotes.

Os padrões de metilação são estabelecidos durante a embriogêneses, logo após a implantação, e desta forma, neste período, o feto está susceptível a passar por modificações neste processo através da dieta materna durante a gestação [60]. O ácido fólico fornece grupos metil para metilação do DNA e de outras moléculas, e assim, a suplementação desta vitamina pode influenciar na metilação de regiões promotoras de determinados genes, levando ao aumento da expressão gênica, se a região não estiver metilada, ocasionando, consequentemente, o aumento da expressão proteica; da mesma forma, se o gene estiver metilado, leva a diminuição da expressão gênica e consequentemente a diminuição da expressão proteica [10,61,62].

Em relação aos dois genes, Foxo1 e Pparg analisados e que foram realizados os mecanismos completos de metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica, foram obtidos resultados satisfatórios. No TAB, Foxo1 regula a homeostase de nutrientes e energia, já no TAM tem a função de promover o gasto de energia, aumentando a expressão de genes envolvidos na termogênese, como Pparg e Ucp1 [40,63]. Em nosso estudo, observou-se que no TAB Foxo1 se apresentou da mesma maneira tanto entre as fêmeas, como entre os machos, o qual houve uma menor metilação nos filhotes que receberam dieta suplementada com ácido fólico comparado com os que receberam dieta controle, e em resposta, maior expressão gênica. Já no TAM e no fígado, no atual trabalho, não se obteve diferenças estatísticas significativas entre machos e fêmeas para esse gene, exceto para as análises de expressão proteica, a qual houve menor expressão nos machos que receberam dieta suplementada

comparado com os que receberam dieta deficiente e controle.

O Pparg é um gene altamente expresso no tecido adiposo, envolvido principalmente na síntese lipídica [64]. No entanto, também é amplamente expresso em muitos outros tecidos, incluindo fígado [39]. Em nosso estudo, no fígado, o gene Pparg não apresentou diferença estatística significativa na metilação do DNA, no entanto, houve maior expressão gênica nos filhotes (machos e fêmeas) que receberam dieta suplementada, e corroborando com esse resultado, apresentaram também aumento na expressão proteica comparado ao grupo controle. Ainda, entre as fêmeas, a expressão gênica foi maior naquelas que receberam dieta suplementada com ácido fólico comparada com as que receberam dieta controle e deficiente e, da mesma forma em resposta a expressão proteica. Mesmo não apresentando diferença estatística significativa na metilação do DNA, é muito provável que esse gene, para o grupo suplementado, foi menos metilado no fígado, em decorrência dos resultados de maior expressão gênica e proteica. Como apresentado no estudo de Sie *et al.* [50] foi observado que filhotes de ratas que foram expostas a dieta suplementada com ácido fólico durante a gestação e lactação apresentaram diminuição significativa na metilação global e específica dos genes *Pparg, ER-α, p53* e *Apc* no fígado.

O gene Pparg no fígado, após ser ligado por ligantes endógenos ou sintéticos, heterodimeriza com outro receptor nuclear, o receptor X retinóide alfa (RXRα). O heterodímero se liga ao elemento de resposta PPAR (PPRE) nas regiões promotoras dos genes alvo e induz ou reprime a transcrição gênica, dependendo da intervenção, como mostrado em nosso estudo. A ativação total de *Pparg* pode estimular a lipogênese hepática. Por outro lado, a ativação parcial do *Pparg* ou, mesmo, sua expressão reduzida, está ligada à lipogênese diminuída. *Pparg* diminuída, diminui SREBP-1c e, consequentemente diminui a lipogêneses [39,65]. Nesse sentido, foi observado que os filhotes que receberam a dieta suplementada se beneficiaram em relação a esse mecanismo.

No entanto, a expressão gênica de *Pparg* nos filhotes pode se comportar de maneiras distintas, dependendo da dieta materna nos períodos de gestação e lactação, e do tecido em análise. Em um estudo, foi observado que a suplementação materna com ácido fólico resultou em alteração significativa na expressão gênica de *Pparg* também no fígado da prole, todavia, esta mudança

não ocorreu no cérebro, rim e colo [66]. Em nosso estudo, foi observado que no TAM, a resposta de Pparg também foi diferente da que foi encontrada do fígado, visto que, entre os filhotes fêmeas a expressão gênica e expressão proteica foram menores naquelas que receberam dieta suplementada e deficiente comparado ao controle. Ainda, no TAB e TAM, esse gene não apresentou diferença estatística significativa em nenhum mecanismo de metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica entre as intervenções dietéticas nos filhotes machos. No estudo de Penailillo *et al*. [59] também encontraram diferenças com relação ao gênero da prole já na placenta, no qual foi observado que a suplementação de ácido fólico (8 mg/ kg), a mesma quantidade utilizada em nosso estudo, durante a gravidez, foi capaz de modificar a expressão e a metilação do gene 11β-hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11β-HSD2) na placenta, de maneira dependente do sexo, sugerindo que dietas maternas suplementadas com ácido fólico, podem induzir respostas precoces específicas do sexo.

Ainda em relação aos genes envolvidos com o metabolismo energético, observou-se em nosso estudo que, entre as fêmeas, a dieta suplementada com ácido fólico foi capaz de aumentar significativamente a expressão do gene Sirt1, comparada as que receberam dieta controle e deficiente, no fígado e no TAB, e esse mesmo resultado também corrobora com as análises de expressão proteica. A SIRT1 desempenha um papel crítico na saúde metabólica por desacetilar muitas proteínas alvo e na regulação da transcrição de genes em vários tecidos, incluindo fígado, músculo, tecido adiposo, coração e endotélio. O fígado é um dos principais órgãos no qual a SIRT1 está envolvida na regulação do metabolismo de glicose e lipídios [67,68]. No TAB, o aumento da atividade da SIRT1 é capaz de reduzir a diferenciação dos adipócitos [42,67].

No entanto, entre os filhotes machos, não foi observado diferença significativa na expressão gênica, nem proteica de Sirt1 no fígado e no TAB. Em um experimento animal, com diferente intervenção nutricional do nosso estudo, o qual analisaram filhotes machos de ratas que foram submetidas a dieta com restrição energética durante o período gestacional, foi observado menor expressão gênica de SIRT1, em amostras de TAB e fígado, quando comparados com o grupo controle. Sugerindo que há uma predisposição desses animais ao desenvolvimento de obesidade na vida adulta [46].

Já no TAM, foi observado que as fêmeas não apresentaram diferença estatística significativa para esse gene, na expressão gênica e expressão proteica. Entretanto, entre os filhotes machos, a expressão gênica e proteica de Sirt1, para esse tecido, foi significativamente maior naqueles filhotes que receberam dieta deficiente do que os que receberam dieta controle e suplementada. Vale ressaltar que a expressão aumentada do gene *Sirt1* é descrita como benéfica, pois tem a função de ativar as atividades de vias metabólicas e aumentar a longevidade [45].

Com relação aos genes envolvidos na inflamação do atual estudo, vale destacar que o TAB produz de 100 a 1.000 vezes mais citocinas pró-inflamatória, como Il6, Tnf-α e Il1-β quando comparado com o fígado, em resposta a algumas alterações metabólicas, como a obesidade. Já o fígado é um dos principais alvo de mediadores derivados do tecido adiposo, e este desequilíbrio metabólico resulta em dano hepático [29,69]. Além disso, essas três citocinas pró-inflamatórias, participam de complexos mecanismos, os quais regulam negativamente a sinalização da insulina no próprio tecido adiposo, além de músculo e fígado [28].

Em nosso estudo, foi observado que no TAB, a expressão gênica e proteica de Il6 apresentaram respostas divergentes entre machos e fêmeas. Nos machos, a dieta suplementada com ácido fólico foi capaz de ocasionar maior expressão gênica e proteica de Il6 comparado aos que receberam dieta controle e deficiente. Enquanto que as fêmeas que receberam dieta deficiente foram mais expressas do que as que receberam dieta suplementada. Nesse sentido, como observado em um estudo *in vitro,* a deficiência de folato pôde ocasionar aumento na resposta inflamatória por macrófagos, visto que houve um aumento de 2 a 3 vezes na expressão de RNAm e de proteínas dos mediadores inflamatórios IL-1β, TNF-α e IL-6, sugerindo um aumento do risco do desenvolvimento de doenças vasculares [35].

No fígado, entre os filhotes machos, a expressão gênica de Tnf-α foi significativamente maior nos que receberam dieta suplementada com ácido fólico comparado com os que receberam dieta controle e deficiente, corroborando igualmente com as análises de expressão proteica. Entre os filhotes fêmeas, a expressão gênica de Tnf- α foi maior naquelas que receberam dieta deficiente e suplementada do que as que receberam dieta controle.

Entretanto, a expressão proteica foi maior naquelas que receberam dieta suplementada comparadas as que receberam dieta controle, e as que receberam dieta deficiente foi maior do que as que receberam dieta suplementada e controle. Com similaridade parcial, no estudo de Kumar *et al.* [36] com a prole de ratas alimentadas com dieta deficiente em vitamina B12 e folato, foi observado que os níveis de *Tnf-α* e *Il-6* foram significativamente aumentados em comparação aos que receberam dieta controle. Todavia, em nosso estudo, esse aumento da expressão de *Tnf-α,* além de ser observado na dieta deficiente em ácido fólico, também ocorreu nos filhotes fêmeas que receberam dieta suplementada.

No TAB, a expressão de Tnf-α entre os filhotes machos, não apresentou diferença estatística significativa. No entanto, entre as fêmeas, esse resultado foi similar ao encontrado no fígado, onde a expressão gênica foi maior nas que receberam dieta suplementada e deficiente comparadas as que receberam dieta controle, o que corrobora com os dados de expressão proteica, a qual apresentou maior expressão nas que receberam dieta suplementada do que as que receberam dieta controle.

Entre machos e fêmeas, a expressão gênica e proteica de Il6 no fígado e TAM, e a expressão gênica e proteica de Tnf-α no TAM, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos do estudo.

Com relação a expressão gênica e proteica de Il1-β no fígado e no TAB, foi observada maior expressão nos filhotes machos que receberam deita deficiente comparado com os que receberam deita suplementada. Entretanto, entre as fêmeas, no fígado, essa expressão não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Enquanto que no TAB a expressão de Il1-β foi maior nas que receberam dieta suplementada do que nas que receberam dieta controle. No TAM, entre os filhotes machos, observou-se que os que receberam dieta suplementada com ácido fólico apresentou maior expressão gênica de Il1-β do que os que receberam dieta controle e deficiente. Todavia, entre as fêmeas, essa expressão foi significativamente maior nas que receberam dieta deficiente comparado com as que receberam dieta controle. Assim, em um estudo, porém em células de linhagem monocítica humana (THP-1), mostrou-se que essas células tratadas com ácido fólico e expostas a hipóxia para causar inflamação,

ocasionou diminuição dos níveis de proteína e expressão de IL-1β e Tnf-α, destacando o efeito anti-inflamatório deste micronutriente nessas condições [70].

Na literatura se destaca o efeito benéfico da suplementação de ácido fólico, como encontrado no atual estudo para determinados genes e tecidos. No entanto, em um estudo de revisão foi mostrado que níveis elevados de vitaminas envolvidas no metabolismo do carbono 1, como a vitamina B12 e ácido fólico, tem sido correlacionada com disfunção imunológica, câncer e aumento da mortalidade [71]. Nesse sentido, há a necessidade de mais estudos para a melhor compreensão da quantidade ofertada, com o intuito de fornecer saúde para prole.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que diferentes concentrações de ácido fólico na dieta materna, bem como durante a lactação e pós-desmame, apresentam respostas divergentes entres os filhotes machos e fêmeas, capazes de modular o peso corpóreo, consumo alimentar, metilação do DNA, expressão gênica e expressão proteica tanto dos genes envolvidos na inflamação, quanto dos envolvidos no metabolismo energético na prole. De modo geral, a dieta suplementada com ácido fólico foi capaz de modular os genes, dependendo do sexo e do tecido analisado, de forma benéfica, visto que esses genes fazem parte de complexos mecanismos capazes de prevenir diversas patologias, como a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e doenças hepáticas. No entanto, há a necessidade de mais estudos para fornecer melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à reprogramação epigenética fetal dos genes da inflamação e do metabolismo energético, bem como para o adequado fornecimento de ácido fólico durante o período de desenvolvimento embrionário/fetal e no pós-desmame.

8 REFERÊNCIAS

[1] DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, "epigenetic"? **Genetics,** v. 199, n. 4, p. 887-96, Apr 2015. ISSN 0016-6731.

[2] BERNAL, A. J.; JIRTLE, R. L. Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol,** v. 88, n. 10, p. 938-44, Oct 2010. ISSN 1542-0752.

[3] BUTLER M. Imprinting disorders in humans: a review. Curr Opin Pediatr, v. 6, n. 32, p. 719-729, Dec 2020. doi: 10.1097/MOP.0000000000000965.

[4] DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **Int J Obes (Lond),** v. 39, n. 4, p. 633-41, Apr 2015. ISSN 0307-0565. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2015.13 >.

[5] MESSERSCHMIDT, D. M.; KNOWLES, B. B.; SOLTER, D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. **Genes Dev,** v. 28, n. 8, p. 812-28, Apr 15 2014. ISSN 0890-9369. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1101/gad.234294.113 >.

[6] XU R, LI C, LIU X, GAO S. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. Protein Cell, v.1, n. 12, p. 7-28, Jul 2020. doi: 10.1007/s13238-020-00757-z.

[7] GERAGHTY, A. A. et al. Nutrition During Pregnancy Impacts Offspring's Epigenetic Status-Evidence from Human and Animal Studies. **Nutr Metab Insights,** v. 8, n. Suppl 1, p. 41-7, 2015. ISSN 1178-6388.

[8] VENÂNCIO, L. S.; BURINI, R. C.; YOSHIDA, W. B. Tratamento dietético da hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **J. vasc. bras.**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 28-41, 2010 .

[9] TYAGI SC, STANISIC D, SINGH M. Epigenetic memory: gene writer, eraser and homocysteine. **Mol Cell Biochem**, v. 2, n. 476, p. 507-512, Feb 2021. doi: 10.1007/s11010-020-03895-4.

[10] XU, J.; SINCLAIR, K. D. One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. **Reprod Fertil Dev**, Feb 25 2015. ISSN 1031-3613.

[11] KEMSE, N. G.; KALE, A. A.; JOSHI, S. R. A combined supplementation of omega-3 fatty acids and micronutrients (folic acid, vitamin B12) reduces oxidative stress markers in a rat model of pregnancy induced hypertension. **PLoS One,** v. 9, n. 11, p. e111902, 2014. ISSN 1932-6203.

[12] KOTSOPOULOS, J.; SOHN, K. J.; KIM, Y. I. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. **J Nutr,** v. 138, n. 4, p. 703-9, Apr 2008. ISSN 0022-3166. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

[13] MALONEY, C. A. et al. A methyl-deficient diet fed to rat dams during the peri-conception period programs glucose homeostasis in adult male but not female offspring. **J Nutr,** v. 141, n. 1, p. 95-100, Jan 2011. ISSN 0022-3166. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.119453 >.

[14] CHEN M, ROSE CE, QI YP, WILLIAMS JL, YEUNG LF. Defining the plasma folate concentration associated with the red blood cell folate concentration threshold for optimal neural tube defects prevention: a population-based, randomized trial of folic acid supplementation. Am J Clin Nutr, v. 5, p. 1452-1461, 2019. doi: 10.1093/ajcn/nqz027.

[15] BARUA, S.; KUIZON, S.; JUNAID, M. A. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease. **J Biomed Sci,** v. 21, p. 77, 2014. ISSN 1021-7770. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/s12929-014-0077-z >.

[16] KIM, K. C.; FRISO, S.; CHOI, S. W. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **J Nutr Biochem,** v. 20, n. 12, p. 917-26, Dec 2009. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.008 >.

[17] LYON P, STRIPPOLI V, FANG B, CIMMINO L. B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p.2867, Sep 2020. doi: 10.3390/nu12092867.

[18] ABLES, G. P.; HENS, J. R.; NICHENAMETLA, S. N. Methionine restriction beyond life-span extension. **Ann N Y Acad Sci**, Feb 24 2016. ISSN 0077-8923.

[19] CAI S, QUAN S, YANG G, YE Q, CHEN M, YU H, et al. One Carbon Metabolism and Mammalian Pregnancy Outcomes. **Mol Nutr Food Res**, v. 2, n. 65:e2000734, Jan 2021. doi: 10.1002/mnfr.202000734.

[20] PADMANABHAN, N. et al. Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects On Development. **Cell,** v. 155, n. 1, Sep 26 2013. ISSN 0092-8674 (Print)1097-4172 (Electronic). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.002 >.

[21] ZHAO, M. et al. Folic acid protects against lipopolysaccharide-induced preterm delivery and intrauterine growth restriction through its anti-inflammatory effect in mice. **PLoS One,** v. 8, n. 12, p. e82713, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082713 >.

[22] CRIDER, K. S. et al. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role12. In: (Ed.). **Adv Nutr**, v.3, 2012. p.21-38. ISBN 2161-8313 (Print)2156-5376 (Electronic).

[23] CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Consumption of distinct dietary lipids during early pregnancy differentially modulates the expression of microRNAs in

mothers and offspring. **PLoS One,** v. 10, n. 2, p. e0117858, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117858 >.

[24] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Obesity, 2016. Disponível em: < http://www.who.int/topics/obesity/en/> Acesso em: 15 fev. 2016.

[25] ESSANDOH, K. et al. Mirna-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. **Shock**, Mar 3 2016. ISSN 1073-2322. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1097/shk.0000000000000604 >.

[26] ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 105, n. 2, p. 141-50, Aug 2014. ISSN 0168-8227. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006 >.

[27] KAWAI T, AUTIERI MV, SCALIA R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 3, n. 320, p. C375-C391, Mar 2021. doi: 10.1152/ajpcell.00379.2020.

[28] ESSER, N.; PAQUOT, N.; SCHEEN, A. J. Inflammatory markers and cardiometabolic diseases. **Acta Clin Belg,** v. 70, n. 3, p. 193-9, Jun 2015. ISSN 1784-3286

[29] GERNER, R. R. et al. Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 91, n. 11, p. 867-72, Nov 2013. ISSN 0008-4212. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2013-0050 >.

[30] INGVORSEN, C. et al. Effects of pregnancy on obesity-induced inflammation in a mouse model of fetal programming. **Int J Obes (Lond),** v. 38, n. 10, p. 1282-9, Oct 2014. ISSN 0307-0565.

[31] CANNON, M. V. et al. Maternal nutrition induces pervasive gene expression changes but no detectable DNA methylation differences in the liver of adult offspring. **PLoS One,** v. 9, n. 3, p. e90335, 2014. ISSN 1932-6203.

[32] BOLLATI, V. et al. Nutrients intake is associated with DNA methylation of candidate inflammatory genes in a population of obese subjects. **Nutrients,** v. 6, n. 10, p. 4625-39, Oct 2014. ISSN 2072-6643. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/nu6104625 >.

[33] PONZIANI, F. R. et al. Folate in gastrointestinal health and disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci,** v. 16, n. 3, p. 376-85, Mar 2012. ISSN 1128-3602 (Print)
1128-3602.

[34] CHO, C. E. et al. High folate gestational and post-weaning diets alter hypothalamic feeding pathways by DNA methylation in Wistar rat offspring.

Epigenetics, v. 8, n. 7, p. 710-9, Jul 2013. ISSN 1559-2294. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4161/epi.24948 >.

[35] KOLB, A. F.; PETRIE, L. Folate deficiency enhances the inflammatory response of macrophages. **Mol Immunol,** v. 54, n. 2, p. 164-72, Jun 2013. ISSN 0161-5890. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.11.012 >.

[36] KUMAR, K. A. et al. Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. **J Nutr Biochem,** v. 24, n. 1, p. 25-31, Jan 2013. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.01.004 >.

[37] HUANG, X. et al. Folic Acid Represses Hypoxia-Induced Inflammation in THP-1 Cells through Inhibition of the PI3K/Akt/HIF-1alpha Pathway. **PLoS One,** v. 11, n. 3, p. e0151553, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151553 >.

[38] RYALL, J. G. The role of sirtuins in the regulation of metabolic homeostasis in skeletal muscle. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care,** v. 15, n. 6, p. 561-6, Nov 2012. ISSN 1363-1950. Available at: < http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283590914 >.

[39] HAN, L. et al. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-beta/delta and PPAR-gamma. **Future Cardiol,** v. 13, n. 3, p. 279-296, May 2017. ISSN 1479-6678. Available at: < http://dx.doi.org/10.2217/fca-2017-0019 >.

[40] KOUSTENI, S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. **Bone,** v. 50, n. 2, p. 437-43, Feb 2012. ISSN 1873-2763. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.034 >.

[41] LI, X. SIRT1 and energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),** v. 45, n. 1, p. 51-60, Jan 2013. ISSN 1672-9145. Available at: < http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gms108 >.

[42] LIU, Y. et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. **Nature,** v. 456, n. 7219, p. 269-73, Nov 13 2008. ISSN 0028-0836. Available at: < http://dx.doi.org/10.1038/nature07349 >.

[43] DOMINY, J. E., JR. et al. Nutrient-dependent regulation of PGC-1alpha's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. **Biochim Biophys Acta,** v. 1804, n. 8, p. 1676-83, Aug 2010. ISSN 0006-3002. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.023>.

[44] CHANG, H and GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in Metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 3, p. 138-145, March 2014. doi:10.1016/j.tem.2013.12.001. Available at: < http://sciencedirect.com/science/journal/10432760>.

[45] PFLUGER, P. T. et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 28, p. 9793-8, Jul 15 2008. ISSN 0027-8424. Available at: < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802917105 >.

[46] PALOU, M. et al. Metabolic programming of sirtuin 1 (SIRT1) expression by moderate energy restriction during gestation in rats may be related to obesity susceptibility in later life. **Br J Nutr,** v. 109, n. 4, p. 757-64, Feb 28 2013. ISSN 0007-1145. Available at: < http://dx.doi.org/10.1017/s0007114512001961 >.

[47] GUEANT, J. L. et al. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? **Trends Endocrinol Metab,** v. 24, n. 6, p. 279-89, Jun 2013. ISSN 1043-2760. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.010 >.

[48] MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacol Rev,** v. 58, n. 4, p. 726-41, Dec 2006. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Available at: < http://dx.doi.org/10.1124/pr.58.4.5 >.

[49] LY, A. et al. Maternal folic acid supplementation modulates DNA methylation and gene expression in the rat offspring in a gestation period-dependent and organ-specific manner. **J Nutr Biochem,** v. 33, p. 103-10, Jul 2016. ISSN 0955-2863. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.018 >.

[50] SIE, K. K. et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on global and gene-specific DNA methylation in the liver of the rat offspring. **Mol Nutr Food Res,** v. 57, n. 4, p. 677-85, Apr 2013. ISSN 1613-4125. Available at: < http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200186 >.

[51] MEHER, A.; JOSHI, A.; JOSHI, S. Differential regulation of hepatic transcription factors in the Wistar rat offspring born to dams fed folic acid, vitamin B12 deficient diets and supplemented with omega-3 fatty acids. **PLoS One,** v. 9, n. 2, p. e90209, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090209 >.

[52] LOANNILLI L, CICCARONE F, CIRIOLO MR. Adipose Tissue and FoxO1: Bridging Physiology and Mechanisms. **Cells**, v. 4, n. 9, p. 849, Mar 2020. doi: 10.3390/cells9040849.

[53] NAKAE, J. et al. Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. **Diabetes,** v. 57, n. 3, p. 563-76, Mar 2008. ISSN 0012-1797. Available at: < http://dx.doi.org/10.2337/db07-0698 >.

[54] MUTSKOV, V. et al. Early-life physical activity reverses metabolic and Foxo1 epigenetic misregulation induced by gestational sleep disturbance. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 308, n. 5, p. R419-30, Mar 1 2015. ISSN 0363-6119. Available at: < http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00426.2014 >.

[55] REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, Springfield, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

[56] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

[57] JADAVJI, N. M. et al. MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring. **Neuroscience,** v. 300, p. 1-9, Aug 6 2015.

[58] CHO, C. E. et al. Methyl vitamins contribute to obesogenic effects of a high multivitamin gestational diet and epigenetic alterations in hypothalamic feeding pathways in Wistar rat offspring. **Mol Nutr Food Res,** v. 59, n. 3, p. 476-89, Mar 2015.

[59] PENAILILLO, R. et al. Folic acid supplementation during pregnancy induces sex-specific changes in methylation and expression of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rats. **PLoS One,** v. 10, n. 3, p. e0121098, 2015.

[60] DAS J, MAITRA A. Maternal DNA Methylation During Pregnancy: a Review. **Reprod Sci**, Online ahead of print. Jan 2021. doi: 10.1007/s43032-020-00456-4.

[61] FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science,** v. 330, n. 6004, p. 622-7, Oct 29 2010.

[62] SMITH, C. J.; RYCKMAN, K. K. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. **Diabetes Metab Syndr Obes,** v. 8, p. 295-302, 2015.

[63] BENCHOULA K, ARYA A, PARHAR IS, HWA WE. FoxO1 signaling as a therapeutic target for type 2 diabetes and obesity. **Eur J Pharmacol**, 891:173758, Jan 2021. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173758.

[64] CHRISTOFIDES A, KONSTANTINIDOU E, JANI C, BOUSSIOTIS. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. **Metabolism**, 114:154338, Jan 2021. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154338.

[65] LIU Y, WANG J, LUO S, ZHAN Y, LU Q. The roles of PPARγ and its agonists in autoimmune diseases: A comprehensive review. **J Autoimmun**, 113:102510, Sep 2020. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102510.
[66] LY, A. et al. Maternal folic acid supplementation modulates DNA methylation and gene expression in the rat offspring in a gestation period-dependent and organ-specific manner. **J Nutr Biochem,** v. 33, p. 103-10, Jul

2016. ISSN 0955-2863. Available at: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.03.018 >.

[67] CHANG, H and GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in Metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 3, p. 138-145, March 2014. doi:10.1016/j.tem.2013.12.001. Available at: < http://sciencedirect.com/science/journal/10432760>.

[68] REN R, WANG Z, WU M, WANG H. **Emerging Roles of SIRT1 in Alcoholic Liver Disease.** Int J Biol Sci, v. 16, n. 16, p. 3174-3183, Oct 2020. doi: 10.7150/ijbs.49535.

[69] RIVES C, FOUGERAT A, ELLERO-SIMATOS S, LOISEAU N, GUILLOU H, GAMET-PAYRASTRE L, WAHLI W. Oxidative Stress in NAFLD: Role of Nutrients and Food Contaminants. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1702, Dec 2020. doi: 10.3390/biom10121702.

[70] HUANG, X. et al. Folic Acid Represses Hypoxia-Induced Inflammation in THP-1 Cells through Inhibition of the PI3K/Akt/HIF-1alpha Pathway. **PLoS One,** v. 11, n. 3, p. e0151553, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151553 >.

[71] LYON P, STRIPPOLI V, FANG B, CIMMINO L. B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p.2867, Sep 2020. doi: 10.3390/nu12092867.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA FMRP-USP

FMRP

DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **028/2017** sobre o projeto intitulado *"Padrões de metilação e expressão de genes da inflamação e do metabolismo energético na prole de ratas submetidas à dieta suplementada com ácido fólico"*, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Helio Vannucchi,** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de outubro de 2018.

We declare that the Addendum to the Protocol ***n°* 028/2017**, entitled ***"Methylation patterns and expression of gene of inflammation and energetic metabolism in the offspring of rats submitted to folic acid-supplemented diet"*** is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *10/29/2018*.

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA – FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3901 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br