



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Impacto metabólico transgeracional da suplementação com ácido fólico  
durante a gestação**

**Transgenerational metabolic impact of folic acid supplementation during  
pregnancy**

**Rita Micaela Teixeira Fernandes**

**Orientado por: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria da Conceição Costa Pinho Calhau**

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Elisa Oliveira Braga Keating**

**Trabalho de Investigação**

**Ciclo de estudos: 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição**

**Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto**

**Porto, 2012**



## **Dedicatória**

A ti, mãe e pai.



### **Contributo Pessoal**

No desenvolvimento deste projeto fui responsável pela execução das técnicas de doseamento de hormonas e citocinas, tratamento de todos os resultados apresentados e pela discussão dos mesmos. Os resultados que são apresentados em anexo foram obtidos previamente à minha integração neste projeto.



## Lista de Abreviaturas

**AF** – Ácido fólico

**ANOVA** – Análise de variância a dois fatores

**C** – Controlo

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**E.U.A.** - Estados Unidos da América

**G<sub>0</sub>** – Geração 0

**G<sub>1</sub>** – Geração 1

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**PCR** – Proteína C reativa

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SAF** – Suplementação com ácido fólico

**SEM** – Erro padrão da média

**SM** – Síndrome metabólica

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa



## Resumo

A nutrição é determinante na promoção da saúde e prevenção da doença durante todo o ciclo de vida e, em particular, durante a gravidez e o desenvolvimento fetal. O folato é fundamental na gravidez e, como outros componentes da dieta, pode alterar a metilação do DNA, uma via de regulação epigenética.

Apesar de estarem bem demonstrados os efeitos benéficos da suplementação com ácido fólico durante o período periconcepcional, a determinação da dose máxima recomendada bem como os potenciais efeitos a longo prazo desta suplementação na saúde da descendência, permanecem largamente desconhecidos.

Foi assim objetivo deste trabalho avaliar o impacto metabólico sobre a descendência da suplementação materna com doses elevadas de ácido fólico. Para tal foram usados ratos fêmea Sprague-Dawley adultas expostas a uma dose diária de 40 mg de ácido fólico/kg de ração por dia, por comparação com o grupo controlo, exposto a uma dose de 2 mg de ácido fólico/kg de ração por dia (correspondente à dose recomendada). A suplementação começou no período de acasalamento, mantendo-se até ao final da lactação.

Na descendência das mães expostas a elevadas doses de ácido fólico observou-se (aram-se): (i) menor tolerância oral à glicose aos 13 meses de idade; (ii) nas fêmeas, um ganho ponderal significativamente maior; e (iii) níveis significativamente mais elevados de leptina e menores de adiponectina, aos 13 meses de idade (e não aos 3 meses de idade), em ambos os sexos.

Conclui-se que a suplementação com doses elevadas de ácido fólico durante o período periconcepcional induz perturbações metabólicas na descendência, particularmente na idade adulta.

### Palavras-Chave

Ácido fólico; Disfunção metabólica; Exposição *in utero*; Obesidade; Programação fetal.

## Abstract

Nutrition plays a central role in health promotion and disease prevention throughout the life cycle, particularly during pregnancy and fetal development. Folate is vital during pregnancy, and like other components of the diet, it may change the methylation of DNA, a mechanism of epigenetic regulation. Despite the documented benefic effects of periconceptional supplementation with folic acid, the maximum recommended dose and the potential and long-term effects of such supplementation upon offspring's health remains unclear.

Therefore the objective of this work was to evaluate the metabolic impact in the progeny of high maternal dosage supplementation with folic acid. For this 6 Sprague-Dawley female rats were exposed to a daily dosage of 40 mg of folic acid per kg of chow (supplemented group) while other 6 were subject to a recommended dose of 2 mg of folic acid per kg of chow (control group). The supplementation started with mating period and lasted until the end of lactation.

The progeny of the mothers exposed to high dosage of folic acid had: (i) decreased oral glucose tolerance at 13 months of age; (ii) a significant increase in weight gain (females), and (iii) a significant higher level of leptin and lower of adiponectin in both sexes at 13 months, but not at 3 months of age, when compared to respective controls. In conclusion, the periconceptional supplementation with high dosage of folic acid induces metabolic dysfunction in the offspring, particularly in later life.

## Key-words

Fetal programming; Folic Acid; *In utero* exposure; Metabolic dysfunction; Obesity.



## Índice

Dedicatória .....	i
Contributo Pessoal .....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo .....	vii
Palavras-Chave .....	viii
Abstract .....	ix
Key-words .....	ix
Introdução .....	1
Objectivos.....	3
Material e Métodos.....	3
1. Modelo Animal.....	3
2. Avaliação do perfil metabólico.....	4
3. Análise estatística .....	5
Resultados .....	6
1. Avaliação morfométrica .....	6
2. Avaliação do perfil glicémico .....	7
3. Quantificação de parâmetros bioquímicos .....	7
Discussão e Conclusões .....	11
Agradecimentos .....	16
Referências Bibliográficas .....	17
Material suplementar.....	a1



## Introdução

A nutrição é determinante na promoção da saúde e prevenção da doença durante todo o ciclo de vida<sup>(1)</sup> e em particular durante a gravidez e o desenvolvimento fetal<sup>(2)</sup>. O folato é de vital importância particularmente na gravidez, estado em que as necessidades desta vitamina aumentam substancialmente devido ao aumento acentuado da divisão celular<sup>(3)</sup>.

Entre as várias recomendações nutricionais durante a gravidez, o aporte diário de ácido fólico (AF) é, provavelmente, uma das mais consensuais preocupações presentes dado o seu reconhecido papel na prevenção dos defeitos do tubo neural. Tendo por base este conhecimento e esta preocupação, em Portugal é clinicamente recomendada a toma de suplementos vitamínicos de AF durante o período periconcepcional<sup>(4),(5)</sup>.

O AF é a estrutura parental da família dos folatos (vitamina B<sub>9</sub>) que desempenham papel de coenzima em diversas reações de transferência de unidades monocarbonadas, tais como, no metabolismo de aminoácidos e de síntese de purinas e de timidilato. Os folatos são também responsáveis pela remetilação da homocisteína a metionina, precursor da S-adenosilmetionina<sup>(6)</sup> (dador universal de metilos que participa em reações de metilação de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, fosfolípidos e neurotransmissores<sup>(7)</sup>).

As investigações mais recentes mostram que o folato, bem como outros componentes da dieta (como a colina e a metionina) podem alterar a metilação do DNA<sup>(6)</sup>. Esta constitui um dos mecanismos de regulação epigenética, uma área de investigação em enorme desenvolvimento<sup>(8)</sup>.

A epigenética refere-se ao estudo de alterações hereditárias na expressão génica que não podem ser explicadas por alterações na sequência de bases do DNA e,

assim também, ao modo como o ambiente molda o fenótipo. A epigenética manifesta-se dessa forma no fenótipo ao longo da vida e nas gerações seguintes, e pode ser feita por duas vias de maior relevância: a metilação de DNA e a modificação covalente da cromatina por alteração das histonas (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquinação, somiulação, biotinilação)<sup>(9)</sup>. Estes processos epigenéticos herdados transmitem a trajetória de desenvolvimento à descendência<sup>(10)</sup>. Durante os períodos pré e pós-natal inicial, a plasticidade de desenvolvimento em resposta a estímulos ambientais maternos modifica esta trajetória<sup>(11)</sup>, resultando num ajustamento metabólico, independentemente do ambiente ser adequando ou deficitário. Segundo o conceito de *match-mismatch*, se o ambiente adulto for concordante com o ambiente previsto durante o período de desenvolvimento, haverá uma vantagem evolutiva que garante sobrevivência e transmissão desse fenótipo à descendência. No entanto, se se verificar um desfasamento entre o ambiente previsto e o ambiente adulto efetivo, o risco de doença aumenta comprometendo a sobrevivência e a saúde futura da descendência<sup>(12)</sup>.

Há estudos que evidenciam a forte influência da nutrição materna durante a gravidez no ambiente intra-uterino<sup>(13)</sup>. Em estudos realizados em modelos animais, a desnutrição materna global e o baixo aporte proteico originaram uma descendência com restrição de crescimento intra-uterino associada a obesidade, resistência à insulina e disfunção endotelial na vida adulta<sup>(14-16)</sup>, manifestações que em conjunto constituem a síndrome metabólica (SM).

Reconhecendo a importância da suplementação com AF nos períodos críticos do desenvolvimento, têm vindo a criar-se recomendações abrangendo a fortificação generalizada de farinhas e cereais com AF (Estados Unidos da América (E.U.A.)<sup>(17)</sup>,

Canadá<sup>(18)</sup>, por exemplo) ou a recomendação clínica para a suplementação com AF particularmente em mulheres em idade fértil (Portugal<sup>(5)</sup> e outros países da Europa). Estas recomendações generalizadas levantam a inquietação de o aporte de AF exceder os valores máximos recomendados pelo *Institute of Medicine*<sup>(19)</sup> (400 µg em mulheres em idade fértil e os 600 µg durante a gravidez<sup>(20)</sup>).

### Objectivos

Por todos estes motivos, pretendeu-se com este trabalho esclarecer se a suplementação com elevadas doses de AF durante o período perinatal programa a descendência para a disfunção metabólica.

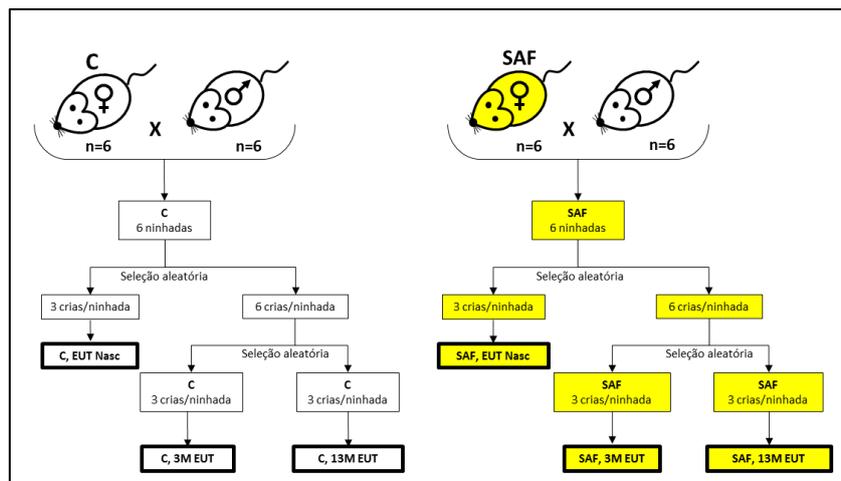
### Material e Métodos

#### 1. Modelo Animal

Neste estudo, utilizou-se um modelo animal. Foram usados 12 ratos adultos (fêmeas) Sprague-Dawley (designados de geração 0, G<sub>0</sub>) e de acordo com o esquema de tratamento (Figura 1), foram constituídos 2 grupos: grupo controlo (controlo, C, n = 6) e grupo alimentado com ração enriquecida em AF (suplementação com ácido fólico, SAF, n = 6). Ao grupo C, de acordo com Achon *et al*<sup>(21)</sup>, foi disponibilizada uma ração contendo um nível de AF adequado para a gravidez (2 mg/kg de ração; *Research Diets*, INC. D10001; E.U.A.) e ao grupo SAF foi disponibilizada uma ração enriquecida com AF, contendo 20 vezes o valor recomendado para a gravidez (40 mg/kg de ração; *Research Diets*, INC. D10032904; E.U.A.). As dietas continham a mesma composição diferindo apenas no teor de AF. A suplementação com AF começou no período de acasalamento e durou toda a gestação e lactação (7 semanas). Um quarto de cada ninhada foi eutanasiado

ao nascimento para colheita de sangue. No desmame, às mães ( $G_0$ ) e crias (geração 1,  $G_1$ ) foi dada uma ração padrão para rato com 0,5 mg de AF por kg de ração (Harlan, Teklad 20145; E.U.A). A ração e água foram disponibilizadas *ad libitum*. A descendência foi eutanasiada aos 3 e aos 13 meses de idade (idades adulta inicial e tardia, respetivamente), para colheita de sangue e de tecidos. Estas amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ao momento de execução dos diversos doseamentos.

As experiências com os animais foram desenvolvidas em concordância com a portaria 1005/92 (nº3, e, iii) da Lei Portuguesa e as directivas comunitárias (86/609/EEC) para experimentação animal e foram coordenadas e executadas por investigadores acreditados.



**Figura 1.** Representação esquemática do desenho experimental. C - controlo; SAF- suplementação com ácido fólico; Nasc - nascimento; 3 M – 3 mês de idade; 13 M – 13 meses de idade; EUT – eutanásia. A cor cinzenta representa o grupo de animais suplementados ou dos seus descendentes.

## 2. Avaliação do perfil metabólico

Aos animais das gerações  $G_0$  e  $G_1$  foi realizada uma avaliação morfométrica (peso do animal, bioimpedância (RLJ Systems, Quantum /S Bioelectrical Impedance Analyzer nº série 200403002; Itália)), avaliação de alguns parâmetros metabólicos (tolerância oral à glicose e alguns doseamentos plasmáticos de glicemia, AF,

homocisteína, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), proteína C reativa (PCR), ácido úrico, insulina, leptina, adiponectina e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ )).

A tolerância oral à glicose da descendência G<sub>1</sub> foi medida aos 13 meses de idade através da administração oral, por gavagem, de 2 mg de glicose por kg de peso corporal após 4 horas em jejum, tendo-se procedido à quantificação de glicose capilar imediatamente antes e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração. A quantificação de parâmetros bioquímicos de glicose, homocisteína, LDL, HDL, PCR e ácido úrico foram realizados através de procedimentos de rotina no Departamento de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João. A quantificação de AF, por fluorimunoensaio (*AutoDelfia® B072-201*, Finlândia), foi executada no Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, de acordo com a descrição do fornecedor. A quantificação, pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), de insulina (*Millipore EZRM-13K*, E.U.A.), de leptina (*Millipore EZRL-83K*, E.U.A.), de adiponectina (*Invitrogen Corporation KRP0041*, E.U.A.) e de TNF- $\alpha$  (*R&D Systems Inc. RTA00, SRTA00, PRTA00*; E.U.A.) no plasma da geração G<sub>1</sub> aos 3 e 13 meses, foi realizada de acordo com a descrição dos fornecedores.

### **3. Análise estatística**

Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para comparação entre dois grupos usou-se o teste *t student* não emparelhado. A significância estatística entre grupos de diferentes idades e com diferentes tratamentos foi avaliada por análise de variância a dois factores (*two way ANOVA*), seguido de teste de *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente

significativas sempre que  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando o programa *GraphPadPrism 5* (*GraphPad Software, Inc.; CA, E.U.A.*).

## Resultados

### 1. Avaliação morfométrica

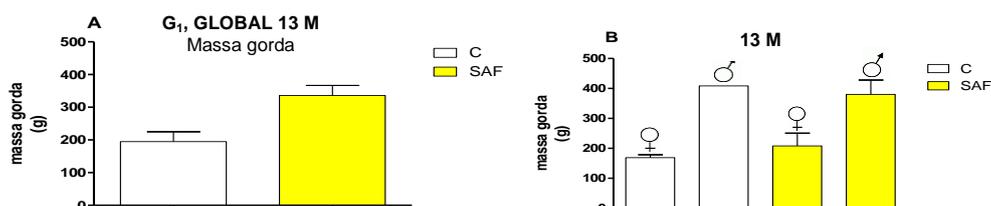
A exposição *in utero* ao AF em doses elevadas não teve qualquer impacto significativo nos seguintes parâmetros avaliados: tamanho da ninhada e percentagem de fêmeas e machos das ninhadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tamanho das ninhadas, e proporção de fêmeas e machos da geração  $G_1$ . Valores em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$

	tamanho da ninhada			% fêmeas			% machos		
	média	sem	$p$	média	sem	$p$	média	sem	$p$
C	15,6	0,7483	0,248	60,75	6,237	1,00	39,25	6,237	0,822
SAF	13,4	1,6		57,6	10,87		42,4	10,87	

A exposição a doses elevadas de AF foi capaz de provocar alterações no peso corporal das fêmeas  $G_1$  ao longo do tempo (Fig. 4S B), embora não tenha havido diferenças significativas neste parâmetro na população global  $G_1$  e na população de machos  $G_1$ .

Quanto aos resultados de bioimpedância aos 13 meses, na  $G_1$ , verificou-se que os valores de massa gorda foram superiores no grupo SAF *versus* o C, não atingindo, no entanto, significado estatístico (Fig. 2A). Quando avaliados os resultados por sexo, verificaram-se diferenças estatísticas entre os sexos, tendo os machos apresentado valores superiores de gordura corporal comparativamente às fêmeas em ambos os grupos de tratamento (Fig. 2B).



**Figura 2.** Valores de massa gorda da G<sub>1</sub> aos 13 meses, por grupos de tratamento (A) e por sexos (B). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico.

## 2. Avaliação do perfil glicémico

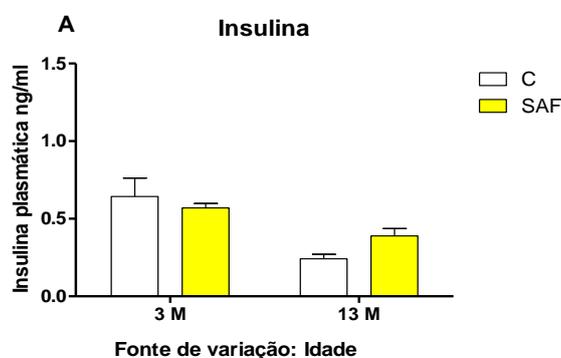
O tratamento com doses elevadas de AF foi capaz de provocar uma diminuição com significado estatístico nos valores de tolerância oral à glicose em G<sub>1</sub> (Fig. 5S B).

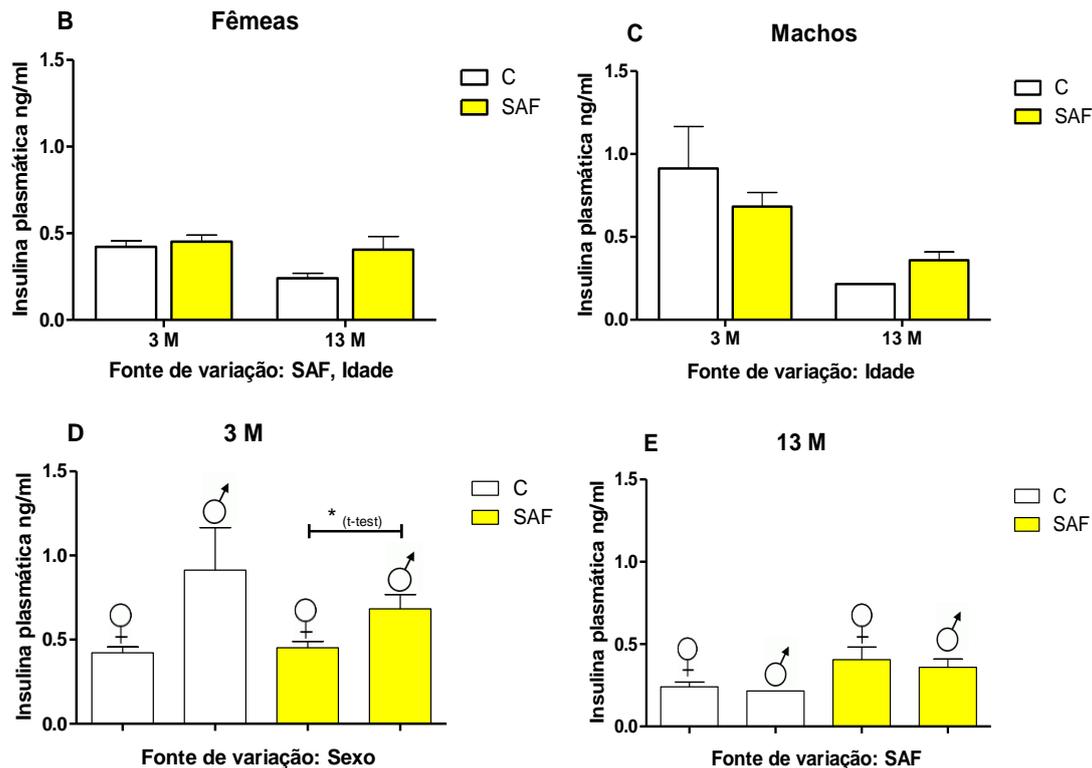
## 3. Quantificação de parâmetros bioquímicos

Foram doseados os seguintes parâmetros, em G<sub>1</sub> aos 3 meses de idade, para os quais não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento: AF, homocisteína, LDL, HDL, ácido úrico, PCR.

A glicemia de G<sub>1</sub>, SAF, aos 3 meses de idade foi superior à do grupo controle (Fig. 6S). Esta diferença perdeu significância estatística aos 13 meses de idade.

Insulina. Os valores plasmáticos de insulina, aos 3 meses e aos 13 meses de idade, na G<sub>1</sub>, revelaram algumas diferenças. No que diz respeito à população global, houve uma diminuição nos níveis de insulina ao longo do tempo (os valores encontrados aos 13 meses de idade foram inferiores aos valores encontrados aos 3 meses de idade). Por outro lado, a suplementação com AF parece provocar um aumento, embora sem significado estatístico, nos níveis de insulina apenas aos 13 meses de idade (Fig. 3A).





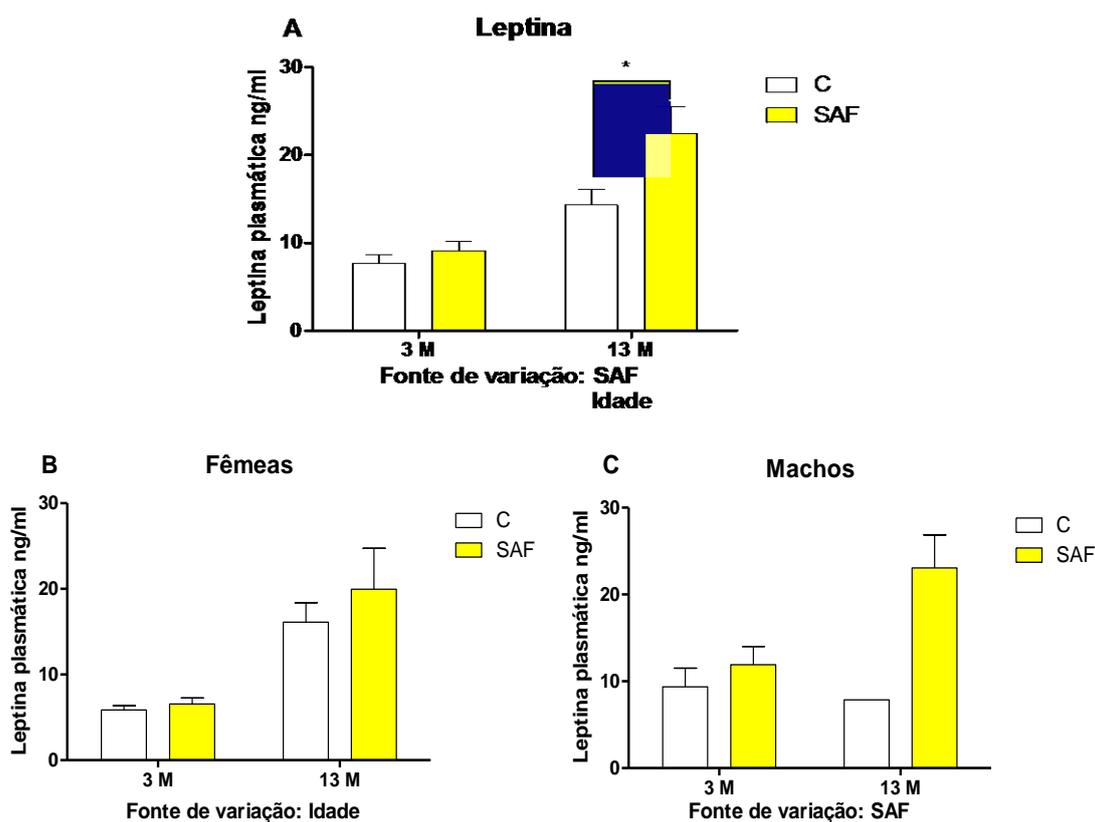
**Figura 3.** Valores de insulina plasmática da G<sub>1</sub> global (A), estratificados por sexos (B e C) e por idade (D e E). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controlo; SAF - suplementação com ácido fólico; 3 M - 3 meses de idade; 13 M - 13 meses de idade.

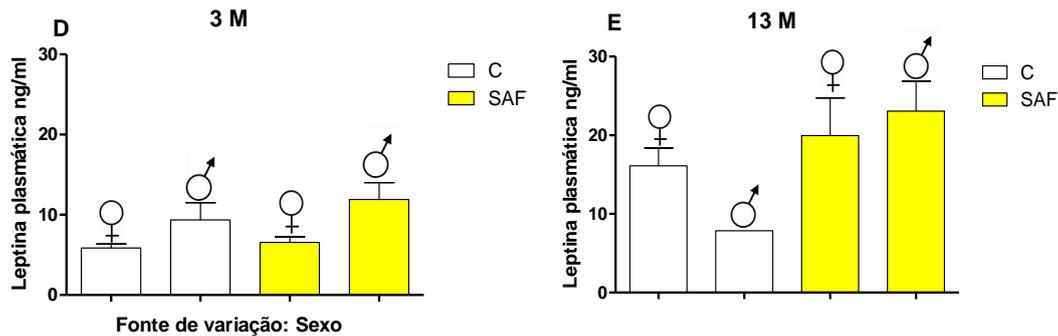
Quando são avaliados os resultados, analisando-os por sexo, conclui-se que, a suplementação com AF faz aumentar os níveis de insulina de uma forma estatisticamente significativa nas fêmeas (Fig. 3B), o mesmo não acontecendo no grupo dos machos (Fig. 3C). Este aumento nos níveis de insulina nos grupos SAF comparado com os respetivos controlos é aparente apenas aos 13 meses de idade e não aos 3 meses (Fig. 3D e E). Por fim, observa-se que os níveis de insulina plasmáticos aos 3 meses de idade são tendencialmente maiores nos machos, comparando com as fêmeas, sendo que esta diferença só tem significado estatístico para o grupo SAF (Fig. 3D).

Leptina. Os valores plasmáticos de leptina na G<sub>1</sub>, revelaram diferenças com significado estatístico. Os valores encontrados aos 13 meses de idade foram

significativamente superiores comparativamente aos valores encontrados aos 3 meses de idade e significativamente superiores nos animais SAF quando comparados com o controlo, aos 13 meses (Fig 4A).

Quando os resultados são analisados por sexos, observa-se que a suplementação com AF parece aumentar os níveis de leptina nas fêmeas e machos de uma forma mais acentuada aos 13 meses de idade, embora estas diferenças não atinjam significância estatística (Fig. 4B e C). Tal como para a insulina, verifica-se que os machos apresentam níveis plasmáticos de leptina mais elevados do que as fêmeas aos 3 meses de idade (Fig. 4D), diferenças estas que não se verificam aos 13 meses de idade (Fig. 4E).

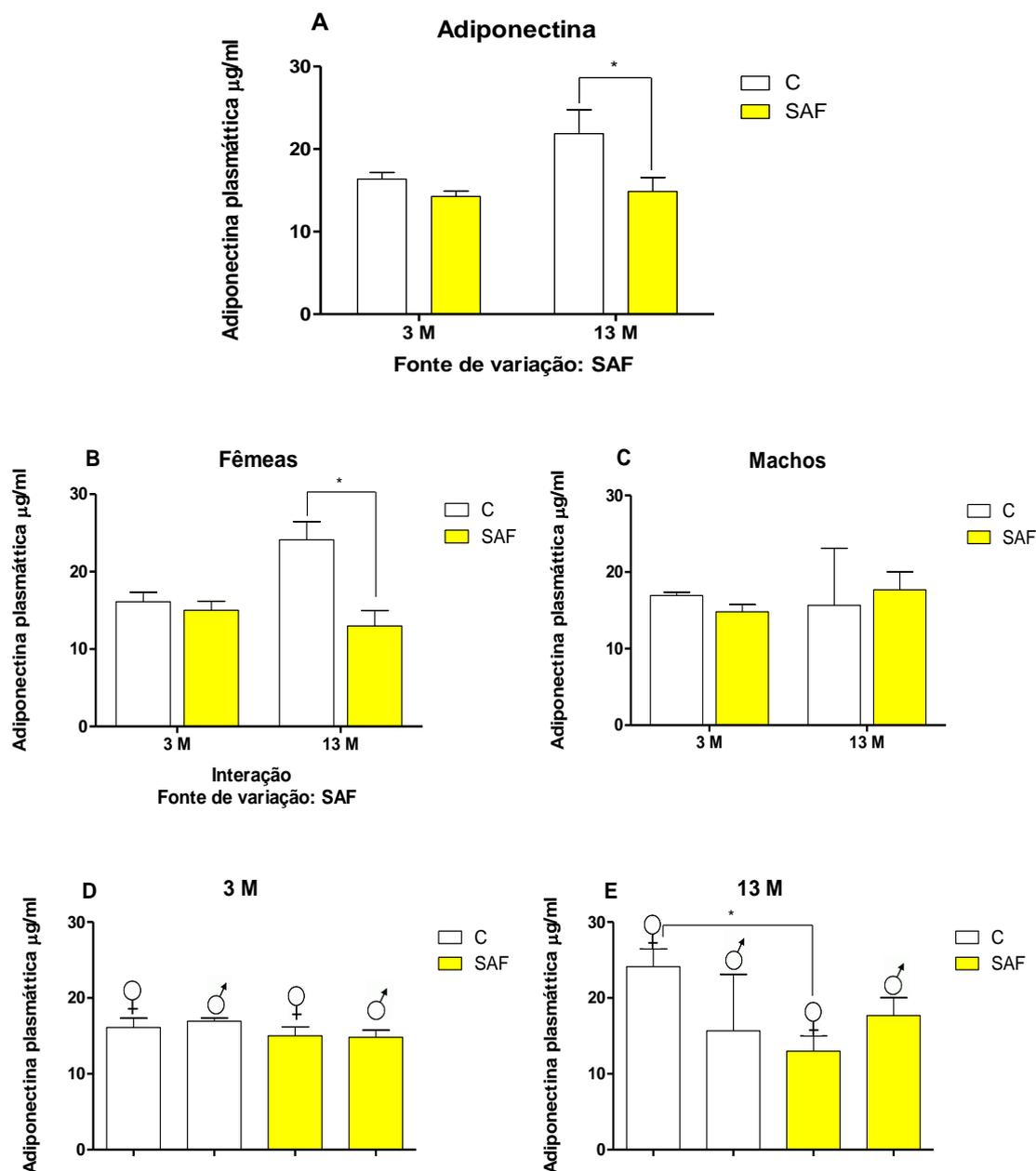




**Figura 4.** Valores de leptina plasmática da G<sub>1</sub> global (A), estratificados por sexos (B e C) e por idade (D e E). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controlo; SAF - suplementação com ácido fólico; 3 M - 3 meses de idade; 13 M - 13 meses de idade; F - fêmea; M - macho.

Adiponectina. Quanto aos valores plasmáticos de adiponectina na G<sub>1</sub>, foram observadas diferenças com significado estatístico. Assim, a suplementação com AF fez diminuir os níveis de adiponectina plasmáticos na população G<sub>1</sub> global. Em particular, os níveis de adiponectina aos 13 meses idade foram inferiores no grupo SAF, tendência já observável aos 3 meses de idade, embora sem significado estatístico (Fig. 5A).

A análise dos resultados por sexos permite concluir que a suplementação faz diminuir, de modo estatisticamente significativo, os níveis de adiponectina nas fêmeas, mas tal não se verifica nos machos (Fig. 5B e C). Especificamente, verifica-se que a diminuição dos níveis de adiponectina nas fêmeas SAF comparadas com as do controlo é estatisticamente significativa aos 13 meses de idade (tendência já observável aos 3 meses) (Fig 5D e E). Surpreendentemente, não se observou diferença com significado estatístico aos 3 meses de idade entre os sexos, como aconteceu, quer nos valores de insulina, quer nos de leptina.



**Figura 5.** Valores de adiponectina plasmática da G<sub>1</sub> global (A), estratificados por sexos (B e C), separados por tempo (D e E). Valores apresentados em média ± SEM. \* $p < 0,05$ . C - controlo; SAF - suplementação com ácido fólico; 3 M - 3 meses de idade; 13 M - 13 meses de idade; F - fêmea; M - macho.

TNF- $\alpha$  - Não se obteve valores detetáveis da citocina TNF- $\alpha$  em nenhum dos grupos pelo que estes resultados não são apresentados.

## Discussão e Conclusões

Como tem sido defendido em diversos estudos, a suplementação com doses elevadas de AF poderá conduzir a efeitos nefastos para a saúde<sup>(22-29)</sup>. Foi objetivo

deste trabalho avaliar o impacto duma suplementação materna com doses elevadas de AF, na saúde metabólica da descendência.

Para além de terem sido avaliados os efeitos na descendência ( $G_1$ ), foram também avaliados alguns parâmetros metabólicos na geração das mães ( $G_0$ ), por ter sido a geração directamente exposta ao tratamento em questão. De um modo global, verificou-se que a exposição a doses elevadas de AF provocou, em  $G_0$ , um aumento de peso corporal (Fig. 1S) acompanhado por um aumento de consumo de ração e água ao longo do tempo (Fig. 2S e 3S). Curiosamente, estas diferenças foram acentuadas ao longo do tempo e sempre após o período de suplementação, indicando que a ingestão de elevadas doses de AF tem um efeito programador de aumento de peso e da ingesta alimentar (Fig 2S B e C e 3S B e C).

Relativamente à avaliação morfométrica da geração  $G_1$ , verificou-se que a descendência do sexo feminino do grupo de mães suplementadas apresentou maior ganho ponderal ao longo do tempo (Fig. 4S B) quando comparado com o grupo controlo (acompanhado de uma tendência para aumento da adiposidade total aos 13 meses de idade). Mais uma vez esta diferença entre os dois grupos de tratamento acentua-se com o envelhecimento, e em particular após o desmame (período em que terminou a exposição, através das mães, às doses elevadas de AF).

Relativamente ao perfil bioquímico avaliado, observou-se que a população  $G_1$  global (machos e fêmeas) do grupo SAF apresentou um aumento da glicemia aos 3 meses de idade, comparativamente com o grupo controlo.

Nos restantes parâmetros bioquímicos avaliados aos 3 meses de idade, ou não se verificaram diferenças (AF, homocisteína, LDL, HDL, ácido úrico e PCR) ou verificaram-se diferenças ténues, sem significado estatístico (insulina, leptina e adiponectina) embora concordantes com os doseamentos aos 13 meses de idade.

De facto, as diferenças metabólicas verificaram-se sobretudo aos 13 meses de idade, tendo o grupo suplementado apresentado níveis mais altos de insulina (tendencialmente) e leptina e níveis mais baixos de adiponectina, quando comparados com o grupo controlo. Concordantemente com este perfil bioquímico, observou-se, na G<sub>1</sub>, uma diminuição significativa da tolerância oral à glicose, quer na população global, quer quando estratificada por sexos (Fig 5S).

Neste trabalho, verificou-se ainda uma diminuição dos níveis plasmáticos de insulina com a idade, ao contrário do que está descrito na literatura<sup>(30)</sup>, podendo tal diferença dever-se ao diferente método de quantificação (revelação por deteção da radioatividade). Efetivamente, os animais descendentes das mães SAF parecem desenvolver insuficiência na produção insulínica com o envelhecimento. Apesar desta insuficiência, os níveis tendencialmente superiores de insulina aos 13 meses de idade no grupo SAF comparado com o respectivo controlo são indicativos de resistência à insulina, que é corroborada pela diminuição da tolerância oral à glicose observada em G<sub>1</sub> global, e em particular nos machos.

Por outro lado, o aumento observado nos níveis plasmáticos de leptina com a idade foi concordante com a literatura<sup>(30)</sup>. Efetivamente, os nossos resultados indicam que há o desenvolvimento de hiperleptinemia com o envelhecimento que é agravada aos 13 meses de idade pela suplementação materna com elevadas doses de AF, neste modelo animal. Esta observação sugere que há uma deterioração do perfil metabólico nestes animais. De facto a SM é caracteristicamente acompanhada por um aumento nos níveis circulantes de leptina<sup>(31)</sup>.

Também a diminuição dos níveis plasmáticos de adiponectina nos grupos SAF da G<sub>1</sub> global e em particular nas fêmeas são concordantes com uma deterioração do perfil metabólico, como resultado da exposição a doses elevadas de AF. De facto, a

diminuição dos níveis circulantes de adiponectina é também uma característica da SM<sup>(32)</sup>, bem como indicador inverso da adiposidade corporal. Por tal facto, o aumento significativo de ganho ponderal nas fêmeas poderá ser por um aumento da massa gorda (corroborada pelo valor significativamente reduzido de adiponectina e a tendência de maior massa gorda nos valores de bioimpedância).

Assim, os resultados deste estudo parecem mostrar um papel reprogramador do AF no fenótipo metabólico durante o período perinatal. O estímulo que resulta da exposição perinatal a concentrações elevadas de AF, neste período crítico do novo ser, provocou uma disfunção metabólica que poderá ter resultado de um desfasamento entre o ambiente previsto e o ambiente efetivo do adulto, segundo o conceito de *match-mismatch*<sup>(12)</sup>. Tal traduziu-se numa maior susceptibilidade individual para o desenvolvimento de disfunção metabólica na idade adulta<sup>(12)</sup> (predisposição para a SM) evidente na diminuição da tolerância oral à glicose, no aumento dos valores de leptina e na diminuição da adiponectina (indicador de maior percentagem de gordura corporal) que, no seu conjunto, representam fatores de risco independentes para a SM<sup>(33)</sup>.

Uma análise da literatura poderá apontar para uma relação entre AF e a SM contrária à que se sugere neste trabalho. De facto, há estudos que demonstram que a suplementação com AF (5mg) em adultos tem um papel benéfico na redução da inflamação hepática e da resistência à insulina<sup>(34)</sup>, na melhoria da função endotelial<sup>(35)</sup> e na melhoria da produção de óxido nítrico vascular<sup>(36)</sup>. *Stewart et al.* demonstram mesmo que a suplementação antenatal com AF (400 µg) reduziu o risco de desenvolver SM na descendência de mulheres do Nepal rural<sup>(37)</sup>. Relativamente a este estudo é de destacar: a) que a dose utilizada corresponde à dose recomendada pelo *Institute of Medicine* para mulheres em idade fértil e b) que

a população é composta por mulheres desnutridas, factos que poderão justificar a incoerência aparente entre este estudo e os nossos resultados. De facto, está demonstrado que a mega-suplementação vitamínica (p.ex. beta caroteno) poderá ter efeitos indesejáveis<sup>(36)</sup>.

A análise destes mesmos resultados por sexo evidenciou uma diferença no perfil metabólico entre fêmeas e machos de G<sub>1</sub>, em que as primeiras contribuíram para a maioria das alterações nos parâmetros observados. Assim, estes resultados sugerem uma predisposição diferente para a SM dos descendentes expostos *in utero* a elevada suplementação com AF, de acordo com o sexo.

Esta resposta diferencial por sexos está em linha com os dados recentes de Khulan *et al.*<sup>(38)</sup>. Neste estudo verifica-se que a suplementação com micronutrientes (incluindo AF) de mulheres em idade fértil está associada a alterações de metilação do genoma da descendência e que os loci sujeitos a alterações de metilação são diferentes nos diferentes sexos.

Um pior desempenho metabólico da descendência feminina, a confirmar-se, poderá ter consequências devastadoras para a saúde pública já que a mulher com disfunção metabólica, pelo seu papel primordial na gestação, condicionará sempre a descendência pela contribuição com um ambiente uterino metabolicamente nefasto<sup>(13, 14)</sup>, desencadeando assim um processo transgeracional exponencial de indução de disfunção metabólica. Os resultados apresentados neste trabalho, ainda que preliminares, trazem no seu conjunto uma preocupação a ponderar na tomada de decisão relativamente às *guidelines* para a suplementação com AF no período perinatal.

## **Agradecimentos**

Obrigada a todos os membros do Departamento pela ajuda e disponibilidade.

## Referências Bibliográficas

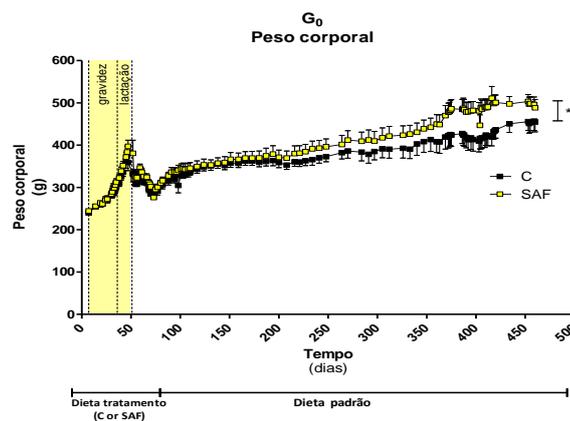
1. Stitzel KF. Position of the American Dietetic Association: the roles of registered dietitians and dietetic technicians, registered in health promotion and disease prevention [Practice Guideline]. *J Am Diet Assoc.* 2006; 106(11):1875-84.
2. Kaiser L, Allen LH. Position of the American Dietetic Association: nutrition and lifestyle for a healthy pregnancy outcome [Practice Guideline]. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108(3):553-61.
3. Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development [Research Support, N I H , Extramural Research Support, U S Gov't, Non-P H S]. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(2):598S-603S.
4. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology.* 1995; 6(3):219-26.
5. Divisão de Saúde Materna ledA, Direção Geral de Saúde. Prestação de cuidados pré-concepcionais. Porto: Direção Geral de Saúde; 2006.
6. Parle-McDermott A, Ozaki M. The Impact of Nutrition on Differential Methylated Regions of the Genome. *Advances in Nutrition: An International Review Journal.* 2011; 2(6):463-71.
7. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, et al. S-Adenosylmethionine and methylation [Review]. *Faseb J.* 1996; 10(4):471-80.
8. Ho DH, Burggren WW. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *The Journal of Experimental Biology.* 2010; 213(1):3-16.
9. Choi S-W, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md).* 2010; 1(1):8-16.
10. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease [Research Support, N I H , Extramural Review]. *Nature.* 2007; 447(7143):433-40.
11. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature.* 2004; 430(6998):419-21.
12. Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA. The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk [Research Support, Non-U S Gov't Review]. *Early Hum Dev.* 2005; 81(1):51-9.
13. Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(Pt 5):779-82.
14. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life [Review]. *Rev Reprod.* 1997; 2(2):105-12.
15. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat [Research Support, Non-U S Gov't]. *Obesity.* 2006; 14(8):1330-43.
16. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *Journal of Nutrition.* 2005; 135(6):1382-86.
17. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LYC. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama-Journal of the American Medical Association.* 2001; 285(23):2981-86.
18. Liu S, West R, Randell E, Longerich L, O'Connor K S, Scott H, et al. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary

- prevention of neural tube defects [Journal article]. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2004; 4(1):20.
19. Lunet N, Rodrigues T, Correia S, Barros H. Adequacy of prenatal care as a major determinant of folic acid, iron, and vitamin intake during pregnancy [Research Support, Non-U S Gov't]. *Cad Saude Publica*. 2008; 24(5):1151-7.
  20. Institute of Medicine FNB. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. The National Academies Press; 1998.
  21. Achon M, Alonso-Aperte E, Reyes L, Ubeda N, Varela-Moreiras G. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *British Journal of Nutrition*. 2000; 83(2):177-83.
  22. Stolzenberg-Solomon RZ, Chang SC, Leitzmann MF, Johnson KA, Johnson C, Buys SS, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 83(4):895-904.
  23. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, et al. Vitamin B-12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia*. 2008; 51(1):29-38.
  24. Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *Journal of Nutrition*. 2006; 136(1):189-94.
  25. Junaid MA, Kuizon S, Cardona J, Azher T, Murakami N, Pullarkat RK, et al. Folic acid supplementation dysregulates gene expression in lymphoblastoid cells - Implications in nutrition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 412(4):688-92.
  26. Achon M, Reyes L, Alonso-Aperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G. High dietary folate supplementation affects gestational development and dietary protein utilization in rats. *Journal of Nutrition*. 1999; 129(6):1204-08.
  27. Pickell L, Brown K, Li D, Wang X-L, Deng L, Wu Q, et al. High intake of folic acid disrupts embryonic development in mice. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2011; 91(1):8-19.
  28. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK [Research Support, Non-U S Gov't Review]. *Br J Nutr*. 2007; 98(4):667-75.
  29. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: Acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997; 65(6):1790-95.
  30. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels [Research Support, U S Gov't, Non-P H S]. *Endocrinology*. 1999; 140(2):1009-12.
  31. Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, et al. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models [Comparative Study]. *Am J Hypertens*. 2008; 21(9):1018-22.
  32. Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, et al. Peripheral factors in the metabolic syndrome: the pivotal role of adiponectin. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1083:185-95.

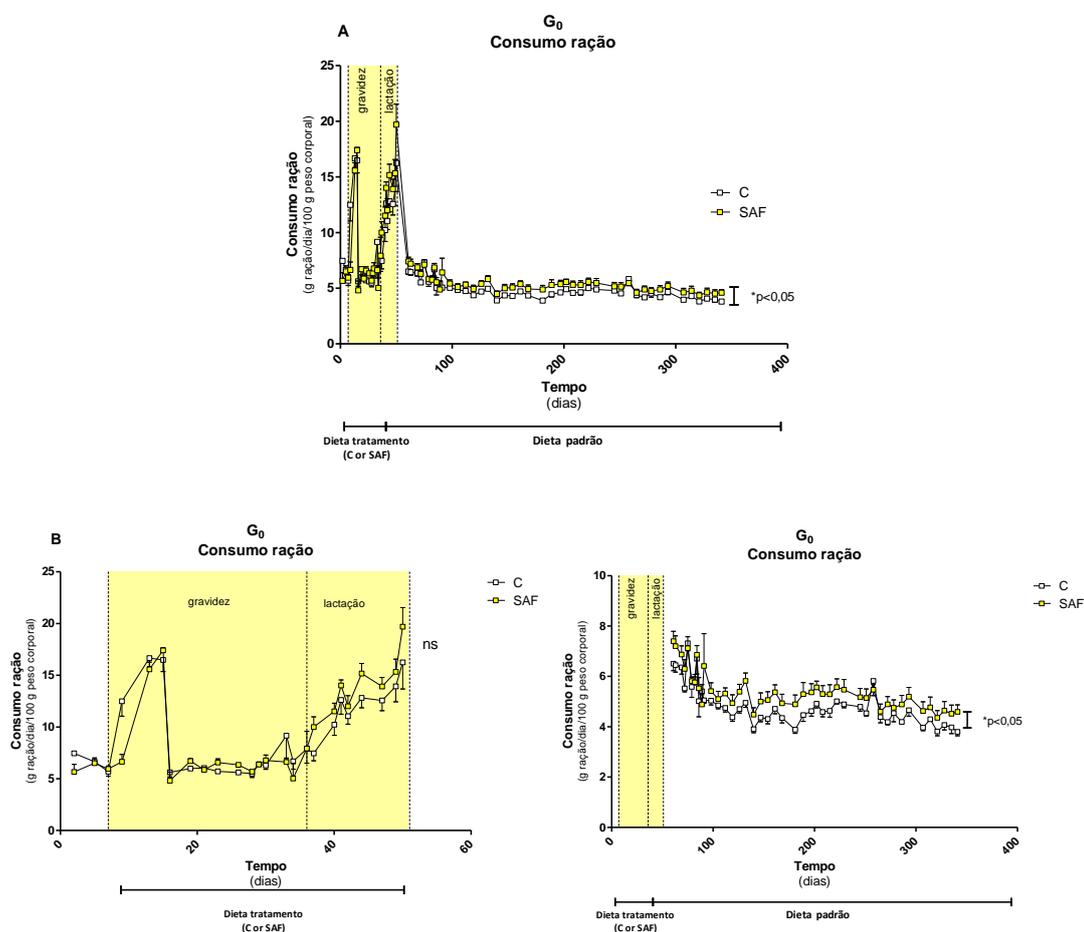
33. Renaldi O, Pramono B, Sinorita H, Purnomo LB, Asdie RH, Asdie AH. Hypoadiponectinemia: a risk factor for metabolic syndrome. *Acta Med Indones.* 2009; 41(1):20-4.
34. Buettner R, Bettermann I, Hechtl C, Gabele E, Hellerbrand C, Scholmerich J, et al. Dietary folic acid activates AMPK and improves insulin resistance and hepatic inflammation in dietary rodent models of the metabolic syndrome [Research Support, Non-U S Gov't]. *Horm Metab Res.* 2010; 42(11):769-74.
35. Setola E, Monti LD, Galluccio E, Palloshi A, Fragasso G, Paroni R, et al. Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia [Clinical Trial Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U S Gov't]. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151(4):483-9.
36. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine.* 1996; 334(18):1150-55.
37. Stewart CP, Christian P, Schulze KJ, Leclercq SC, West KP, Jr., Khattry SK. Antenatal micronutrient supplementation reduces metabolic syndrome in 6- to 8-year-old children in rural Nepal [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U S Gov't]. *J Nutr.* 2009; 139(8):1575-81.
38. Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, Bauer J, Owens S, Prentice AM, et al. Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Human Molecular Genetics.* 2012; 21(9):2086-101.



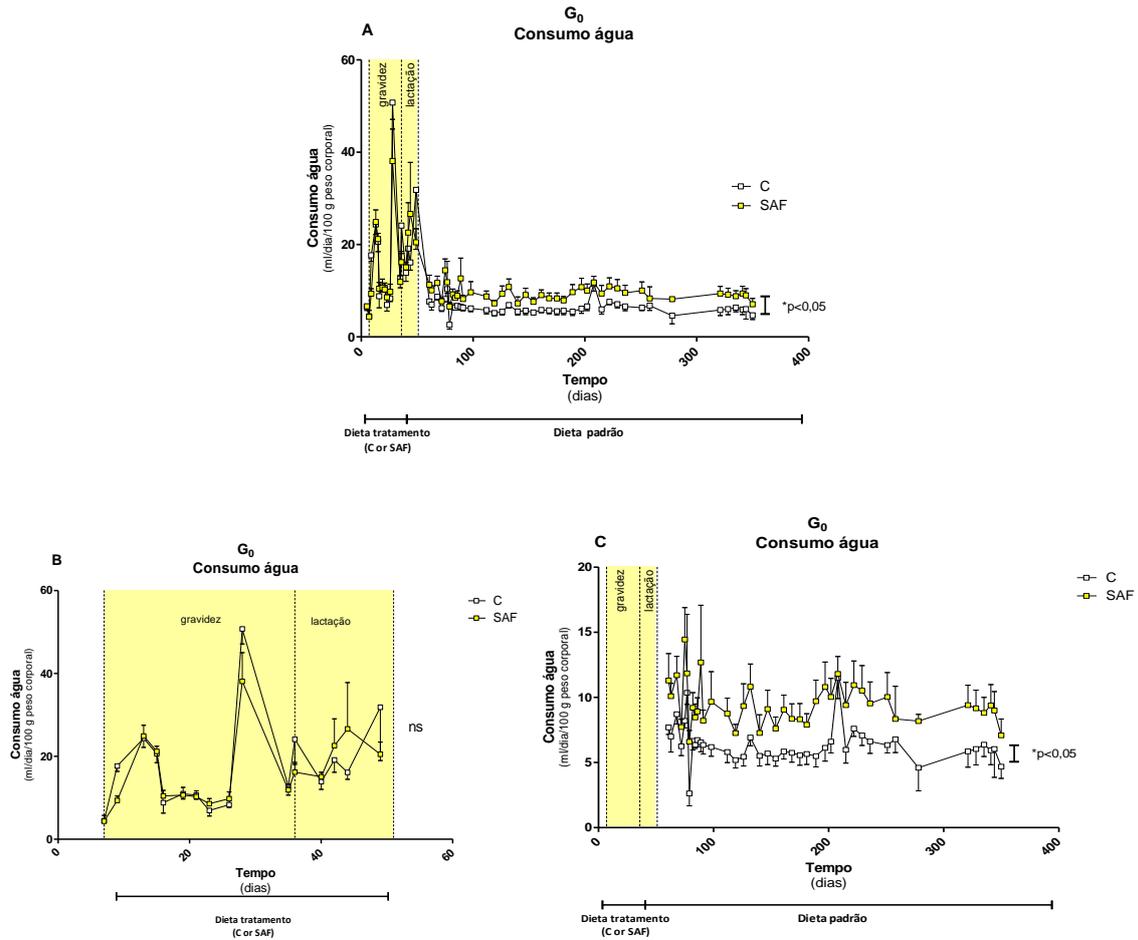
## Material suplementar



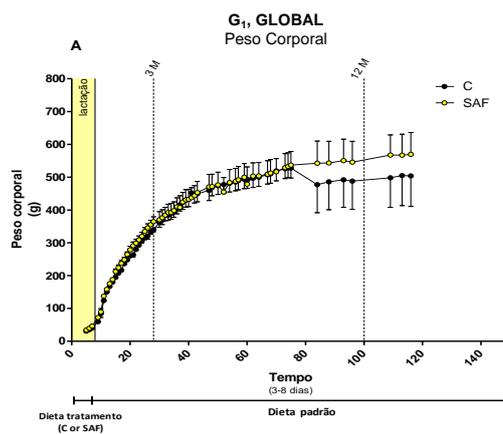
**Figura 1S.** Evolução ponderal da  $G_0$ . Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico.

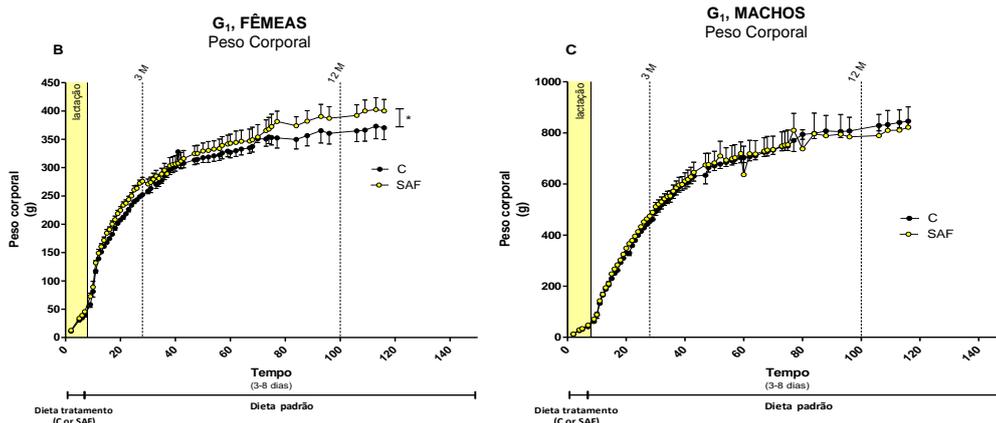


**Figura 2S.** Consumo de ração da  $G_0$  (A), durante a suplementação (B) e após (C). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico.



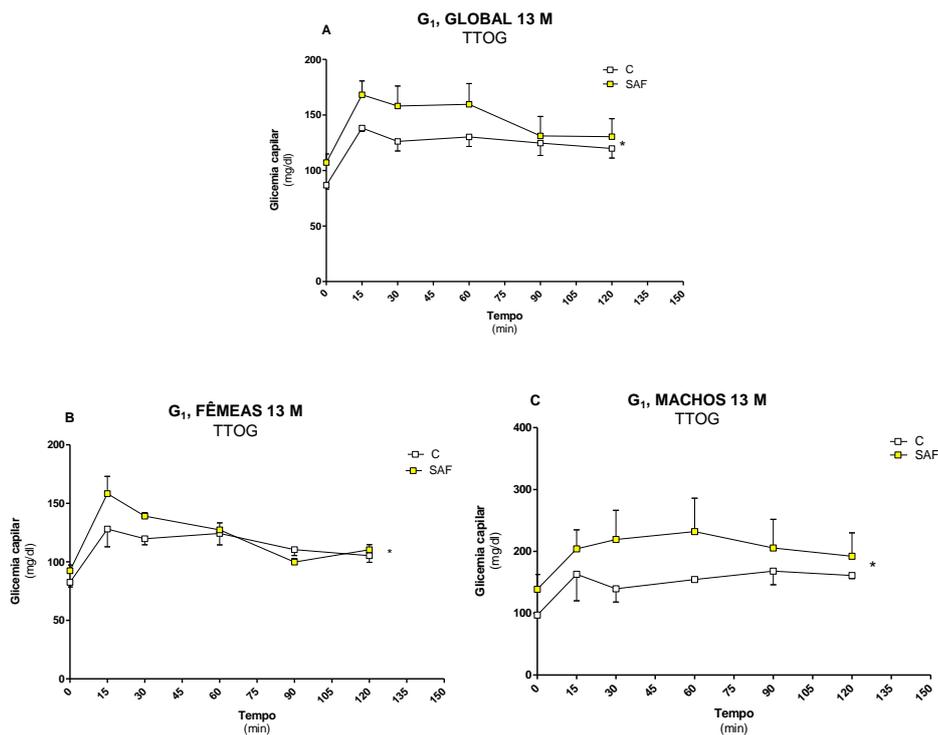
**Figura 3S.** Consumo de água da G<sub>0</sub> (A), durante a suplementação (B) e após (C). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico.



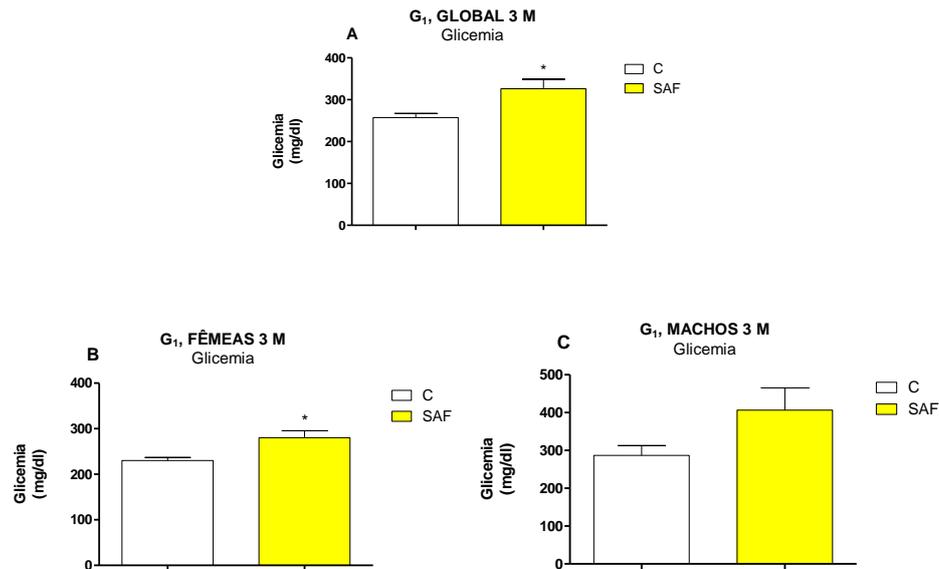


**Figura 4S.** Evolução ponderal da G<sub>1</sub> global (A) e estratificada por sexos (B e C). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico.

Observa-se em (A) uma acentuação de diferença no ganho ponderal a partir do dia 75, altura em que se dividiu os grupos para tratamento com um indutor de SM, tendo-se provocado um viés de sexos que se reflecte no peso total.



**Figura 5S.** Teste de tolerância oral à glicose da G<sub>1</sub> global (A) e estratificada por sexos (B e C). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controle; SAF- suplementação com ácido fólico. (Os valores apresentados correspondem a glicemia capilar obtida por em colheita de sangue por punção da veia da cauda).



**Figura 6S.** Glicemia aos 3 meses de idade da G<sub>1</sub> global (A) e estratificada por sexos (B e C). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . C - controlo; SAF- suplementação com ácido fólico.

(Os valores apresentados correspondem a glicemia em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca na eutanásia).