

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

Bruna Morais Faleiros de Paula

Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico

Ribeirão Preto
2016

Bruna Morais Faleiros de Paula

**Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas
deficiente e suplementada com ácido fólico**

Dissertação 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 mestre

Área de concentração: Investigação
Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Helio Vannucchi

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Paula, Bruna Moraes Faleiros
Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico, 2016.

72p.

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

1. Ácido Fólico. 2. Proopiomelanocortina. 3. Metilação. 4. Epigenética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Morais Faleiros de Paula

Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico

Dissertação 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 mestre.

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helio Vannucchi – Orientador

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva

Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – FMB/UNESP

Profa. Dra. Carla Barbosa Nonino

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, e em especial ao meu pai Paulo César (*In Memoriam*), 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 Memoriam*) 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.

Aos meus irmãos Breno e Brenda por todo afeto, companheirismo e cumplicidade que foram essenciais para a fase a qual passei.

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

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

Agradeço demasiadamente a minha amiga de trabalho Paula Lumy por todo aprendizado, paciência e carinho que teve comigo ao decorrer destes anos, que foram fundamentais tanto para meu crescimento pessoal como profissional.

Ao meu orientador Helio Vannucchi, por todos os ensinamentos que me proporcionou e por desde o início confiar e acreditar na minha capacidade de realizar o mestrado.

Aos profissionais de outros laboratórios, que tiveram participação nesta fase para que o trabalho se concretizasse da melhor forma, ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, por colocar à disposição seu Laboratório de Fisiologia, à Val e ao Rubinho (técnicos), Ricardo e Fernanda (pós-graduandos). À Lilian (técnica) do Laboratório Multidisciplinar.

À Prof. Dra. Selma Freire de Carvalho da Cunha e ao Prof. Julio Sérgio Marchini por todo conhecimento científico que me proporcionaram e pela oportunidade de ser aluna PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino).

Ao Prof. Dr. Joel Claudio Heimann da USP de São Paulo, à sua aluna de pós-doutorado Maria Angélica, e ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela disposição em nos ajudar.

Aos técnicos do Biotério da FMRP, Maurício, Roni e Adalberto.

Às minhas amigas e amigos Nathália, Fernanda, Lara, Samara, Jackeline, Sofia, Renata, Susana, Bruno, Camilinha, Jowanka, Heric, Carol, Marcela, Naty, Cici, Mônica, Sandra e Flávia 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 a bolsa de mestrado para a realização do mesmo.

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

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

De Paula, B. M. F. **Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.** 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A epigenética é uma subárea da Genética, na qual são estudados mecanismos que são essenciais para o adequado desenvolvimento dos mamíferos, sendo que, alterações neste estágio podem levar a vários distúrbios metabólicos, como a obesidade. Atualmente a obesidade é um grave problema de saúde pública mundial, tem origem multifatorial envolvendo tanto fatores ambientais quanto genéticos. Existem alguns genes que estão envolvidos com a obesidade, como por exemplo, o gene da pró-opiomelanocortina (*POMC*). O objetivo do presente projeto de pesquisa é investigar os padrões de expressão e metilação do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico. Os animais utilizados foram ratos Wistar. O estudo envolveu filhotes (n=24) machos e fêmeas que foram desmamados com a mesma dieta de suas respectivas mães, sendo três grupos de tratamento, o grupo controle (2,0 mg de ácido fólico/kg de ração), o grupo deficiente (0,5 mg de ácido fólico/kg de ração) e o grupo suplementado (8 mg de ácido fólico/kg de ração). Foram coletadas amostras do núcleo arqueado do hipotálamo, a partir das quais foram extraídos DNA, RNA e proteínas utilizando kits comerciais seguindo o protocolo do fabricante. Com o DNA foi realizada a análise do padrão de metilação. O mRNA foi utilizado para a análise da expressão gênica, por PCR em tempo real, pelo sistema TaqMan® (Life Technologies™). O estudo de proteômica foi realizado por Western blotting. De modo geral, observou-se que o peso corpóreo dos filhotes machos não apresentou diferença estatística entre os grupos. O consumo de ração do grupo deficiente em ácido fólico foi estatisticamente ($p = 0,03$) maior do que o grupo controle. Em relação aos filhotes fêmeas observou-se que o peso corpóreo do grupo suplementado foi estatisticamente ($p = 0,01$) maior do que o grupo controle, e referente ao consumo de ração, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento. As análises de peso cerebral, expressão gênica, metilação e expressão proteica de *Pomc* não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento de ambos os sexos. Conclui-se que a intervenção com dietas com diferentes concentrações de ácido fólico não ocasionou alterações significativas na prole, em relação ao estudo de proteômica e aos padrões de metilação e expressão do gene *Pomc*. Quanto ao peso corpóreo e consumo de ração dos animais mostrou-se que a suplementação

com ácido fólico durante a gestação e no pós desmame foi capaz de alterar estes dois parâmetros, com resposta divergente entre os machos e fêmeas na prole adulta.

Palavras-chave: Ácido Fólico. Proopiomelanocortina. Metilação. Epigenética.

ABSTRACT

De Paula, B. M. F. **Methylation and expression patterns of the *Pomc* gene in the offspring of rats subjected to deficient and supplemented with folic acid diets.** 2016. 72 f. Dissertation (Master Degree), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, Ribeirão Preto.

Epigenetic mechanisms are essential for proper development in mammals, and that changes at this stage may lead to various metabolic disorders such as obesity. Currently obesity is a serious problem of public health worldwide, has a multifactorial origin involving both environmental and genetic factors. There are some genes that are involved with obesity, such as the proopiomelanocortin gene (*POMC*). The aim of this research project is to investigate the expression and methylation patterns of the *Pomc* gene in the offspring of rats subjected to deficient and supplemented diets with folic acid. Animals used were Wistar rats. The study involved males and females pups (n = 24) that were weaned at the same diet their mothers, three treatment groups, control group (2,0 mg/kg of folic acid), deficient group (0,5 mg/kg of folic acid) and the supplemented group (8,0 mg/kg of folic acid). The arcuate nucleus of the hypothalamus tissue were collected, from which was extracted DNA, RNA and proteins using commercially available kits following the manufacturer's protocol. The DNA methylation pattern analysis was performed. The mRNA was used for the analysis of gene expression by real time PCR, the TaqMan (Life Technologies™) system. The proteomic study was carried out by Western blotting. In general, we found that the body weight of the male offspring showed no statistical difference between the groups. The feed intake of folic acid deficient group was statistically (p = 0.03) higher than the control group. In relation to female offspring was observed that the body weight of the supplemented group was statistically (p = 0.01) higher than the control group, and related to feed intake, there was no statistically significant difference between the treatment groups. The analysis of brain weight, gene expression, methylation and protein expression of *Pomc* no significant statistical differences among treatment groups of both sexes. Concluded that the intervention diets with different folic acid concentrations did not cause significant changes in the offspring compared to the study of proteomics and methylation and expression patterns of the *Pomc* gene. As for the body weight and feed consumption of animals it showed that supplementation with folic acid during pregnancy and post weaning was able to alter these two parameters with differing response between males and females in the adult offspring.

Keywords: Folic Acid. Proopiomelanocortin. Methylation. Epigenetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação epigenética.....	17
Figura 2 – Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína.....	19
Figura 3 – Controle do balanço energético hipotalâmico.....	24
Figura 4 – Via de sinalização da leptina e da insulina no núcleo arqueado do hipotálamo.	26
Figura 5 – Dieta dos filhotes de ambos os sexos durante o estudo.....	32
Figura 6 – Homogeneização dos ingredientes.....	33
Figura 7 – Peletização da ração.....	34
Figura 8 – Estufa de secagem.....	34
Figura 9 – Secagem da ração em estufa.....	34
Figura 10 – Ração colocada em saco plástico.....	35
Figura 11 – Aparelho Criostato.....	36
Figura 12 – Parte interior do Criostato.....	36
Figura 13 – Manuseio do Criostato.....	36
Figura 14 – União da comissura anterior.....	37
Figura 15 – Hipocampo e trato óptico.....	37
Figura 16 – Agulha de <i>punch</i>	37
Figura 17 – Fatia do cérebro em lâmina com o núcleo arqueado do hipotálamo extraído..	37
Figura 18 – Núcleo arqueado do hipotálamo em microtubo comRNA <i>later</i> após extraído..	38
Figura 19 – Delineamento experimental.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso dos filhotes machos.....	43
Gráfico 2 – Consumo de ração dos filhotes machos.....	44
Gráfico 3 – Peso das filhotes fêmeas.....	45
Gráfico 4 – Consumo de ração das fêmeas.....	46
Gráfico 5 – Peso do cérebro dos filhotes machos.....	47
Gráfico 6 – Peso do cérebro das filhotes fêmeas.....	48
Gráfico 7 – Expressão gênica de <i>Pomc</i> nos filhotes machos.....	48
Gráfico 8 – Expressão gênica de <i>Pomc</i> nos filhotes fêmeas.....	49
Gráfico 9 – Metilação do gene <i>Pomc</i> no grupo controle de ambos os sexos.....	49
Gráfico 10 – Metilação do gene <i>Pomc</i> no grupo deficiente de ambos os sexos.....	50
Gráfico 11 – Metilação do gene <i>Pomc</i> do grupo suplementado de ambos os sexos.....	50
Gráfico 12 – Expressão protéica de <i>Pomc</i> nos filhotes machos.....	51
Gráfico 13 – Expressão protéica de <i>Pomc</i> nos filhotes fêmeas.....	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Quantidade dos ingredientes para o preparo da ração.....	33
Tabela 1 – Correlação entre peso corpóreo e consumo de ração controle, deficiente e suplementada em filhotes de ambos os sexos.....	47

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

ARC: núcleo arqueado

BSA: albumina de soro 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

MC3R: receptor 3 de melanocortina

MC4R: receptor 4 de melanocortina

MCRs: receptores de melanocortinas

miRNA: microRNA

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MSH: hormônio estimulador de melanócito

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

MTR: metionina sintase

NPY: neuropeptídeo Y

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pomc: pró-opiomelanocortina

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

TBS-T: Tampão Tris Salino com Tween

THF: tetraidrofolato

TM - Marca comercial

V: volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Epigenética.....	16
1.2	Ácido fólico.....	20
1.3	Obesidade.....	21
1.4	Gene <i>Pomc</i>	23
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Animais do estudo.....	31
4.2	Preparo da ração.....	32
4.3	Sacrifícios dos animais.....	35
4.4	Extração do núcleo arqueado do hipotálamo.....	35
4.5	EXTRAÇÃO DE RNA.....	38
4.5.1	Quantificação do RNA.....	38
4.5.2	Tratamento do RNA.....	38
4.5.3	SÍNTESE DE cDNA.....	38
4.5.4	Expressão do gene <i>Pomc</i>	39
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	39
4.6.1	Quantificação do DNA.....	39
4.6.2	Metilação do gene <i>Pomc</i>	40
4.7	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	40
4.7.1	Quantificação da proteína.....	41
4.7.2	Expressão de proteína por Western Blotting.....	41
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Peso e consumo de ração – machos.....	43
5.2	Peso e consumo de ração – fêmeas.....	44
5.3	Peso do cérebro.....	47
5.4	Expressão do gene <i>Pomc</i>	48
5.5	Metilação do gene <i>Pomc</i>	49
5.6	Expressão proteica de <i>Pomc</i>	50
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A - MODIFICAÇÕES REALIZADAS DO PROTOCOLO TRIZOL® REAGENT (LIFE TECHNOLOGIES™).....	66
	ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIGENÉTICA

A palavra epigenética traz consigo distintas 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” (DEANS; MAGGERT, 2015).

As influências ambientais sobre a epigenética, provavelmente, são mais importantes durante o período pré-natal e início do desenvolvimento pós-natal, quando os mecanismos epigenéticos sofrem estabelecimento e maturação. O acúmulo de erros na manutenção da informação epigenética contribuirá para a variação interindividual conforme a idade (WATERLAND; MICHELS, 2007; ERIKSSON, 2016).

Vários estudos mostram que existem fortes evidências de que os fatores ambientais, como alimentação, atividade física, estresse, exposição ao álcool e tabaco durante a gestação podem ocasionar grandes impactos na saúde dos seus descendentes, por meio de alterações nos mecanismos epigenéticos, como metilação de DNA e modificação de histonas, levando ao quadro de inúmeras doenças, como cardiopatias, alergias, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer (ALEGRIA-TORRES et al., 2011).

Sendo assim, a nutrição materna, durante a concepção, tem grande relevância para o adequado desenvolvimento do feto e refletirá em sua saúde a longo prazo, visto que é neste período que o desenvolvimento e função da placenta estão fortemente ligados e dependentes da alimentação da mãe (KING, 2016).

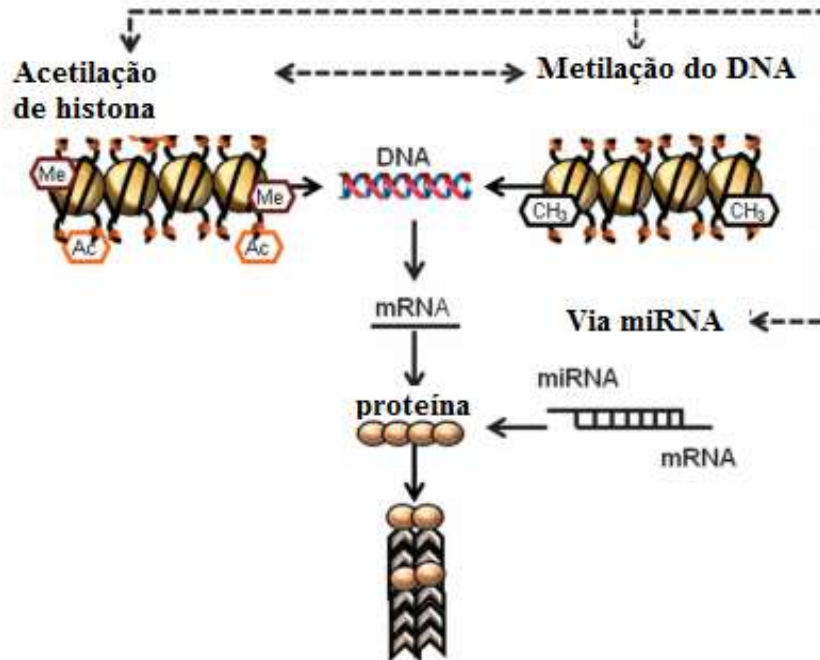
Além da nutrição materna ser extremamente importante para prole, atualmente, alguns estudos tem mostrado que a nutrição paterna também apresenta sua contribuição significativa, influenciando na saúde e na doença dos filhos (STUPPIA et al., 2015).

A nutrieepigenômica (interação do nutriente com o DNA) com o adequado manejo nutricional, por meio da alimentação saudável, equilibrada e personalizada, é um dos fatores que pode evitar o surgimento de determinadas doenças e complicações decorrentes, provendo desta forma a saúde (REMELY et al., 2015).

A epigenética engloba três mecanismos distintos: metilação do DNA, modificação de histonas e a ação de microRNAs (miRNA), que atuam na regulação da expressão gênica, como mostrado na figura 1. Estes mecanismos são essenciais para o desenvolvimento de mamíferos e tem um papel de grande relevância na programação fetal, uma vez que modificações em quaisquer estágios do desenvolvimento podem levar ao surgimento de

inúmeras patologias (BERNAL; JIRTLE, 2010). Entre estas patologias estão a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e síndrome metabólica (SMITH; RYCKMAN, 2015).

Figura 1 – Regulação epigenética



Fonte: modificada de Desai; Jellyman e Ross (2015).

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.

Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético de regulação da expressão gênica que ocorre em dinucleotídeos CpG (pares de Citosina-fosfato-Guanina), 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, além da expressão gênica tecido-específica, no *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (MESSERSCHMID; KNOWLES; SOLTER, 2014). Além da metilação do DNA, mecanismos epigenéticos incluem modificações na estrutura das histonas, como acetilação e desacetilação, que participam do empacotamento e regulam a conformação espacial da cromatina e, conseqüentemente, controlam o acesso de fatores de

transcrição ao DNA (JAENISCH; BIRD, 2003).

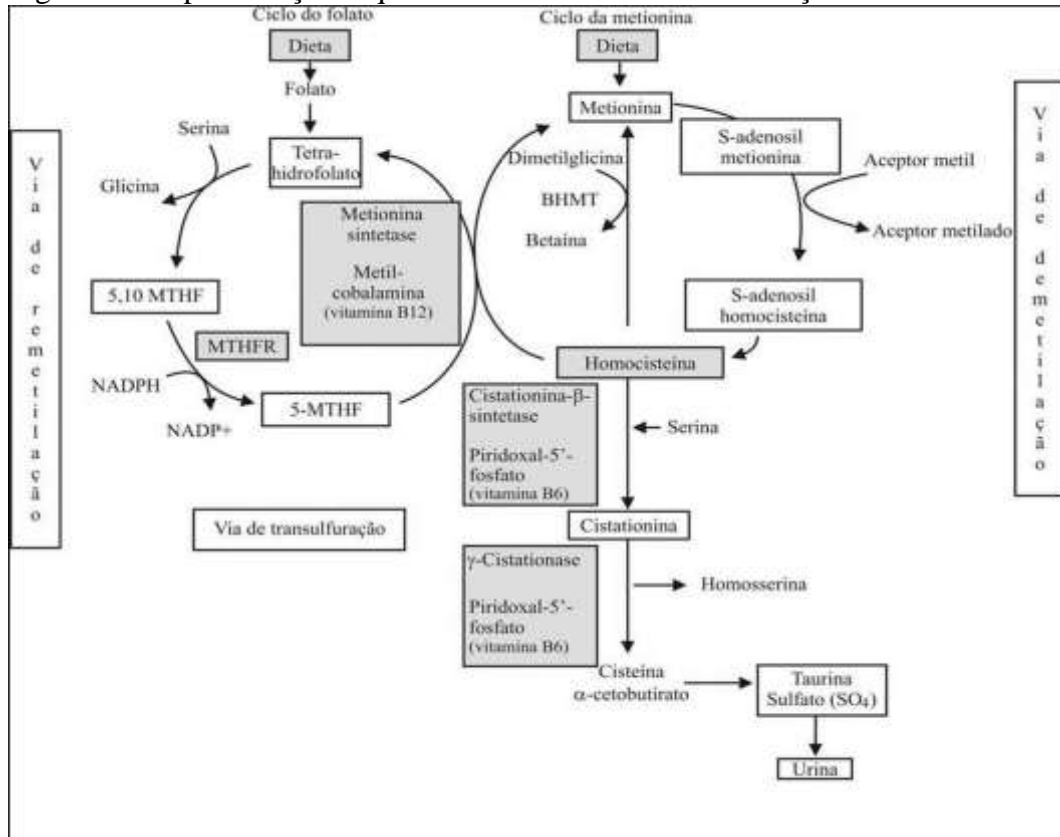
Nas fases embrionárias iniciais, os padrões de metilação são apagados e, então, reestabelecidos de maneira linhagem-específica (DESHMUKH et al., 2011). O processo de diferenciação celular envolve o estabelecimento de marcas epigenéticas tecido-específicas que são necessárias para a manutenção de padrões apropriados de expressão gênica por vários ciclos de replicação do DNA durante o desenvolvimento embrionário e, em muitos tecidos, por toda a vida. Vale ressaltar que após o seu estabelecimento, padrões tecido-específicos de metilação do DNA, geralmente, são mantidos com alta fidelidade (BHUTANI et. al., 2011).

Durante a metilação de dinucleotídeos CpG, a enzima DNA metiltransferase (DNMT) converte S-adenosilmetionina (SAM) em S-adenosilhomocisteína (SAH). É importante considerar que os mecanismos fundamentais pelos quais fatores nutricionais afetam o suprimento de SAM e/ou a remoção de SAH poderiam afetar a metilação do DNA (SU et al., 2016). Durante o desenvolvimento pré-natal e no início do desenvolvimento pós-natal, quando os padrões de metilação tecido-específicos estão sendo estabelecidos, qualquer fator que iniba a eficiência de DNMT pode resultar em deficiência permanente de metilação dos dinucleotídeos CpG. Até mesmo durante a fase adulta, padrões estabelecidos de metilação do DNA devem ser mantidos nos tecidos em proliferação e, portanto, deficiências nutricionais afetando o metabolismo do carbono-1 poderiam induzir hipometilação do DNA. A suplementação nutricional durante o início do desenvolvimento pode aumentar a metilação de genes específicos e causar mudanças permanentes na expressão gênica (WATERLAND; JIRTLE, 2003; XU; SINCLAIR, 2015;). Isto é possível porque em certos *loci*, o estabelecimento do epigenótipo exibe uma dinâmica estocástica que pode ser influenciada pela dieta (INGROSSO et al., 2003).

Perturbações no metabolismo do carbono-1 podem afetar diretamente a integridade do genoma pela produção de inserções inadequadas de uracila ao DNA e alterar seus padrões de metilação (CHOI et al., 2004). Nutrientes como o ácido fólico, vitaminas B12, B6, riboflavina, colina, betaína e metionina desempenham importantes papéis nesta via bioquímica (MILLIAN; GARROW, 1998; ZEISEL et al., 2003; JI et al., 2016). 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 tetraidrofolato, para subsequente redução ou oxidação e/ou transferência do carbono para as vias bioquímicas essenciais para a síntese e reparo do DNA ou metilação. No metabolismo do carbono-1 a reação da metionina sintetase exerce um papel central porque ela fornece meios para que a homocisteína possa ser remetilada e, desse modo, haja a síntese de metionina. A metionina é, então, adenilada para

formar SAM, que por sua vez doa seu grupo metil para aproximadamente 80 reações de metilação, incluindo a metilação do DNA, RNA e de proteínas (Figura 2) (CHOI et al., 2004; VENÂNCIO; BURINI; YOSHIDA, 2010).

Figura 2 – Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína



Fonte: Venâncio; Burini e Yoshida (2010).

BHMT = betaína-homocisteína metiltransferase; MTHF = metilenotetra-hidrofolato; MTHFR = metilenotetra-hidrofolato redutase; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida; NADP+ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

O ciclo da metionina, como mostrado anteriormente, envolve vários mecanismos que também influencia na epigenética. Muitas pesquisas realizadas recentemente mostraram que a restrição de metionina pode influenciar benéficamente vários aspectos da 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. A restrição dietética de metionina ocasiona alterações na metilação do DNA e nos miRNAs (ABLES; HENS; NICHENAMETLA, 2016).

Em mamíferos, após a fertilização, os padrões de metilação dos gametas dos pais são apagados por demetilação do genoma e durante o período de implantação embrionário, esses padrões são reestabelecidos através de metilação *de novo*. Estas marcas são importantes para

o início do desenvolvimento embrionário e estabelecimento da toti ou pluripotência celular (ARAND et al., 2015). Curiosamente, a exposição embrionária e fetal a nutrientes que são principalmente oriundos da dieta materna, pode influenciar este mecanismo epigenético afetando o desenvolvimento do organismo e podendo trazer consequências tardias sobre o estado de saúde do descendente (TANG; HO, 2007; JIAO et al., 2016).

Waterland e Michels (2007) propuseram dois mecanismos possíveis para explicar o efeito epigenético de nutrientes maternos sobre os fenótipos de sua prole: a) redução da disponibilidade de grupos metil pode alterar o estabelecimento de metilação do DNA afetando tanto o metabolismo do carbono-1 ou a atividade da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e b) a repressão de genes críticos podem ocorrer durante a metilação *de novo* do DNA no início do desenvolvimento fetal. Além disso, este efeito nutricional pode resultar em defeito permanente da regulação da metilação do DNA sugerindo um possível mecanismo para o desenvolvimento de doenças futuras durante a vida do organismo (STEEGERS-THEUNISSEN et al., 2013).

Entre muitos fatores que influenciam a saúde do organismo no ambiente intrauterino e no início da vida adulta estão os eventos epigenéticos. Uma adequada metilação do DNA é essencial para a embriogênese e início do desenvolvimento fetal, uma vez que o estabelecimento inadequado dos padrões de metilação do DNA influenciados pela dieta materna insuficiente, como por exemplo, uma dieta pobre em ácido fólico pode induzir doenças pediátricas e até mesmo levar ao desenvolvimento de doenças crônicas, visto que, estudos epidemiológicos indicam que interferências no crescimento e desenvolvimento intrauterinos estão associados a um maior risco de obesidade, doença cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 2 e osteoporose na vida adulta dos filhos. (WATERLAND; JIRTLE, 2004; GLUCKMAN et al., 2008; ROCHTUS et al., 2015).

1.2 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. Todavia, esta suplementação também está envolvida com outros mecanismos, que podem trazer efeitos benéficos ou maléficos para os seus descendentes (BARUA; KUIZON; JUNAID, 2014).

O ácido fólico está envolvido na via metabólica do carbono-1, o qual desempenha um importante papel no desenvolvimento e programação fetais. Esta via controla a síntese e

degradação de homocisteína e fornece grupos metil para as reações de metilação associadas com o controle da integridade e da regulação epigenética do genoma (ZEISEL, 2009).

Estudos com animais demonstraram que a deficiência ou a suplementação no período periconcepcional da dieta materna com ácido fólico e vitamina B12 pode afetar o estabelecimento dos padrões de metilação do DNA, alterando a expressão de genes e do fenótipo da prole (WATERLAND; JIRTLE, 2003; SINCLAIR et al., 2007).

Kim et al. (2009) observaram que houve uma hipermetilação do DNA da placenta quando ratas recebiam uma dieta suplementada com ácido fólico e uma hipometilação quando a dieta era deficiente. Houve também uma correlação positiva entre a metilação do DNA dessas placentas com o folato hepático e a SAM.

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 (PADMANABHAN et al., 2013).

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. Desta forma, sugere-se que há efeito epigenético com a ingestão de folato não somente no útero, mas também após o nascimento (CHO et al., 2013).

Isto posto, é de grande relevância o estudo sobre a ingestão de ácido fólico para modular os padrões adequados de metilação do DNA, 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 (CRIDER et al., 2012; CASAS-AGUSTENCH; IGLESIAS-GUTIERREZ; DAVALOS, 2015).

1.3 OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (2016), 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 IMC igual ou superior a 25 kg/m² é considerado excesso de peso, e se for igual ou acima de 30 kg/m² é classificado obeso.

A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial que envolve fatores

genéticos e determinantes ambientais, sendo caracterizada por alterações na composição corporal com um aumento do tecido adiposo e do risco de co-morbidades que afetam a qualidade e a expectativa de vida (SERRA-MAJEM; BAUTISTA-CASTAÑO, 2013).

A obesidade em ratos e em seres humanos está associada com a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (ESSANDOH et al., 2016). Assim, este excesso de gordura é caracterizado por uma inflamação crônica de baixo grau, que predispõe à resistência a insulina, levando ao quadro de diabetes *mellitus* tipo 2, complicações cardiovascular, entre outras. (ESSER et al., 2014).

O comitê da sociedade do Japão para estudos da obesidade definiu-a como uma doença clínica causada por si só devido ao sedentarismo e aumento do consumo energético ou, ainda, associada a outras doenças que podem induzi-la. Por uma questão de saúde, a pessoa com excesso de peso deve perdê-lo, ficando dentro dos valores do IMC adequado (TAKAHASHI; MORI, 2013). Quando o IMC não se encontra dentro da faixa de normalidade (entre o \geq percentil 3 e \leq ao percentil 85), mas em parâmetros acima desta, que representa sobrepeso e obesidade, há riscos significativos para desenvolver doenças cardiovasculares em crianças e adolescentes (FRIEDEMANN et al., 2012).

Must et al. (2012) mostraram que homens e mulheres que apresentaram excesso de peso antes da puberdade o risco de morte por doença isquêmica do coração foi de 1,4 e 2 vezes, respectivamente, maior que aqueles que não tiveram sobrepeso na infância.

A prevalência da obesidade em crianças e adolescentes tem aumentado na maior parte dos países e tem-se traduzido em um dos mais significativos problemas nutricionais da atualidade (HONORATO, 2010).

Caso a obesidade permaneça em *continuum* as doenças cardiovasculares vão aumentar em mais de 30% nos próximos 15 anos, resultando em significativa morbidade e mortalidade nos futuros adultos (BIBBINS-DOMINGO et al., 2007).

Além das características clínicas a obesidade também traz prejuízo no aspecto financeiro. Atualmente, no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta R\$ 488 milhões por ano com o tratamento da obesidade e suas doenças relacionadas como hipertensão, diabetes, cardiopatias e alguns tipos de câncer (UNIVERSIDADE DE BRASILIA, 2013).

Para combater esta patologia várias pesquisas têm sido realizadas. Estudos identificaram alguns genes envolvidos com a obesidade como, por exemplo, o gene da pró-opiomelanocortina (*POMC*) (MARTINEZ et al., 2008).

1.4 GENE POMC

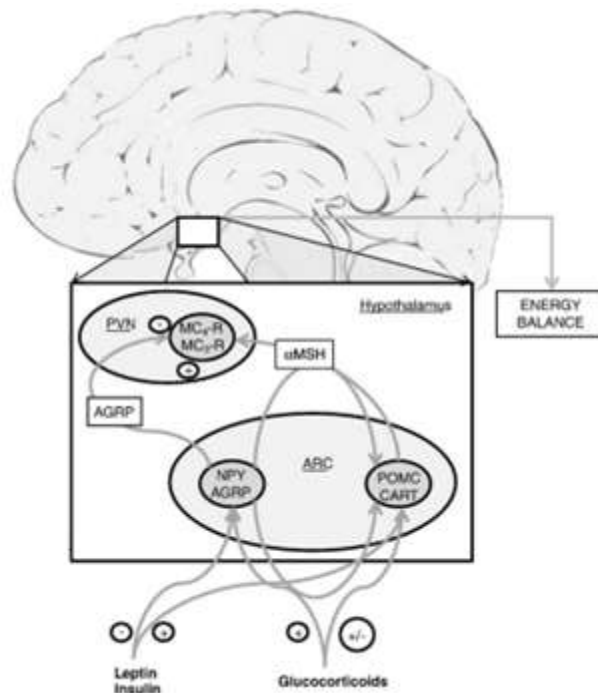
O gene *POMC* encontra-se expresso nos lobos anterior e intermediário da hipófise e também em vários outros tecidos, como cérebro, placenta, trato gastrointestinal, aparelho reprodutor, pulmões e linfócitos (LEVITOV; DALLAS; SLONIM, 2013), e mapeado no cromossomo 2p23.3 em humanos e em ratos no cromossomo 6q14 (COMUZZIE et al., 1997; MARQUES-LOPES et al., 2004; KOHL, 2010).

A poliproteína codificada pelo gene *POMC* dá origem às melanocortinas, que são neuropeptídeos encontrados no núcleo arqueado do hipotálamo, núcleo do trato solitário, hipófise e outros tecidos periféricos. Após clivagem proteolítica da POMC formam-se as várias melanocortinas: o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e os hormônios alfa, beta e gama estimuladores de melanócitos (MSH). O sistema das melanocortinas engloba ainda dois antagonistas endogenamente expressos, o Agouti e a Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP). Estes neuropeptídeos são reconhecidos por cinco receptores das melanocortinas (MCRs), classificados de 1 a 5 (MC1R-MC5R) (JACOBOWITZ; O'DONOHUE, 1978; GEE et al., 1983; LU et al., 1994; OLLMAN et al., 1997; TAN et al., 2004).

Em neurônios hipotalâmicos, a expressão de *POMC* é regulada por diversos hormônios, nutrientes e citocinas. Um dos mecanismos melhor estudados compreende a regulação mediada pela leptina, secretada pelos adipócitos (CHEUNG; CLIFTON; STEINER, 1997; MOUNTJOY, 2010).

De uma forma sucinta, a leptina liberada pelos adipócitos inibe a expressão de AgRP e estimula a síntese de POMC e, conseqüentemente, promove a liberação de alfa-MSH pelos neurônios melanocortinérgicos no hipotálamo. O alfa-MSH atua sobre o MC3R e MC4R expressos nestes neurônios inibindo a ingestão alimentar e aumentando o dispêndio energético (MIZUNO; MOBBS, 1999; COWLEY et al., 2001; STEVENS et al., 2011). Como ilustrado a seguir na figura 3.

Figura 3 – Controle do balanço energético hipotalâmico



Fonte: Stevens et al. (2011).

ARC = núcleo arqueado; PVN = núcleo paraventricular; AGRP = peptídeo relacionado a Agouti; POMC = pro-opiomelanocortina; CART = transcrito regulado pela cocaína e anfetamina. NPY = neuropeptídeo Y; MC₄-R = receptor-4 de melanocortina; MC₃-R = receptor-3 de melanocortina.

Em humanos, a primeira evidência do envolvimento das melanocortinas no controle da ingestão alimentar surgiu da descrição de dois pacientes que desenvolveram uma obesidade muito precoce e que possuíam mutações no gene *POMC*. Igualmente, murinos *knockout* para o gene *Pomc* também são obesos, hiperfágicos e apresentam, ainda, deficiências na pigmentação e função da glândula supra-renal (KRUDE et al., 1998; CHALLIS et al., 2002; COLL; LORAINE TUNG, 2009).

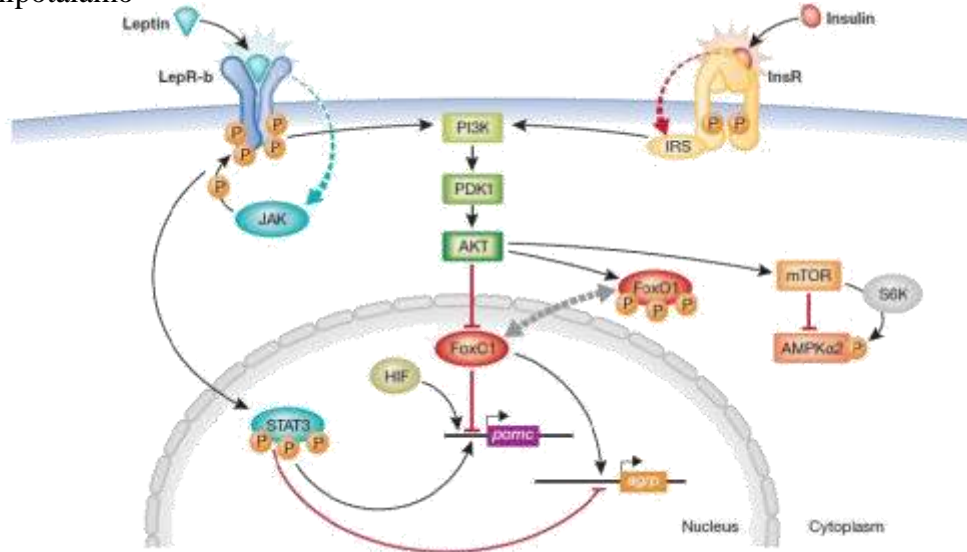
No núcleo arqueado do hipotálamo, a deficiência de POMC é capaz de aumentar a ingestão alimentar e reduzir o gasto energético, resultando em obesidade, desordens metabólicas e endócrinas. Em um estudo realizado por Zhan et al. (2013), observou-se diferentes funções comportamentais dos neurônios POMC no núcleo arqueado do hipotálamo e no núcleo do trato solitário, sugerindo que os neurônios POMC regulam a alimentação e a homeostase energética, integrando sinais de adiposidade a longo prazo, a partir do hipotálamo, e sinais de saciedade, a curto prazo, a partir do tronco cerebral.

Durante o envelhecimento ocorre a perda seletiva de autofagia em neurônios hipotalâmicos, como POMC, fazendo com que diminuam os níveis de alfa-MSH,

promovendo então, adiposidade, prejudicando a lipólise e alterando a homeostase da glicose. Assim sendo, a modulação da autofagia hipotalâmica (processo que regula a homeostase celular), pode ter implicações na prevenção da obesidade e síndrome metabólica, durante esta fase da vida (KAUSHIK et al., 2012).

Leptina e insulina são dois hormônios anorexígenos que têm papel-chave na regulação do peso corporal e homeostase energética, uma vez que vários pacientes obesos desenvolvem resistência a esses hormônios. No cérebro, os neurônios POMC e AgRP do núcleo arqueado do hipotálamo foram identificados como os principais alvos da leptina e ação da insulina. A via de ambos os hormônios no núcleo arqueado, ocorre da seguinte maneira: o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) é ativado e fosforilado quando a leptina se liga ao receptor b de leptina (LEPR-b). No núcleo, o STAT3 fosforilado liga-se aos promotores *POMC* e *AgRP*, estimulando a expressão de *POMC* e inibindo *AgRP*. A via de sinalização da insulina e leptina convergem para o transdutor de sinal e ativador da transcrição PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase). A ativação de PI3K leva a fosforilação e inativação do fator FoxO1 (*Forkhead Box O1*), um repressor da expressão de *POMC*. A fosforilação de FoxO1 provoca sua exportação nuclear e permite que STAT3 se ligue aos promotores *POMC* e *AgRP* (Figura 4) (VARELA; HORVATH, 2012).

Figura 4 – Via de sinalização da leptina e da insulina no núcleo arqueado do hipotálamo



Fonte: Varela e Horvath (2012).

AgRP, proteína relacionada a Agouti; AKT, proteína quinase B; AMPK, AMP-quinase dependente; FoxO1, Forkhead box protein O1; HIF, fator de hipóxia induzida; InsR, receptor de insulina; IRS, receptor de substrato de insulina; JAK, Janus quinase; LepR-b, receptor b de leptina; mTOR, alvo de rapamicina em mamíferos; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; POMC, proopiomelanocortina; S6K,; STAT3, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3.

POMC e AgRP também são reguladas por nutrientes, como glicose, aminoácidos e ácidos graxos. A glicose, por exemplo, é transportada ativamente, através da barreira hematoencefálica e, dependendo da área do cérebro, pode aumentar ou diminuir a capacidade dos neurônios para detectar alterações na glicemia. Os neurônios do núcleo arqueado, como POMC e AgRP, devido às suas localizações são capazes de responder a alterações nas concentrações de glicose no ambiente, sendo glicose ativada (aumento da glicose leva a um aumento da queima) ou glicose inibida (aumento da glicose leva a uma diminuição da queima). Além disso, o canal de potássio dependente de ATP (KATP) é um importante mecanismo para o funcionamento normal do neurônio POMC, a inibição da sensibilidade de KATP pode prejudicar POMC na detecção de glicose. Então, desta maneira, a regulação do canal de KATP pode ser um mecanismo de controle relevante na homeostase da glicose que é alterado no desenvolvimento da obesidade (BELGARDT; OKAMURA; BRÜNING, 2009).

Em um estudo, mostrou-se que o tratamento com leptina durante a lactação promove modificação epigenética no promotor *Pomc* com efeitos duradouros sobre a ingestão alimentar e protetor no ganho peso corpóreo na fase adulta, particularmente, quando estes animais são expostos a uma dieta com alto teor de gordura. Estes dados fornecem dicas sobre os possíveis mecanismos que afetam a expressão do gene no sistema nervoso central em

animais que foram submetidos a tratamento com leptina por via oral durante o período de aleitamento (PALOU et al., 2011).

Heuvel et al. (2014) estudaram ratos tratados com leptina (intracerebral ventricular) e observaram que esta diminuiu a ingestão calórica, tanto em ratos que receberam a dieta com alto teor de gordura e açúcar, como naqueles que se alimentaram da dieta controle. Este hormônio também foi capaz de causar aumento de *Pomc* e diminuição de *NPY* (neuropeptídeo Y) em animais que receberam dieta controle.

Outro estudo observou que as proles de mães obesas ganharam mais peso do que as magras, independente da dieta (normal ou com alto teor de gordura) pós desmame. A prole de ratas que foram expostas à dieta com alto teor de gordura apresentaram maiores níveis de hiperfagia, adiposidade, hiperlipidemia, e intolerância à glicose, conseqüentemente, houve um aumento hipotalâmico da sinalização de *NPY* e resistência à leptina nessa prole quando adultos (CHEN; SIMAR; MORRIS, 2009).

A hipermetilação na região promotora do gene *Pomc* pode surgir em períodos pós-lactação e interferir com a ligação do fator de transcrição, bloqueando os efeitos de níveis elevados de leptina, levando à obesidade (MARCO et al., 2013). O gene *MECP2* (*Methyl CpG Binding Protein 2*), codifica a proteína MECP2, que é essencial para a função neural e também é capaz de desligar e ativar outros genes. Como exemplo, a mesma regula positivamente a expressão do gene *Pomc* no hipotálamo. A ausência de *MECP2* em neurônios *Pomc* leva ao aumento da metilação do DNA deste promotor, que por sua vez, diminui a expressão de *Pomc*, levando ratos à obesidade com acentuado grau de resistência à leptina, incluindo aumento da ingestão alimentar, diminuição da queima de gordura e maior peso corpóreo (WANG et al., 2014).

Durante a análise da metilação do DNA do gene *POMC*, através de amostra de sangue, em indivíduos que foram acompanhados do nascimento até os vinte anos de idade, observou-se um aumento significativo na metilação em crianças obesas, em comparação com aquelas que apresentaram peso normal. Esta hipermetilação do DNA levou a modificação da expressão do gene *POMC* aumentando o risco individual em desenvolver a obesidade (KUEHNEN et al., 2012).

Os mecanismos epigenéticos também são fatores de alta relevância para a programação do tecido adiposo durante o período perinatal. Em roedores, o desenvolvimento do tecido adiposo é particularmente ativo durante este período, especialmente no decorrer da última semana de gestação e durante a vida pós-natal precoce (LUKASZEWSKI et al., 2013)

Plagemann et al. (2009) através de seus estudos propuseram um conceito geral de um

“círculo vicioso epigenético” da programação da obesidade durante os períodos críticos pré e pós-natais. Inicialmente, este conceito consiste em sobrepeso e obesidade materna, acompanhado de desnutrição hipercalórica e diabetes durante a gravidez, causado por superalimentação na fase pré e/ou pós-natal (período crítico do desenvolvimento do hipotálamo), o que levaria a hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, por conseguinte, vulnerabilidade de resíduos de CpG dentro de sítios de ligação do fator de transcrição dos respectivos promotores de genes hipotalâmicos. A hiper ou hipometilação resultaria em atividade permanentemente alterada de regiões promotoras do genes de neuro-hormônios do hipotálamo e/ou seus receptores (como exemplo, POMC e MC4R). Esta má programação adquirida da regulação neuroendócrina da ingestão de alimentos, do metabolismo, do peso corporal, resulta em disposição permanente da obesidade. Este mecanismo pode contribuir substancialmente para a epidemia da obesidade e suas doenças correlacionadas, como doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, porém, podem ser prevenidas por normalização da oferta de alimentos no início da vida.

Um estudo mostrou-se que a restrição de crescimento fetal intra-uterino (RCIU) em ratos recém-nascidos ocasionou hiperfagia, redução da saciedade e adultos obesos. Isso ocorreu, pois, em resposta ao jejum, a atividade da AMPK aumenta a expressão de peptídeos orexígenos (NPY e AgRP) e diminui peptídeos anorexígenos (*Pomc*), contribuindo desta forma para o desenvolvimento de hiperfagia e obesidade (FUKAMI et al., 2012).

Outros estudos, que corroboram com o de Fukami, et al. (2012), porém, estudando ovelhas e babuínos, apontaram que a desnutrição materna periconcepcional induz hipometilação nos genes *Pomc* e receptor de glicocorticóide (GR) no feto, levando à alteração da fisiologia das vias hipotalâmicas e, conseqüentemente, da regulação do balanço energético. Como consequência, estes animais apresentaram uma maior propensão para desenvolver obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 na fase adulta (BEGUM et al., 2012; LI et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Na literatura há trabalhos que evidenciaram a influência da dieta materna no desenvolvimento da obesidade em sua prole na idade adulta. Os dados gerados pelo presente projeto poderão auxiliar a compreensão em nível molecular do desenvolvimento da obesidade, uma vez que na literatura há escassas informações acerca do efeito isolado da suplementação e deficiência do ácido fólico sobre a metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de mães sujeitas a esses dois tipos de dieta. Os resultados obtidos pelo presente projeto abrirão caminho e darão suporte para futuras pesquisas na área da nutrigenômica, principalmente a respeito da influência do ácido fólico fornecido pela dieta materna sobre a metilação e expressão gênica que ocorrem durante o período de desenvolvimento embrionário e que podem trazer consequências tardias para o indivíduo na idade adulta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os padrões de expressão e de metilação do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Investigar, por PCR em tempo real, o padrão de expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

-Investigar, por PCR em tempo real, o padrão de metilação do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

-Identificar e quantificar a proteína *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa de Mestrado intitulado “Padrões de metilação e expressão do gene *Pomc* na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e 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 30 de junho de 2014, com número de protocolo 005/2014-1 (ANEXO A).

4.1 ANIMAIS DO ESTUDO

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo/USP do campus de Ribeirão Preto.

Estes animais eram ratos Wistar e de início foram solicitados 9 ratos, 6 fêmeas e 3 machos. Quando chegaram ao Biotério da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/FMRP, os animais permaneceram em caixas plásticas (44cm de largura, 50cm de comprimento e 27cm de altura), sendo no máximo 3 animais por caixa e separados por sexo, o ambiente era climatizado (22°C) e ciclo de 12 horas escuro, 12 horas claro e recebiam a dieta e água *ad libitum*, além disso, o peso destes animais e o consumo das rações eram aferidos três vezes por semana durante todo o tratamento.

A princípio, os animais foram submetidos ao consumo da ração comercial por 3 dias, para se ambientarem ao 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 (fêmeas 1 e 2 e macho1), grupo de dieta deficiente em ácido fólico (fêmeas 3 e 4 e macho 2) e grupo de dieta suplementada com ácido fólico (fêmeas 5 e 6 e macho 3). Após uma semana, as fêmeas que estavam separadas foram colocadas nas caixas junto com os machos, sendo o protocolo de acasalamento duas fêmeas para um macho como supracitado. Estes animais permaneceram juntos por, aproximadamente, uma semana e depois de confirmada a prenhez das fêmeas, foram separados.

Durante o período de gestação e lactação, que durou aproximadamente 42 dias (sendo 21 dias cada), às mães foram mantidas as dietas modificadas.

Após o desmame, os filhotes passaram a consumir as dietas modificadas, correspondentes ao seu grupo de tratamento, por 3 meses.

No total, foram analisados 24 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas de cada grupo de estudo. Seguem os grupos de tratamento:

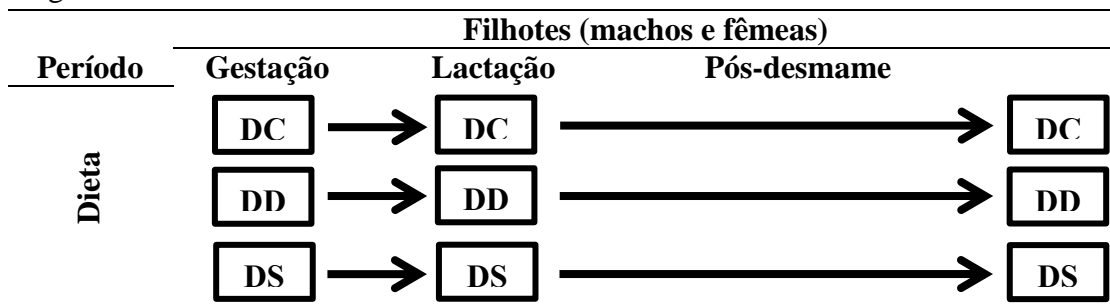
-Grupo dieta controle (n=8): animais que receberam dieta normal com 2,0 mg de ácido fólico/kg de ração.

-Grupo dieta deficiente (n=8): animais que receberam dieta deficiente com 0,5 mg de ácido fólico/kg de ração.

-Grupo dieta suplementada (n=8): animais que receberam dieta suplementada com 8 mg de ácido fólico/kg de ração.

Na figura 5 está representado o protocolo de tratamento dos filhotes de ambos os sexos durante o estudo.

Figura 5 – Protocolo de tratamento dos filhotes de ambos os sexos durante o estudo



Dieta Controle (DC); Dieta Deficiente (DD); Dieta Suplementada (DS).

4.2 PREPARO DA RAÇÃO

A dieta oferecida para os animais foi baseada na AIN 93 – American Institute of Nutrition (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) que fornece todos os macro 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, a dieta deficiente 0,5mg/kg ração e a dieta suplementada 8,0mg/kg ração. O quadro 1 abaixo mostra os ingredientes e suas quantidades utilizadas para o preparo de 5 kg da ração:

Quadro 1 – Quantidade dos ingredientes para o preparo da ração

Ingredientes	Quantidade (g)
L-Cistina	9
Bitartarato de Colina	12,5
Mix de vitaminas	50
Mix de minerais	175
Celulose microfina	250
Sacarose	500
Caseína	700
Amido dextrinizado	775
Amido de milho	2.328,5
Ditert butil-hidroquinona	0,040
Óleo de Soja	200
Água	1.750 ml

Todos os ingredientes eram 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 uma máquina. Posteriormente, essa ração foi levada para estufa para secagem à 45°C por 24 horas. Após a secagem, a ração foi colocada em sacos plásticos identificados e armazenada em freezer até o momento do consumo.

Todos os passos supracitados estão ilustrados pelas figuras (6, 7, 8, 9 e 10), como segue:

Figura 6 – Homogeneização dos ingredientes



Figura 7 – Peletização da ração



Figura 8 – Estufa de secagem



Figura 9 – Secagem da ração em estufa



Figura 10 – Ração colocada em saco plástico



4.3 SACRÍFICIO DOS ANIMAIS

Após o tratamento de todos os filhotes (n=24), os mesmos foram sacrificados por decapitação. Desta forma, o cérebro foi extraído manualmente. Primeiro, o pêlo da cabeça do animal foi retirado com uma tesoura e uma pinça dente de rato, logo após, com o alicate o crânio foi aberto, cuidadosamente, para não lesionar o tecido cerebral. Posteriormente, o cérebro foi embrulhado em papel alumínio autoclavado e imediatamente congelado em gelo seco e armazenado em freezer a -80°C .

4.4 EXTRAÇÃO DO NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO

A extração do núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para realização desta etapa utilizou-se um criostato (Microm International/ HM 500 OM), para que o tecido cerebral fosse manualmente fatiado em baixa temperatura (-18°C) e não houvesse degradação do mRNA da amostra do ARC. Para a correta localização do ARC, foram utilizados pontos de referência do Atlas Brain Maps, Structure of the Rat Brain (SWANSON, L. W., 1992).

Inicialmente, o corte foi feito de maneira que as fatias tivessem uma espessura de $90\mu\text{m}$. Quando a comissura anterior de ambos os lados se uniu, a espessura da fatia diminuiu para $30\mu\text{m}$ e, cuidadosamente, o tecido foi cortado até se observar nitidamente o hipocampo, o trato óptico ficar menor e começar a lateralizar-se, deixando a parte inferior do cérebro

irregular. A partir de então, foi feito um corte de 1500 μm de espessura que continha o ARC. Em seguida, essa fatia foi transferida para uma lâmina de vidro estéril e previamente resfriada onde procedeu-se a retirada do ARC com uma agulha de *punch* de 1,5mm autoclavada. O ARC foi colocado em um microtubo de 1,5 ml estéril contendo RNAlater® Solution (Ambion®) e armazenado em freezer -80°C até o seu processamento.

As figuras (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18) seguintes ilustram este procedimento:

Figura 11 – Aparelho Criostato



Figura 12 – Parte interior do Criostato



Figura 13 – Manuseio do Criostato



Figura14 – União da comissura anterior



Figura 15 – Hipocampo e trato óptico

Figura 16 – Agulha de *punch*

Figura 17 – Fatia do cérebro em lâmina com o núcleo arqueado do hipotálamo extraído



Figura 18 – Núcleo arqueado do hipotálamo em microtubo com RNAlater após extraído



4.5 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA a partir da amostra do núcleo arqueado do hipotálamo foi realizada utilizando TRIzol® Reagent (Life Technologies™), seguindo o protocolo do fabricante.

A eluição do RNA total foi feita em 20µl de água ultrapura livre de RNase.

4.5.1 QUANTIFICAÇÃO DO RNA

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

4.5.2 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.

A quantidade de RNA tratado foi de 1.500 ng, a 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.

4.5.3 SÍNTESE DE cDNA

Para realização da síntese de cDNA seguiu-se o protocolo do fabricante SuperScript® VILO™ MasterMix (Life Technologies™).

A reação foi realizada em Termociclador Veriti® 96 well thermal cycler (Applied Biosystem™) seguindo a ciclagem: incubação à 25°C por 10 minutos, incubação à 42°C por 60 minutos e a reação foi finalizada com 85°C por 5 minutos.

4.5.4 EXPRESSÃO DO GENE *Pomc*

Os estudos para quantificação relativa de expressão do gene *Pomc* (Pomc-Rn00595020_m1) por PCR em tempo real foi realizado em aparelho Termociclador 7500 Fast (Applied Biosystem®) utilizando placas TaqMan® Array Fast Plates (Life Technologies™), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em triplicata pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando o Expression Suite Software v1.0.3.

Os genes de referência utilizados foram beta actina (Actb-Rn00667869_m1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh-Rn01775763_g) e hipoxantina fosforibosiltransferase-1 (Hprt1-Rn01527840_m1). Todavia, foram considerados para as análises de expressão os genes *Actb* e *Hprt1*, já que mantiveram-se constantes nas condições experimentais.

A concentração de cDNA adequada foi a de 50 ng para 20 µl de volume final de reação.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA a partir da amostra do núcleo arqueado do hipotálamo foi realizada através de dois protocolos distintos, o do TRIzol® Reagent (Life Technologies™) e o do PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™). Primeiramente, o protocolo do TRIzol® Reagent foi seguido para a precipitação do DNA que havia ficado na fase não aquosa quando o RNA total do ARC foi extraído para análise de expressão gênica. Para segunda parte da extração de DNA utilizou-se o passo de purificação do DNA do protocolo do PureLink® Genomic DNA Mini Kit.

Ao final deste procedimento, o DNA foi eluído em 200 µl do tampão PureLink® Genomic Elution Buffer.

4.6.1 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA de cada amostra foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) com o Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen™).

Devido ao tamanho da amostra de ARC ser pequeno, a quantidade de DNA foi baixa, e dessa forma optou-se por realizar o *pool* das amostras, para que fosse possível realizar a análise de metilação do DNA. O *pool* das amostras foi feito juntando-as por sexo e grupo de tratamento, como segue:

- Fêmeas (n=4) do grupo controle.
- Machos (n=4) do grupo controle.
- Fêmeas (n=4) do grupo deficiente.
- Machos (n=4) do grupo deficiente.
- Fêmeas (n=4) do grupo suplementado.
- Machos (n=4) do grupo suplementado.

4.6.2 METILAÇÃO DO GENE *Pomc*

Para análise de metilação do gene *Pomc* utilizaram-se as ferramentas de bioinformática para análise dos primers. Para verificar a homologia e alinhamento de sequências utilizaram-se os programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e MultAlin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet). Para desenhar os primers utilizou-se o programa MethPrimer e para verificar sua viabilidade, o programa Gene Runner (Hastings software – v 6.0.24.). Assim, os primers utilizados para o gene *Pomc* foram: forward: 5' - GTTTTGTGTTAGTTTTGAGTGGA - 3', e reverse: 5' - ATCCCTATTCACTCTTCTCTCTT - 3'.

Para a conversão do DNA para bissulfito, seguiu-se o protocolo Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems™). A eficiência da conversão foi realizada seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, realizou-se a PCR em tempo real de acordo com o protocolo MeltDoctor™ HRM Master Mix no equipamento Termociclador 7500 Fast (Applied Biosystem®) seguindo a ciclagem: holding: 95°C, 10 minutos; cycling (40 ciclos): 95°C, 15 segundos; 60°C 1 minutos; curva de melting: 95°C, 10 segundos; 60°C, 1 minuto; 95°C, 15 segundos; 60°C, 15 segundos. Foi utilizado como controle o Premixed Rat Calibration Standard (EpigenDx), que contém 7 padrões de metilação (0%; 5%; 10%; 25%; 50%; 75%; 100%). A análise dos resultados foi feita com o software HRM Software v3.0.1.

4.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A extração de proteína foi realizada através de modificações do protocolo TRIzol® Reagent (Life Technologies™), estas modificações encontram descritas no apêndice A.

A ressuspensão da proteína foi em 100 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) 1%. Em seguida, para completa solubilização das proteínas utilizou-se o sonicador Virtis Virsonic 100 Ultrasonic Cell Disruptor (5 ciclos: 15 segundos sonicador/ 30 segundos incubação em gelo). Após essa etapa as amostras foram levadas ao banho-maria (ALB 800s; INBRAS™) à 100°C por 3 minutos, em seguida centrifugou-se a 8700 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante (contendo a proteína) foi retirado e colocado em um novo microtubo limpo.

4.7.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

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.

4.7.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA POR WESTERN 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 5µl do marcador do peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™) e nos demais poços 20µl de amostra, contendo o extrato de proteína (3µg de proteína por poço). 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).

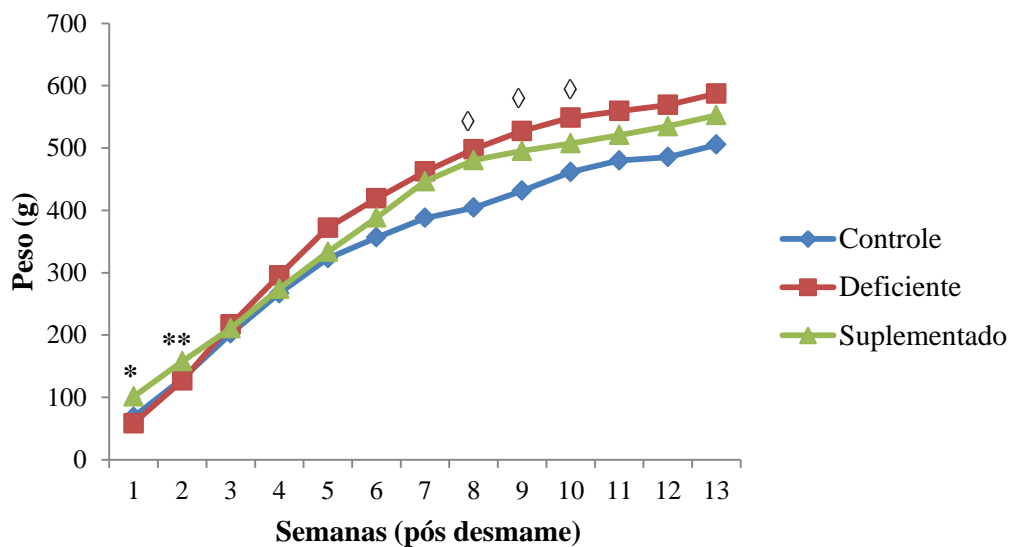
Após o bloqueio com 5ml de BSA (Bovine Serum Albumin-Sigma) 5% em TBS por 1 hora, a membrana foi incubada overnight (16 horas) a 4°C com os anticorpos primários: 1µl de anti-β-actina (Mouse, monoclonal, 1:10.000, Sigma 5441); para o gene de referência utilizou 6,25 µl de anti-Pomc (Rabbit, polyclonal, 1:800, ab94446). Em seguida lavou-se a membrana com TBS-T e colocou 5 ml de BSA 5% e 1µl do anticorpo secundário conjugado com HRP anti-mouse IgG (Goat, 1: 5.000, sc2302) para o anticorpo endógeno (anti-β-actina) e incubou por 1 hora. Para o anticorpo de referência (anti-Pomc) utilizou-se 1µl do anticorpo secundário conjugado com HRP anti-Rabbit IgG (Goat, 1: 10.000, ab97051) em 10 ml de BSA 5%, e esta também foi incubada por 1 hora. Logo após, as membranas foram lavadas com TBS-T e em seguida utilizou-se o revelador Amersham™ ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) para ser revelada através do

5. RESULTADOS

5.1 PESO E CONSUMO DE RAÇÃO – FILHOTES MACHOS

De modo geral não houve diferença estatística significativa entre os pesos dos filhotes machos dos três grupos de tratamento. O peso dos machos alimentados com dieta suplementada com ácido fólico na primeira semana pós desmame foi significativamente ($p < 0,001$) maior do que o peso dos machos alimentados com dieta controle e deficiente em ácido fólico. Na semana 2 observou-se que o peso dos machos alimentados com dieta suplementada com ácido fólico foi significativamente ($p = 0,035$) maior em comparação ao peso dos machos alimentados com dieta deficiente. Já na semana 8, 9 e 10 o peso dos machos alimentados com dieta deficiente em ácido fólico foi significativamente ($p = 0,03$) maior em relação ao peso dos machos alimentados com dieta controle.

Gráfico 1 – Peso dos filhotes machos



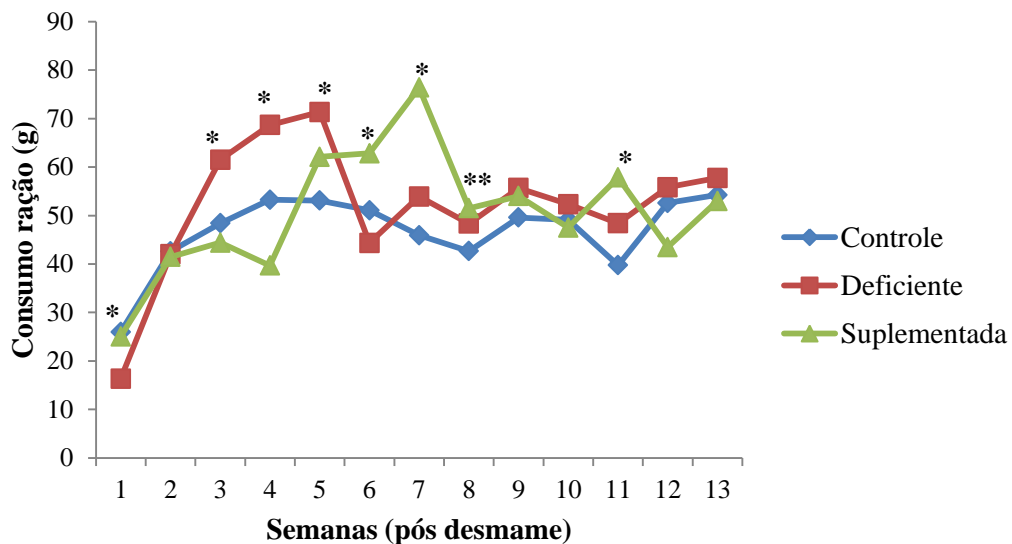
* $p < 0,001$; $p = 0,035$ **; $p = 0,03$ ◇.

O consumo de ração dos filhotes machos alimentados com dieta deficiente em ácido fólico foi significativamente ($p = 0,03$) maior em comparação ao consumo dos machos alimentados com dieta controle.

No entanto, observou-se que, na semana 1 o consumo de ração controle foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao consumo de rações suplementada e deficiente, e o consumo de ração suplementada foi maior que o consumo de ração deficiente. Na terceira e quarta semanas o consumo de ração controle foi significativamente ($p < 0,001$) maior do que o consumo de ração suplementada, e o consumo de ração deficiente foi superior ao consumo

de rações controle e suplementada. Na quinta semana o consumo de rações suplementada e deficiente apresentou-se significativamente ($p < 0,001$) maior que o consumo de ração controle e o consumo de ração deficiente foi superior ao consumo de rações controle e suplementada. Na sexta semana o consumo de ração suplementada foi significativamente ($p < 0,001$) superior ao consumo de rações controle e deficiente. Na sétima e décima primeira semana o consumo de ração suplementada mostrou significativamente ($p < 0,001$) maior do que o consumo de rações controle e deficiente, e consumo de ração deficiente foi superior ao consumo de ração controle. Na oitava semana o consumo de ração suplementada exibiu significativamente ($p = 0,01$) superior ao consumo de ração controle entre os filhotes machos.

Gráfico 2 – Consumo de ração dos filhotes machos



$p < 0,001^*$; $p = 0,01^{**}$.

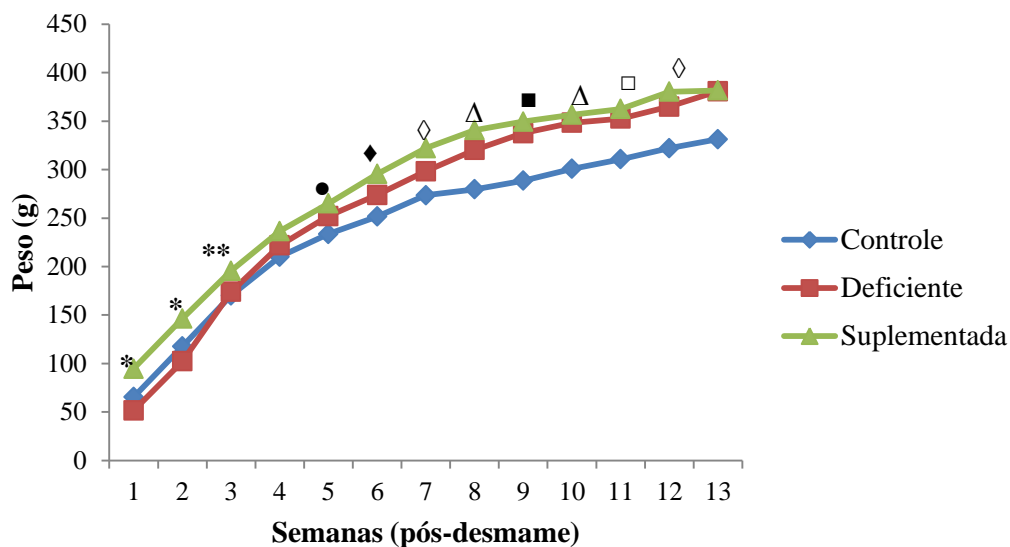
5.3 PESO E CONSUMO DE RAÇÃO – FILHOTES FÊMEAS

De modo geral observou-se que o peso das fêmeas que consumiram ração suplementada foi significativamente ($p = 0,01$) maior que o peso daquelas que consumiram ração controle durante o período do estudo.

Na primeira e segunda semana pós desmame notou-se que o peso das fêmeas alimentadas com dieta suplementada foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o peso das fêmeas alimentadas com dietas controle e deficiente e o peso das fêmeas alimentadas com dieta controle foi maior do que o peso das fêmeas alimentadas com dieta deficiente. Na terceira semana identificou-se que o peso das fêmeas alimentadas com dieta suplementada apresentou-se significativamente ($p = 0,003$) maior que o peso das fêmeas alimentadas com

dietas controle e deficiente. Da quinta a oitava semanas e na décima primeira e décima segunda semanas o peso das fêmeas alimentadas com dieta suplementada foi significativamente ($p = 0,04$; $p = 0,015$; $p = 0,03$; $p = 0,009$; $p = 0,02$; $p = 0,03$, respectivamente) maior que o peso das fêmeas alimentadas com dieta controle. Na nona e décima semana verificou-se que o peso das fêmeas alimentadas com dietas suplementada e deficiente foi significativamente ($p = 0,004$; $p = 0,009$, nesta ordem) maior que o peso das fêmeas alimentadas com dieta controle.

Gráfico 3 – Peso dos filhotes fêmeas



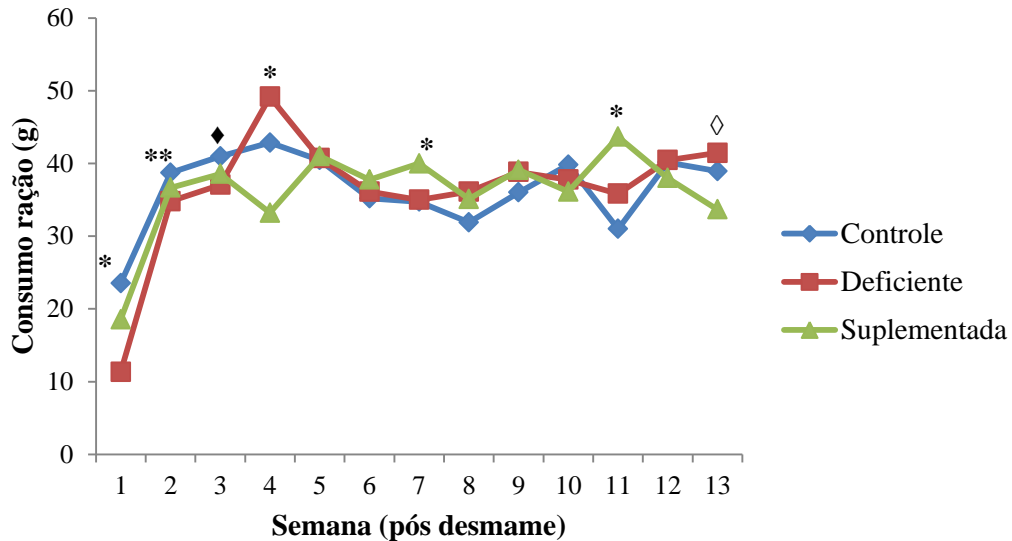
$p < 0,001^*$; $p = 0,003^{**}$; $p = 0,04^{\bullet}$; $p = 0,015^{\blacklozenge}$; $p = 0,03^{\blacktriangle}$; $p = 0,009^{\blacktriangle}$; $p = 0,004^{\blacksquare}$; $p = 0,02^{\square}$.

De modo geral, em relação ao consumo de ração dos filhotes fêmeas, constatou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento.

Na primeira semana pós desmame o consumo de ração controle foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o consumo das rações suplementada e deficiente e o consumo de ração suplementada foi maior do que o consumo de ração deficiente. Na segunda e terceira semanas o consumo de ração controle foi significativamente ($p = 0,01$ $p = 0,006$, respectivamente) maior que o consumo de ração deficiente. Na quarta semana, o consumo de ração controle foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o consumo da ração suplementada e o consumo de ração deficiente foi maior que o de rações controle e suplementada. Na sétima semana, notou-se que o consumo de ração suplementada foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o de rações controle e deficiente. Na décima primeira semana, o consumo de ração suplementada foi significativamente ($p < 0,001$) maior que o de rações controle e deficiente e o consumo de

ração deficiente foi maior do que o de ração controle. Já na décima terceira semana, o consumo de rações controle e deficiente apresentou-se significativamente ($p = 0,002$) maior que o de ração suplementada.

Gráfico 4 – Consumo de ração das fêmeas



$p < 0,001^*$; $p = 0,01^{**}$; $p = 0,006^\diamond$; $p = 0,002^\diamond$.

Observou-se que houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos de tratamento referente à correlação do ganho de peso corpóreo dos animais e o consumo de ração dos mesmos, todavia os dados apresentaram fraca correlação positiva.

Houve correlação positiva significativa do consumo e ganho de peso dos machos que consumiram ração controle e suplementada ($p = 0,03$; $p = 0,02$, respectivamente). Entre as fêmeas, verificou-se uma correlação positiva significativa do consumo de ração e ganho de peso, naquelas que receberam ração deficiente e suplementada ($p = 0,01$; $p = 0,02$, respectivamente), como mostra na tabela 1.

Tabela 1 – Correlação entre peso corpóreo e consumo de ração controle, deficiente e suplementada em filhotes de ambos os sexos

Variáveis	Peso (g)			
	Machos (n=4)		Fêmeas (n=4)	
	r	p	r	p
Consumo (g) – DC	0,35	0,03*	0,17	0,31
Consumo (g) – DD	0,27	0,09	0,39	0,01*
Consumo (g) – DS	0,37	0,02*	0,36	0,02*

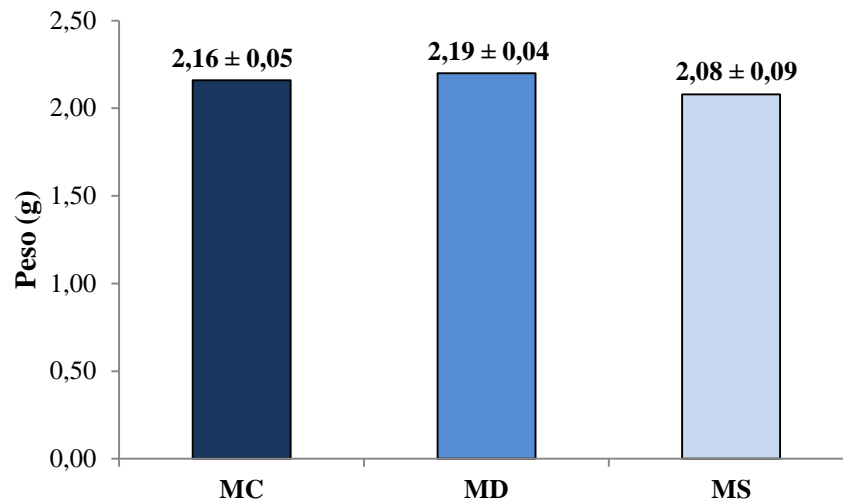
DC (dieta controle); DD (dieta deficiente); DS (dieta suplementada).

Nível de significância ($p < 0,05$)*.

5.3 PESO DO CÉREBRO

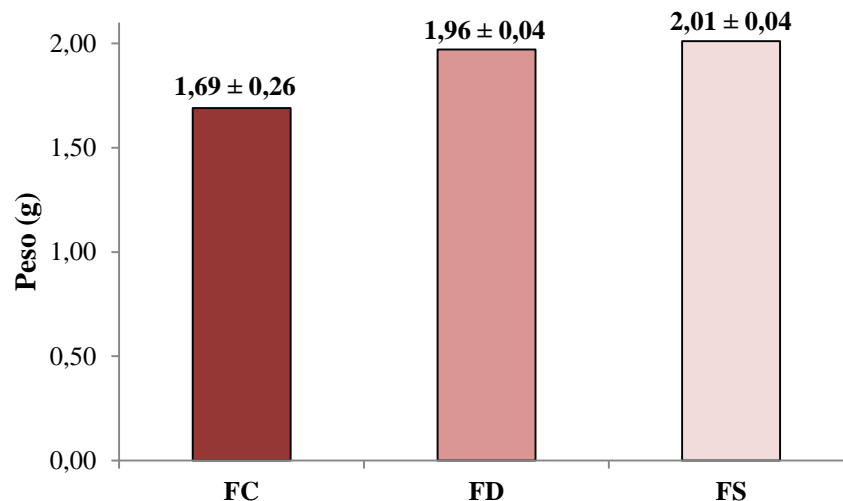
Não houve diferença estatística significativa no peso do cérebro entre os grupos de tratamento, tanto nos machos como nas fêmeas.

Gráfico 5 – Peso do cérebro dos filhotes machos



MC (Filhotes machos que receberam dieta controle); MD (Filhotes machos que receberam dieta deficiente); MS (Filhotes machos que receberam dieta suplementada).

Gráfico 6 – Peso do cérebro dos filhotes fêmeas



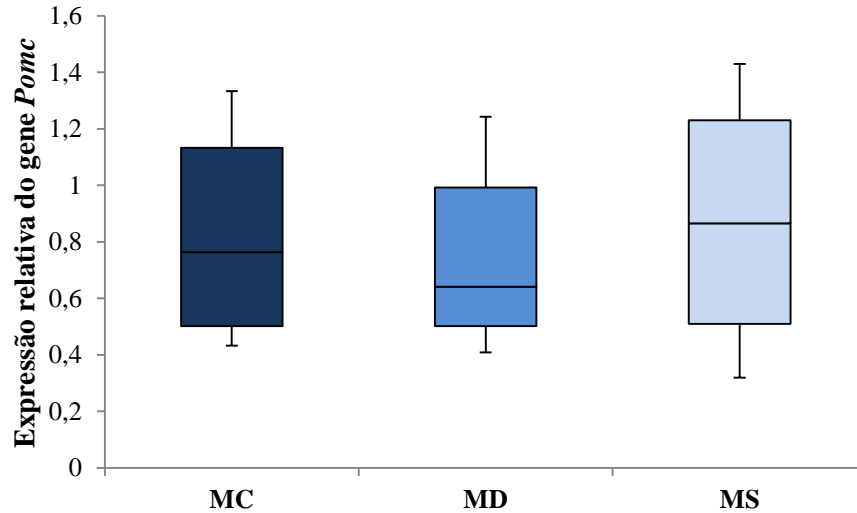
FC (Filhotes fêmeas que receberam dieta controle); FD (Filhotes fêmeas que receberam dieta deficiente); FS (Filhotes fêmeas que receberam dieta suplementada).

5.4 EXPRESSÃO DO GENE *Pomc*

Tanto nos filhotes machos como nas fêmeas não houve diferença estatística

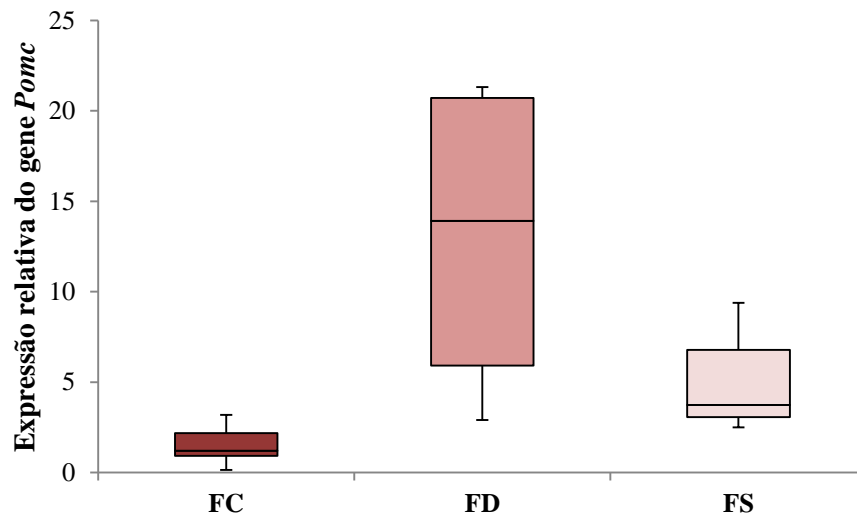
significativa entre os grupos de tratamento, referente à expressão do gene *Pomc*.

Gráfico 7 – Expressão gênica de *Pomc* nos filhotes machos



MC (Filhotes machos que receberam dieta controle); MD (Filhotes machos que receberam dieta deficiente); MS (Filhotes machos que receberam dieta suplementada).

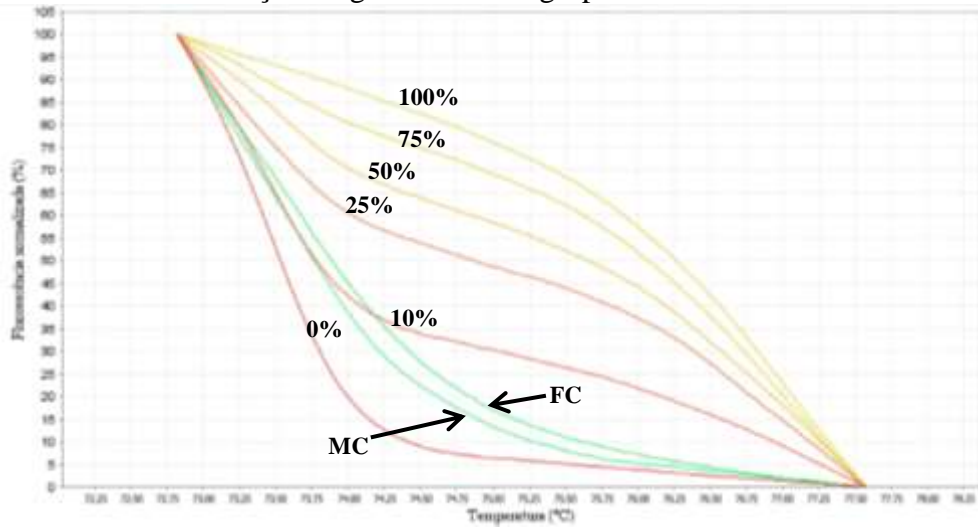
Gráfico 8 – Expressão gênica de *Pomc* nos filhotes fêmeas



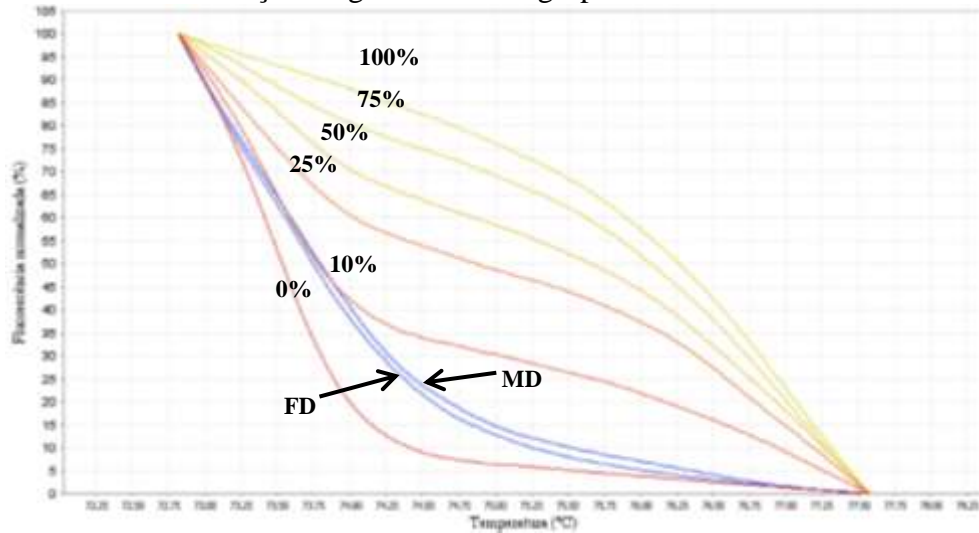
FC (Filhotes fêmeas que receberam dieta controle); FD (Filhotes fêmeas que receberam dieta deficiente); FS (Filhotes fêmeas que receberam dieta suplementada).

5.5 METILAÇÃO DO GENE *Pomc*

Independente do sexo ou grupo de tratamento a metilação do gene *Pomc* mostrou-se entre 0 e 10% metilado.

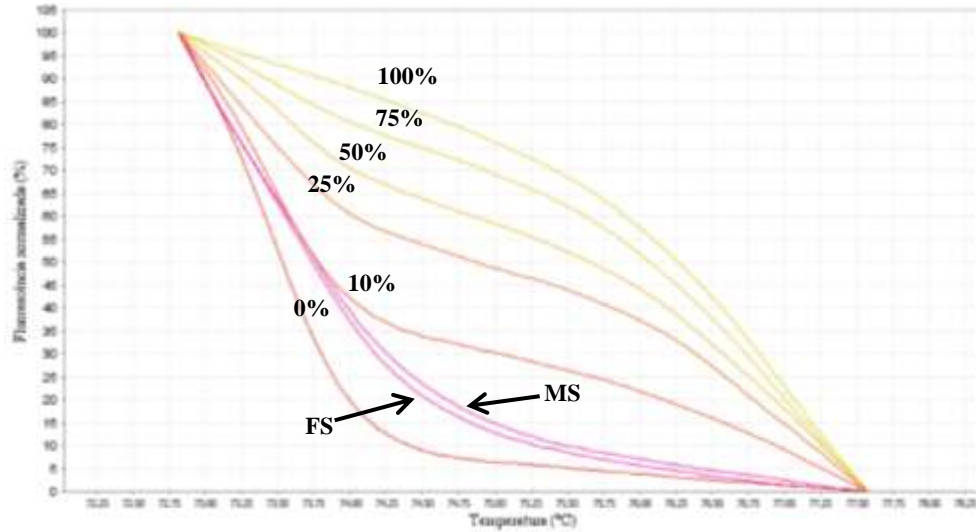
Gráfico 9 – Metilação do gene *Pomc* no grupo controle de ambos os sexos

Filhotes machos que receberam dieta controle (MC); Filhotes fêmeas que receberam dieta controle (FC).

Gráfico 10 – Metilação do gene *Pomc* no grupo deficiente de ambos os sexos

Filhotes machos que receberam dieta deficiente (MD); Filhotes fêmeas que receberam dieta deficiente (FD).

Gráfico 11 – Metilação do gene *Pomc* do grupo suplementado de ambos os sexos

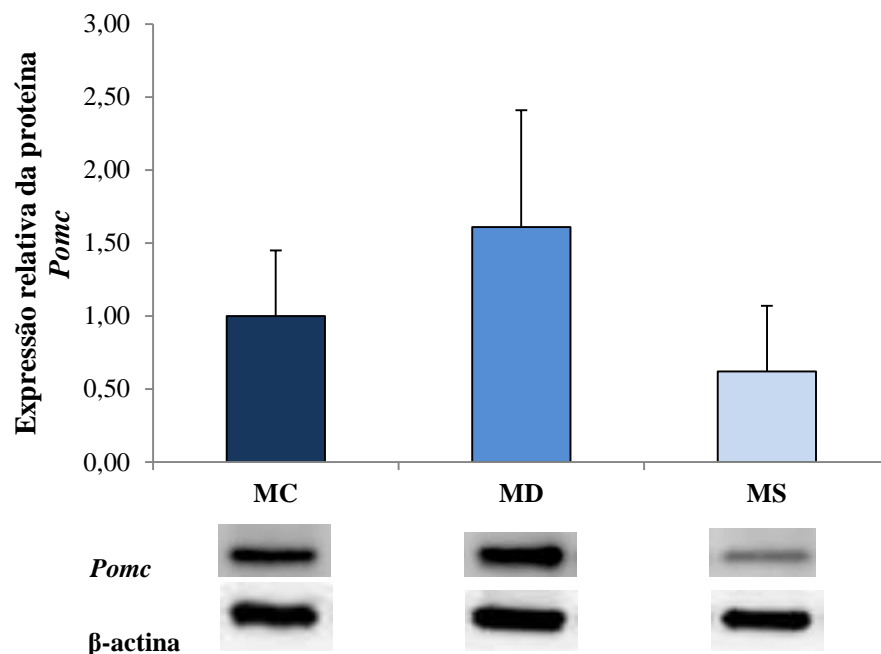


Filhotes machos que receberam dieta suplementada (MS); Filhotes fêmeas que receberam dieta suplementada (FS).

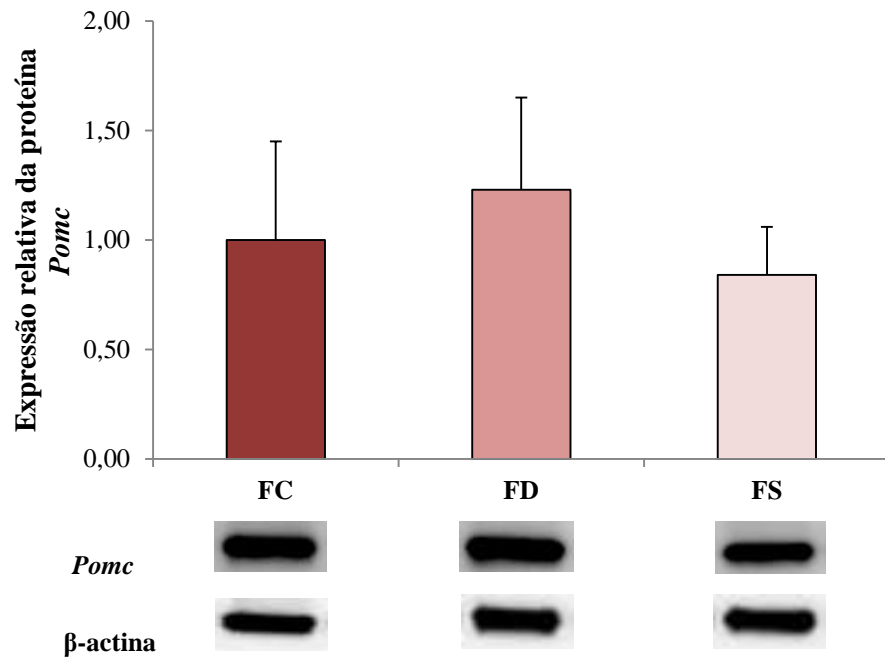
5.6 EXPRESSÃO PROTÉICA DE *Pomc*

Na expressão proteica de *Pomc* não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento, tanto nos filhotes machos quanto nas fêmeas.

Gráfico 12 – Expressão proteica de *Pomc* nos filhotes machos



MC (Filhotes machos que receberam dieta controle); MD (Filhotes machos que receberam dieta deficiente); MS (Filhotes machos que receberam dieta suplementada).

Gráfico 13 – Expressão protéica de *Pomc* nos filhotes fêmeas

FC (Filhotes fêmeas que receberam dieta controle); FD (Filhotes fêmeas que receberam dieta deficiente); FS (Filhotes fêmeas que receberam dieta suplementada).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo não apresentaram diferença estatística significativa na expressão gênica, na metilação e na expressão proteica de *Pomc*, provavelmente devido à quantidade de ácido fólico que foi utilizada nas dietas deficiente e suplementada, a qual teve uma diminuição ou aumento, respectivamente, de 4 vezes a da dieta controle (2mg/kg), visto que em outros estudos esta diferença chegava a ser de 10 ou 20 vezes a mais da dieta controle (ACHON et al., 2000; WANG et al., 2012; CHO et al., 2013a BARUA et al., 2016b).

Outro aspecto importante que deve ser considerado é que a biossíntese de folato pelas bactérias intestinais podem atender grande parte da exigência de folato (RONG et al., 1991), o que justificaria a não diferença estatística nos resultados obtidos pelo presente trabalho. Para indução da deficiência de ácido fólico são necessários períodos prolongados de alimentação a base de aminoácidos e/ou com 1% do fármaco succinilsulfatiazol, para inibir estas bactérias intestinais (WALZEM; CLIFFORD, 1988), como realizado no estudo de Jadavji et al. (2015), no qual também utilizou 1% de succinilsulfatiazol em todas as dietas maternas da pesquisa, inclusive na dieta deficiente em ácido fólico (0,3 mg/kg), e desta forma conseguiu obter diferenças significativas entre os grupos de tratamento. Outra pesquisa que também utilizou este fármaco em todas as dietas maternas (controle; deficiente em ácido fólico (0,0mg/kg); e dieta deficiente em ácido fólico e suplementada em colina) do estudo foi mostrado diferenças significativas nas análises referente ao desenvolvimento cerebral da prole (CRACIUNESCU et al., 2010).

Em nossa pesquisa este procedimento supracitado não foi realizado, uma vez que, após a implantação do programa de fortificação de ácido fólico em farinhas de trigo – no Brasil foi instituído em 2002, de acordo com o Ministério da Saúde – houve uma redução significativa da deficiência desta vitamina na população. Wang et al. (2016) em seu estudo, envolvendo 16.648 mulheres grávidas, mostrou grande eficácia do programa de fortificação da farinha com ácido fólico nesta população de estudo, entre os benéficos estão a diminuição da deficiência e a redução significativa ($p < 0,001$) de crianças nascidas com algum defeito no tubo neural.

Em uma pesquisa foi observado que em alguns alimentos, como biscoitos e lanches preparados com farinha fortificada com ácido fólico, comercializados no Brasil, apresentaram maior quantidade de ácido fólico do que o recomendado (GODOY et al., 2014).

Desta forma optou-se por não zerar a quantidade de ácido fólico na dieta deficiente, em razão de, na prática clínica, a deficiência total desta vitamina não é mais comum entre os

indivíduos, e além de outros benefícios, o ácido do fólico tem efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA (GUO et al., 2015).

Os resultados encontrados em nossa pesquisa, em relação aos pesos e consumo de ração dos filhotes machos, corroboram, em parte, com os resultados dos trabalhos de Cho et al. (2013a) visto que, filhotes 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. O estudo supracitado realizou a pesquisa apenas com filhotes machos, já em nossa pesquisa também envolveu filhotes fêmeas. Nas primeiras semanas pós desmame as fêmeas de mães alimentadas com dieta suplementada com ácido fólico apresentaram maior peso, o que condiz com a pesquisa feita por Penailillo et al. (2015), na qual 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. Todavia, em nosso estudo observou-se que, para as fêmeas, mantendo a dieta suplementada com ácido fólico o peso não foi reduzido para este sexo.

No presente estudo observou-se que o consumo dos filhotes machos alimentados com dieta deficiente em ácido fólico, foi maior em relação ao grupo controle. O trabalho de Jadavji et al. (2015) também mostrou que os filhotes machos de mães alimentadas com dieta deficiente em ácido fólico (0,3 mg/kg) pesavam significativamente ($p < 0,001$) mais que aqueles de mães alimentadas com dieta controle (2 mg de ácido fólico/kg).

Já Cho et al. (2015) 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 (CHO et al., 2013a).

Nos filhotes fêmeas não observou-se este efeito protetor do ácido fólico, visto que estes filhotes que receberam dieta suplementada em ácido fólico na gestação e no pós desmame apresentaram maior consumo (em alguns períodos do estudo) e maior ganho de peso. Este resultado afirma a hipótese de que o fornecimento da dieta suplementada em vitaminas que são doadoras de grupo metil, como o ácido fólico, faria com que o gene

expressasse menos, e como é um gene supressor do apetite, ocasionaria desta forma, maior consumo e maior ganho de peso do animal. Todavia, não está claro o motivo da diferença entre os sexos.

Em outro estudo observou-se que a média dos pesos dos filhotes machos e fêmeas de mães alimentadas com dieta suplementada com ácido fólico e desmamados com dieta controle foi significativamente (4%, $p < 0,001$) maior do que aqueles filhotes de mães alimentadas com dieta controle (SIE et al., 2011).

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 dieta do filhote.

Em nosso estudo não encontramos diferenças significativas no peso do cérebro dos filhotes machos e fêmeas, dos grupos controle, deficiente e suplementado. Em uma pesquisa, na qual ratas foram submetidas às dietas deficiente em ácido fólico (0,3 mg/kg) e controle (2 mg de ácido fólico/kg) durante a gestação e lactação, também não foi encontrada diferença significativa entre o peso do cérebro na prole, independente da dieta materna (JADAVJI et al., 2015).

Modelos de ratas hiper-homocisteinêmicas tratadas com ácido fólico (administração intragástrica – dose de 20mg/kg) não apresentaram diferença significativa no peso do cérebro da prole comparado com os filhotes de mães do grupo controle (sem hiperhomocisteinemia e sem o tratamento com ácido fólico), como observado em nossa pesquisa (WANG et al., 2012).

Em outra pesquisa, envolvendo diferente intervenção, sem ser questão alimentar, observou-se que ratas prenhas sob estresse crônico também não apresentou diferença estatística significativa entre os pesos dos cérebros dos filhotes, independente do sexo e do grupo de tratamento (HUANG et al., 2012).

Na pesquisa de Bautista et al. (2016) observou-se que os filhotes fêmeas com 32 dias pós-nascimento de mães alimentadas com dieta controle ou dieta obesogênica (dieta rica em gorduras), não apresentaram diferença estatística significativa no peso do cérebro entre os dois grupos de estudo.

Em um trabalho foi observado que ratas alimentadas com dieta controle (18% de proteína/ 2 mg de ácido fólico/kg de dieta) ou suplementada com ácido fólico (12% de proteína/ 8 mg de ácido fólico/kg de dieta) durante a gravidez também não ocasionou em alteração significativa no peso do cérebro dos filhotes, tanto nos machos como nas fêmeas (JOSHI et al., 2004).

Sabe-se que os nutrientes envolvidos no metabolismo do carbono 1, como ácido fólico e colina, durante a gestação e lactação são de extrema importância para o desenvolvimento cerebral da prole e que dependendo da dieta materna podem provocar alterações na função deste órgão. Assim, sugere-se que os benefícios da dieta adequada com essas vitaminas estejam ligados à adequada diferenciação de neurônios durante a neurogênese e não ao tamanho do cérebro em si, o que explicaria o resultado de nossa pesquisa, que independente da intervenção alimentar, o tamanho do cérebro não sofre alterações significativas (CRACIUNESCU et al., 2004; ZEISEL, 2006; ZEISEL, 2009;).

Em nosso estudo a expressão gênica de *Pomc* foi diferente nos grupos de tratamento e nos sexos, entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Penailillo et al. (2015) mostraram que a suplementação de ácido fólico (8 mg/kg) também ocasionou alterações, não estatisticamente significativas, na expressão de genes de seu estudo na prole dependendo do sexo. Estes pesquisadores não encontraram diferença estatística significativa entre as fêmeas, em relação à expressão do gene 11 β -HSD2, já referente ao gene DNMT1 não houve diferença significativa nos machos, bem como nas fêmeas.

No estudo de Huot et al. (2016), como em nosso estudo, foi observado que a expressão do gene *Pomc* apresentou-se maior nos filhotes machos e menor nas fêmeas que receberam dieta suplementada com ácido fólico, na gestação e no pós desmame, do que no grupo controle, todavia esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Igualmente mostrado no atual trabalho, um outro estudo também observou-se que a expressão de *Pomc* foi maior nos filhotes machos que receberam dieta suplementada com ácido fólico na gestação e no pós-desmame. Entretanto, foi mostrado que o folato sozinho (apenas durante a gestação, através da dieta materna) pode ocasionar diminuição da expressão do gene *Pomc* e, conseqüentemente, aumento do peso e consumo de dieta na prole, levando ao fenótipo obesogênico. Mostrando que no pós-desmame a suplementação de ácido fólico age como protetor para este fenótipo (CHO et al., 2013b).

A expressão dos genes *Pomc* e *Ob-Rb* (*leptin receptor*) na prole de mães alimentadas com recomendações de vitaminas adequadas e com dez vezes mais as vitaminas que fornecem grupo metil (ácido fólico, vitamina B12 e B6) durante a gestação não diferenciou dos filhotes que tiveram mães alimentadas com dieta contendo dez vezes mais a quantidade do mix multivitamínico e daquelas que alimentaram de dieta com recomendação adequada de vitamina (CHO et al., 2015).

Cho et al. (2015) observaram também que filhotes machos de mães que receberam dieta contendo dez vezes mais a quantidade do mix multivitamínico e contendo ácido fólico

durante a gestação, mostraram aumento significativo (38%, $p = 0,02$) na expressão gênica de *Pomc* em relação aos filhotes de mães que receberam apenas a dieta contendo dez vezes mais a quantidade do mix multivitamínico.

No estudo de Huot et al. (2015) foi observado que a suplementação de ácido fólico na dieta materna e na dos filhotes machos apresentou resultado satisfatório, como redução da resistência à insulina, todavia, esta intervenção em filhotes fêmeas levou a maior resistência à insulina. Além deste aspecto, eles mostraram que a dieta suplementada com ácido fólico foi associada com alterações no peso corpóreo e expressão gênica hipotalâmica na prole dependente do sexo. Nos filhotes fêmeas observou-se maior expressão gênica de *Npy* e *Agrp*, que são neuropeptídeos envolvidos nos mecanismos de aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético. Em nosso estudo estes genes não foram analisados, sendo assim, pode-se hipotetizar que estes genes poderiam também estar mais expressos nos filhotes fêmeas da nossa pesquisa, visto que se realizou intervenção similar (dieta materna e no pós desmame suplementada com ácido fólico) e estas apresentaram maior ganho de peso e, em alguns momentos do estudo, maior consumo também.

Os padrões de metilação são estabelecidos durante a embriogênese, 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. 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, provocando alterações fenotípicas permanentes na prole (FENG et al., 2010; XU; SINCLAIR, 2015; SMITH; RYCKMAN, 2015).

Contrariamente a hipótese inicial e a literatura, como supracitado, em nosso resultado não foi observada diferença entre os grupos de tratamento (suplementado e deficiente em ácido fólico), apresentando ambos com hipometilação (entre 0 e 10% de metilação).

Este mesmo achado foi observado por Maloney et al. (2007), onde expôs ratas fêmeas em período gestacional à dieta deficiente em ácido fólico com baixas concentrações de metionina e colina, e mesmo interferindo nos diversos nutrientes que fornecem grupos metil não observou modificações estatísticas significativa na metilação global da mãe e de seus filhotes.

Em um estudo mostrou-se que a dieta materna suplementada com ácido fólico (5mg/kg de ração) durante a gestação e lactação, reduziu significativamente a metilação global do DNA e a atividade de DNMT no fígado da prole. Esta mesma dieta materna também provocou diminuição significativa na metilação nas regiões promotoras dos genes

Ppar-γ, *ER-α*, *p53* e *Apc*. Como em nossa pesquisa com o gene *Pomc*, este estudo não encontrou interação significativa entre a dieta materna e dos filhotes em influenciar regiões específicas de metilação do DNA dos genes na prole (SIE et al., 2013).

Cho et al. (2013a) verificaram que a dieta suplementada com ácido fólico durante a gestação, através da dieta materna, e no pós desmame, pelos filhotes, não teve efeito na metilação global do hipotálamo na prole, e apresentaram hipometilação específica no gene *Pomc* comparados com aqueles filhotes que receberam dieta controle na gestação e no pós desmame. Em outro estudo, observou-se também que a suplementação com ácido fólico no pós-desmame na prole ocasionou diminuição significativa na metilação global do DNA colorretal (SIE et al., 2011).

A hipometilação fortalece o conceito de remodelação epigenética que responde a fatores ambientais para estabelecer o fenótipo ao longo da vida. Sie et. al. (2013) sugeriram que as unidades de carbono 1 fornecidas pela suplementação de ácido fólico nestes dois períodos (gestação e no pós-desmame) são preferencialmente fornecidos para síntese de DNA e não apenas para metilação, a ponto de alterar o padrão de metilação, o que parcialmente também poderia explicar não termos encontrado diferenças na metilação de *Pomc* nos diferentes tratamentos.

Outro aspecto importante é que se uma das vitaminas, como por exemplo, ácido fólico e colina, que estão envolvidas no metabolismo do carbono 1, está em falta, a outra pode ser capaz de atender parte da demanda para este processo, desta forma existem vias paralelas para garantir o fornecimento adequado de doadores metil (ZEISEL, 2006; ZEISEL, 2009). Outro estudo observou que a colina pode compensar alguns dos efeitos da deficiência de folato (CRACIUNESCU et al., 2010). Assim, há dados na literatura que podem justificar não termos encontrado diferenças na metilação nos grupos de tratamento.

Em relação à expressão de proteína *Pomc*, os nossos resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os machos e fêmeas, dos distintos grupos de tratamento. Todavia, observou-se que os filhotes, tanto machos como fêmeas que receberam dieta deficiente em ácido fólico apresentaram maior expressão proteica de *Pomc*, e os que receberam dieta suplementada teve menor expressão comparada com os grupos deficiente e controle.

Em um estudo, que apresentou resultado divergente ao encontrado pelo nosso, todavia, utilizando outra proteína, observou que os níveis de proteínas de 11β-HSD2 nos filhotes machos alimentados com dieta suplementada com ácido fólico foi maior (89%) do que no grupo controle (PENAILILLO et. al., 2015).

Barua et al. (2016a) mostraram que os filhotes machos de mães alimentadas com dieta deficiente ou suplementada com ácido fólico não apresentaram diferença estatística significativa na expressão proteica de *Gad1*, e a de *Park2* (ambos expressos nos cerebelo) também não mostrou diferença estatística tanto nos machos como nas fêmeas, sob a intervenção das duas dietas.

Filhotes fêmeas alimentadas com dieta de alto teor de gordura e baixa concentração de selênio e folato, ou dieta de alto teor de gordura e concentração adequada de selênio e folato no pós-desmame, não mostrou efeito na expressão proteica no cólon da prole. Além disso, foi verificado que a expressão gênica e proteica no fígado não apresentaram correlação (BERMINGHAM et al., 2013).

O ácido fólico, como outros componentes da dieta, está envolvido em diversas vias por ser doador de grupo metil. Desta forma, a dieta materna envolvendo essa vitamina tem grande influência sobre a modulação epigenética da prole, envolvendo não apenas a metilação do DNA, mas também a modificação de histonas e miRNAs, que juntos fazem parte do controle da expressão gênica, resultando em alterações fenotípicas (CHANGO; POGRIBNY, 2015). Os miRNAs regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente e seus alvos são mRNAs. Esta regulação inibe a expressão de proteínas codificadas por estes mRNA (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Há vários fatores de transcrição e mecanismos que são responsáveis pela adequada expressão do gene *Pomc*. Este gene é regulado principalmente pelo hormônio hipotalâmico liberador de corticotrofina (CGH) (DROUIN, 2016) e, recentemente, foi mostrado que o miRNA, miR-375, regula negativamente a via de sinalização do CGH afetando a expressão gênica de *Pomc* (ZHANG et al., 2013). Deste modo, sugere-se que provavelmente pode ter havido a atuação de miRNAs, interferindo assim nos resultados obtidos. Na pesquisa de Shookhoff e Gallicano (2010) foi observado que a deficiência de ácido fólico e hipometilação está relacionado com superexpressão de miRNAs.

A intervenção com ácido fólico na dieta materna e na dieta dos seus respectivos filhotes acarretou em diferentes resultados nos machos e nas fêmeas. Nos filhotes machos verificou-se que o ganho de peso e o consumo da dieta foram maiores no grupo deficiente, o que condiz com o resultado da expressão do gene *Pomc*, no qual, mesmo não tendo diferença estatisticamente significativa, observou-se que a expressão gênica apresentou ser menor no grupo deficiente do que no grupo suplementado e controle. Nas fêmeas, o ganho de peso e o consumo da dieta foram maiores no grupo suplementado, todavia, corresponde também com a expressão do gene *Pomc*, de modo que ele apresentou ser menos expresso no grupo

suplementado do que o grupo deficiente. Os dados encontrados sugerem que a expressão de *Pomc* não está relacionada com a metilação, como também observado no trabalho de Penailillo *et al.* (2015). Em relação à expressão proteica de *Pomc*, na qual também não apresentou diferença estatística significativa, observou-se que os filhotes machos do grupo deficiente apresentou ter maior expressão. Nos filhotes fêmeas, a expressão proteica de *Pomc* apresentou ser maior no grupo suplementado, correspondendo com a expressão gênica.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pelo presente estudo conclui-se que a intervenção com dietas controle, deficiente e suplementada com ácido fólico não ocasionou alterações significativas na prole, em relação ao estudo de proteômica e aos padrões de metilação e expressão do gene *Pomc*.

Quanto ao peso corpóreo e consumo de ração dos animais mostrou-se que a suplementação com ácido fólico durante a gestação e no pós desmame foi capaz de alterar estes dois parâmetros, com resposta divergente entre os machos e fêmeas na prole adulta.

Como também mostrado em outros trabalhos, estas diferenças fenotípicas obtidas entre os sexos nos filhotes submetidos ao mesmo tratamento continuam a ser elucidado, necessitando mais estudos envolvendo os diversos mecanismos epigenéticos, bem como diferentes intervenções alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABLES, G. P.; HENS, J. R.; NICHENAMETLA, S. N. Methionine restriction beyond life-span extension. **Ann N Y Acad Sci**, Feb 24 2016.
- ACHON, M. et al. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. **Br J Nutr**, v. 83, n. 2, p. 177-83, Feb 2000.
- ALEGRIA-TORRES, J. A.; BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and lifestyle. **Epigenomics**, v. 3, n. 3, p. 267-77, Jun 2011.
- ARAND, J. et al. Selective impairment of methylation maintenance is the major cause of DNA methylation reprogramming in the early embryo. **Epigenetics Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- BARUA, S. et al. DNA Methylation Profiling at Single-Base Resolution Reveals Gestational Folic Acid Supplementation Influences the Epigenome of Mouse Offspring Cerebellum. **Front Neurosci**, v. 10, p. 168, 2016a.
- BARUA, S. et al. High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. **J Mol Neurosci**, v. 58, n. 2, p. 277-86, Feb 2016b.
- 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.
- BAUTISTA, C. J. et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. **Br J Nutr**, v. 115, n. 3, p. 538-46, Feb 14 2016.
- BEGUM G. et al. Epigenetic changes in fetal hypothalamic energy regulating pathways are associated with maternal undernutrition and twinning. **FASEB J**, Bethesda, v. 26, n. 4, p. 1694-1703, 2012.
- BELGARDT B.F.; OKAMURA T.; BRÜNING J. C. Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. **J Physiol**, London, v. 587, n. 22, p. 5305-14, 2009.
- BERMINGHAM, E. N. et al. Post-weaning selenium and folate supplementation affects gene and protein expression and global DNA methylation in mice fed high-fat diets. **BMC Med Genomics**, v. 6, p. 7, 2013.
- 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.
- BHUTANI, N.; BURNS, D. M.; BLAU, H. M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866-72, Sep 16 2011.
- BIBBINS-DOMINGO, Kirsten et al. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 357, n. 23, p. 2371-2380, 2007.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-55, Feb 20 2009.

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. 117858, 2015.

CASAS-AGUSTENCH, P.; IGLESIAS-GUTIERREZ, E.; DAVALOS, A. Mother's nutritional miRNA legacy: Nutrition during pregnancy and its possible implications to develop cardiometabolic disease in later life. **Pharmacol Res**, v. 100, p. 322-34, Oct 2015.

CHALLIS, B. G. et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. **Hum Mol Genet**, Oxford, v. 11, n. 17, p. 1997-2004, 2002.

CHANGO, A.; POGRIBNY, I. P. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2748-70, Apr 2015.

CHEN H.; SIMAR D.; MORRIS M.J. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 7, p. 62-69, 2009.

CHEUNG, C. C.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. **Endocrinology**, Springfield, v. 138, n. 10, p. 4489-4492, 1997.

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 2013a.

CHO, C. E. et al. Obesogenic phenotype of offspring of dams fed a high multivitamin diet is prevented by a post-weaning high multivitamin or high folate diet. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 9, p. 1177-82, Sep 2013b.

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.

CHOI S.W. et al. Vitamin B-12 deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. **J Nutr**, Springfield, v. 134, n. 4, p. 750-755, 2004.

COLL, A. P.; LORRAINE TUNG, Y. C. Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. **Mol Cell Endocrinol**, Amsterdam, v. 300, n. 1-2, p. 147-151, 2009.

COMUZZIE A.G. et al. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. **Nat Genet**, New York, v. 15, n. 3, p. 273-276, 1997.

COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural

network in the arcuate nucleus. **Nature**, London, v. 411, n. 6836, p. 480-484, 2001.

CRACIUNESCU, C. N. et al. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. **J Nutr**, v. 134, n. 1, p. 162-6, Jan 2004.

CRACIUNESCU, C. N.; JOHNSON, A. R.; ZEISEL, S. H. Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain. **J Nutr**, v. 140, n. 6, p. 1162-6, Jun 2010.

CRIDER, K. S. et al. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. In: (Ed.). **Adv Nutr**, v.3. p.21-38, 2012.

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

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.

DESHMUKH, R. S. et al. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v. 6, n. 2, p. 177-87, Feb 2011.

DROUIN, J. 60 YEARS OF POMC: Transcriptional and epigenetic regulation of POMC gene expression. **J Mol Endocrinol**, v. 56, n. 4, p. T99-t112, May 2016.

ERIKSSON, J. G. Developmental Origins of Health and Disease - from a small body size at birth to epigenetics. **Ann Med**, p. 1-12, Jun 8 2016.

ESSANDOH, K. et al. Mirna-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. **Shock**, Mar 3 2016.

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.

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.

FRIEDEMANN, CLAIRE et al. Cardiovascular disease risk in healthy children and its association with body mass index: systematic review and meta-analysis. **BMJ: British medical journal**. London, v. 345, p. 4759, 2012.

FUKAMI, T. et al. Mechanism of programmed obesity in intrauterine fetal growth restricted offspring: paradoxically enhanced appetite stimulation in fed and fasting states. **Reprod Sci**, Thousand Oaks, v. 19, n. 4, p. 423-430, 2012.

GEE, C. E. et al. Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. **Nature**, London, v. 306, n. 5941, p. 374-376, 1983.

GLUCKMAN P.D. *et al.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and

disease. **Engl J Med**, Boston, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.

GODOY, A. T. et al. Molar ratio iron: zinc and folic acid in Brazilian biscuits and snacks and test for classification using principal component analyses. **Arch Latinoam Nutr**, v. 64, n. 2, p. 108-15, Jun 2014.

GUO, X. et al. Protective Effect of Folic Acid on Oxidative DNA Damage: A Randomized, Double-Blind, and Placebo Controlled Clinical Trial. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 45, p. e1872, Nov 2015.

HEUVEL J.K. et al. Differential modulation of arcuate nucleus and mesolimbic gene expression levels by central leptin in rats on short-term high-sugar diet. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 82-89, 2014.

HONORATO, Anderson da Silva *et al.* Perfis antropométricos, lipídico e glicêmico em adolescentes de uma instituição filantrópica no noroeste do Paraná. **Bras Patol Med Lab**, Paraná, v. 46, n. 1, p. 7-15, 2010.

HUANG, Y. et al. Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. **BMC Neurosci**, v. 13, p. 22, 2012.

HUOT, P. S. et al. Maternal and postweaning folic acid supplementation interact to influence body weight, insulin resistance, and food intake regulatory gene expression in rat offspring in a sex-specific manner. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 4, p. 411-20, Apr 2016.

INGROSSO, D. et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. **Lancet**, v. 361, n. 9370, p. 1693-9, May 17 2003.

JACOBOWITZ, D. M.; O'DONOHUE T. L. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 12, p. 6300-6304, 1978.

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.

JAENISCH R.; BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, New York, v. 33, p. 245-254, 2003.

JI, Y. et al. Nutritional epigenetics with a focus on amino acids: implications for the development and treatment of metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**, v. 27, p. 1-8, Jan 2016.
 JIAO, F. et al. Protective effects of maternal methyl donor supplementation on adult offspring of high fat diet-fed dams. **J Nutr Biochem**, v. 34, p. 42-51, Apr 27 2016.

JOSHI, S. et al. Differential effects of fish oil and folic acid supplementation during pregnancy in rats on cognitive performance and serum glucose in their offspring. **Nutrition**, v. 20, n. 5, p. 465-72, May 2004.

KAUSHIK S. et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons lipolysis. **EMBO Rep.**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 258-265, 2012.

KIM, K. C. et al. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **J Nutr Biochem**, v. 20, n. 12, p. 917-926, 2009.

KING, J. C. A. Summary of Pathways or Mechanisms Linking Preconception Maternal Nutrition with Birth Outcomes. **J Nutr**, v. 146, n. 7, p. 1437s-44s, Jul 2016.

KOHL, I. **Pesquisa de genes e/ou segmentos cromossômicos em pacientes com obesidade e/ou hiperfagia, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldades de aprendizado e distúrbios de comportamento.** 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nat Genet**, New York, v. 19, n. 2, p. 155-157, 1998.

KUEHNEN P. et al. An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. **PLoS Genet**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 125-132, 2012.

LEVITOV A.B.; DALLAS A.P.; SLONIM A. D. *Bioquímica Ilustrada de Harper (Lange)*. 29 ed. **AMGH editora**, 2013. cap. 2 seção V, p. 459-516, 2013.

LI C. et. al. IUGR alters term fetal baboon hypothalamic appetitive peptide balance. **J Endocrinol**, Texas, v. 217, n. 3, p. 275-282, 2014.

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.

LU, D. et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. **Nature**, London, v. 371, n. 6500, p. 799-802, 1994.

LUKASZEWSKI M.A. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 10, p. 1195-1207, 2013.

MALONEY, C. A.; HAY, S. M.; REES, W. D. Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. **Br J Nutr**, v. 97, n. 6, p. 1090-8, Jun 2007.

MARCO A. et al. High fat diet induces hypermethylation of the hypothalamic Pomc promoter and obesity in post-weaning rats. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 2844-53, 2013.

MARQUES-LOPES I. et al. Aspectos genéticos da obesidade. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2004.

- MARTINEZ, J. A. et al. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. **Asia Pac J Clin Nutr**, London, v. 17, n. 1, p. 119-122, 2008.
- 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.
- MILLIAN N.S.; GARROW T.A. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 356, n. 1, p. 93-98, 1998.
- MIZUNO, T. M.; MOBBS, C. V. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 2, p. 814-817. 1999.
- MOUNTJOY, K. G. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. **Biochem J**, London, v. 428, n. 3, p. 305-324, 2010.
- MUST, A. et. al. Occurrence and timing of childhood overweight and mortality: findings from the third harvard growth study. Boston, 2012. **J Pediatr**, Saint Louis, v. 160, n. 5, p. 743-750, 2012.
- OLLMANN, M.M. et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related. **Science**, New York, v. 278, v. 5335, p. 135-138, 1997.
- PADMANABHAN, N. et al. Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects On Development. **Cell**, v. 155, n. 1, Sep 26 2013.
- PALOU A. *et al.* Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. **Br J Nutr**, v. 106, n. 5, p. 769-778, 2011.
- 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.
- PLAGEMANN A. et al. Hypothalamic proopi melanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and metabolic syndrome. **J Physiol**, London, v. 587, n. 20, p. 4963-76, 2009.
- 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REMELY, M. et al. Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 18, n. 4, p. 328-33, Jul 2015.
- ROCHTUS, A. et al. Nutri-epigenomic Studies Related to Neural Tube Defects: Does Folate Affect Neural Tube Closure Via Changes in DNA Methylation? **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 13, p. 1095-102, 2015.

- RONG, N. et al. Bacterially synthesized folate in rat large intestine is incorporated into host tissue folyl polyglutamates. **J Nutr**, v. 121, n. 12, p. 1955-9, Dec 1991.
- SERRA-MAJEM, Lluís; BAUTISTA-CASTAÑO, Inmaculada. Etiology of obesity: two “key issues” and other emerging factors. **Nutr Hosp**, Madrid, v. 28, n. 5, p. 32-43, 2013.
- SHOOKHOFF, J. M.; GALLICANO, G. I. A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. **Genesis**, v. 48, n. 5, p. 282-94, May 2010.
- SIE, K. K. et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on colorectal cancer risk in the offspring. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1687-94, Dec 2011.
- 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.
- SINCLAIR, K.D et. al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 104, n. 49, p. 19351-6, 2007.
- 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.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. et al. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. **Hum Reprod Update**, v. 19, n. 6, p. 640-55, Nov-Dec 2013.
- STEVENS, A.; BEGUM, G.; WHITE, A. Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: a mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 194-201, Jun 11 2011.
- STUPPIA, L. et al. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 120, 2015.
- SU, X.; WELLEN, K. E.; RABINOWITZ, J. D. Metabolic control of methylation and acetylation. **Curr Opin Chem Biol**, v. 30, p. 52-60, Feb 2016.
- TAKAHASHI, H; MORI, M. Characteristic and significance of criteria for obesity disease in Japan 2011. **Nihon Rinsho**, Osaka, v. 71, n. 2, p. 257-261, 2013.
- TAN, C. M. *et al.* Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 559-609, 2004.
- TANG, W.Y.; HO, S.M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**, Boston, v. 8, n. 2, p. 173-182, 2007.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. UnB Agência. **Obesidade custa R\$ 488 milhões por ano ao SUS**. Brasília, DF, 2013. Disponível em:

<<http://www.unb.br/noticias/unbagencia/cpmod.php?id=94270#>>.

VARELA L.; HORVATH T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBO Rep.**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1079-1086, 2012.

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

WALZEM, R. L.; CLIFFORD, A. J. Folate deficiency in rats fed diets containing free amino acids or intact proteins. **J Nutr**, v. 118, n. 9, p. 1089-96, Sep 1988.

WANG, H. et al. Effectiveness of Folic Acid Fortified Flour for Prevention of Neural Tube Defects in a High Risk Region. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 152, Mar 2016.

WANG, J. et al. Folic acid supplementation attenuates hyperhomocysteinemia-induced preeclampsia-like symptoms in rats. **Neural Regen Res**, v. 7, n. 25, p. 1954-9, Sep 5 2012.

WANG, X. et al. Leptin resistance and obesity in mice with deletion of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) neurons. **Diabetologia**, v. 57, n. 1, p. 236-245, 2014.

WATERLAND R.A.; JIRTLE R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol.**, Washington, v. 23, n. 15, p. 1089-1093, 2003.

WATERLAND R.A.; JIRTLE R.L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition**, Burbank, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2004.

WATERLAND R.A.; MICHELS K.B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annu Rev Nutr.**, Palo Alto, v. 27, n. 6, p. 363-388, 2007.

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

ZHAN C. et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. **J Neurosci.**, United States, v. 33, n. 8, p. 3624-32, 2013.

ZEISEL, S. H. The fetal origins of memory: the role of dietary choline in optimal brain development. **J Pediatr**, v. 149, n. 5 Suppl, p. S131-6, Nov 2006.

ZEISEL, S. H. Importance of methyl donors during reproduction. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 2, p. 673s-7s, Feb 2009.

ZHANG, N. et al. MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogen-activated protein kinase 8. **J Biol Chem**, v. 288, n. 15, p. 10361-73, Apr 12 2013.

APÊNDICE A – MODIFICAÇÕES REALIZADAS DO PROTOCOLO TRIZOL® REAGENT (LIFE TECHNOLOGIES™)

Precipitação da proteína.

1. Adicionar 200µl de etanol 100% no lizado da amostra.
2. Adicionar 600µl de acetona no sobrenadante com fenol-etanol por 1 ml do Trizol® Reagent usado no início da homogeneização.
3. Misturar por inversão por 15 segundos para obter uma solução homogeneizada.
4. Incubar as amostras por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12.000g (10.500rpm) por 10 minutos a 4°C. Após, remover e descartar o sobrenadante.

Lavagem da proteína

1. Lavar o pellet de proteína com 500µl de 0.3M de cloridrato de guanidina em etanol 95%.
2. Após, adicionar mais 500µl de 0.3M de cloridrato de guanidina em etanol 95%.
3. Passar no vortex brevemente. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 8.000g (7.000rpm) por 5 minutos a 4°C.
5. Repetir a etapa 1 a 4 duas vezes.
6. Para lavagem final adicionar 1.000µl de etanol 100%.
7. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 8.000g (7.000rpm) por 5 minutos a 4°C.
9. Descarte o sobrenadante (etanol), inverte o tubo para secar o pellet por 10 minutos a temperatura ambiente.

Ressuspensão do pellet de proteína

1. Adicionar 100µl de SDS 1%.
2. Sonicator (5 ciclos: 15 segundos sonicator/ 30 segundos incubação em gelo).
3. Incubar no banho-maria a 100°C por 3 minutos.
4. Centrifugar a 8.700rpm por 10 minutos a 4°C.
5. Transferir o sobrenadante (contendo a proteína) para um novo tubo.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 005/2014-1, sobre o projeto intitulado “*Padrões de metilação e expressão do gene POMC na prole de ratas submetidas às dietas deficiente e suplementada com ácido fólico*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Hélio 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 30 de junho de 2014.

We certify that the protocol nº 005/2014-1, entitled “*Methylation patterns and expression of the POMC gene in the offspring of rats subjected to diets deficient and supplemented with folic acid*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 06/30/2014.

Ribeirão Preto, 30 de junho de 2014.



Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP