

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Josiane Silva Silveira

**DIETA MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO: IMPACTOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS NA PROLE**

Porto Alegre

2022

Josiane Silva Silveira

**DIETA MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO: IMPACTOS COMPORTAMENTAIS
E NEUROQUÍMICOS NA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Silva Silveira, Josiane
DIETA MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO: IMPACTOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS NA PROLE / Josiane
Silva Silveira. -- 2022.
127 f.
Orientador: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Ácido fólico. 2. Aminoácidos. 3. Comportamento.
4. Dieta hiperproteica. 5. Gestação. I. de Souza Wyse,
Angela Terezinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*À minha família
pelo incentivo, confiança e amor.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Angela Wyse, pela oportunidade de participar do seu grupo, por confiar em mim e no meu trabalho, pelo comprometimento, paciência, ensinamentos e dedicação durante todos esses anos de orientação. Sua dedicação e amor à pesquisa mantêm todo o seu grupo de pesquisa motivado!

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, do biotério e da recepção.

À professora Carmen Regla Vargas e ao professor Luis Eduardo Savio, bem como seus alunos pela colaboração na execução desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro concedido.

Aos colegas e amigos que tive a oportunidade de conviver no Laboratório 36: Alessandra, Agni, Ana Karla, Bianca, Bruna, Clarissa, Cassi, Darlan, Felipe, Fernanda, Gustavo, Lucas, Marcus, Osmar Junior, Raquel, Roberta e Tiago. Muito obrigada pela parceria, pela disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos e momentos de descontração sempre com muito café.

Em especial, agradeço ao Felipe Schmitz, a Fernanda Ferreira e ao Osmar Ramires Junior por serem incansáveis em me ajudar em todas as etapas da execução dessa tese, sem o apoio de vocês eu não teria chagado até aqui. Muito obrigada pelo auxílio na realização dos experimentos, pelo apoio psicológico, incentivo e pela AMIZADE.

À minha amiga e primeira orientadora, Aline Cunha, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, motivação e apoio para seguir na pesquisa.

À minha família, pelo incentivo constante aos meus estudos, pelo apoio, carinho e amor incondicional. Obrigada pelos exemplos de vida, força e perseverança. Vocês são meu porto-seguro. AMO VOCÊS!

MUITO OBRIGADA!

*O que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher.*

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
PARTE I.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Dieta materna durante a gestação.....	16
1.2 Folatos	17
1.3 Suplementação com ácido fólico durante a gestação	20
1.4 Transferência de folato para o feto através da placenta.....	21
1.5 Efeitos na prole da suplementação com ácido fólico durante a gestação	22
1.6 Metabolismo de aminoácidos.....	24
1.7 Ciclo da metionina-homocisteína-folato	25
1.8 Transferência de aminoácidos para o feto através da placenta	28
1.9 Dieta hiperproteica	29
1.10 Dieta hiperproteica na gestação.....	31
1.11 Estresse oxidativo e nitrativo.....	33
1.12 Neuroinflamação	35
1.13 Efeitos da dieta no comportamento da prole.....	37
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	38
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
3.2.1 Capítulo I.....	39
3.2.2 Capítulo II.....	40
PARTE II.....	42
4 METODOLOGIA E RESULTADOS	43

4.1 Modelo de suplementação com ácido fólico durante a gestação	43
4.2 Modelo de consumo de dieta hiperproteica durante a gestação	44
4.3 Capítulo I: Folic acid supplementation during pregnancy alters behavior in male rat offspring: oxidative stress and neuroinflammatory implications	46
4.4 Capítulo II: High-protein nutrition during pregnancy increases neuroinflammation and homocysteine levels and impairs behavior in male adolescent rats offspring	64
PARTE III.....	80
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÕES.....	95
7 PERSPECTIVAS	98
8 REFERÊNCIAS	99
ANEXO	122
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)	123

RESUMO

A dieta materna consumida durante a gestação pode afetar o neurodesenvolvimento, o comportamento, o metabolismo, a homeostase redox e o estado inflamatório da prole. Durante a gestação a demanda de folato aumenta para a manutenção das reações de transferência de um carbono, que participam da síntese de DNA, e reações de metilação biológica importantes para o crescimento uterino, placentário e fetal. Além disso, as proteínas consumidas pela dieta são uma fonte de aminoácidos que são cruciais para o crescimento e desenvolvimento fetal adequado. No entanto, estudos têm demonstrado que alterações no consumo materno durante a gestação de macronutrientes ou micronutrientes podem causar prejuízos na prole. Baseado nisso, o objetivo dessa tese foi investigar os efeitos da suplementação de ácido fólico ou do consumo de dieta hiperproteica durante a gestação sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos no córtex cerebral e soro da prole de ratos machos. No capítulo I, as ratas prenhes foram randomizadas em dois grupos, de acordo com a dieta: grupo 1, (controle) dieta padrão (2 mg/kg dieta de ácido fólico) e grupo 2, dieta suplementada com 4 mg/kg dieta de ácido fólico. No capítulo II, as ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em dois grupos, de acordo com a dieta: grupo 1, (controle) dieta padrão contendo 20% de proteína e grupo 2, dieta hiperproteica contendo 50% de proteína. Durante todo o períodogestacional as ratas prenhes receberam as dietas experimentais. Em ambos os capítulos, a prole de 21 dias pós-natal a foi submetida a uma bateria de testes comportamentais, a saber: qualidade do cuidado materno, preferência olfatória da prole pelo odor maternal, campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro, teste de depressão relacionada à alimentação, escada horizontal, trave de equilíbrio e *rotarod*. Após a realização dos testes comportamentais, a prole foi eutanasiada e o soro e o córtex cerebral total foram imediatamente coletados para análise dos parâmetros neuroquímicos (homeostase redox, neuroinflamação e níveis de aminoácidos teciduais e séricos). Os resultados do capítulo I demonstram que a dieta suplementada com 4 mg/kg de ácido fólico durante toda a gestação prejudicou a memória e a motricidade da prole quando comparada ao controle. Também foi observado um aumento no comportamento do tipo ansioso e depressivo neste grupo, bem como os níveis de nitritos que aumentaram no córtex cerebral da prole. Entretanto, o imunoconteúdo e a expressão de óxido nítrico sintase induzível não foram alterados. Além disso, identificamos um aumento na expressão gênica do fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-10 e da proteína quimioatraente de monócitos-1 no córtex cerebral da prole suplementada com ácido fólico ao longo da gestação. Em relação ao capítulo II, os resultados evidenciaram um aumento nos níveis de homocisteína e mediadores neuroinflamatórios no córtex cerebral da prole de ratas prenhes que consumiram dieta hiperproteica durante toda a gestação. Além de diminuir os níveis de histidina no soro da prole. Os resultados também revelaram

prejuízos na memória e motricidade e um aumento do comportamento do tipo ansioso na prole suplementada com dieta hiperproteica durante a gestação. Os resultados dessa tese indicam que a suplementação com ácido fólico ou o consumo de dieta hiperproteica durante a gestação podem causar prejuízos neuroquímicos e comportamentais na prole de ratos machos. Em conjunto, esses achados fornecem uma nova base para a compreensão dos resultados bioquímicos e comportamentais associados à suplementação de ácido fólico ou o consumo de dieta hiperproteica durante todo o período gestacional.

Palavras-chave: Ácido fólico; Aminoácidos; Ansiedade; Comportamento, Depressão; Dieta hiperproteica; Estresse oxidativo; Gestação; Homocisteína; Memória; Motricidade; Neuroinflamação; Óxido nítrico; Prole.

ABSTRACT

Pregnancy diet can impact in offspring's neurodevelopment, behavior, metabolism, redox homeostasis, and inflammatory status. In pregnancy, folate demand increases due to the requirement for one-carbon transfer reactions required for DNA synthesis and biological methylation reactions to uterine, placental, and fetal growth. Moreover, proteins in the diet are a source of amino acids that are crucial for proper fetal growth and development. However, studies have shown that changes in maternal macronutrients or micronutrients consumption during pregnancy may cause behavioral impairments in the offspring. Based on this, the objective of the thesis was to investigate the effects of folic acid supplementation or high-protein diet consumption throughout pregnancy on neurochemical and behavioral parameters in male offspring. For this, in the chapter I, pregnant rats were randomly divided into two groups, according to the diet: group 1, (control) standard diet (2 mg/kg diet of folic acid) and group 2, diet supplemented with 4 mg/kg diet of folic acid. In the chapter II, pregnant rats were randomly divided into two groups, according to the diet: group 1, (control) standard diet containing 20% protein, and group 2, the high-protein diet containing 50% protein. Throughout the gestational period, the pregnant rats received experimental diets. In both chapters, offspring at 21 postnatal days were submitted to behavioral tests, namely: maternal behavior, olfactory preference test, open field, object recognition, plus maze, light-dark transition, eating-related depression test, ladder walking, beam balance, and rotarod. After conducting behavioral tests, offspring were euthanized and serum and total cerebral cortex were immediately collected for the analysis of neurochemical parameters (redox homeostasis, neuroinflammation, and tissue and serum amino acid levels, including homocysteine). The results of the chapter I showed that the supplemented diet with 4 mg/kg diet of folic acid throughout pregnancy impaired memory and motricity of the offspring when compared with control (standard diet). It was also observed an increase in anxiety- and depression-like behavior in this group. Nitrite levels increased in cerebral cortex of the offspring. In contrast, inducible nitric oxide synthase expression and immunocontent were not altered. Moreover, we identify an increase in tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in the cerebral cortex of the offspring supplemented with folic acid throughout pregnancy. In relation to chapter II, Results showed an increase in homocysteine levels and neuroinflammatory mediators in the offspring's cerebral cortex from pregnant rats supplemented with a high-protein diet throughout pregnancy. Besides decreasing histidine levels in offspring's serum. The results also revealed impairment in memory and motricity and an increase in anxiety-like behavior in the offspring supplemented with a high-protein diet throughout pregnancy. The results of this thesis indicate that folic acid supplementation or maternal high-protein diet consumption throughout pregnancy may cause biochemical and behavioral impairments in the offspring. Together, these

findings provide a new basis for understanding the biochemical and behavioral outcomes associated with folic acid supplementation and high-protein exposure throughout pregnancy.

Keywords: Amino acid; Anxiety; Behavior, Depression; Folic acid; Gestation; High-protein diet; Homocysteine; Memory; Motricity; Neuroinflammation; Offspring; Nitric oxide; Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato
5,10-METHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP: Adenosina trifosfato
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT: Catalase
DHF: Dihidrofolato
DHFR: Dihidrofolato redutase
DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (do inglês, Developmental Origins of Health and Disease)
Egr2: Gene 2 de resposta ao crescimento precoce
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
GPx: Glutaciona peroxidase
GSH: Glutaciona reduzida
GSSG: Glutaciona oxidada
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
IL: Interleucina
JAK: Janus cinase
LCR: Líquido cefalorraquidiano
MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos-1
MTHFR: Metilenotetrahidrofolato redutase
NGF: Fator de crescimento neural
NMDA: N-metil-d-aspartato
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NOS: Óxido nítrico sintase
Nrf2: Fator nuclear relacionado ao eritróide 2
OMS: Organização Mundial da Saúde
PrxR: Peroxiredoxina
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RF: Receptor de folato
SAM: S-adenosilmetionina
SLC: *Solute carrier*
SNC: Sistema nervoso central
SOD: Superóxido dismutase
STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
THF: Tetrahidrofolato
TNF- α : Fator de necrose tumoral- α
TNFR1: Receptor do fator de necrose tumoral 1

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Estrutura molecular do ácido fólico.....18
- Figura 2:** Metabolismo do ácido fólico.....19
- Figura 3:** Rota da metionina-homocisteína-folato.....26

METODOLOGIA E RESULTADOS

- Figura 4:** Linha do tempo dos modelos e das análises experimentais.....45

CONCLUSÕES

- Figura 5:** Resumo dos resultados do capítulo I.....95
- Figura 6:** Resumo dos resultados do capítulo II.....96

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dieta materna durante a gestação

A teoria das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD), do inglês *Developmental Origins of Health and Disease* sugere que a exposição materna durante a gestação a componentes externos pode ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas durante a vida da prole. A teoria DOHaD descreve como componentes externos o estilo de vida, exposição ao estresse, prática de atividade física, doenças, adição a drogas/álcool e a nutrição materna (Suzuki, 2017; Almeida et al., 2019).

A qualidade e a quantidade de nutrientes consumidos pela mulher durante a gestação é considerado um dos aspectos mais relevantes para a saúde materno-fetal. Durante a gestação, as necessidades de energia e nutrientes aumentam para permitir o crescimento e o desenvolvimento do feto, aumento do tamanho do útero, hipertrofia das glândulas mamárias e o acúmulo de reservas de gordura (Puszkó et al., 2017; Garcia-Casal et al., 2018).

O consumo de uma dieta nutricionalmente inadequada durante o desenvolvimento intrauterino do feto, principalmente devido à quantidade e à qualidade dos nutrientes consumidos pelas mães, pode afetar o crescimento e o metabolismo, a função imunológica e cerebral e o desenvolvimento cognitivo da prole (Bordeleau et al., 2020; Lecorguillé et al., 2021; Mirpuri, 2021). Neste contexto, a deficiência ou o excesso do consumo de micronutriente e macronutrientes durante a gestação vêm sendo descritas como importantes fatores de risco para transtornos do neurodesenvolvimento, tais como transtorno do espectro autista,

transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e esquizofrenia (Bordeleau et al., 2021), cujos mecanismos não são totalmente compreendidos.

Baseado nisto, é importante investigar os efeitos da suplementação de ácido fólico e o consumo da dieta hiperproteica durante toda a gestação sobre o comportamento e a neuroquímica da prole.

1.2 Folatos

O folato (vitamina B9) é uma vitamina do complexo B e é solúvel em água. O folato tem uma estrutura central de pteridina e alta atividade metabólica devido à sua capacidade de aceitar elétrons e reagir com ligações O-, S-, N-, C- (Relton et al., 2004; Shulpekova et al., 2021). O folato é inerentemente conjugado com para-aminobenzoil-glutamato como mono-, di-, tri- e poliglutamatos. O folato natural possui a forma de poliglutamato (Thöny et al., 2000). Na natureza o folato pode ser encontrado em alimentos como fígado, rim, frutas cítricas, cogumelos, espinafre, fermentos e folhas verdes (Engevik et al., 2019).

O folato catalisa reações bioquímicas essenciais, especialmente por meio de seu papel central no ciclo da metionina, participa dos processos de metilação, regula os níveis de homocisteína e está envolvido no metabolismo de purinas, pirimidinas, serina, glicina e histidina (Iyer et al., 2009). Essa vitamina é uma molécula que existe fisiologicamente como tetraidrofolato (THF) e 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). O THF e o 5-MTHF são metabólitos intermediários no ciclo do folato e são relacionados ao metabolismo de um carbono. Juntos, o ciclo do folato e o metabolismo de um carbono são responsáveis por gerar grupos metila e coordenar os processos envolvidos nas modificações epigenéticas e *imprinting* (Cridler et al., 2012). Assim, manter o equilíbrio adequado de substratos e cofatores

no ciclo do folato é crucial para manter a homeostase, pois a interrupção de uma etapa enzimática em qualquer parte do ciclo pode ter consequências prejudiciais significativas. A homeostase do ciclo do folato é crucial durante a gestação, onde a deficiência de folato tem impacto no fechamento do tubo neural, neurodesenvolvimento e no crescimento placentário e fetal (Crider et al., 2014).

Folato é um termo genérico que engloba o ácido fólico e seus compostos derivados dihidro-, tetra-hidro-, metil-, formil com atividade metabólica (Thöny et al., 2000). O ácido fólico é uma molécula quimicamente sintetizada que é usada como suplemento dietético e na fortificação de alimentos (Bailey et al., 2009). É totalmente oxidado e mais estável e biodisponível que o folato natural. A fórmula química do ácido fólico é $C_{19}H_{19}N_7O_6$. O núcleo da molécula consiste em uma estrutura heterocíclica de pteridina, com um grupo metila na sexta posição ligada a ácidos para-aminobenzóico e glutâmico para que o ácido fólico apresente ácido pteroilglutâmico. O ácido fólico possui a forma de monoglutamato (Shulpekova et al., 2021). A pteridina é composta por anéis de pirimidina e pirazina com substituição dos grupos ceto e amino na segunda e quarta posições. Estruturas heterocíclicas aromáticas fornecem uma capacidade de aceitação reversível de elétrons (Mahendran et al., 2018). A figura 1 demonstra a estrutura molecular do ácido fólico.

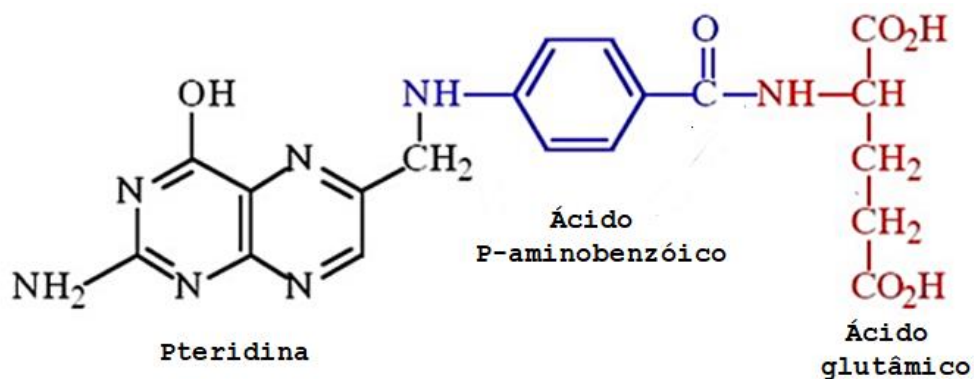


Figura 1: Estrutura molecular do ácido fólico (Menezo et al., 2022, modificado).

Após o consumo, o ácido fólico é absorvido principalmente no jejuno proximal (Aufreiter et al., 2009). O ácido fólico em si não é ativo como coenzima e passa por várias etapas metabólicas dentro da célula para ser convertido na forma metabolicamente ativa. Sua atividade biológica depende da ação da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Nos enterócitos e hepatócitos, o ácido fólico absorvido inicialmente é reduzido pela DHFR em dihidrofolato (DHF) e THF. O THF é convertido em 5,10- metilenotetrahidrofolato (5,10-METHF) pela enzima serina hidroximetiltransferase dependente de piridoxina e após é reduzido a 5-MTHF pela metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (Menezo et al., 2022). A figura 2 ilustra o metabolismo do ácido fólico.

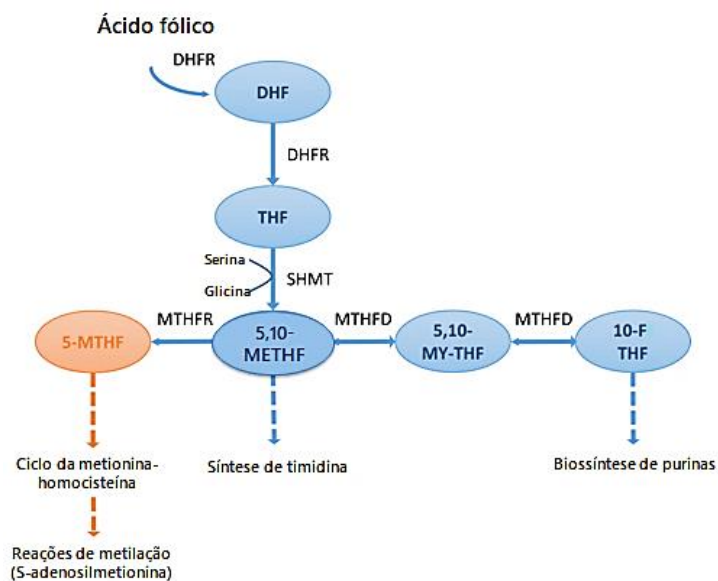


Figura 2: Metabolismo do ácido fólico. 5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato; 5,10-METHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato; 5,10-MITHF; 5,10-meteniltetrahidrofolato; 10-FTHF: 10-formiltetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolato redutase; MTHFD: metilenotetrahidrofolato desidrogenase; MTHFR: metilenotetrahidrofolato

redutase; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetrahydrofolato. (Lubout et al., 2020, modificado).

O 5-MTHF é transportado para o sistema nervoso central (SNC) principalmente através do plexo coroide para então chegar às células nervosas (Wollack et al., 2008). As células epiteliais do plexo coroide expressam altos níveis de receptores de folato α (RF α), sugerindo que essas células desempenham um papel importante no transporte de folato para o SNC e na manutenção de seus níveis no líquido cefalorraquidiano (LCR), o qual é mantido em uma concentração de 2,5 a 3,5 vezes maior do que o plasma (Zhao et al., 2013).

1.3 Suplementação com ácido fólico durante a gestação

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todas as mulheres que estão tentando engravidar realizem a suplementação com 400 μ g de ácido fólico diariamente (Organização Mundial da Saúde, 2013). A suplementação é recomendada antes da concepção e não somente após a confirmação da gestação, pois o fechamento do tubo neural pode ocorrer antes de muitas mulheres estarem cientes de sua gravidez (Greene et al., 2014). Visando a redução de defeitos no tubo neural, muitos países com deficiência nutricional de folato, os produtos a base de farinha são fortificados com ácido fólico na tentativa de reduzir essa deficiência (Crider et al., 2011). No Brasil, a fortificação mandatória dos alimentos iniciou com a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 344 de 13 de dezembro de 2002. Nesta publicação a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que as farinhas de milho e trigo sejam fortificadas com 150 μ g de ácido fólico para cada 100 g de farinha (Brasil, 2002).

É amplamente aceito que a suplementação de ácido fólico no período perinatal protege contra o desenvolvimento de defeitos do tubo neural. Os defeitos do tubo neural resultam da falha do tubo neural em fechar aproximadamente na terceira a quarta semana de gestação em humanos e nos dias gestacionais 10,5 a 11 em ratos, podendo resultar em mortalidade ou deficiências em longo prazo (Rice et al., 2000; Greene et al., 2014; Flores et al., 2015). A maioria dos defeitos do tubo neural é evitável pela ingestão suficiente de folato ou de sua forma sintética, o ácido fólico (Greene et al., 2014; Czeizel et al., 2013). O folato desempenha um papel importante no fechamento do tubo neural, regulando processos de biossíntese de nucleotídeos e reações de metilação (Greene et al., 2014). Além disso, o folato é reconhecido como um dos principais nutrientes necessários para a formação e desenvolvimento do encéfalo fetal devido ao seu envolvimento na proliferação e crescimento de células neuronais e na síntese de neurotransmissores (Naninck et al., 2019).

1.4 Transferência de folato para o feto através da placenta

A concentração de folato no soro fetal é muito mais elevada do que a encontrada no soro materno, provavelmente devido ao transporte ativo de folato (Obeid et al., 2005). Estudos experimentais *in vivo* mostram que há transporte placentário ativo de folato e concentrações totais elevadas de folato são encontradas no cérebro durante o desenvolvimento fetal precoce (Yasuda et al., 2008). Três mecanismos específicos de transporte de folato operam na placenta, incluindo o RF α e RF β , o carreador de folato reduzido e o transportador de folato acoplado a prótons/proteína transportadora de heme 1 (Zhao et al., 2009; Solanky et al., 2010). A transferência de folato da circulação da mãe para o feto é resultado da ação

coordenada desses transportadores (Castaño et al., 2018). O envolvimento de membros da superfamília de transportadores cassete de ligação de adenosina trifosfato (ATP) na homeostase celular de folato na placenta humana também foi relatado (Joshi et al., 2016). A placenta é um órgão que sofre modificações e adaptações no decorrer da gestação (Zeng et al., 2017). O transporte de folato placentário é estabelecido no início da gestação, mas os transportadores de folato podem mudar durante o curso da gravidez. Os genes do carreador de folato reduzido e do transportador de folato acoplado a prótons/proteína transportadora de heme 1 diminuem entre o primeiro e o último trimestre de gravidez, enquanto o RFA não se altera durante todo o período gestacional. Isso sugere que o RFA pode ser o principal regulador para o aumento do transporte de folatos da mãe para o feto à medida que a gestação progride (Yasuda et al., 2005; 2008; Castaño et al., 2018).

1.5 Efeitos na prole da suplementação com ácido fólico durante a gestação

Além da proteção contra defeitos no fechamento do tubo neural, estudos também relatam que a suplementação com ácido fólico durante a gestação melhora a neurogênese, sinaptogênese, reflexos primitivos, aprendizagem espacial e motricidade (McGarel et al., 2015; Wang et al., 2018; 2019; 2021; Harlan et al., 2021). Entretanto, recentemente a suplementação de ácido fólico durante a gestação está sendo relacionada com alterações patológicas na prole (Deniz et al., 2018; Li et al., 2019). Variações no consumo de ácido fólico durante a gestação podem alterar a atividade de DNA metiltransferases e histonas metiltransferases (Joubert et al., 2016). Além disso, o folato pode alterar as respostas inflamatórias ao estimular a metilação aberrante e alterar a atividade de proliferação celular (Jones et al., 2019).

Estudos experimentais têm demonstrado que a suplementação com ácido fólico durante o período gestacional pode causar na prole intolerância à glicose (40 mg de ácido fólico/kg dieta), câncer de mama (5 mg de ácido fólico/kg de dieta), disfunção na tireoide (8 mg de ácido fólico/kg de dieta) e diminuição do peso e tamanho dos embriões (20 mg de ácido fólico/kg de dieta) (Yajnik et al., 2008; Ly et al., 2011; Sittig et al., 2012; Mikael et al., 2013; Huang et al., 2014; Khot et al., 2015; Boyles et al., 2016). Além disso, estudos identificaram que a suplementação de ácido fólico durante toda a gestação pode causar atraso no neurodesenvolvimento, diminuição no imunoconteúdo de neurotrofinas (fator de crescimento neural [NGF] e fator neurotrófico derivado do cérebro [BDNF]) e comprometimento da memória espacial na prole de roedores (Sable et al., 2012;2014; Barua et al., 2014), cujos mecanismos ainda são desconhecidos.

Bahous e colaboradores (2017) observaram que a ingestão de folato durante a gestação leva à deficiência de pseudo-metilenotetrahidrofolato redutase, causando distúrbios no metabolismo da acetilcolina, diminuição do volume hipocampal e déficit de memória na prole. Neste contexto, um estudo pré-clínico demonstrou que camundongos que ingeriram água suplementada com ácido fólico (3,75 mg/L) tiveram uma aprendizagem motora deficiente (Chu et al., 2019).

Em humanos, os resultados de uma metanálise demonstraram que a cada 100 mg/dia de aumento na ingestão de folato materno há um P de 0,02% mais risco do desenvolvimento de asma infantil (Li et al., 2019). Além disso, um estudo de coorte prospectivo mostrou que crianças de um ano de idade nascidas de mães que relataram consumir doses de ácido fólico de 5000 µg/dia ou mais tiveram um desenvolvimento neuropsicomotor mais lento em comparação com mães que

consumiram doses de 400-1000 µg/dia (Valera-Gran et al., 2014). Embora conflitantes, evidências também sugerem que a ingestão de folato pode estar associada ao aumento do risco de transtorno do espectro do autista (Choi et al., 2014; Neggers, 2014).

Assim, o uso crescente de ácido fólico durante a gestação cria a necessidade de melhor investigar as consequências de seu uso em longo prazo no comportamento, homeostase redox e estado inflamatório da prole.

1.6 Metabolismo de aminoácidos

Os aminoácidos têm importância fisiológica essencial. Além da sua participação na síntese de proteínas, os aminoácidos participam da sinalização celular e regulam a expressão gênica e a cascata de fosforilação de proteínas. Os aminoácidos são precursores chave para a síntese de hormônios, neurotransmissores e outras substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, sendo todas de grande importância biológica (Wu et al., 2009; 2014).

Há mais de 700 aminoácidos conhecidos na natureza, mas apenas 20 deles (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina) participam da síntese proteica nas células (Hu et al., 2021). Os aminoácidos são tradicionalmente classificados como essenciais ou não essenciais. Os aminoácidos essenciais, que não são sintetizados em eucariotos, devem estar presentes na dieta. Os aminoácidos essenciais descritos são a histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Wu et al., 2009).

A síntese de aminoácidos depende da disponibilidade de substrato, espécie,

estágio de desenvolvimento, a microbiota no lúmen do trato gastrointestinal, fatores ambientais e estados patológicos (Wu et al., 2013). Conforme descrito anteriormente, concentrações fisiológicas de aminoácidos e seus derivados como óxido nítrico, poliaminas, glutatona, taurina, hormônios tireoidianos e serotonina são necessários para a manutenção da homeostase no organismo (Wu, 2009; Hu et al., 2021). No entanto, níveis elevados de aminoácidos e seus produtos como a amônia, dimetilarginina, homocisteína e outros, podem desregular a homeostase redox e inflamatória e estão relacionados à fisiopatologia de doenças cardiovasculares, danos cerebrais, distúrbios neurometabólicos e psiquiátricos (Fabregues et al., 2019; Leite et al., 2021; Ikenaka et al., 2022). Assim, um equilíbrio ideal entre o consumo de aminoácidos na dieta e sua concentração na circulação é crucial para a homeostase de todo o organismo.

1.7 Ciclo da metionina-homocisteína-folato

A homocisteína é um aminoácido sulfurado que não pode ser obtido por meio da dieta e é gerada no metabolismo do aminoácido metionina. A metionina é adquirida através da dieta, por meio do consumo de alimentos ricos em proteínas ou pela degradação de proteínas endógenas (Martínez et al., 2017; Geltink et al., 2019). A metionina é principalmente metabolizada no fígado pela enzima metionina adenosiltransferase que transfere o grupamento adenosil do ATP para a metionina, formando S-adenosilmetionina (SAM) (Skovierová et al., 2016). A SAM é responsável pela metilação de diversas moléculas, doando seu grupamento metila para o DNA, por exemplo, e formando S-adenosilhomocisteína. A enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase é responsável pela hidrólise da S-adenosilhomocisteína em homocisteína (Sanderson et al., 2019). A homocisteína

pode ser metabolizada por duas diferentes vias: a via da remetilação e a via da transulfuração. Na via da remetilação, o 5-MTHF, proveniente do metabolismo do folato, doa seu grupamento metila para a homocisteína formando novamente metionina. Esse processo é catalizado pela enzima metionina sintase e utiliza vitamina B12 como cofator (Sanderson et al., 2019). Na via da transulfuração, a homocisteína é condensada com uma serina para formar cistationina através da ação da enzima Cistationina β -sintase e utiliza vitamina B6 como cofator. A enzima cistationina γ -liase converte cistationina em α -cetobutirato e cisteína (Martínez et al., 2017; Geltink et al., 2019). A figura 3 esquematiza as principais rotas de formação e degradação da metionina e da homocisteína.

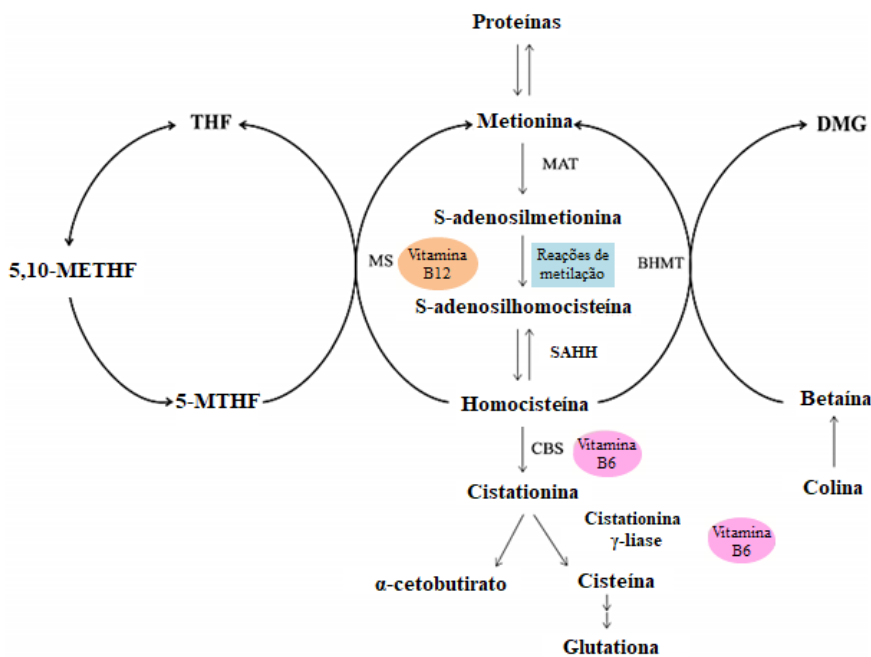


Figura 3: Rota da metionina-homocisteína-folato. 5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolato; 5,10- METHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato; BHMT: betaina-homocisteína-metiltransferase; CBS: cistationina β -sintase; MAT: metionina adenosiltransferase; MS: metionina sintase; SAHH: S-adenosilhomocisteína hidrolase; THF:

tetrahidrofolato. (Schweinberger et al., 2016, modificado).

Níveis plasmáticos de homocisteína entre 5 e 12 $\mu\text{mol/L}$ (μM em mulheres) e 5 e 15 μM (em homens) são considerados normais. Níveis deste aminoácido superiores a 13-16 μM caracterizam uma condição denominada hiper-homocisteinemia (Herrmann 2006), que pode ser leve, moderada ou grave (severa), sendo que a hiper-homocisteinemia grave é característica da homocistinúria clássica, que é um erro inato do metabolismo. Os níveis de homocisteína nos pacientes afetados por esta doença podem atingir a 500 μM (hiper-homocisteinemia grave). Entretanto, causas não genéticas também podem elevar os níveis deste aminoácido, como por exemplo, a deficiência das vitaminas do complexo B (principalmente B6, B9 e B12), dieta rica em proteínas, principalmente de origem animal, insuficiência renal crônica e uso de medicamentos como fenitoína, L-DOPA e metotrexato (De Bree et al. 2002; Selhub 2002; Liew et al., 2014; Yin et al. 2017). As hiper-homocisteinemas, leve ou moderada, vêm sendo relacionada a fatores de risco para várias doenças, especialmente doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Tinelli et al., 2019; Yu et al., 2022). Neste contexto, estudos mostram que a homocisteína pode induzir comprometimento da homeostase redox, disfunção no metabolismo energético, aumento da acetilcolinesterase, neuroinflamação e alterações na sinalização celular no SNC (Arutjunyan et al., 2020; dos Santos et al., 2021; Ramires-Junior et al., 2022). Considerando todas essas alterações neuroquímicas causadas pela hiper-homocisteinemia, prejuízos comportamentais como déficit de memória, ansiedade, depressão, alterações motoras tem sido relatadas (Jadavji et al., 2019; Esnafoglu et al., 2020; Wyse et al., 2020).

1.8 Transferência de aminoácidos para o feto através da placenta

A transferência placentária fornece os aminoácidos necessários para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo fetal. O feto requer aminoácidos para a síntese de proteínas, processos metabólicos e vias biossintéticas (Cleal et al., 2018). As concentrações de aminoácidos são maiores no plasma fetal em comparação com o plasma materno, indicando um processo de transferência ativo através da placenta (Cetin et al., 1996). Transportadores de aminoácidos são expressos nas microvilosidades voltadas para a mãe e nas membranas basais voltadas para o feto do sinciciotrofoblasto da placenta (Cleal et al., 2018). O transporte de aminoácidos através da placenta é um processo complexo que é determinado por múltiplos fatores, incluindo as características do transportador, estrutura placentária, fluxo sanguíneo e as concentrações de aminoácidos dentro do compartimento materno, placentário e fetal (Panitchob et al. 2016). O tráfego de proteínas transportadoras de aminoácidos para a membrana plasmática também é um fator importante na regulação da transferência de aminoácidos (Chen et al. 2015; 2017). Além disso, o metabolismo materno, placentário e fetal influenciará as concentrações de aminoácidos no plasma arterial e, portanto, no gradiente que determina a captação e o efluxo. A síntese proteica placentária reduz a quantidade de aminoácidos disponíveis para transporte para o feto enquanto a quebra de proteínas aumentará sua disponibilidade (Bonninet al., 2011; Lofthouse et al. 2016).

A atividade dos transportadores de aminoácidos depende da concentração total de aminoácidos disponíveis para transporte e em suas concentrações relativas (Cleal et al., 2018). Todos os transportadores de aminoácidos na placenta são membros da superfamília de *Solute carrier* (SLC) (Hediger et al., 2013). Para

transportar os aminoácidos para o feto, a placenta requer as diferentes classes de transportador de aminoácidos para trabalhar em conjunto tanto nas microvilosidades como na membrana basal do sinciciotrofoblasto. Os transportadores de aminoácidos são divididos em três classes funcionais com base em seu modo de funcionamento: transportadores acumulativos, de troca e facilitadores (Cleal et al., 2011). Os transportadores acumulativos como SLC1 e SLC7 promovem a absorção líquida de aminoácidos específicos através das microvilosidades para o sinciciotrofoblasto. Este mecanismo cria um gradiente de aminoácidos transmembrana através das microvilosidades que conduzem a captação de outros aminoácidos extracelulares via transportadores de troca de aminoácidos (Cleal et al., 2008; Fotiadis et al., 2013). Os transportadores de troca nas microvilosidades incluem a família do SLC7 e trocam aminoácidos intracelulares por outros aminoácidos específicos no plasma materno. Portanto, os transportadores de troca de aminoácidos alteram a concentração de aminoácidos dentro da placenta, mas não modificam a quantidade de aminoácidos (Widdows et al., 2015). Os transportadores acumulativos e trocadores de aminoácidos devem trabalhar em conjunto para fornecer a placenta todos os aminoácidos de que ela necessita (Cleal et al., 2018). Os transportadores facilitadores promovem o transporte de soluto em ambas às direções através da membrana (Cleal et al., 2018). O transporte líquido de aminoácidos ocorrerá a favor do gradiente de concentração até se atinja uma mesma concentração de aminoácidos em ambos os lados da membrana (Cleal et al., 2018).

1.9 Dieta hiperproteica

A proteína é um componente da estrutura corpórea, uma fonte de energia e um nutriente essencial que promove o crescimento e o desenvolvimento (Wu et al.,

2017). O consumo de dietas ricas em proteínas aumentou consideravelmente em todo o mundo nos últimos anos (Acheson, 2013). Neste contexto, devido ao aumento da obesidade e sobrepeso da população nas últimas décadas, dietas ricas em proteínas têm sido desenvolvidas como uma intervenção nutricional para diminuir massa corporal excessiva e prevenir o seu ganho (Wycherley et al., 2012; Moon et al., 2020). Atualmente, a hipernutrição é considerada uma importante questão de saúde pública. Já é demonstrado na literatura que a ingestão dietética de proteínas excede os níveis recomendados entre os adultos jovens (Delimaris et al., 2013).

Dietas ricas em proteínas promovem uma maior saciedade pós-prandial, aumento da termogênese, gliconeogênese, cetogênese, lipólise e inibição da lipogênese de novo (Martens et al., 2013; Azzout-Marniche et al., 2007; Drummen et al., 2018). Evidências demonstram que consumir mais proteína do que a quantidade recomendada na dieta não apenas reduz o peso corporal, mas também melhora a composição corporal, diminuindo a massa gorda e aumenta a hipertrofia muscular. Assim, devido aos seus efeitos metabólicos que contribuem para o controle de ganho de massa corporal, dietas ricas em proteínas vêm sendo ingeridas por mulheres em idade fértil e durante a gravidez (Andreasyan et al., 2007; Halldorsson et al., 2021).

Apesar dos benefícios no metabolismo causados pela ingestão de dietas hiperproteicas, o consumo em longo prazo de uma dieta rica em proteínas pode estar relacionado a problemas metabólicos e clínicos, como perda de massa óssea e disfunção renal em pessoas com alteração renal prévia (Kerstetter et al., 2003; Huang et al., 2008; Farhadnejad et al., 2019; Björnson et al., 2020). Assim, dietas

ricas em proteínas podem ser apropriadas para algumas pessoas, mas devem ser consumidas com cautela por outras. Portanto, necessidades individuais específicas, bem como potenciais consequências negativas, devem ser consideradas com cautela antes que tal dieta seja adotada (Cuenca-Sánchez et al., 2015).

1.10 Dieta hiperproteica na gestação

As proteínas da dieta são uma fonte de aminoácidos essenciais que são cruciais para crescimento e desenvolvimento adequados do feto (Wu et al., 2017). Neste contexto, o perfil de aminoácidos e a capacidade de transporte da mãe para o feto é determinada pela quantidade de proteínas consumidas pela mãe durante a gestação (Cleal et al., 2018). A ingestão adequada de proteínas durante a gravidez é importante para garantir desfechos maternos e neonatais saudáveis (Herring et al., 2018).

Embora o consumo de proteínas pela mãe durante a gestação contribua para um adequado crescimento e desenvolvimento fetal, estudos tem demonstrado que a utilização de uma dieta hiperproteica durante a gestação pode ser prejudicial à prole. A ingestão de dieta rica em proteínas pode aumentar os níveis de derivados da metionina (homocisteína e sulfeto de hidrogênio) e amônia, que podem prejudicar a sobrevivência e o crescimento embrionário e fetal (Taylor, 2016; Wu, 2016). Evidências têm demonstrado que o consumo de dieta hiperproteica durante a gestação está associadas ao crescimento fetal reduzido, níveis mais elevados de pressão arterial, morfologia renal alterada, modificações da microbiota intestinal, redução da imunidade humoral, elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), cortisol e à resistência a insulina (Campbell et al., 1996; Shiell et al., 2001; Sloan et al., 2001; Thone-Reineke et al., 2006; Andreatyan et al., 2007;

Reynolds et al., 2007; Mitchell et al., 2009; Tuchscherer et al., 2012; Maredsous et al., 2015). Estudos experimentais realizados em animais também mostram que uma dieta hiperproteica durante a gestação pode levar a um crescimento fetal reduzido e subsequentemente desencadeiam aumento da massa de gordura na idade adulta (Maredsous et al., 2016).

O consumo de uma dieta hiperproteica durante a gestação também está relacionado ao aumento da resposta inflamatória na prole. Neste contexto, foi demonstrado que o consumo materno de uma dieta rica em proteínas (40%) durante a gravidez e a lactação aumenta os níveis de IL-6 no tecido adiposo marrom da prole (Maurer et al., 2011). Além disso, uma dieta rica em proteínas (40%) durante a gestação afetou significativamente os genes de resposta aguda, do sistema complemento e da Janus cinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT) no fígado da prole de camundongos (Vanselow et al., 2011). Evidências também mostram que uma dieta rica em proteínas (30%) durante a gestação altera a expressão de genes que determinam a ação dos glicocorticoides no hipotálamo fetal de porcos causando um desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com consequências duradouras na prole (Kanitz et al., 2012). A desregulação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal pode predispor a doenças psiquiátricas como a ansiedade (Sheng et al., 2021). Um estudo de coorte prospectivo demonstrou que uma maior ingestão de proteínas de origem animal durante o segundo trimestre de gestação está ligada ao aumento do risco de diabetes mellitus gestacional (Yong et al., 2021).

Assim, acreditamos ser crucial investigar os efeitos de uma dieta rica em proteínas sobre os possíveis efeitos sobre o comportamento e neuroquímica da

prole, já que há um número limitado de estudos em relação ao tema.

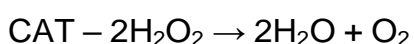
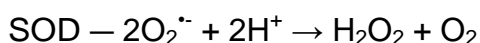
1.11 Estresse oxidativo e nitrativo

Os principais locais de geração de espécies reativas nas células são as mitocôndrias e os peroxissomos (García-Caparrós et al., 2021). As espécies reativas produzidas resultam do metabolismo celular normal e são essenciais para muitas funções biológicas como em processos de sinalização celular, defesa imunológica e plasticidade sináptica (Halliwell et al., 2007; Rajendran et al., 2014). As espécies reativas são geradas a partir de fontes endógenas e fontes exógenas. Ativação de células imunes, inflamação, isquemia, infecção, câncer, exercício excessivo, estresse mental, e envelhecimento são exemplos de produção endógena de espécies reativas. A produção exógena de espécies reativas pode ocorrer como resultado da exposição à poluição, algumas drogas, solventes químicos, fumaça de cigarro, álcool e radiações (Pizzino et al., 2017). O estresse oxidativo/nitrativo é um fenômeno causado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes (Halliwell, 2012). As espécies reativas podem induzir lesões celulares pela oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA, que podem resultar em morte celular (Akter et al., 2015; He et al., 2018; Ozgur et al., 2018).

As EROs são moléculas reativas e radicais livres derivados do oxigênio molecular (Halliwell, 2012). As principais EROs produzidas são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlet (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}). Entre as defesas antioxidantes enzimáticas podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a peroxiredoxina (PrxR). Como defesas não enzimáticas podemos citar as vitaminas

A, C, E, glutathiona reduzida (GSH), flavonoides, carotenoides, polifenóis entre outros (Gutteridge et al., 2010). Em resposta ao estresse oxidativo/nitrativo, as células aumentam suas defesas antioxidantes através da ativação do fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), um importante fator de transcrição de enzimas antioxidantes (Baird et al., 2020).

As reações que envolvem as principais enzimas antioxidantes e as EROs são:



As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (Halliwell et al, 2007; Halliwell, 2012). O NO atua como uma importante molécula de sinalização celular e é crucial para uma adequada modulação do fluxo sanguíneo, eliminação de patógenos intracelulares e células tumorais e para a atividade neural normal (Genestra; Pacher et al., 2007). A formação de NO ocorre por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS) (Cinelli et al., 2020).

O folato pode regular a produção de NO (Stanhewicz et al., 2017). A ativação da NOS depende da presença do cofator tetrahydrobiopterina (BH₄) e substrato disponível para acoplar a oxidação da l-arginina à redução do oxigênio molecular para produzir NO (Montezano et al., 2012). A enzima DHFR dependente de folato tem um papel essencial na redução de BH₂ novamente a BH₄ através da via de salvamento BH₄ (Crabtree et al., 2011). Quando ocorre uma diminuição na formação de BH₄, há um desacoplamento enzimático da NOS e aumenta a produção de EROS

(Crabtree et al., 2009; 2011). O 5-MTHF pode ligar-se ao sítio ativo da NOS e mimetizar a ação da BH₄ e aumentar a produção de NO e reduzir a produção de EROs (Chalupsky et al., 2015). O folato regula a produção de EROs indiretamente através da prevenção do desacoplamento da NOS (Joshi et al., 2001).

O cérebro é vulnerável aos efeitos estresse oxidativo/nitrativo, principalmente devido à grande quantidade de oxigênio consumido neste órgão, alto conteúdo de lipídios insaturados, presença de metais de transição reativos, neurotransmissores que sofrem auto-oxidação e baixos níveis de defesas antioxidantes (Halliwell, 2012; Cogley et al., 2018). O cérebro humano consome 20% do quantitativo total de oxigênio basal para suprir ATP para a intensiva atividade neuronal. Assim, danos na cadeia transportadora de elétrons, causadas pelas EROs/ERN, podem levar a redução da síntese de ATP e contribuir para a fisiopatologia da neurodegeneração (Cobb et al., 2015; Wilkins et al., 2017).

1.12 Neuroinflamação

O SNC é considerado um local imunoprivilegiado. Entretanto, apesar de ser protegido por barreiras físicas especializadas, o SNC não é inerte e nem imunologicamente separado do sistema imunológico periférico (Pape et al., 2019). A neuroinflamação se refere a uma resposta inflamatória que ocorre dentro do SNC que pode ter várias causas como infecções, trauma, isquemia, toxinas, entre outros. O processo é marcado principalmente pela produção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (DiSabato et al., 2016). A resposta imune do SNC envolve células e mediadores locais bem como mediadores transportados da periferia através da barreira cérebro-sangue. As

células envolvidas são principalmente a micróglia e os astrócitos, mas células endoteliais capilares e células sanguíneas também contribuem no processo neuroinflamatório (Heneka et al., 2014; DiSabato et al., 2016).

O aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α fora do SNC afetam o cérebro principalmente pelas vias neurais vagais, pela interação com receptores de citocinas nas células endoteliais cerebrais e/ou por meio da ativação microglial (Becher et al., 2017). Citocinas pró-inflamatórias podem ter efeitos neurotóxicos aumentando a produção de EROs, reduzindo a transmissão das monoaminas e potencializando a transmissão glutamatérgica. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pode também causar disfunção sináptica, morte neuronal e inibição da neurogênese (Mishra et al., 2012; Lyman et al., 2014).

A citocina IL-1 β induz disfunção sináptica por aumentar a produção de prostaglandina E2, o que leva liberação pré-sináptica de glutamato e ativação pós-sináptica do receptor de N-metil-d-aspartato (NMDA) (Mishra et al., 2012). A citocina TNF- α causa morte neuronal ao ativar o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e recrutar caspase 8 (Micheau et al., 2003). Essa citocina também reduz a captação de glutamato pelos astrócitos podendo causar excitotoxicidade (Clark et al., 2016). A quimiocina MCP-1 neuronal é essencial para a quimioatração de monócitos para o local da inflamação no SNC (Howe et al., 2017). Citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, também são produzidas durante o processo neuroinflamatório fazendo parte de um mecanismo de controle da inflamação excessiva (Calsolaro et al., 2016). Diversos estudos já demonstraram um aumento na produção de marcadores pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β , TNF- α e MCP-1 em doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (D'Mello et al., 2017; Howes et al., 2017; Dani et al., 2018).

1.13 Efeitos da dieta no comportamento da prole

O SNC necessita de suprimento de nutrientes suficiente para seu desenvolvimento morfológico, neuroquímico e neurofisiológico (Cusick et al., 2016). Especialmente durante a gestação, uma nutrição adequada é importante, porque nesse período o cérebro cresce mais rapidamente e as bases para o desenvolvimento cognitivo, motor e habilidades sociais e emocionais são estabelecidas (Prado et al., 2014). Neste contexto, estudos têm demonstrado que a dieta materna consumida durante a gestação pode impactar na cognição da prole (Borge et al., 2017; Freitas-Vilela et al., 2018; Mahmassani et al., 2022).

Há evidências de que uma dieta materna com excesso ou déficit de nutrientes pode prejudicar a memória, a motricidade e o aprendizado bem como aumentar a susceptibilidade à ansiedade e à depressão na prole (Fisch et al., 2019; Silveira et al., 2022). Padrões alimentares maternos inadequados durante a gestação também estão associados a pontuações em testes de inteligência mais baixos, desregulação no comportamento emocional e aumento da probabilidade de sintomas de hiperatividade e desatenção (Pina-Camacho et al., 2015; Freitas-Vilela et al., 2018; Galera et al., 2018). Já a ingestão materna de uma dieta de melhor qualidade durante a gravidez foi associada a melhores habilidades visuais espaciais na primeira infância e uma melhor inteligência e função executiva na prole na metade da infância (Mahmassani et al., 2022). Assim, considerando os achados descritos acima, a nutrição materna durante a gestação impacta na cognição da prole, reforçando a importância do estudo deste tópico.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando que: a) a suplementação de ácido fólico durante a gestação é amplamente recomendada e seu excesso pode ser prejudicial à prole e b) dietas hiperproteicas estão sendo altamente consumidas por mulheres em fase reprodutiva e os efeitos do seu consumo em longo prazo no SNC da prole ainda não são totalmente compreendidos, é de extrema importância avaliar o efeito da exposição de ratas Wistar a estes nutrientes durante toda a gestação avaliando o seu impacto no comportamento e neuroquímica da prole. Nossa hipótese é que o consumo de uma dieta hiperproteica ou a suplementação com ácido fólico durante toda a gestação causará alterações comportamentais e neuroquímicas de maneira duradora na prole de ratos machos, pois durante a gestação ocorre o transporte placentário de ácido fólico e de aminoácidos para o feto, e estes nutrientes podem chegar ao cérebro fetal em uma fase crítica do seu neurodesenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral da tese foi avaliar as possíveis alterações causadas pela suplementação de ácido fólico ou consumo de dieta hiperproteica durante toda a gestação de ratas Wistar sobre: parâmetros comportamentais (relação mãe-filhote, memória, comportamento do tipo ansioso/depressivo e motricidade), bem como analisar parâmetros neuroquímicos no córtex cerebral e soro da prole de ratos machos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente tese foram subdivididos em dois (2) capítulos, os quais correspondem a 2 artigos científicos, respectivamente:

3.2.1 Capítulo I

Avaliar os efeitos da suplementação com ácido fólico durante toda a gestação de ratas Wistar sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no córtex cerebral da prole de ratos machos, analisando:

- a qualidade do cuidado materno;
- a preferência olfatória da prole pelo odor maternal;
- o comportamento exploratório e locomotor por meio do teste de campo aberto;
- a memória de longa duração utilizando o teste de reconhecimento de objetos;
- o comportamento do tipo ansioso através dos testes de labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro;

- o comportamento do tipo depressivo realizando o teste de depressão relacionada à alimentação; a motricidade pelos testes da escada horizontal, da trave de equilíbrio e *rotarod*;
- plasticidade sináptica por meio do imunoconteúdo da sinapsina I;
- alguns parâmetros de estresse oxidativo, a saber: níveis de EROS, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de sulfidrilas e de GSH;
- a atividade de algumas enzimas antioxidantes, a saber: SOD, CAT e GPx;
- alguns parâmetros de estresse nitrativo, a saber: níveis de nitritos, imunoconteúdo e expressão da iNOS;
- a expressão de citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a quimiocina MCP-1, bem como a citocina anti-inflamatória IL-10.

3.2.2 Capítulo II

Avaliar os efeitos do consumo de uma dieta hiperproteica durante toda a gestação de ratas Wistar sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no córtex cerebral da prole de ratos machos, analisando:

- a qualidade do cuidado materno;
- a preferência olfatória da prole pelo odor maternal;
- o comportamento exploratório e locomotor por meio do teste de campo aberto;
- a memória de longa duração utilizando o teste de reconhecimento de objetos;

- o comportamento do tipo ansioso através dos testes de labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro;
- o comportamento do tipo depressivo realizando o teste de depressão relacionada à alimentação;
- a motricidade pelos testes da escada horizontal, da trave de equilíbrio e *rotarod*;
- a concentração de aminoácidos (aspartato, glutamato, serina, histidina, glutamina, glicina, alanina, tirosina, triptofano, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina e lisina) no soro e córtex cerebral;
- os níveis de homocisteína no soro e córtex e cerebral;
- alguns parâmetros de estresse oxidativo, a saber: níveis de EROS, níveis de TBARS, conteúdo de sulfidrila e GSH;
- a atividade de algumas enzimas antioxidantes, a saber: SOD, CAT e GPx;
- parâmetros de estresse nitrativo, a saber: níveis de nitritos e a expressão de iNOS;
- a expressão de citocinas inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a quimiocina MCP-1, bem como a citocina anti-inflamatória IL-10.

PARTE II

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados serão apresentados em 2 capítulos. Os capítulos I e II correspondem a artigos científicos que serão apresentados posteriormente. No artigo científico do capítulo I foi utilizado o modelo experimental de suplementação com ácido fólico durante a gestação. Já no artigo científico do capítulo II, utilizamos o modelo de dieta hiperproteica gestacional.

4.1 Modelo de suplementação com ácido fólico durante a gestação

Após a confirmação do acasalamento, o qual foi considerado o dia zero de gestação (G0), as fêmeas prenhes foram randomizadas em 2 grupos experimentais: 1) grupo controle e 2) grupo suplementado com ácido fólico. A dieta padrão continha 2 mg de ácido fólico por kg de dieta e a dieta suplementada teve a adição de 2 mg de ácido fólico por kg de dieta (totalizando 4 mg de ácido fólico por kg de dieta) (Deniz et al., 2018a; 2018b). As ratas prenhes receberam as dietas experimentais somente durante a gestação. Após o nascimento dos filhotes, as mães e a prole receberam somente dieta padrão (2 mg de ácido fólico por kg de dieta). Nos primeiros 10 dias de vida da prole foi realizado diariamente a avaliação da qualidade do cuidado materno. Aos 10 dias pós-natal os filhotes foram submetidos ao teste de preferência olfatória da prole pelo odor maternal. Aos 21 dias pós-natal, os filhotes foram submetidos a testes comportamentais a fim de analisar a atividade locomotora, memória, comportamento do tipo ansioso e depressivo e a motricidade. Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e o córtex cerebral total foi coletado para a realização das análises bioquímicas.

4.2 Modelo de consumo de dieta hiperproteica durante a gestação

Após a confirmação do acasalamento, o qual foi considerado o dia zero de gestação (G0), as fêmeas prenhes foram randomizadas em dois grupos experimentais: 1) grupo controle e 2) grupo dieta hiperproteica. A dieta padrão continha 20% de proteína e a dieta hiperproteica foi composta de 50% de proteína (Maredsous et al., 2016). As ratas prenhes receberam as dietas experimentais somente durante a gestação. Após o nascimento dos filhotes, as mães e a prole receberam somente dieta padrão (20% de proteína). Nos primeiros 10 dias de vida da prole foi realizado diariamente a avaliação da qualidade do cuidado materno. Aos 10 dias pós-natal os filhotes foram submetidos ao teste de preferência olfatória da prole pelo odor maternal. Aos 21 dias pós-natal, os filhotes foram submetidos a testes comportamentais a fim de analisar a atividade locomotora, memória, comportamento do tipo ansioso e depressivo e a motricidade. Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e o córtex cerebral total e soro foram coletados para a realização das análises bioquímicas.

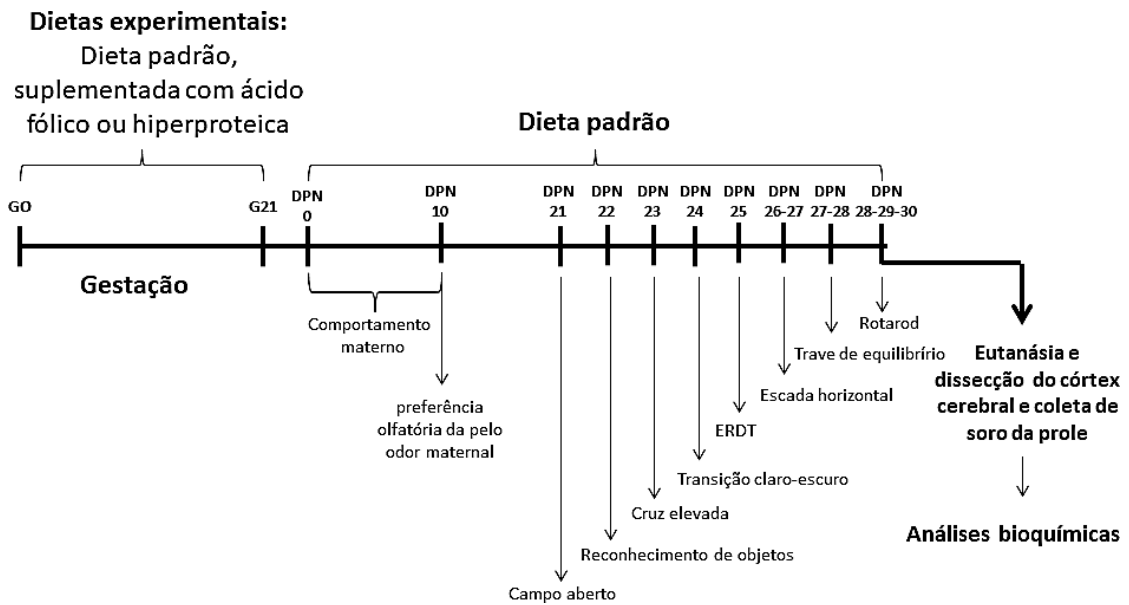


Figura 4: Linha do tempo dos modelos e das análises experimentais. DPN: dia pós-natal, ERDT: teste de depressão relacionada à alimentação, G: dia gestacional.

4.3 Capítulo I

Folic acid supplementation during pregnancy alters behavior in male rat offspring: nitrative stress and neuroinflammatory implications

Josiane Silva Silveira, Osmar Vieira Ramires Júnior, Felipe Schmitz,
Fernanda Silva Ferreira, Fabiana Cristina Rodrigues, Robson Coutinho Silva,
Luiz Eduardo Baggio Savio, Angela T. S. Wyse.

Artigo publicado na revista *Molecular Neurobiology*, 2022 59(4):2150-2170.

doi: 10.1007/s12035-022-02724-7.

Fator de impacto: 5,682 (2021), Qualis CAPES A1

4.4 Capítulo II

High-protein nutrition during pregnancy increases neuroinflammation and homocysteine levels and impairs behavior in male adolescent rats offspring

Josiane Silva Silveira, Osmar Vieira Ramires Júnior, Felipe Schmitz, Fernanda Silva Ferreira, Fabiana Cristina Rodrigues, Marion Deon, Graziella Ribas, Robson Coutinho-Silva, Carmen Regla Varga, Luiz Eduardo Baggio Savio, Angela T. S. Wyse.

Artigo aceito para publicação no periódico *Life Science*, 2022 310:121084

doi: 10.1016/j.lfs.2022.121084

Fator de impacto: 6,78 (2021), Qualis CAPES A1

PARTE III

5 DISCUSSÃO

Na presente tese, demonstramos que a suplementação com ácido fólico e o consumo de dieta hiperproteica durante toda a gestação causaram prejuízos comportamentais e neuroquímicos no córtex cerebral da prole de ratos machos adolescentes, confirmando nossa hipótese inicial. Escolhemos realizar as análises experimentais em ratos adolescentes, pois as primeiras semanas do período pós-natal são caracterizadas por intensa sinaptogênese, mielinização e gliogênese, uma vez que o desenvolvimento do cérebro em roedores não é concluído ao nascimento (Rice et al., 2000; Gilmore et al., 2018). Para a realização das análises bioquímicas a estrutura escolhida foi o córtex cerebral total, uma vez que tal região desempenha um importante papel em diversos comportamentos, tais como percepção, função motora, cognição, memória e aprendizagem (Essen et al., 2018; Natale et al., 2021).

No artigo I, demonstramos que a suplementação com ácido fólico durante toda a gestação não prejudicou a relação mãe-filhote, mas causou déficit de memória, alterações na motricidade e prejudicou a aprendizagem motora, bem como aumentou o comportamento do tipo ansioso e depressivo na prole. A ingestão de ácido fólico por ratas prenhes resultou também na indução de estresse nitrativo e de neuroinflamação no córtex cerebral da prole. Esses resultados são relevantes devido à sua correlação com gestantes que amplamente recebem suplementação com ácido fólico durante a gestação.

Evidências mostraram que a dieta durante a gestação pode alterar o cuidado materno e, conseqüentemente, impactar no neurodesenvolvimento da prole (Fairbanks et al., 2010; Purcell et al., 2011; Tang et al., 2014; Bstista et al., 2017). Não observamos diferenças entre os grupos controle e ácido fólico no cuidado

materno total e na frequência de cuidados maternos. No entanto, as mães do grupo ácido fólico passaram menos tempo fora do ninho quando comparado ao grupo controle, indicando que elas passaram mais tempo no ninho com os seus filhotes. Evidências mostram o olfato no início da vida desempenha um importante papel na sobrevivência da prole, bem como na manutenção dos cuidados maternos (Meyer et al., 2016). O desempenho da prole no teste de preferência olfatória pelo odor maternal não foi afetado pela suplementação com ácido fólico durante a gestação. De acordo com estudos anteriores, o cuidado materno influencia significativamente nos resultados do teste de preferência pelo odor maternal (Uriarte et al., 2007; Kojima et al., 2009). Acreditamos que não foram observadas alterações no teste de preferência pelo odor maternal devido aos cuidados maternos não terem sido prejudicados. Assim, em nosso estudo, a suplementação com ácido fólico durante a gestação não prejudicou a relação mãe-filhote.

O estado nutricional durante a gravidez tem um importante impacto no desenvolvimento neurológico e nas funções cognitivas da prole (Gresham et al., 2014; Grieger et al., 2014; Chu et al., 2019; Neves et al., 2020). No presente estudo, foi observado que a suplementação com ácido fólico durante toda a gestação causou um déficit de memória de longo prazo na prole. Bahous e colegas (2017) observaram que ingestão de folato durante a gestação levou à deficiência de pseudo-metileno tetraidrofolato redutase, causando distúrbios no metabolismo da acetilcolina, diminuição do volume hipocampal e déficit de memória na prole. Nesse contexto, estudos identificaram que a suplementação de ácido fólico durante a gestação pode provocar na prole uma diminuição nos níveis de neurotrofinas como NGF e BDNF (Sable et al., 2012; 2014). Além disso, Brocardo e colegas (2008)

observaram que o ácido fólico é capaz de inibir os receptores NMDA. Os receptores NMDA estão envolvidos na formação da memória (Crair et al., 1995; Feldman et al., 1999). Sugerimos que a suplementação com ácido fólico durante toda a gestação pode causar inibição destes receptores e afetar a memória da prole. Baseado nos resultados encontrados no teste de reconhecimento de objetos, decidimos analisar o imunoconteúdo da proteína sinapsina I no córtex cerebral da prole. Não identificamos diferenças entre os grupos controle e ácido fólico no imunoconteúdo da sinapsina I. Assim, nossos achados demonstram que a suplementação com ácido fólico durante gestação prejudica a memória de longo prazo da prole independente do imunoconteúdo de sinapsina I.

Estudos epidemiológicos evidenciam que a exposição a um ambiente adverso durante a gravidez eleva o risco de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole (Degroote et al., 2016; Tuovinen et al., 2021). Neste contexto, foi observado que a prole do grupo ácido fólico apresentou um aumento do comportamento do tipo ansioso no teste do labirinto em cruz elevado. Entretanto, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos no teste de transição claro-escuro. Semelhante aos nossos resultados, Matsumoto e colaboradores (2016) demonstraram que a prole de ratas suplementadas com ácido fólico durante a gestação apresentou um aumento no comportamento do tipo ansioso, evidenciado pela diminuição do número de entradas nos braços abertos. Contrário aos nossos resultados, Barua e colegas (2014) não demonstraram alterações no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos que receberam ácido fólico durante a gestação. Curiosamente, alguns estudos clínicos realizados em humanos observaram que a deficiência de folato durante a gravidez tem sido associada à

ansiedade (Steenweg et al., 2012; Anjos et al., 2013). Nossos resultados da avaliação do comportamento do tipo ansioso estão em concordância com estudos anteriores que mostraram que diferentes testes de ansiedade parecem refletir diferentes níveis de ansiedade (Holmes et al., 2001).

Fatores exógenos, como uma dieta enriquecida ou deficiente em nutrientes, como aminoácidos e vitaminas podem modificar a síntese de neurotransmissores podendo contribuir para o desenvolvimento de depressão (Marx et al., 2021). No teste de depressão relacionada à alimentação, identificamos um aumento na latência para a primeira mordida no grupo ácido fólico quando comparado ao grupo controle. Este teste avalia a anedonia em uma situação onde há um conflito entre a recompensa alimentar e a ansiedade (Ansorge et al., 2004). Zheng e colegas (2020) identificaram que a ingestão total de folato natural foi inversamente associada com sintomas depressivos, enquanto o ácido fólico sintético não foi. Contrário aos nossos resultados, Matsumoto e colegas (2016) demonstraram que a prole de ratas suplementada com ácido fólico durante a gestação não apresentou alteração da motivação para ingestão de alimentos, isto pode ser devido a uma menor dose de ácido fólico utilizada neste estudo (3mg/kg).

Estudos em pacientes com doenças neuropsiquiátricas, a deficiência de folato tem sido associada a baixos níveis de serotonina no LCR e a suplementação de ácido fólico restaura os níveis desse neurotransmissor (Hyland et al., 2010; Pan et al., 2017). Em resumo, os resultados encontrados na literatura sobre a suplementação de ácido fólico e depressão são conflitantes, e estudos devem ser realizados sobre este tema principalmente durante o período gestacional.

Estudos clínicos e pré-clínicos mostraram que a suplementação da dieta

durante a gravidez pode impactar na função motora da prole (Georgief et al., 2018). No teste da escada horizontal, observamos um aumento no tempo para atravessar a escada, no número de erros, bem como na porcentagem de erros no grupo ácido fólico quando comparado ao grupo controle. No *rotarod*, verificamos um aumento no número de quedas (teste: dia 1) no grupo ácido fólico quando comparado ao grupo controle. No entanto, não observamos diferenças entre os grupos controle e ácido fólico no número de quedas (teste: dia 2). Esses resultados mostraram que os animais do grupo ácido fólico apresentaram a capacidade de aprendizagem motora preservada. De acordo com os nossos resultados, um estudo de coorte prospectivo mostrou que crianças de um ano de idade nascidas de mães que relataram consumir doses de ácido fólico superiores a 5000 µg/dia tiveram um prejuízo no desenvolvimento psicomotor em comparação com mães que consumiram doses de 400-1000 µg/dia (Valera-Gran et al., 2014). Chu e colegas (2019) observaram que camundongos machos que consumiram água suplementada com ácido fólico (3,75 mg/L) tiveram uma aprendizagem motora deficiente e um aumento na expressão do gene 2 de resposta ao crescimento precoce (*Egr2*). Camundongos deficientes em *Egr2* mostraram melhor desempenho na aprendizagem motora no *rotarod* (Poirier et al., 2007).

O estresse oxidativo/nitrativo durante a gravidez é uma condição que ocorre principalmente porque a placenta é rica em mitocôndrias. Durante a gestação, a placenta sofre alterações de um ambiente hipóxico para um ambiente rico em oxigênio. Com isso, mecanismos de defesas contra os danos dos radicais livres aumentam à medida que a gravidez progride (Lymperaki et al., 2015; Wu et al., 2016). Primeiramente, demonstramos no grupo ácido fólico uma diminuição nos

níveis de EROs no córtex cerebral da prole quando comparado ao grupo controle. Observamos também um aumento nos níveis de nitritos no grupo ácido fólico quando comparado ao grupo controle. No entanto, a suplementação com ácido fólico durante a gestação não alterou a expressão e o imunoconteúdo da iNOS no córtex cerebral da prole. Um aumento nos níveis de nitritos sugere que pode haver um aumento na produção de ERN. O aumento nos níveis de nitritos observado no córtex cerebral da prole pode estar relacionado com a atividade de outras enzimas que produzem óxido nítrico, tais como a nNOS e a eNOS. O folato pode regular a produção de NO e de EROs (Stanhewicz et al., 2017). A formação de iNOS depende da presença do cofator BH₄ e de substrato disponível para acoplar a oxidação da l-arginina à redução do oxigênio molecular para produzir NO (Jones et al., 2019). A enzima DHFR dependente de folato tem um papel na redução de BH₂ a BH₄ através da via de salvamento de BH₄ (Crabtree et al., 2011). Uma diminuição na formação de BH₄, leva ao desacoplamento enzimático da iNOS e aumento da produção de EROs (Crabtree et al., 2009; 2011). O 5-MTHF pode ligar-se ao sítio ativo da iNOS e mimetizar a ação da BH₄, promovendo a síntese de óxido nítrico e uma redução na produção de EROs (Chalupsky et al., 2015). O folato regula a produção de EROs indiretamente através da prevenção do desacoplamento da iNOS. Além disso, o folato pode reduzir a produção de EROs agindo diretamente como antioxidante (Joshi et al., 2001; Rezk et al., 2003). Tais mecanismos citados acima podem explicar parcialmente o aumento dos níveis de nitritos e a diminuição da produção de EROs no córtex cerebral da prole de ratas que foram suplementadas com ácido fólico durante toda a gestação.

A suplementação com ácido fólico pode afetar a metilação de genes anti-

inflamatórios e pró-inflamatórios (O'Neill et al., 2014). A partir disso, estudos têm mostrado que a relação entre folato e inflamação depende do momento da suplementação, da dosagem, dos genes metilados e da interação com o meio ambiente (Jones et al., 2019). Identificamos um aumento na expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1 no córtex cerebral no grupo ácido fólico quando comparado ao grupo controle. As citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 são produzidas principalmente por células da microglia em resposta ao desequilíbrio homeostático do sistema nervoso central (Becher et al., 2017). A citocina TNF- α diminui a captação de glutamato pelos astrócitos e pode aumentar a excitotoxicidade. A secreção da citocina IL-1 β está fortemente relacionada à exacerbação de doenças neurodegenerativas (Clark et al., 2016). A quimiocina MCP-1 neuronal é essencial para a quimioatração de monócitos para o local da inflamação no sistema nervoso central (Howe et al., 2017).

Em nosso estudo, observamos um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 que pode ser devido a um mecanismo compensatório para tentar diminuir o processo neuroinflamatório. Com base em nossos resultados, podemos sugerir que o aumento da neuroinflamação observado no córtex cerebral pode estar associado às alterações comportamentais observadas na prole.

Os resultados obtidos no artigo I reforçam a importância do uso do ácido fólico na dose e período recomendados pela OMS, além do consumo de uma dieta balanceada durante todo o período gestacional, principalmente de nutrientes doadores de grupo metila, como o ácido fólico, o qual pode afetar o comportamento e a neuroquímica da prole.

Em relação ao artigo II, observamos um aumento nos níveis de homocisteína

no córtex cerebral, bem como uma redução dos níveis de histidina no soro da prole de ratas que consumiram dieta hiperproteica durante toda a gestação. Demonstramos também um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no córtex cerebral deste grupo. O consumo da dieta hiperproteica não prejudicou a relação mãe-filhote. Nossos achados também evidenciaram prejuízos na memória e motricidade, bem como aumento do comportamento do tipo ansioso na prole de ratas suplementadas com dieta hiperproteica durante toda a gestação.

Os aminoácidos são importantes para a síntese de proteínas e outras moléculas como catecolaminas, creatina, dopamina, óxido nítrico, poliaminas e hormônios (Wu et al., 2017). A ingestão de uma dieta rica em proteínas aumenta a formação de metabólitos de aminoácidos como homocisteína, sulfeto de hidrogênio e amônia, que podem prejudicar a sobrevivência e o crescimento embrionário e fetal (Taylor et al., 2016; Wu, 2016). Nosso estudo demonstrou que o consumo de uma dieta hiperproteica durante a gestação diminui os níveis de histidina no córtex cerebral da prole. A histidina é um aminoácido essencial que participa da síntese de proteínas e é um precursor da histamina (Moro et al., 2020). A histamina desempenha um importante papel como neurotransmissor regulando o humor, o ciclo do sono, a aprendizagem, a memória, o estado de alerta, o apetite e a percepção da dor (Carthy et al., 2021). Foi observado que a dieta hiperproteica causou um aumento significativo nos níveis de homocisteína no córtex cerebral da prole. A homocisteína é um aminoácido que contém enxofre e é derivada do metabolismo da metionina (Skovierová et al., 2016). Um aumento nos níveis de homocisteína tem sido associado ao estresse oxidativo, exacerbação da inflamação, alterações metabólicas e comportamentais (Loureiro et al., 2010; Pierozan et al.,

2018; Wyse et al., 2020; dos Santos et al., 2021; Ramires-Junior et al., 2022).

A ativação imune materna durante a gestação pode ser um fator de risco para alterações neurológicas observadas na prole que posteriormente se manifestam como distúrbios comportamentais (Knuesel et al., 2014; Ziats et al., 2015). Verificamos a presença de neuroinflamação no córtex cerebral da prole causada pela suplementação com dieta hiperproteica durante toda a gestação. Demonstramos um aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1 na prole de ratas que consumiram dieta hiperproteica. A microglia ativada produz citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 que ativam os astrócitos, podendo resultar em morte e disfunção neuronal e estão envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas (Jacobs et al., 2012; Wang et al., 2015). A proteína MCP-1 neuronal é uma quimiocina que induz o acúmulo de monócitos no local da inflamação (Guzman-Martinez et al., 2019). Corroborando com os nossos resultados, Maurer e colegas (2011) mostraram que o consumo materno de uma dieta rica em proteínas (40%) durante a gravidez e a lactação aumentaram os níveis de IL-6 no tecido adiposo marrom da prole.

Curiosamente, em nosso estudo, observamos um aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 na prole de ratas que consumiram dieta hiperproteica. Esse aumento de IL-10 pode ser devido a um mecanismo compensatório para controlar o processo neuroinflamatório causado pelo aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1. Com base em nossos resultados, sugerimos que o aumento da neuroinflamação observado no córtex cerebral pode estar associado as alterações comportamentais identificadas na prole de ratas que consumiram dieta hiperproteica durante toda a gestação.

A nutrição materna durante a gravidez influencia o neurodesenvolvimento da prole, especialmente os processos cognitivos, como a memória (Ge et al., 2021; Cortés-Álvarez et al., 2022). Nossos achados mostram que o consumo de uma dieta hiperproteica durante a gestação prejudicou a memória de longo prazo da prole, sugerimos que o comprometimento da memória observada na prole pode estar associado em parte com a diminuição dos níveis de histidina e aumento dos níveis de homocisteína no córtex cerebral. A histidina é um neurotransmissor que controla uma ampla variedade de processos neurobiológicos e funções comportamentais, como a memória. A histamina é sintetizada a partir da histidina através da catálise da histidina descarboxilase (Moro et al., 2020). Níveis baixos de histamina podem causar prejuízos comportamentais, como depressão, redução da motivação, prejuízos motores, dificuldade na aprendizagem e déficits de memória (Leppik et al., 2018; Solís-Ortiz et al., 2021; Nakamura et al., 2022). Uma redução dos níveis de histamina também é observada na Doença de Alzheimer (Haas et al., 2008). Esses resultados sugerem que o consumo de uma dieta hiperproteica durante toda a gestação diminui os níveis de histidina na prole e conseqüentemente pode reduzir a produção de histamina, o que pode contribuir para o comprometimento da memória na prole.

O aumento dos níveis de homocisteína é um importante fator de risco para doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Cordaro et al., 2021). Recentemente, Ramires-Junior e colegas (2022) demonstraram déficit de memória de trabalho e diminuição da proteína sinapsina I no hipocampo em um modelo de hiper-homocisteinemia leve crônica em ratos. Assim, devido às alterações neuroquímicas causadas pela homocisteína que podem prejudicar a memória,

sugerimos que o consumo de uma dieta hiperproteica durante a gestação aumenta os níveis de homocisteína na prole e conseqüentemente, pode ser um dos fatores associados ao déficit de memória observado na prole.

A dieta materna enriquecida ou deficiente em nutrientes durante a gravidez, como aminoácidos e vitaminas pode modificar a síntese de neurotransmissores e contribuir para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas (Marx et al., 2021; Siveira et al., 2022). Na análise do teste de transição claro-escuro, nossos resultados revelam um aumento do comportamento do tipo ansioso na prole de ratas suplementadas com dieta hiperproteica durante toda a gestação. A dieta materna também pode influenciar o comportamento alimentar da prole. No teste de depressão relacionada à alimentação, identificamos uma diminuição na latência para a primeira mordida no grupo dieta hiperproteica. Esse teste analisa os níveis de depressão e motivação para comer após privação alimentar e a anedonia em uma situação onde há um conflito entre recompensa alimentar e ansiedade (Ansorge et al., 2004). Kanitz e colegas (2012) observaram que uma dieta rica em proteínas (30%) durante a gestação altera a expressão de genes que controlam a produção do hormônio glicocorticóide no hipotálamo fetal de porcos, causando um desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com conseqüências duradouras na prole. A desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pode causar doenças neuropsiquiátricas como a ansiedade (Sheng et al., 2021).

O aumento nos níveis de homocisteína tem sido fortemente associado a distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, transtorno bipolar, autismo, depressão e ansiedade (Kinoshita et al., 2013; Nabi et al., 2013; Vuksan-Cusa et al., 2013; Hrcic et al., 2016; Józefczuk et al., 2017; Wyse et al., 2020). Uma das

causas do aumento do comportamento do tipo ansioso observado no grupo dieta hiperproteica pode ter sido o aumento nos níveis de homocisteína no córtex cerebral da prole. O déficit de histamina neuronal está envolvida em várias doenças neurológicas, incluindo narcolepsia, distúrbios alimentares, síndrome de Tourette, depressão e ansiedade (Haas et al., 2008). A diminuição dos níveis de histidina observada na prole exposta a uma dieta hiperproteica durante a gestação pode ter alterado o sistema histaminérgico no SNC e, conseqüentemente, pode ter contribuído para o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso. Assim, um aumento na concentração de homocisteína e uma diminuição dos níveis de histidina observados em nosso estudo pode ter contribuído para o aumento do comportamento do tipo ansioso na prole.

Evidências mostram o tipo de dieta consumida durante a gravidez pode afetar a motricidade da prole (Georgief et al., 2018). Nossos resultados demonstram um prejuízo na motricidade da prole de ratas suplementadas com dieta hiperproteica durante a gestação evidenciada nos testes da escada horizontal e da trave de equilíbrio. Em parte, o aumento nos níveis homocisteína na prole pode ter contribuído para o comprometimento motor. Estudos têm relacionado o aumento dos níveis de homocisteína a alterações na função muscular, prejuízos na coordenação motora e locomoção (Veeranki et al., 2015; Gales et al., 2018). Estudos demonstram que a composição da dieta pode alterar a bioquímica muscular (Braggion et al., 2016; Soheli et al., 2020). Em nosso estudo mostramos que a dieta hiperproteica consumida durante toda a gestação diminui os níveis de histidina no córtex cerebral da prole. A histidina é precursor da carnosina (Brosnan et al., 2020). A carnosina contribui para a contratilidade e homeostase do músculo esquelético, através de seu

papel como antioxidante, tampão de pH e regulador de cálcio (Caruso et al., 2012; Boldyrev et al., 2013). Portanto, o prejuízo na motricidade observado na prole pode ser associado em parte com a diminuição dos níveis de histidina e a provável diminuição dos níveis de carnosina. Novos estudos são necessários para elucidar tal mecanismo.

Algumas limitações devem ser consideradas nos achados dessa tese. Em primeiro lugar, devido à diferença entre espécies, nossos resultados não devem ser diretamente extrapolados para humanos. Os roedores são, em muitos aspectos, biologicamente e psicologicamente semelhantes aos humanos, tais como em características de dor, medo e sofrimento. No entanto, as evidências demonstram que as diferenças entre as espécies na fisiologia e genética, bem como a exposição a procedimentos laboratoriais podem resultar em desfechos expressivamente diferentes em humanos (Akhtar et al., 2015). Outra limitação refere-se ao período o qual foi realizada a suplementação com ácido fólico ou o consumo de dieta hiperproteica durante a gestação. A suplementação com ácido fólico ou o consumo de dieta hiperproteica durante todo o período perinatal ou apenas durante a lactação pode causar outros efeitos que não foram encontrados nesse estudo. Em nosso estudo realizamos as análises experimentais na prole de ratos machos. No presente estudo, optamos por realizar os experimentos somente com a prole de ratos machos pois as fêmeas são suscetíveis às flutuações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral (Beery et al., 2011). Além disso, vários estudos mostraram que o ciclo estral pode afetar o resultado dos testes comportamentais (Meziane et al., 2007; Prendergast et al., 2014; Kokras et al., 2015; Chari et al., 2020). Nesse contexto, a prole feminina poderia apresentar diferentes respostas a suplementação de ácido

fólico e dieta hiperproteica durante o período gestacional. Uma vez que placenta da prole masculina é mais dependente da dieta materna e a transferência de nutrientes é mais eficiente porque possui uma menor capacidade de armazenamento comparada com a placenta da prole de fêmeas (Eriksson et al., 2010).

Os achados observados nos capítulos I e II desta tese nos permitem concluir que a suplementação com ácido fólico ou o consumo de dieta hiperproteica durante toda a gestação de ratas Wistar causaram prejuízos comportamentais e neuroquímicos na prole de ratos machos. Nosso estudo representa um importante passo na exploração dos efeitos da composição da dieta materna consumida por ratas prenhes durante toda a gestação, uma vez que fornece evidências de desfechos desfavoráveis sobre a prole.

6 CONCLUSÕES

Os resultados da presente tese permitem concluir que:

CAPÍTULO I:

A dieta suplementada com 4 mg/kg de ácido fólico durante toda a gestação prejudicou a memória e a motricidade da prole quando comparada ao controle. Também foi observado um aumento no comportamento do tipo ansioso e depressivo neste grupo, bem como os níveis de nitritos aumentaram no córtex cerebral da prole. Entretanto, o imunoconteúdo e a expressão de iNOS não foram alterados. Além disso, identificamos um aumento na expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e da MCP-1 no córtex cerebral da prole suplementada com ácido fólico ao longo da gestação.

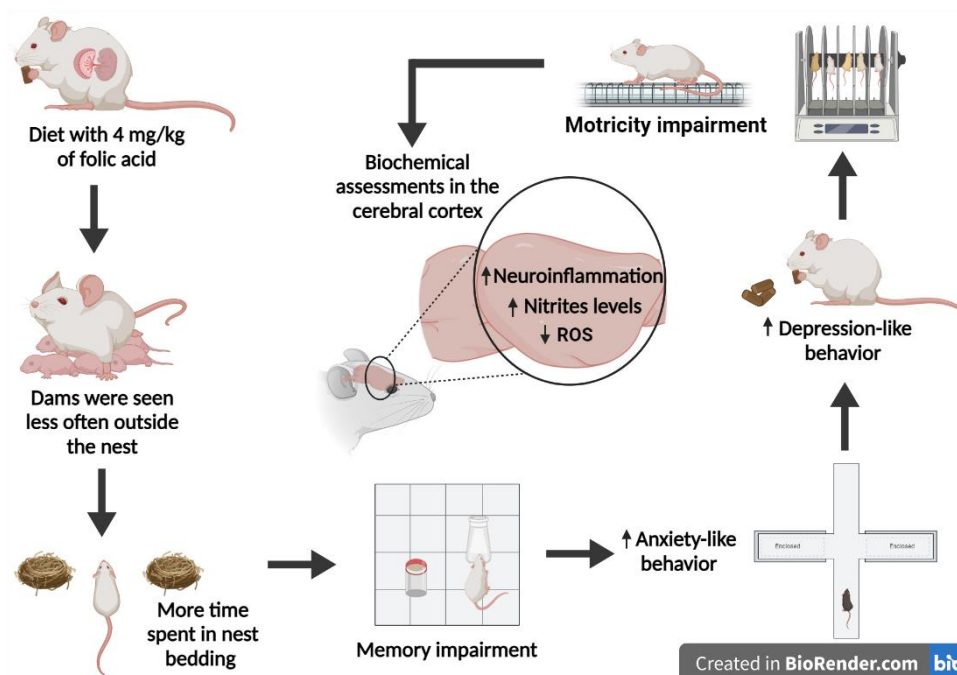


Figura 5: Resumo dos resultados do capítulo I (Silveira et al., 2022).

CAPÍTULO II:

Os resultados evidenciam um aumento nos níveis de homocisteína e na expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e da MCP-1 no córtex cerebral da prole de ratas prenhes que consumiram dieta hiperproteica (50%) durante toda a gestação. Além de diminuir os níveis de histidina no soro da prole. Os resultados também revelaram prejuízos na memória e motricidade e um aumento do comportamento do tipo ansioso na prole suplementada com dieta hiperproteica durante a gestação.

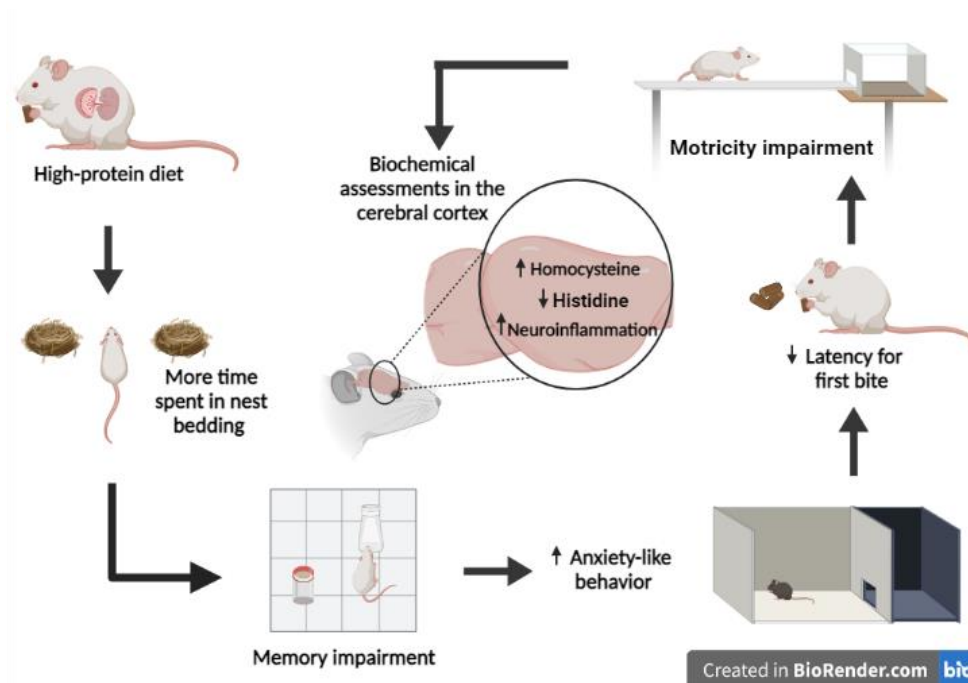


Figura 6: Resumo dos resultados do capítulo II.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que alterações na dieta maternas tais como suplementação com ácido fólico e consumo de dieta hiperproteica durante todo o período gestacional, podem provocar alterações comportamentais e neuroquímicas na prole. Nossos resultados reforçam a importância do consumo de uma dieta equilibrada durante o período gestacional, onde o consumo de nutrientes,

principalmente de doadores de grupo metila, pode impactar no desenvolvimento da prole. Nossos achados fornecem uma base para a melhor compreensão de que a exposição do feto a um ambiente intrauterino adverso pode provocar alterações duradouras na prole. Além disso, fornece evidências adicionais para a compreensão dos resultados bioquímicos e comportamentais associados à suplementação de ácido fólico ou à exposição à dieta hiperproteica durante toda a gestação. Assim, mais estudos são necessários, principalmente relacionados à análise de mudanças epigenéticas, dimorfismo sexual e alterações ao longo da vida da prole de mães suplementadas com ácido fólico ou dieta hiperproteica durante toda a gestação.

7 PERSPECTIVAS

Avaliar na prole de ratas Wistar submetidas à suplementação de ácido fólico ou ao modelo de dieta hiperproteica gestacional:

1. o metabolismo energético e parâmetros relacionados à função mitocondrial;
2. o metabolismo da glicose;
3. avaliação das modificações epigenéticas;
4. avaliar se as alterações observadas nesta tese persistem na prole em ratas fêmeas.

8 REFERÊNCIAS

Acheson KJ (2013) Diets for body weight control and health: the potential of changing the macronutrient composition. *Eur J Clin Nutr* 67:462-466. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.194>

Almeida DL, Pavanello A, Saavedra LP, Pereira TS, de Castro-Prado MAA, Mathias PCF (2019) Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis* 10:608-615. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000151>

Akhtar A (2015) The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb Q Healthc Ethics* 24:407-419. <https://doi.org/10.1017/S0963180115000079>

Akter S, Huang J, Waszczak C, Jacques S, Gevaert K, Breusegem FV, Messens J (2015) Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view. *Journal of Experimental Botany* 66: 2935-2944. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv044>

Andreasyan K, Ponsonby AL, Dwyer T, Morley R, Riley M, Dear K, et al (2007) Higher maternal dietary protein intake in late pregnancy is associated with a lower infant ponderal index at birth. *Eur J Clin Nutr* 61:498–508. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602552>

Anjos T, Altmae S, Emmett P, Tiemeier H, Cloas-Monasterolo R, Luque V et al (2013) Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr* 52:1825-1842. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0560-4>

Ansorge MS, Zhou M, Liva A, Hen R, Gingrich JA (2004) Early life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306:879-881. <https://doi.org/10.1126/science.1101678>

Arutjunyan AV, Milyutina YP, Shcherbitskaia AD, Kerkeshko GO, Zalozniaia IV, Mikhel AV et al (2020) Neurotrophins of the Fetal Brain and Placenta in Prenatal Hyperhomocysteinemia. *Biochemistry Moscow* 85:213-223. <https://doi.org/10.1134/S000629792002008X>

Aufreiter S, Gregory JF, Pfeiffer CM, Fazili Z, Kim Y-I, Marcon N et al (2009) Folate is absorbed across the colon of adults: Evidence from cecal infusion of (13)C-labeled [6S]-5-formyltetrahydrofolic acid. *Am J Clin Nutr* 90:116-123. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27345>

Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathé V, Huneau JF et al (2007) Liver glycogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1400-1407. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00566.2006>

Bahous RH, Jadavji NM, Deng L, Cosin-Tomas M, Lu J, Malysheva O et al (2017)

High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. *Hum Mol Genet* 26:888-900. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx004>

Baird L, Yamamoto M (2020) The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol* 15;40:e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>

Barua S, Chadman KK, Kuizon S, Buenaventura D, Stapley NW, Ruocco F et al (2014) Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PLoS ONE* 9:e101674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101674>

Batista TH, Veronesi VB, Ribeiro ACAF, Giusti-Paiva A, Vilela FC (2017) Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. *Nutr Neurosci* 20:437-442. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1177320>

Bailey S, Ayling JE (2009) The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15424-15429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902072106>

Becher B, Spath S, Goverman J (2017) Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol* 17:49-59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>

Beery AK, Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav* 35:565-572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>

Björnson GA, Ericsson A, Sanchez J, Tonelius P, William-Olsson L, Dahlqvist U (2020) High-protein diet accelerates diabetes and kidney disease in the BTBRob/ob mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 318:763-771. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00484.2019>

Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 93:1803-45. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>

Bonnin A, Levitt P (2011). Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 197:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.005>

Bordeleau M, de Cossío LF, Chakravarty MM, Tremblay M-È (2020) From Maternal Diet to Neurodevelopmental Disorders: A Story of Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci* 14: 612705. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612705>

Borge TC, Aase H, Brantsæter AL, Biele G (2017) The importance of maternal diet

quality during pregnancy on cognitive and behavioural outcomes in children: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7:e016777. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016777>

Boyles AL, Yetley EA, Thayer KA, Coates PM (2016) Safe use of high intakes of folic acid: research challenges and paths forward. *Nutr Rev* 74:469-474. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw015>

Braggion GF, Ornelas E, Cury JCS, Lima NEA, Aquino RC, Fonseca FLA et al (2016) Morphological and biochemical effects on the skeletal muscle of ovariectomized old female rats submitted to the intake of diets with vegetable or animal protein and resistance training. *Oxid Med Cell Longev* 2016:9251064. <https://doi.org/10.1155/2016/9251064>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, dispõe sobre o regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF.

Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos ARS, Rodrigues ALS (2008) Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* 54:464-473. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.10.016>

Brosnan M, Brosnan JT (2020) Histidine Metabolism and Function. *J Nutr* 150:2570S-2575S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa079>

Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement* 12:719-732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>

Carthy E, Ellender T (2021) Histamine, neuroinflammation and neurodevelopment: a review. *Front Neurosci* 15:680214. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.680214>

Caruso J, Charles J, Unruh K, Giebel R, Learmonth L, Potter W et al (2012) Ergogenic effects of β -alanine and carnosine: proposed future research to quantify their efficacy. *Nutrients* 4:585-601. <https://doi.org/10.3390/nu4070585>

Chalupsky K, Kračun D, Kanchev I, Bertram K, Görlach A (2015) Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxidants Redox Signal* 23:1076-1091. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6329>

Clark IA, Vissel B (2016) Excess cerebral TNF causing glutamate excitotoxicity

rationalizes treatment of neurodegenerative diseases and neurogenic pain by anti-TNF agents. *J Neuroinflammation* 13:236. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0708-2>

Cobb CA, Cole MP (2015). Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 84:4-21. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.020>

Cobleya JN, Fiorello ML, Bailey DM (2018) 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress *RedoxBiology* 15 490-503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>

Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM (2011) Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med* 50:1639-1646. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.010>

Crabtree MJ, Tatham AL, Hale AB, Alp JN, Channon KM (2009) Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J Biol Chem* 284:28128-28136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041483>

Campbell DM, Hall MH, Barker DJP, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM (1996) Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 103:273-280. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1996.tb09718.x>

Castaño E, Caviedes L, Hirsch S, Llanos M, Iñiguez G, Ronco AM. Folate transporters in placentas from preterm newborns and their relation to cord blood folate and vitamin B12 levels. *PLoS ONE* 12: e0170389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170389>

Cetin I, Ronzoni S, Marconi AM, Perugino G, Corbetta C, Battaglia FC et al & (1996) Maternal concentrations and fetal-maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 174:1575-1583. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(96\)70609-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(96)70609-9)

Chalupsky K, Kračun D, Kanchev I, Bertram K, Görlach A (2015) Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxidants Redox Signal* 23:1076-1091. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6329105>

Chari T, Griswold S, Andrews NA, Fagiolini M (2020) The stage of the estrus cycle is critical for interpretation of female mouse social interaction behavior. *Front Behav Neurosci* 14:113. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00113>

Chen YY, Powell TL & Jansson T (2017). 1,25-Dihydroxy vitamin D3 stimulates system A amino acid transport in primary human trophoblast cells. *Mol Cell*

Endocrinol 442:90-97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.009>

Chen YY, Rosario FJ, Shehab MA, Powell TL, Gupta MB, Jansson T (2015) Increased ubiquitination and reduced plasma membrane trafficking of placental amino acid transporter SNAT-2 in human IUGR. *Clin Sci (Lond)* 129:1131-1141. <https://doi.org/10.1042/CS20150511>

Choi JH, Yates Z, Veysey M, Heo YR, Lucock M (2014) Contemporary issues surrounding folic acid fortification initiatives. *Prev Nutr Food Sci* 19:247-260. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.4.247>

Chu D, Li L, Jiang Y, Tan J, Ji J, Zhang Y et al (2019) Excess folic acid supplementation before and during pregnancy and lactation activates fos gene expression and alters behaviors in male mouse offspring. *Front Neurosci* 13:313. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00313>

Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB (2020) Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 40:158-189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>

Clark IA, Vissel B (2016) Excess cerebral TNF causing glutamate excitotoxicity rationalizes treatment of neurodegenerative diseases and neurogenic pain by anti-TNF agents. *J Neuroinflammation* 13:236. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0708-2>

Cleal JK, Lofthouse EM, Sengers BG, Lewis RM (2018) A systems perspective on placental amino acid transport. *J Physiol* 596:5511-5522. <https://doi.org/10.1113/P274883>

Cleal JK, Glazier JD, Ntani G, Crozier SR, Day PE, Harvey NC et al (2011) Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *J Physiol* 589:987-997. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.198549>

Cleal JK, Lewis RM (2008) The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human fetus. *J Neuroendocrinol* 20:419-426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01662.x>

Cordaro M, Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S, Paola RD, Impellizzeri D (2021) Involvements of hyperhomocysteinemia in neurological disorders. *Metabolites* 11:37. <https://doi.org/10.3390/metabo11010037>

Cortés-Álvarez NY, Vuelvas-Olmos CR, Pinto-González MF, GuzmánMuñiz J, Gonzalez-Perez O., Moy-López N.A (2022) A high-fat diet during pregnancy impairs memory acquisition and increases leptin receptor expression in the hippocampus of rat offspring. *Nutr Neurosci* 25:146-158. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1728473>

Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM (2011) Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med* 50:1639-1646. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.010>

Crabtree MJ, Tatham AL, Hale AB, Alp JN, Channon KM (2009) Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J Biol Chem* 284:28128-28136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041483>

Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325-328. <https://doi.org/10.1038/375325a084>

Crider KS, Devine O, Hao L, Dowling N, Li S, Molloy AM, et al (2014) Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: Bayesian model. *BMJ* 349:g4554. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4554>

Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB (2012). Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 3:21-38. <https://doi.org/10.3945/an.111.000992>

Crider KS, Bailey LB, Berry RJ (2011) Folic acid food fortification - its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients* 3:370-84. <https://doi.org/10.3390/nu3030370>

Cuenca-Sánchez M, Navas-Carrillo D, Orenes-Piñero E (2015) Controversies surrounding high-protein diet intake: satiating effect and kidney and bone health. *Adv Nutr* 6:260-266. <http://dx.doi.org/10.3945/an.114.007716>

Cusick SE, Georgieff MK (2016) The role of nutrition in brain development: the golden opportunity of the "first 1000 days." *J Pediatr* 175:16-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.013>

Czeizel AE, Dudás I, Vereczkey A, Bánhidly F (2013) Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients* 5:4760-4775. <http://dx.doi.org/10.3390/nu5114760>

Dani M, Wood M, Mizoguchi R, Fan Z, Walker Z, Morganet R et al (2018) Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. *Brain* 141:2740-2754. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awy188>

De Bree A, Verschuren WMM, Kromhout D et al (2002) Homocysteine and coronary heart disease: the importance of a distinction between low and high risk subjects. *Int J Epidemiol* 31:1268-1272. <https://doi.org/10.1093/ije/31.6.1268>

Degroote S, Hunting DJ, Baccarelli AA, Takser L (2016) Maternal gut and fetal brain connection: increased anxiety and reduced social interactions in Wistar rat offspring following peri-conceptual antibiotic exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 71:76-82. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.06.010> Delimaris I (2013) Adverse Effects Associated with protein intake above the recommended dietary allowance for adults. *ISRN Nutr* 126929. <https://doi.org/10.5402/2013/126929>

Deniz BF, Confortim HD, Deckmann I, Miguel PM, Bronauth L, de Oliveira BC et al (2018a) Gestational folic acid supplementation does not affect the maternal behavior and the early development of rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia but the high supplementation impairs the dam's memory and the Na⁺, K⁺-ATPase activity in the pup's hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 71:181-192. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.10.001>

Deniz BF, Confortim HD, Deckmann I, Miguel PM, Bronauth L, Oliveira BC, et al (2018b) Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia. *J Nutr Biochem* 60:35-46. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.008>

D'Mello C, Swain MG (2017) Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression. *Curr Top Behav Neurosci* 31:73-94. https://doi.org/10.1007/7854_2016_37

DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 139:136-153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>.

dos Santos TM, Ramires-Júnior OV, Alves VS, Coutinho-Silva Robson, Savio LEB, Wyse ATS (2021) Hyperhomocysteinemia alters cytokine gene expression, cytochrome c oxidase activity and oxidative stress in striatum and cerebellum of rodents. *Life Sciences* 277:119386. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119386>

Engevik MA, Morra CN, Röth D, Engevik K, Spinler JK, Devaraj S et al Microbial metabolic capacity for intestinal folate production and modulation of host folate receptors. *Front Microbiol* 10:2305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02305>

Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJP (2010) Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol* 22:330-335. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20995>

Esnafoglu E, Ozturan DD (2020) The relationship of severity of depression with homocysteine, folate, vitamin B12, and vitamin D levels in children and adolescents. *Child Adolesc Ment Health* 25:249-255. <https://doi.org/10.1111/camh.12387>

Essen DCV, Donahue CJ, Glasser MF (2018) Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Brain Behav Evol* 91:158-169. <https://doi.org/10.1159/000489943>

Fabregues OD, Viñas J, Palasí A, Quintana M, Cardona I, Auger Cristina et al (2019) Ammonium tetrathiomolybdate in the decoppering phase treatment of Wilson's disease with neurological symptoms: A case series. *Brain and Behavior* 10:e01596. <https://doi.org/10.1002/brb3.1596>

Fairbanks LA, Karin B, Matthew JJ (2010) High-fiber diet promotes weight loss and affects maternal behavior in vervet monkeys. *Am J Primatol* 72:234-241. <https://doi.org/10.1002/ajp.20772>

Farhadnejad H, Asghari G, Emamat H, Mirmiran P, Azizi F (2019) Low-carbohydrate high-protein diet is associated with increased risk of incident chronic kidney diseases among Tehranian adults. *J Ren Nutr* 29:343-349. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2018.10.007>

Feldman DE, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *J Neurobiol* 41:92-101. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.09.063>

Flores AL, Vellozzi C, Valencia D, Sniezek J (2015) Global burden of neural tube defects, risk factors, and prevention. *Indian J Comm Health* 26:3-5.

Fisch J, Feistauer V, de Moura AC, Silva AO, Bollis V, Porawski M et al (2019) Maternal feeding associated to post-weaning diet affects metabolic and behavioral parameters in female offspring. *Physiology & Behavior* 204:162-167. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.02.026>

Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* 2013:34:139-158. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>

Freitas-Vilela AA, Pearson RM, Emmett P, Heron J, Smith ADAC, Emond A et al (2018) Maternal dietary patterns during pregnancy and intelligence quotients in the offspring at 8 years of age: findings from the ALSPAC cohort. *Matern Child Nutr* 14:e12431. <https://doi.org/10.1111/mcn.12431>

Galera C, Heude B, Forhan A, Bernard JY, Peyre H, Van der Waerden J et al (2018) Prenatal diet and children's trajectories of hyperactivity-inattention and conduct problems from 3 to 8 years: the EDEN mother-child cohort. *J Child Psychol Psychiatry* 59:1003-1011. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12898>

Gales A, Masingue M, Millecamps S, Giraudier S, Grosliere L, Adam C et al (2018) Adolescence/adult onset MTHFR deficiency may manifest as isolated and treatable

distinct neuro-psychiatric syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 13:29. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0767-9>

García-Caparrós P, Filippis LD, Gul A, Hasanuzzaman M, Ozturk M, Altay V et al (2021) Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review* (2021) 87:421-466. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09231-1>

Garcia-Casal MN, Estevez D, De-Regil LM (2018) Multiple micronutrient supplements in pregnancy: Implementation considerations for integration as part of quality services in routine antenatal care. Objectives, results, and conclusions of the meeting. *Matern Child Nutr* 14:e12704. <https://doi.org/10.1111/mcn.12704>

Ge Q, Hu X, Ma N, Sun M, Zhang L, Cai Z (2021) Maternal high-salt diet during pregnancy impairs synaptic plasticity and memory in offspring. *FASEB J* 35:e21244. <https://doi.org/10.1096/fj.202001890R>

Geltink RIK, Pearce EL (2019) The importance of methionine metabolism. *Elife* 8:e47221. <https://doi.org/10.7554/eLife.44210>

Georgief MK, Ramel SE, Cusick SE (2018) Nutritional influences on brain development. *Acta Paediatr* 107:1310–1321. <https://doi.org/10.1111/apa.14287>

Greene NDE, Copp AJ (2014) Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci* 37:221-242. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170354>

Gilmore JH, Knickmeyer RC, Gao W (2018) Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nature Reviews Neuroscience* 19:123-137. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2018.1>

Gresham E, Byles J, Bisquera A, Hure A (2014) Effects of dietary interventions on neonatal and infant outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 100:1298-1321. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.080655>

Grieger J, Clifton V (2014) A review of the impact of dietary intakes in human pregnancy on infant birthweight. *Nutrients* 7:153-178. <https://doi.org/10.3390/nu7010153>

Grotemeyer A, McFleder RL, Wu J, Wischhusen J, Ip CW. Neuroinflammation in Parkinson's Disease — putative pathomechanisms and targets for disease-modification. *Front Immunol* 13:878771. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878771>

Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor M.G, Ramos-Escobar N (2019) Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol* 10:1008. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01008>

Halliwell B (2014) Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls.

Biomed J 37:99-105. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.128725>

Halliwell B (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70:257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.

Halldorsson TI, Birgisdottir BE, Brantsæter AL, Meltzer HM, Haugen M, Thorsdottir I et al (2021) Old Question Revisited: Are High-Protein Diets Safe in Pregnancy? *Nutrients* 13:440. <https://doi.org/10.3390/nu13020440>

Harlan De Crescenzo A, Panoutsopoulos AA, Tat L, Schaaf Z, Racherla S, Henderson L et al (2021) Deficient or excess folic acid supply during pregnancy alter cortical neurodevelopment in mouse offspring. *Cereb Cortex* 31:635–649. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa248>

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88:1183-1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>

Hediger MA, Clemençon B, Burrier RE, Bruford EA (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 34, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009>

Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 14:463-477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>

Herring CM, Bazer FW, Johnson GA, Wu G (2018) Impacts of maternal dietary protein intake on fetal survival, growth, and development. *Exp Biol Med* 243:525-533. <https://doi.org/10.1177/1535370218758275>

Herrmann W (2006) Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab* 52:367-374.

Howe CL, LaFrance-Corey RG, Goddery EN, Johnson RK, Mirchia K (2017) Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation* 14:238. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1015-2>

Howes D, McCutcheon R (2017) Inflammation and the neural diathesis-stress hypothesis of schizophrenia: a reconceptualization. *Transl Psychiatry* 7:e1024. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.278>

Hrnčić D, Mikić J, Rasić-Marković A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R et al (2016) Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Can J Physiol*

Pharmacol 94:1074-1082. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0581>

Hu Xiaoming, Guo Feifan (2021) Amino Acid Sensing in Metabolic Homeostasis and Health. *Endocrine Reviews* 42 56-76. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnaa026>

Huang MC, Chen ME, Hung HC, Chen HC, Chang WT, Lee CH, et al (2008) Inadequate energy and excess protein intakes may be associated with worsening renal function in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 18:187-94. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2007.08.003>

Huang Y, He Y, Sun X, He Y, Li Y, Sun C (2014) Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse offspring fed a high-fat diet. *Int J Mol Sci* 15:6298-6313. <https://doi.org/10.3390/ijms15046298>

Hyland K, John S, Heales SJ (2010) Cerebral folate deficiency. *J Inherit Metab Dis* 33:563–570. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9159-6>

Ikenaka Kensuke, Maeda Y, Hotta Y, Nagano S, Yamada S, Ito D et al (2022) Serum asymmetric dimethylarginine level correlates with the progression and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 29:1410-1416. <https://doi.org/10.1111/ene.15254>

Iyer R, Tomar SK (2009) Folate: a functional food constituent. *J Food Sci* 74:R114-22. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x>

Jacobs AH, Tavitian B (2012) Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1393-1415. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.53>

Jadavji NM, Mosnier H, Kelly E, Lawrence K, Cruickshank S, Stacey S et al (2019) One-carbon metabolism supplementation improves outcome after stroke in aged male MTHFR-deficient mice. *Neurobiol Dis* 132:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104613>

Joubert BR, den Dekker HT, Felix JF, Bohlin J, Ligthart S, Beckett E et al (2016) Maternal plasma folate impacts differential DNA methylation in an epigenome-wide meta-analysis of newborns. *Nat Commun* 7:10577. <https://doi.org/10.1038/ncomms10577>

Jones P, Lucocka M, Scarletta CJ, Veysey M, Beckett EL (2019) Folate and inflammation – links between folate and features of inflammatory conditions. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* 18:100104. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2019.100104>

Joshi AA, Vaidya Soniya S, St-Pierre MV, Mikheev Andrei M, Desino KE et al (2016) Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance *Pharm Res* 33:2847-2878. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2028-8>

Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T (2001) Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 30:1390-1399. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00543-3)

Józefczuk J, Kasprzycka W, Czarnecki R, Graczyk A, Józefczuk P, Magda K et al (2017) Homocysteine as a diagnostic and etiopathogenic factor in children with autism spectrum disorder. *J Med Food* 20:744-749. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0150>

Kanitz E., Otten W., Tuchscherer M., Gräbner M., Brüssow K-P, Rehfeldt C, et al (2012) High and low protein: carbohydrate dietary ratios during gestation alter maternal-fetal cortisol regulation in pigs. *PLoS One* 7:e52748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052748>

Kerstetter JE, O'Brien KO, Caseria DM, Wall DE, Insogna KL (2005) The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *J Clin Endocrinol Metab* 90:26-31. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0179>

Khot V, Chavan-Gautam P, Joshi S (2015) Proposing interactions between maternal phospholipids and the one carbon cycle: a novel mechanism influencing the risk for cardiovascular diseases in the offspring in later life. *Life Sci* 129:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.026>

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T (2013) Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics* 8:584-590. <https://doi.org/10.4161/epi.24621>

Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA et al (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 10:643-660. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>

Kojima S, Alberts JR (2009) Maternal care can rapidly induce an odor-guided huddling preference in rat pups. *Dev Psychobiol* 51:95-105. <https://doi.org/10.1002/dev.20349>

Kokras N, Antoniou K, Mikhail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C (2015) Forced swim test: what about females? *Neuropharmacology* 99:408–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.016>

Lecorguillé M, Teo S, Phillips CM (2021) Maternal Dietary Quality and Dietary Inflammation Associations with Offspring Growth, Placental Development, and DNA Methylation. *Nutrients* 13:3130. doi: <https://doi.org/10.3390/nu13093130>

Leite LO, Pitangueira JCD, Damascena NF, Costa PRF (2021) Homocysteine levels and cardiovascular risk factors in children and adolescents: systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* 79:1067-1078. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa116>

Leppik L, Kriisa K, Koido K, Koch K, Kajalaid K, Haring L et al (2018) Profiling of amino acids and their derivatives biogenic amines before and after antipsychotic treatment in first-episode psychosis. *Front. Psychiatry* 9:155. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00155>

Li W, Xu B, Cao Y, Shao Y, Wu W, Zhou J et al (2019) Association of maternal folate intake during pregnancy with infant asthma risk. *Sci Rep* 9:8347. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44794-z>

Liew SC, Gupta ED (2014) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism : epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* 58:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.10.004>

Lofthouse EM, Perazzolo S, Brooks S, Crocker IP, Glazier JD, Johnstone ED et al (2016). Phenylalanine transfer across the isolated perfused human placenta: an experimental and modeling investigation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310:R828-R836. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00405.2015>

Loureiro SO, Romão L, Alves T, Fonseca A, Heimfarth L, Neto VM et al (2010) Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 1355:151-164. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.071>

Lubout CMA, Goorden SMI, Hurk KVD, Jaeger B, Jager NGL, Koningsbruggen SV et al (2020) Successful treatment of hereditary folate malabsorption with intramuscular folinic acid. *Pediatr Neurol* 102:62-66. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.009>

Ly A, Lee H, Chen J, Sie KK, Renlund R, Medline A et al (2011) Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Res* 71:988-997. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2379>

Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D (2014) Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res* 79:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>

Lymperaki E, Tsikopoulos A, Makedou K, Paliogianni E, Kiriazi L, Charisi C et al (2015) Impact of iron and folic acid supplementation on oxidative stress during pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 35:803-806. <https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1011102> 99

Mahendran R, Thandeeswaran M, Kiran G, Arulkumar M, Ayub NKA, Jabastin J, et al (2018) Evaluation of pterin, a promising drug candidate from cyanide degrading bacteria. *Curr Microbiol* 75:684-693. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1433-0>

Mahmassani HA, Switkowski KM, Scott TM, Johnson EJ, Rifas-Shiman SL, Oken E et al (2022) Maternal diet quality during pregnancy and child cognition and behavior in a US cohort. *Am J Clin Nutr* 115:128-141. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab325>

Maredsous CD, Oozeer R, Barbillon P, Mary-Huard T, Delteil C, Blachier F., et al (2016) High-protein exposure during gestation or lactation or after weaning has a periodspecific signature on rat pup weight, adiposity, food intake, and glucose homeostasis up to 6 weeks of age¹⁻³. *J Nutr* 146:21-29. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216465>

Martens EA, Lemmens SG, Westerterp-Plantenga MS (2013) Protein leverage affects energy intake of high-protein diets in humans. *Am J Clin Nutr* 97:86-93. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.046540>

Martínez Y, Li X, Liu G, Bin P, Yan W, Más D et al (2017) The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids* 49:2091-2098. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2494-2>

Marx W, Lane M, Hockey M, Aslam H, Berk M, Walder K et al (2021) Diet and depression: exploring the biological mechanisms of action. *Mol Psychiatry* 26:134-150. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00925-x>

Matsumoto AK, Higashi CM, Bonifácio KL, Barbosa MA, Klein RM, Figueiras GB et al (2016) Co-exposure to fish oil or folic acid does not reverse effects in the progeny induced by maternal exposure to fluoxetine. *Neurotoxicol Teratol* 56:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.05.006>

Maurer AD, Reimer RA (2011) Maternal consumption of high-prebiotic fibre or -protein diets during pregnancy and lactation differentially influences satiety hormones and expression of genes involved in glucose and lipid metabolism in offspring in rats. *British Journal of Nutrition* 105:329-338. <https://doi.org/10.3390/nu13082730>

McGarel C, Pentieva K, Strain JJ, McNulty H (2015) Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the lifecycle. *Proc Nutr Soc* 74:46-55. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001554>

Menezo Y, Elder K, Clement A, Clement P (2022). Folic acid, folinic acid, 5 methyl tetrahydrofolate supplementation for mutations that affect epigenesis through the folate and one-carbon cycles. *Biomolecules* 12:197. <https://doi.org/10.3390/biom12020197>

Meyer PM, Alberts JR (2016) Non-nutritive, thermotactile cues induce odor preference in infant Mice. *J Comp Psychol* 130:369-379. <https://doi.org/10.1037/com0000044>

Meziane H, Quagazzal AM, Aubert L, Wietrzych M, Krezel W (2007) Estrous cycle

effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav* 6:192-200. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00249.x>

Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00521-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00521-x)

Mikael LG, Deng L, Paul L, Selhub J, Rozen R (2013) Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 97:47-52. <https://doi.org/10.1002/bdra.23092>

Mirpuri J (2021) Evidence for maternal diet-mediated effects on the offspring microbiome and immunity: implications for public health initiatives. *Pediatr Res* 89:301-306. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01121-x>

Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA (2012) Synapse loss induced by interleukin-1 β requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:571-578. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9342-7>

Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M (2009) Metabolic and mitochondrial dysfunction in early mouse embryos following maternal dietary protein intervention. *Biol Reprod* 80:622-630. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072595>

Moon J., Koh G (2020) Clinical evidence and mechanisms of high-protein diet-induced weight loss. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome* 29:166-173. <https://doi.org/10.7570/jomes20028>

Montezano AC, Touyz Rhian M (2012) Reactive Oxygen Species and Endothelial Function — Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110:87-94. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x>

Moro J, Tomé D, Schmidely P, Demersay T-C, Azzout-Marniche D (2020) Histidine: A systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species. *Nutrients* 12:1414. <https://doi.org/10.3390/nu12051414>

Nabi H, Bochud M, Glaus J, Lasserre AM, Waeber G, Vollenweider P et al (2013) Association of serum homocysteine with major depressive disorder: Results from a large population-based study. *Psychoneuroendocrinology* 38: 2309-2318. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.04.018>

Nakamura T, Naganuma F, Kudomi U, Roh S, Yanai K, Yoshikawa T et al (2022) Oral histidine intake improves working memory through the activation of histaminergic nervous system in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 609:141-148.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.016>

Naninck EFG, Stijger PC, Brouwer-Brolsma EM (2019) The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring. *Adv Nutr* 10:502-519. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy120>

Natale S, Masferrer ME, Deivasigamani S, Gross CT (2021) A role for cerebral cortex in the suppression of innate defensive behaviour. *Eur J Neurosci* 54:6044-6059. <https://doi.org/10.1111/ejn.15426>

Neggers YH (2014) Increasing prevalence, changes in diagnostic criteria, and nutritional risk factors for autism spectrum disorders. *ISRN Nutr* 2014:514026. <https://doi.org/10.1155/2014/514026>

Neves PAR, Gatica-Domínguez G, Santos IS, Bertoldi AD, Domingues M, Murray J et al (2020) Poor maternal nutritional status before and during pregnancy is associated with suspected child developmental delay in 2-year old Brazilian children. *Sci Rep* 10:1851. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59034-y>

Obeid R, Munz W, Jager M, Schmidt W, Herrmann W (2005) Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. *Am J Clin Nutr* 82:133-9. doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.1.133>

O'Neill RJ, Vrana PB, Rosenfeld CS (2014) Maternal methyl supplemented diets and effects on offspring health. *Front Genet* 5:289. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00289>

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87:315-424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>

Pan LA, Martin P, Zimmer T, Segreti AM, Kassif S, McKain BW et al (2017) Neurometabolic disorders: potentially treatable abnormalities in patients with treatment-refractory depression and suicidal behavior. *Am J Psychiatry* 174:42-50. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.15111500>

Panitchob N, Widdows KL, Crocker IP, Johnstone ED, Please CP, Sibley CP et al (2016) Computational modelling of placental amino acid transfer as an integrated system. *Biochim Biophys Acta* 1858:1451-1461. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.028>

Pape K, Tamouza R, Leboyer M, Zipp F (2019) Immunoneuropsychiatry — novel perspectives on brain disorders. *Nature Reviews Neurology* 15:317-328. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0174-4>

Pierozan P, Biasibetti-Brendler H, Schmitz F, Ferreira F, Netto CA, Wyse ATS, et al

(2018) Synergistic toxicity of the neurometabolites quinolinic acid and homocysteine in cortical neurons and astrocytes: implications in Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 34:147-163. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9834-6>

Pina-Camacho L, Jensen SK, Gaysina D, Barker ED. Maternal depression symptoms, unhealthy diet and child emotional-behavioural dysregulation. *Psychol Med* 45:1851-1860. <https://doi.org/10.1017/S0033291714002955>

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V et al (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2017:8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

Prado EL, Dewey KG. Nutrition and brain development in early life. *Nutr Rev* 2014 72:267-84. <https://doi.org/10.1111/nure.12102>

Puszko B, Sánchez S, Vilas N, Pérez M, Barretto L, López L (2017) El impacto de la educación alimentaria nutricional en el embarazo: una revisión de las experiencias de intervención. *Rev Chil Nutr* 44:79-88. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000100011>

Poirier R, Cheval H, Mailhes C, Charnay P, Davis S, Laroche S (2007) Paradoxical role of an Egr transcription factor family member, Egr2/Krox20, in learning and memory. *Front Behav Neurosci* 1:6. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.006.2007>

Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I (2014) Female mice liberated in inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav* 40:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>

Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL (2011) Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 104:474-479. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.012>

Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U (2014) Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* 436:332-347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>

Ramires-Junior OV, dos Santos TM, Silveira JS, Leite-Aguiar R, Coutinho-Silva R, Savio LEB et al (2022) Rivastigmine reverses the decrease in synapsin and memory caused by homocysteine: Is There Relation to Infammation? *Mol Neurobiol* 59:4517-4534. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02871-x>

Reis AR, de Azevedo MS, de Souza MA, Lutz ML, Alves MB, Izquierdo I, Cammarota M, Silveira PP, Lucion AB (2014) Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. *Behav Brain Res* 265:216–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.036>

Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ, Jonas PA, Burgess T, Binks K et al (2004) Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Mol Genet Metab* 1:273-281. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.12.010>

Reynolds RM, Godfrey KM, Barker M, Osmond C, Phillips DIW (2007) Stress responsiveness in adult life: influence of mother's diet in late pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2208-2210. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0071>

Rezk BM, Haenen GRMM, Vijgh WJFVD, Bast A (2003) Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. *Fed Eur Biochem Soc* 555:601-605. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01358-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01358-9)

Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environment Health Perspective* 108:511–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>

Sable P, Kale A, Joshi A, Joshi S (2014) Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *Int J Dev Neurosci* 34C:24-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.01.003>

Sable PS, Dangat KD, Joshi AA, Joshi SR (2012) Maternal omega 3 fatty acid supplementation during pregnancy to a micronutrient-imbalanced diet protects postnatal reduction of brain neurotrophins in the rat offspring. *Neuroscience* 217:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.001>

Sanderson SM, Gao X, Dai Z, Locasale JW (2019) Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer* 19:625-637. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8>

Selhub J (2002) Folate, B12 and B6 and one carbone metabolism. *J Nutr Heal Aging* 6:39-42.

Sheng JA, Bales NJ, Myers SA, Bautista AI, Roueinfar M, Hale TM et al 2021 The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci* 14:601939. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601939>

Shiell AW, Campbell-Brown M, Haselden S, Robinson S, Godfrey KM, Barker DJ (2001) High-meat, low-carbohydrate diet in pregnancy: relation to adult blood pressure in the offspring. *Hypertension* 38:1282-1288. <https://doi.org/10.1161/hy1101.095332>

Shulpekova Y, Nechaev V, Kardasheva S, Sedova A, Kurbatova A, Bueverova E (2021) The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules* 26:3731.

<https://doi.org/10.3390/molecules26123731>

Silveira JS, Ramires-Júnior OV, Schmitz F, Ferreira FS, Rodrigues FC, Coutinho-Silva R, et al (2022) Folic acid supplementation during pregnancy alters behavior in male rat offspring: nitrate stress and neuroinflammatory implications. *Mol Neurobiol* 59:2150-2170. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02724-7>

Sittig LJ, Herzing LB, Xie H, Batra KK, Shukla PK, Redei EE (2012) Excess folate during adolescence suppresses thyroid function with permanent deficits in motivation and spatial memory. *Genes Brain Behav* 11:193-200. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00749.x>

Sohel MMH, Akyuz B, Konca Y, Arslan K, Gurbulak K, Abay M et al (2020) Differential protein input in the maternal diet alters the skeletal muscle transcriptome in fetal sheep. *Mamm Genome* 31:309-324. <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09851-3>

Skovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T et al (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci* 17:1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms17101733>

Sloan NL, Lederman SA, Leighton J, Himes JH, Rush D (2001) The effect of prenatal dietary protein intake on birth weight. *Nutr Res* 21:129-139. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00258-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00258-X)

Solanky N, Jimenez AR, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD (2010) Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 31:134-143. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.017>

Solís-Ortiz S, Arriaga-Avila V, Trejo-Bahena A, Guevara-Guzmán R (2021) Deficiency in the essential amino acids L-isoleucine, L-leucine and L-histidine and clinical measures as predictors of moderate depression in elderly women: a discriminant analysis study. *Nutrients* 13:3875. <https://doi.org/10.3390/nu13113875>

Stanhewicz AE, Kenney WL (2017) Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. *Nutr Rev* 75:61-70. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw053>

Steenweg-de GJ, Roza SJ, Steegers EA, Hofman A, Verhulst FC, Jaddoe VW, et al (2012) Maternal folate status in early pregnancy and child emotional and behavioral problems: the Generation R Study. *Am J Clin Nutr* 95:1413-1421. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.030791>

Suzuki K (2017) The developing world of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis* 9:266-269. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000691>

Schweinberger BM, Wyse ATS (2016) Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids* 48:2479-2489. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2302-4>

Tang AC, Reeb-Sutherland BC, Romeo RD, McEwen BS (2014) On the causes of early life experience effects: evaluating the role of mom. *Front Neuroendocrinol* 35:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.11.002>

Taylor CE (2016) A novel treatment for “morning sickness”: nausea of pregnancy could be induced by excess sulfite which molybdenum can help alleviate. *Med Hypotheses* 95:313. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.08.007>

Thone-Reineke C, Kalk P, Dorn M, Klaus S, Simon K, Pfab T et al (2006) Highprotein nutrition during pregnancy and lactation programs blood pressure, food efficiency, and body weight of the offspring in a sex-dependent manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1025-30. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00898.2005>

Thöny B, Auerbach G, Blau N (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 347:1-16.

Tinelli C, Di Pino A, Ficulle E, Marcelli S Feligioni M (2019) hyperhomocysteinemia as a risk factor and potential nutraceutical target for certain pathologies. *Front Nutr* 6:49. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00049>

Tuchscherer M, Otten W, Kanitz E, Gräbner M, Tuchscherer A, Bellmann O et al (2012) Effects of inadequate maternal dietary protein: carbohydrate ratios during pregnancy on offspring immunity in pigs. *BMC Vet Res* 8:232. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-232>

Tuovinen S, Lahti-Pulkkinen M, Girchenko P, Heinonen K, Lahti J, Rebecca MR et al (2021) Maternal antenatal stress and mental and behavioral disorders in their children. *J Affect Disord* 278:57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.09.063>

Valera-Gran D, García DLHM, Navarrete-Muñoz EM, Fernandez-Somoano A, Tardón A, Julvez J et al (2014) Folic acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. *JAMA Pediatr* 168:e142611. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.2611>

Vanselow J, Kucia M, Langhammer M, Koczan D, Rehfeldt C, Metges CC (2011) Hepatic expression of the GH/JAK/STAT/IGF pathway, acute-phase response signalling and complement system are affected in mouse offspring by prenatal and early postnatal exposure to maternal high-protein diet. *Eur J Nutr* 50:611-23. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0168-5>

Veeranki S, Winchester LJ, Tyagi SC (2015) Hyperhomocysteinemia associated skeletal muscle weakness involves mitochondrial dysfunction and epigenetic modifications. *BBA — Mol Basis Dis* 1852:732-741. <https://doi.org/10.1016/j.bba>

dis.2015.01.008

Vuksan-Cusa B, Sagud M, Jakovljevic M, Peles AM, Jaksic N, Mihaljevic S et al (2013) Association between C-reactive protein and homocysteine with the subcomponents of metabolic syndrome in stable patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Nord J Psychiatry* 67:320-325. <https://doi.org/10.3109/08039488.2012.745601>

Wang X, Li Z, Zhu Y, Liu H, Huang G et al (2021) Maternal folic acid impacts DNA methylation profile in male rat offspring implicated in neurodevelopment and learning/memory abilities. *Genes Nutr* 16:1. <https://doi.org/10.1186/s12263-020-00681-1>

Wang X, Li W, Li Z, Ma Y, Yan J, Wilson JX et al (2019) Maternal folic acid supplementation during pregnancy promotes neurogenesis and synaptogenesis in neonatal rat offspring. *Cereb Cortex* 29:3390-3397. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy207>

Wang X, Li W, Li S, Yan J, Wilson JX, Huang G (2018) Maternal folic acid supplementation during pregnancy improves neurobehavioral development in rat offspring. *Mol Neurobiol* 55:2676-2684. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0534-2>

Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L (2015) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 3:136. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>

Widdows K, Panitchob N, Crocker IP, Please CP, Hanson MA, Sibley CP et al (2015) Integration of computational modeling with membrane transport studies reveals new insights into amino acid exchange transport mechanisms. *FASEB J* 29:2583-94. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267773>

WHO (2012) Guideline: Daily iron and folic acid supplementation in pregnant women. Geneva, World Health Organization. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77770/9789241501996_eng.pdf;jsessionid=39634C2C96B5BCA575B3865556CF4D07?sequence=1 [Acessado em 4 de agosto de 2022]

Wilkins HM, Morris JK (2017) New therapeutics to modulate mitochondrial function in neurodegenerative disorders. *Curr Pharm Des* 23:731-752. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161230144517>

Wollack, JB, Makori B, Ahlawat S, Koneru R, Picinich SC, Smith A et al (2008) Characterization of folate uptake by choroid plexus epithelial cells in a rat primary culture model. *J Neurochem* 104:1494-1503. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05095.x>

- Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Herring C, Seo H, Dai Z et al (2017) Functional amino acids in the development of the pig placenta. *Mol Reprod Dev* 84:879-82. <https://doi.org/10.1002/mrd.22809>
- Wu G (2016) Dietary protein intake and human health. *Food Funct* 7:1251-65. <https://doi.org/10.1039/c5fo01530h>
- Wu F, Tian FJ, Lin Y, Xu WM (2016) Oxidative stress: placenta function and dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 76:258-271. <https://doi.org/10.1111/aji.12454>
- Wu G, Bazer FW, Dai Z, Li D, Wang J, Wu Z (2014). Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annu Rev Anim Biosci* 2:387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114113>
- Wu G, Wu ZL, Dai ZL, Yang Y, Wang WW, Liu C et al (2013) Dietary requirements of “nutritionally nonessential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44:1107-1113. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1444-2>
- Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wycherley TP, Moran LJ, Clifton PM, Noakes M, Brinkworth GD (2012). Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard protein, low-fat diets: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 96:1281-98. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.044321>
- Wyse ATS, Sanches EF, Dos Santos TM, Siebert C, Kolling J, Netto CA (2020) Chronic mild hyperhomocysteinemia induces anxiety-like symptoms, aversive memory deficits and hippocampus atrophy in adult rats: New insights into physiopathological mechanisms. *Brain Res* 1728:146592. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146592>
- Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ et al (2008) Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the pune maternal nutrition study. *Diabetologia* 51:29-38. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0793-y>
- Yasuda S, Hasui S, Yamamoto C, Yoshioka C, Kobatashi M, Itagaki S et al (2008) Placental folate transport during pregnancy. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2277-2284. <https://doi.org/10.1271/bbb.80112>
- Yasuda S, Itagaki S, Hirano T, Iseki K (2005) Expression level of ABCG2 in the placenta decreases from the mid stage to the end of gestation. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:1871-6. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1871>
- Yin C, Chan T, Wing S, Cheng K (2017) Elevated homocysteine in human abdominal

aortic aneurysmal tissues. <https://doi.org/10.1177/1358863X17718260> Yong HY, Shariff Z, Yusof BNM, Rejali Z, Tee YYS, Bindels J et al (2021) Higher animal protein intake during the second trimester of pregnancy is associated with risk of GDM. *Front Nutr* 8:718792. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.718792>

Yu Jing, Xue Ranran, Wang Qiuling, Yu Hao, Liu Xia (2022) The effects of plasma homocysteine level on the risk of three major psychiatric disorders: a mendelian randomization study. *Front Psychiatry* 13:841429. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.841429>

Zeng Z, Liu F, Li S (2017) Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review *Ann Nutr Metab* 70:59-65. <https://doi.org/10.1159/000459633>

Zhao R, Matherly LH, Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis; intestinal absorption, transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med*:11:e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399409000969>

Zhao R, Goldman ID (2013) Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Asp Med* 34:373-385. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.006>

Zheng L, Yu X, Jiang W, Zhang D (2020) Total folate, natural folate and synthetic folic acid intake associations with adult depressive symptoms. *Asia Pac J Clin Nutr* 29:846–855. [https://doi.org/10.6133/apjcn.202012_29\(4\).0021](https://doi.org/10.6133/apjcn.202012_29(4).0021)

Ziats MN, Edmonson C, Rennert OM (2015) The autistic brain in the context of normal neurodevelopment. *Front Neuroanat* 9:115. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00115>

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36406

Título: AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À HIPERMETIONINEMIA E À DIETA HIPERPROTEICA DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL: EFEITO

Vigência: 01/02/2019 à 01/10/2022


Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 01/02/2019
Josiane Silva Silveira - Aluno de Doutorado desde 01/02/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 18/03/2019 - Auditório Plenarinho- Saguão do Prédio da Reitoria- Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 77 machos e 77 fêmeas Wistar , com 70 a 90 dias de idade (progenitores), além de mais 777 filhotes (machos e fêmeas) oriundos da prole dos progenitores, com idades experimentais de 07, 21 e 60 dias, todos provenientes do CREAL-UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 29 de Março de 2019



ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética