

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

DEBORA SANTOS ALVES DE OLIVEIRA

**ENRIQUECIMENTO DE ÔMEGA-3 EM DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA
PREVINE PREJUÍZOS METABÓLICOS E PRESSÓRICOS PRECOCES NA PROLE**

Recife

2021

DEBORA SANTOS ALVES DE OLIVEIRA

**ENRIQUECIMENTO DE ÔMEGA-3 EM DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA
PREVINE PREJUÍZOS METABÓLICOS E PRESSÓRICOS PRECOCES NA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

O48e Oliveira, Debora Santos Alves de.
Enriquecimento de Ômega-3 em dieta materna hiperlipídica previne
prejuízos metabólicos e pressóricos precoces na prole / Debora Santos Alves
de Oliveira. – 2021.
117 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientador : João Henrique da Costa Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Adaptação Fisiológica. 2. Dieta Hiperlipídica. 3. Ácido alfa-
Linolênico. 4. Hipertensão. I. Silva, João Henrique da Costa (Orientador).
II. Título.

613.28

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2022-285)

DEBORA SANTOS ALVES DE OLIVEIRA

**ENRIQUECIMENTO DE ÔMEGA-3 EM DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA
PREVINE PREJUÍZOS METABÓLICOS E PRESSÓRICOS PRECOCES NA PROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovado em: 28/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Elizabeth do Nascimento (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Raquel da Silva Aragão (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Monique Assis de Vasconcelos Barros (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Paulo Jacob Sabino (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

À minha família

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFPE e ao Centro Acadêmico de Vitória-UFPE, que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse realizar a minha pesquisa. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) por me conceder a bolsa de estudos, a qual foi de fundamental importância para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho.

Agradeço em especial ao meu orientador, professor João Henrique da Costa, por sua paciência e condução durante esses vários anos. Ele me proporcionou a realidade acadêmica, pedagógica e metodológica das quais contribuíram, em grande parte, para a minha formação. Sua confiança em meu trabalho foi essencial para que eu alcançasse maior autonomia e crescimento na pesquisa.

Sou também particularmente grata a todos que compõem o Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica. Aos vários colegas graduandos e pós-graduandos, em especial à Reginaldo Rocha, Luiza Menezes e Elionay Santos, por me acompanharem incansavelmente nos vários momentos de experimentação. Estendo os agradecimentos, ainda no âmbito acadêmico, a todos os professores que me ensinaram e me estimularam de alguma forma, e à professora Viviane Nogueira pela paciência de me ensinar técnicas. Sou grata a todos e também aos professores que tiveram a gentileza de ler essa tese e participar da minha banca final.

À minha família, em especial aos meus avós Boaventura (*in memoriam*) e Maria Alves, e aos meus pais José e Luiza Alves, por todo o apoio incondicional durante esses anos e por estenderem seu amor e cuidados a despeito da distância. Ao meu marido, Allan Oliveira, por sua ajuda e companhia constantes e pelas ricas discussões e confrontações que enriqueceram meu trabalho. À vocês dedico não somente este trabalho, mas a minha vida.

À amiga Aline Bloise, que dividiu comigo todas as etapas desta pesquisa. Agradeço por conduzir tão bem a vivência profissional e pessoal, e por ser uma fonte de apoio em todos os momentos que se fizeram necessários.

Aos doutores Danilo Fontes, Nelson Lima, Vinícius Vasconcelos, Juliete Lira e mestres Laura Mata, Taís Helena, Ana Paula Arcoverde por toda ajuda prestada.

“Cultivei por muito tempo uma convicção: a maior aventura humana é dizer o que se pensa”. (NASSAR, 1997)

RESUMO

A ingestão de *High-fat diet* (dieta rica em gordura, HFD) durante a gestação e lactação tem sido associada ao aumento do risco de desenvolvimento de distúrbios cardiorrespiratórios na prole adulta. Investigamos se o enriquecimento da dieta hiperlipídica com ômega(ω)-3 é capaz de atenuar as alterações cardiorrespiratórias na prole resultantes do consumo da mesma. A prole de ratos *Wistar* foi alimentada com dieta Controle (GC: 19% de lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 12,66$), hiperlipídica (HF: 33% lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 21,22$) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF $\omega 3$: 33% de lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 9,45$) durante a gestação e lactação e seus filhotes machos foram avaliados. Parâmetros de consumo alimentar da prole, medidas murinométricas, níveis séricos de marcadores metabólicos, frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação (VE) foram avaliados ao longo da vida (1, 7, 14, 21, 30, 90 e 300 dias). As medidas diretas da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e variabilidade respiratória (VR) e cardíaca (VC) foram avaliadas em ratos conscientes adultos (90 e 300 dias). A comparação dos grupos foi feita através da ANOVA one-way e foi considerado $p < 0,05$ como significativo. A HFD materna aumentou o peso corporal ao nascimento, provocou dislipidemia e níveis elevados de glicose em jejum no grupo HF. O enriquecimento de ω -3 na HFD materna reduziu o peso ao nascer e levou à melhora do perfil lipídico, glicêmico e bioquímico das transaminases do grupo HF $\omega 3$ até o início da vida adulta. No entanto, no final da idade adulta prole, não houve melhora nesses parâmetros bioquímicos. O grupo HF apresentou aumento da FR no 1º e 14º dia no momento basal, bem como diminuição do ΔVT no 14º e diminuição do ΔVT no 14º e 21º dia em resposta à hipóxia induzida. Em relação à variabilidade respiratória, o grupo HF apresentou menor valor do componente SD1 no 7º dia e maior do componente SD2 no 14º dia. HF $\omega 3$ mostrou SD1 aumentado no 21º dia. Além disso, tanto HF quanto HF $\omega 3$ apresentaram diminuição da banda LF e da razão LF / HF na variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência no 90º e 300º dia. No entanto, apenas HF apresentou aumento da PAM no 90º dia, e tanto HF quanto HF $\omega 3$ apresentaram PAM aumentada no 300º dia, quando comparados ao Controle. Nossos achados mostram que o consumo materno de dieta rica em ω -3 é capaz de atenuar ou prevenir prejuízos metabólicos induzidos pela HFD materna na prole até o início da idade adulta, mas não em idades mais tardias. A HFD materna também leva ao aumento da frequência respiratória durante o período de maturação da rede neural respiratória, diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e início precoce da hipertensão na prole. Além disso, a HFD materna

enriquecida com ω -3 foi capaz de mitigar os efeitos deletérios sobre os parâmetros ventilatórios durante o período de maturação da rede neural e impediu o início precoce da hipertensão na prole.

Palavras-chave: plasticidade fenotípica; dieta hiperlipídica; ácido alfa-linolênico; hipertensão.

ABSTRACT

Intake of a high-fat diet (HFD) during pregnancy and lactation has been associated with an increased risk of developing cardiorespiratory disorders in adult offspring. We investigated whether enrichment with omega-3 in the high-fat diet is capable of attenuating the cardiorespiratory changes in the offspring resulting from its consumption. The offspring of Wistar rats were fed a Control diet (GC: 19% lipids and ratio $\omega 6 : \omega 3 = 12.66$), hyperlipidic diet (HF: 33% lipids and ratio $\omega 6 : \omega 3 = 21.22$) or hyperlipidic enriched with omega-3 (HF $\omega 3$: 33% lipids and ratio $\omega 6 : \omega 3 = 9.45$) during pregnancy and lactation and their male offspring were evaluated. Parameters of offspring food intake, micrometric measurements, serum levels of metabolic markers, respiratory rate (RR), tidal volume (VT) and ventilation (VE) were evaluated on the 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th and 300th days of life. Direct measurements of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), respiratory rate (RR) and respiratory (VR) and heart (CV) variability were evaluated in conscious rats at 90 and 300 days of life. The groups were compared using one-way ANOVA and $p < 0.05$ was considered significant. Maternal HFD increased body weight at birth, caused dyslipidemia and high fasting glucose levels in the group with HF. The enrichment of omega-3 in maternal HFD led to lower birth weight and improved lipid, glycemic and biochemical profile of transaminases in the HF $\omega 3$ group until early adulthood. However, at the end of adulthood, there was no improvement in these biochemical parameters. The HF group showed an increase in RR on the 1st and 14th days at baseline, as well as a decrease in ΔVT on the 14th and a decrease in ΔVT on the 14th and 21st days in response to induced hypoxia. Regarding respiratory variability, the HF group had a lower value for the SD1 component on the 7th day and a higher value for the SD2 component on the 14th day. HF $\omega 3$ showed increased SD1 on the 21st day. In addition, both HF and HF $\omega 3$ showed a decrease in the LF band and the LF / HF ratio in heart rate variability in the frequency domain on the 90th and 300th day. However, only HF showed an increase in MAP on the 90th day, and both HF and HF $\omega 3$ showed an increased MAP on the 300th day, when compared to Control. Our findings show that maternal consumption of a diet rich in omega-3 is able to attenuate or prevent metabolic damage induced by maternal HFD in the offspring up to 90 days of age, but not in the long term, as observed at 300 days of age of the offspring. The consumption of the maternal HFD diet also leads to increased respiratory rate during the maturation period of the respiratory neural network, decreased heart rate variability and early onset of hypertension in the offspring. In addition, the maternal HF diet enriched with omega-3 was able to mitigate the deleterious effects on ventilatory parameters during the maturation period of the neural network and

prevented the early onset of hypertension in the offspring.

Keywords: phenotypic plasticity; high fat diet; alpha-linolenic acid; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental de acordo com o período de avaliação da prole de machos <i>Wistar</i> submetidos à dieta Controle (19% de lipídios), HF (33% de lipídios) e HF ω 3 (33% de lipídios enriquecida com ômega-3) durante a gestação e lactação.....	38
Figura 2 – Pletismografia de corpo inteiro representada por um desenho esquemático (adaptado de Penitente <i>et al.</i> , 2007) e uma imagem de um animal não anestesiado, no dia do experimento, em uma caixa pletismográfica de corpo inteiro.....	43
Figura 3 – Desenho esquemático do implante de cateter em veia e artéria femoral em ratos.....	45
Figura 4 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	56
Figura 5 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	58
Figura 6 – Valores hemodinâmicos basais aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	60
Figura 7 – Valores hemodinâmicos basais aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	61
Figura 8 – Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração de KCN endovenosa aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	61
Figura 9 – Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração de KCN endovenosa aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	62

Figura 10 – Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração endovenosa de Fen e NPS aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	63
Figura 11 – Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração endovenosa de Fen e NPS aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	65
Figura 12 – Barorreflexo espontâneo (SBR) e induzido (BRI) após administração endovenosa de Fen e NPS aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	66
Figura 13 – Barorreflexo espontâneo (SBR) e induzido (BRI) após administração endovenosa de Fen e NPS aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição quanto aos ingredientes das dietas experimentais.....	40
Tabela 2 – Composição percentual de ácidos graxos quanto à presença de dupla ligação na cadeia carbônica das dietas experimentais.....	43
Tabela 3 – Consumo alimentar em gramas, calorias e macronutrients e o coeficiente de eficiência alimentar após o desmame da prole de ratos submetidos à dieta Controle (C), Hiperlipídica (HF) e Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	47
Tabela 4 – Parâmetros murinométricos da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta Controle (C), Hiperlipídica (HF) ou Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante gestação e lactação.....	48
Tabela 5 – Perfil bioquímico em jejum aos 22, 30, 90 e 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação..	50
Tabela 6 – Parâmetros respiratórios basais de frequência respiratória (RF), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE) de 1 a 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação..	52
Tabela 7 – Valores de variação (Δ) de frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE) após indução de hipóxia de 7 a 30 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	53
Tabela 8 – Componentes SD1 (<i>standard deviation 1</i>) e SD2 (<i>standard deviation 2</i>) da variabilidade respiratoria de 1 a 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA Ácido araquidônico

ACC* Acetil CoA carboxilase

AGL Ácidos graxos livres

AIN-93 *American Institute of Nutrition* (em inglês); Instituto Americano de Nutrição

ALB Albumina

ALT Alanina aminotransferase

AST Aspartato aminotransferase

HF *High frequency* (em inglês); banda de alta frequência

Banda LF *Low frequency* (em inglês); banda de baixa frequência

BBn Intervalo respiração-a-respiração

BBn + 1 intervalo subsequente

BTH Butil-hidroxi-tolueno

C Grupo Controle

CB Corpúsculo carotídeo

CEA Coeficiente de eficiência alimentar

CEUA Comitê Ético de Uso Animal

CO₂ Dióxido de carbono

COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX Cicloxygenase

CT Colesterol total

DHA Ácido docosaexaenóico

EPA Ácido eicosapentaenóico

FC Frequência cardíaca

Fen Fenilefrina

FR Frequência respiratória

HDL-c *High-density lipoprotein cholesterol* (em inglês); lipoproteína de baixa densidade

HF *High frequency* (em inglês); alta frequência

HF Grupo hiperlipídico

HFD *High Fat Diet* (em inglês); dieta rica em gordura

HF ω 3 Grupo hiperlipídico enriquecido com ômega 3

HIF- 1 α Fator indutor de hipóxia - 1 α

IL-17 Interleucina-17

IL-1 β Interleucina-1 β

IL-6 Interleucina-6

KCN Cianeto de potássio

LDL-c *Low-density lipoprotein cholesterol* (em inglês); lipoproteína de baixa densidade

LF *Low frequency* (em inglês); baixa frequência

LF/HF Razão baixa frequência/alta frequência

LOX Lipoxigenase

NCS Nervo carotídeo

NPS Nitroprussiato de sódio

NTS Núcleo do Trato Solitário

O₂ Oxigênio

PAM Pressão arterial média

PE Polietileno

PPAR-gama* Receptor ativado por proliferador de peroxissomas-gama

Pré-böt C Complexo Pré-Bötzinger

pRR50 Porcentagem dos intervalos RR adjacentes

PT Proteínas totais

PUFA Ácidos graxos poliinsaturados

PVN Núcleo paraventricular

RMSSD Raiz quadrada da média das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes em um intervalo de tempo

RPM Rotações por minuto

RVLM rostroventrolateral médio

SBR Sensibilidade barorreflexa espontânea

SD1 *Standard Deviation 1* (em inglês)

SD2 *Standard Deviation 2* (em inglês)

SDARR Desvio padrão das médias dos intervalos RR normais

SDRR Desvio padrão de todos os intervalos RR normais

SNA Sistema Nervoso Autônomo

SREBP* Proteína reguladora de ligação ao elemento esterol

TNF- α Fator de necrose tumoral α

TX Tromboxano dependente de ciclooxygenase

VE Ventilação pulmonar

VFC Variabilidade da frequência cardíaca

VLDL *Very-low-density lipoprotein* (em inglês); lipoproteína de muito baixa densidade

VLF *Very low frequency* (em inglês); muito baixa frequência

VT Volume corrente

Δ Delta, variação

ω -3 Ômega 3

ω -6 Ômega 6

ω -6 $\hat{\Omega}$ mega 6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Ambiente perinatal, nutrição e plasticidade fenotípica.....	23
2.2	Dieta hiperlipídica materna e seus efeitos sobre o metabolismo e crescimento da prole.....	25
2.3	Dieta hiperlipídica materna e seu impacto sobre a rede de controle neural da pressão arterial da prole.....	26
2.4	Dieta hiperlipídica materna e alterações respiratórias e cardiovasculares na prole.....	28
2.5	Ômega (ω)-3 como estratégia nutricional em dietas hiperlipídicas.....	30
3	JUSTIFICATIVA.....	35
4	HIPÓTESES.....	36
5	OBJETIVOS.....	37
5.1	Objetivo geral.....	37
5.2	Objetivos específicos.....	37
6	MÉTODOS.....	38
6.1	Animais e desenho experimental.....	38
6.2	Manipulação nutricional.....	39
6.3	Consumo alimentar.....	42
6.4	Medidas murinométricas.....	42
6.5	Avaliação bioquímica.....	42
6.6	Medidas de ventilação pulmonar.....	43
6.7	Ativação dos quimiorreceptores periféricos.....	44
6.8	Análise da variabilidade respiratória.....	44
6.9	Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca.....	44
6.10	Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria e veia femoral.....	45
6.11	Estudo do tônus simpático sobre o sistema cardiovascular.....	45
6.12	Avaliação do barorreflexo.....	45
6.13	Análise dos dados.....	46
7	RESULTADOS.....	47
7.1	Consumo alimentar das proles de 22 a 300 dias de vida.....	47

7.2	Medidas murinométricas das proles de 1 a 300 dias de vida.....	48
7.3	Parâmetros bioquímicos das proles aos 22, 30, 90 e 300 dias de vida.....	49
7.4	Parâmetros ventilatórios das proles de 1 a 300 dias de vida.....	51
7.5	Indução de hipóxia nas proles de 7 a 30 dias de vida.....	53
7.6	Variabilidade respiratória das proles de 1 a 300 dias de vida.....	54
7.7	Variabilidade da frequência cardíaca das proles aos 90 e 300 dias de vida.....	55
7.8	Parâmetros hemodinâmicos basais das proles aos 90 e 300 dias de vida.....	60
7.9	Ativação quimiorreflexa das proles aos 90 e 300 dias de vida.....	61
7.10	Balanco barorreflexo das proles aos 90 e 300 dias de vida.....	63
8	DISCUSSÃO.....	68
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A – PAPER 1.....	92
	APÊNDICE B – PAPER 2.....	106
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA.....	117

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e metabólicas, tais como hipertensão, dislipidemias e diabetes tipo II, apresentam uma alta prevalência no mundo (DENG; WANG; YUAN, 2020). Tais doenças constituem um importante problema de saúde pública, uma vez que aumentam os fatores de risco associados ao surgimento de outras patologias, incluindo doenças coronárias, derrame cerebral e insuficiência cardíaca (LANDSBERG *et al.*, 2013). Estudos indicam que a etiologia das doenças cardiometabólicas compreende um fenótipo complexo, que emerge de diversas origens genéticas, ambientais, nutricionais, comportamentais e étnicas (LANDSBERG *et al.*, 2013; COSTA-SILVA, SIMÕES-ALVES, FERNANDES, 2016).

Neste contexto, evidenciou-se que os maus hábitos alimentares e o estado nutricional inadequado no início da vida podem desempenhar um importante papel na gênese de doenças cardiometabólicas, levando a disfunções fisiológicas. Essas disfunções podem ocorrer a partir de alterações no processo de diferenciação celular no período crítico do desenvolvimento e/ou modificações epigenéticas, tornando as células e tecidos suscetíveis a desordens ao longo da vida (HEINDEL; VANDENBERG, 2015; BAROUKI *et al.*, 2012).

Estudos mostram que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação está associado a um maior risco para o desenvolvimento de obesidade (DESAI *et al.*, 2020), diabetes mellitus (BRINGHENTI *et al.*, 2014), hipertensão (GUBERMAN *et al.*, 2013) e síndrome metabólica (DESAI *et al.*, 2014) nos descendentes. Além disso, estudos com ratos têm demonstrado que o consumo excessivo e desbalanceado de gorduras na dieta materna durante a gestação, lactação e/ou após o desmame leva ao aumento nos níveis basais de pressão arterial na prole (KHAN *et al.*, 2005; WILDE *et al.*, 2000; FEOLI *et al.*, 2003; STOCKER; MEADOR; ADAMS, 2007; XUE *et al.*, 2015), o qual persiste na vida adulta.

No entanto, durante a gestação e lactação há aumento das necessidades maternas de ácidos graxos essenciais, ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) e seus derivados: os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, conhecidos como ácido araquidônico (AA), ácido docosaexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), que desempenham papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central e acuidade visual (KOLETZKO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007). Os ácidos graxos ω -3 podem atuar por meio da diminuição na produção e/ou na supressão de citocinas inflamatórias durante a gestação, as quais são responsáveis no início pela

recepção do embrião e implantação no útero e no último trimestre pelo amadurecimento cervical e contração uterina, induzindo ao trabalho de parto (AKERELE; CHEEMA, 2016).

As propriedades antiinflamatórias do ω -3 ocorre por redução do metabolismo de ω -6 e, consequentemente, da produção de moléculas pró-inflamatórias. Isto se dá porque o mesmo grupo de enzimas são requeridas para a síntese de moléculas pró-inflamatórias a partir do ω -6 e antiinflamatórias a partir do ω -3 (PERINI *et al.*, 2010; AKERELE; CHEEMA, 2016). Há estudos que têm demonstrado que o ω -3 está associado ao menor risco de doenças cardiovasculares, mas os mecanismos adjacentes a isto ainda não estão esclarecidos (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002; HARRIS; CONNOR; LINSEY, 1984). Não se sabe ao certo se o efeito cardioprotetor é exercido pelo ω -3 ou pelos produtos metabólicos eicosanóides. No entanto, o DHA parece ser mais eficaz na redução da pressão arterial quando comparado ao EPA (MORI *et al.*, 2000).

Embora a etiologia da hipertensão arterial ainda não esteja completamente compreendida, observou-se que o desbalanço do sistema nervoso autônomo, com predominância do tônus simpático, constitui um importante fator de risco (BARROS *et al.*, 2015; DE-BRITO-ALVES *et al.*, 2015, 2016). Além disso, estudos sugerem que a dieta hiperlipídica pode ter um impacto significativo sobre o aumento da atividade nervosa simpática (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017), em neurônios de regiões-chave do controle cardiorrespiratório, a exemplo do núcleo do trato solitário (NTS) (BARDGETT; SHARPE; TONEY, 2014), o que poderia justificar, ao menos em parte, o aumento basal dos níveis de pressão arterial dos animais submetidos à dieta hiperlipídica materna perinatal.

Igualmente tem sido proposto que modificações na geração e modulação do ritmo respiratório basal (MORAES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2010, 2015; DE-BRITO-ALVES *et al.*, 2015) e alterações na quimiossensibilidade periférica e central ao O₂ e CO₂ podem desencadear a hiperativação do sistema nervoso simpático e, consequentemente, a hipertensão arterial (ZOCCAL, 2011; MORAES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2012, 2015). Isto sugere que mecanismos respiratórios também podem estar envolvidos no processo de instalação dessa patologia (BARNETT *et al.*, 2016; ITURRIAGA *et al.*, 2016; NANDURI; BRABHAKAR, 2016).

Neste estudo testamos a hipótese de que animais provenientes de mães que consumiram dieta hiperlipídica durante gestação e lactação apresentam alteração na maturação e controle ventilatório neonatal, decorrente do desbalanço autonômico. Hipotetizamos que estas alterações devam promover modificações na geração e modulação da atividade simpática e respiratória nesse

modelo experimental, com consequente desenvolvimento de hipertensão arterial. Além disso, testamos a hipótese de que o enriquecimento com ω -3 de dieta hiperlipídica, na proporção adequada, é capaz de reverter ou minimizar os danos ocasionados pelo alto consumo materno de ácidos graxos saturados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ambiente perinatal, nutrição e plasticidade fenotípica

O conhecimento dos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento humanos contribui para uma maior compreensão dos mecanismos relacionados à saúde e à doença ao longo da vida. Identificar quais, quando e como atuam tais mecanismos pode ser a melhor alternativa para evitar que as doenças se instalem. Neste sentido, evidências científicas apontam a existência de uma importante associação entre condições ambientais adversas no início da vida e a maior predisposição à instalação de doenças crônicas não-transmissíveis, possivelmente ocasionada por ajustes metabólicos precoces (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A gestação e lactação são períodos em que ocorrem rápida proliferação e diferenciação celular, assim como a maturação de órgãos e sistemas e, devido à essas características, este momento pode ser denominado de ‘período crítico do desenvolvimento’ (DOBBING, 1968, 1981; SMART, 1991; MORGANE *et al.*, 1993). Barker e colaboradores (1989) constataram que o baixo peso ao nascer e, principalmente, no primeiro ano de vida está relacionado a uma maior tendência à mortalidade por isquemia cardíaca. Posteriormente, Hales e colaboradores comprovaram que os indivíduos que nasceram com baixo peso ou apresentaram peso insuficiente no primeiro ano de vida desenvolviam intolerância à glicose, apresentavam maiores níveis de marcador de resistência à insulina (32-33 pró-insulina) e hipertensão arterial quando na vida adulta (HALES *et al.*, 1991).

Tendo em vista que o ambiente é capaz de influenciar o desenvolvimento do fenótipo, emerge então o conceito de plasticidade fenotípica, que pode ser definido como a capacidade do genótipo gerar mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e comportamento em resposta às condições ambientais (WEST-EBERHARD, 1989). Dentre os mecanismos pelos quais podem ocorrer mudanças no fenótipo estão os mecanismos epigenéticos, responsáveis por modificações hereditárias na expressão genética, porém mantendo a sequência de genes, por meio de processos de metilação do DNA, modificação das histonas e microRNAs (WADDINGTON, 1957; GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007; HANSON *et al.*, 2011). Estudos sugerem que o período fetal é o mais sensível à instalação das alterações epigenéticas, que são capazes de influenciar a expressão gênica celular e tecidual, o dimorfismo sexual e a predisposição de distúrbios e doenças ao longo da vida (WEST-EBERHARD, 1986, 2005; BOGDARINA *et al.*, 2007).

Nesse contexto, Wells (2011) propôs um modelo conceitual de má nutrição materna *versus* risco de doenças nos filhos, baseado nas características fenotípicas. Para o autor, os fenótipos

possuem tanto capacidade metabólica (diversidade de aspectos estruturais e funcionais de órgãos e sistemas adquiridos na vida fetal e infância), quanto carga metabólica (carga imposta ao organismo e sua condição fisiológica sobre a capacidade metabólica homeostática). Sendo assim, um insulto nutricional durante a gestação e/ou lactação é capaz de reduzir a capacidade metabólica da prole e, uma vez exposta a um ambiente de sobrecarga metabólica (ex.: consumo de dietas hipercalóricas e/ou exacerbada em macronutrientes, sedentarismo, stress, etc.), a razão capacidade metabólica e carga metabólica entra em desequilíbrio, predispondo o surgimento de doenças. Porém, é difícil precisar o momento em que tal instabilidade ocorre, tendo em vista que cada organismo possui sua particularidade fisiológica, podendo expressar as alterações fenotípicas ao curto ou ao longo prazo (WELLS, 2011).

Aspectos nutricionais, tais como a presença de obesidade materna e o consumo de dieta rica em gorduras durante a gravidez e/ou lactação, predis põem a prole ao aumento de adiposidade, obesidade, diminuição no percentual de massa magra e níveis aumentados de triglicerídeos, corticosterona, insulina e glicose, além de hipertensão, sendo potenciais fatores de risco para a instalação de síndrome metabólica na vida adulta (DESAI *et al.*, 2014). No entanto, a exposição precoce à dieta hiperlipídica, a despeito da obesidade materna, leva a prole ao aumento ponderal e modificação do comportamento alimentar. Há maior tendência ao consumo de alimentos sólidos antes mesmo do desmame e sem redução no consumo de leite materno, refletindo, desse modo, um padrão de hiperfagia que se mantém na vida adulta mesmo após a mudança para a dieta padrão (KOJIMA *et al.*, 2016).

Pirola e Ferraz (2017) afirmam que os ácidos graxos da dieta podem atuar sobre a relação celular dos macrófagos M1 (com atividade pró-inflamatória) / M2 (com atividade anti-inflamatória). Os ácidos graxos saturados estimulam o desenvolvimento de células M1, enquanto que os insaturados aumentam as células M2 no tecido adiposo. No processo de instalação da obesidade e hipertrofia dos adipócitos, os macrófagos pró-inflamatórios M1 e subconjuntos de células T infiltram o tecido adiposo. Segundo os autores, enquanto a obesidade se desenvolve acontece aumento, tanto no tecido adiposo quanto sistemicamente, de diversas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-17 (IL-17) e interleucina-6 (IL-6), que estão associadas à progressão do fenótipo obeso ligado à síndrome metabólica. O estabelecimento do fenótipo pró-inflamatório é caracterizado como a relação entre o desenvolvimento da obesidade, a evolução desta para a resistência à insulina, consequentemente ao *Diabetes Mellitus* tipo 2, e doença cardiovascular associada (PIROLA; FERRAZ, 2017).

2.2 Dieta hiperlipídica materna e seus efeitos sobre o metabolismo e crescimento da prole

O ambiente que uma prole em desenvolvimento experimenta durante o período perinatal é marcadamente influenciado pela saúde materna e composição da dieta (SULLIVAN; NOUSEN; CHAMLOU, 2014). Os mecanismos pelos quais a dieta materna e o perfil metabólico moldam o ambiente perinatal permanecem desconhecidos, mas estudos apontam que aumentos nas citocinas inflamatórias (BILBO; TSANG, 2010; SONG *et al.*, 2015), nutrientes (glicose e ácidos graxos) (TELLECHEA; MENEGUE; PIROLA, 2017; MORAHAN *et al.*, 2020) e hormônios (insulina e leptina) (GOMES *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2019) afetam o ambiente da prole em desenvolvimento.

Diversos estudos em animais sugerem que a exposição pré-natal à *High-Fat Diet* (HFD, “dieta rica em gordura” em tradução livre) é desfavorável para a saúde da prole, independentemente se a exposição ocorreu durante a gestação ou lactação. Dados sobre o impacto da HFD materna durante a gestação e lactação no peso ao nascer da prole indicam que a dieta não afeta diretamente o peso inicial dos filhotes (DESAI *et al.*, 2014; PURCELL *et al.*, 2011; VOLPATO *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2014). No entanto, muitas descobertas também indicam que os filhotes ganham significativamente mais peso durante a adolescência e idade adulta. Vários estudos têm demonstrado que a HFD materna que fornece entre 21% e 60% de energia proveniente das gorduras durante a gravidez e a lactação potencializam o crescimento da prole (DESAI *et al.*, 2014; PURCELL *et al.*, 2011; CONNOR *et al.*, 2012; PARADIS *et al.*, 2017; LÉPINAY *et al.*, 2015).

Além disso, Guo e Jen (1995) descreveram efeitos ao longo prazo da HFD pré-natal em ratos sobre a disfunção metabólica na prole. Esses efeitos incluíram aumento de peso, da gordura corporal e do fígado, aumento dos níveis de triglicerídeos hepáticos, níveis elevados de glicose e triglicerídeos totais no plasma. Vários estudos também mostraram que a síndrome metabólica em humanos contribui para o risco de doenças cerebrais como ansiedade, depressão, distúrbios de aprendizagem e transtorno de deficiência de atenção (ROFEY *et al.*, 2009; CSERJÉSI *et al.*, 2007; WARING; LAPANE, 2008, OTTESEN *et al.*, 2020).

Yokomizo e colaboradores (2014) mostraram que a HFD materna é capaz de programar o metabolismo da glicose na prole de camundongos. Contudo, a maioria dos estudos que avaliaram apenas a HFD materna consumida durante a gravidez e a lactação não relatou alterações importantes nos níveis de glicose ou insulina na prole (CONNOR *et al.*, 2012; D’ASTI *et al.*, 2010; JANTHAKHIN *et al.*, 2017). Por outro lado, um estudo demonstrou níveis aumentados de glicose no sangue em ratos adultos cujas mães foram alimentadas com HFD durante a gravidez e

lactação (DESAI *et al.*, 2014), enquanto outro estudo relatou redução dos níveis de glicose no sangue apenas em ratos jovens do sexo masculino (CONNOR *et al.*, 2012).

O consumo materno de HFD é conhecido por aumentar o risco de hipercolesterolemia na prole, levando ao aumento da morbidade e mortalidade (KISLAL; SHOOK; EDLOW, 2020; BLAY, 2021). O mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de colesterol programado pela HFD materna permanece desconhecido. A HFD materna também aumenta a adiposidade visceral e os níveis séricos de colesterol em ratos neonatos (ZHINKAN; YU; SCHLEGEL, 2018). Sabe-se que as células de gordura não são apenas uma reserva de energia ou uma estrutura protetora. Eles também agem como um órgão endócrino ativo que regula a homeostase metabólica (HARWOOD, 2012). Assim, pode-se dizer que a HFD materna está associada ao ganho de peso, à hipertensão e às complicações cardiovasculares na prole (ZINKHAN *et al.*, 2018; GAWLIŃSKA; GAWLIŃSKI; PRZEGALIŃSKI, 2020).

2.3 Dieta hiperlipídica materna e seu impacto sobre a rede de controle neural da pressão arterial da prole

O sistema cardiovascular é o primeiro sistema funcionante no embrião de mamíferos, principalmente devido à necessidade de um método eficiente de captação de oxigênio e nutrientes. O desenvolvimento deste sistema se dá no início da gestação e leva semanas ou até meses após o nascimento para amadurecer (SEGAR, 1997). Sendo assim, os períodos de gestação e primeira infância possibilitam interações pré- e pós-natais com o meio ambiente, que podem incluir insultos nutricionais, hipóxia aguda ou crônica, hiperóxia, e exposições a drogas ou toxinas. A plasticidade ocorre quando tais experiências, durante períodos críticos do desenvolvimento, resultam em alterações ao longo prazo na estrutura ou função da rede neural do controle cardiorrespiratório (CARROLL, 2003).

Um período crítico pode ser compreendido como uma janela de tempo durante o desenvolvimento dedicado à conformação estrutural e/ou funcional dos sistemas neurais do controle cardiorrespiratório. Experiências vivenciadas durante um período crítico podem interromper e alterar a trajetória de desenvolvimento, ao passo que a mesma experiência antes ou depois desse período tem pouco ou nenhum efeito (BERARDI *et al.*, 2000). Os efeitos da plasticidade sobre o controle cardiorrespiratório podem ocorrer em vários locais durante a formação das redes neurais do tronco cerebral e das vias quimio-aférentes, em vários momentos durante o desenvolvimento, e por vários mecanismos (CARROLL, 2003).

Conceitos anteriores que afirmavam que a maturação do sistema cardiorrespiratório estava tão rigidamente predeterminada por um mapa genético já cederam à uma visão atual diferente. Hoje sabe-se que as interações extremamente complexas entre genes, fatores de transcrição, fatores de crescimento e outras variáveis genéticas moldam o sistema de controle cardiorrespiratório, e as experiências sofridas nas ‘janelas do desenvolvimento’ desempenham um papel-chave para guiar o desenvolvimento normal ou não desse sistema (BURGGREN, 2020).

O insulto nutricional em períodos precoces da vida também pode levar a alterações no desenvolvimento e maturação do controle cardiorrespiratório (BOGDARINA *et al.*, 2007). Dessa forma, condições patológicas decorrentes do desequilíbrio do controle cardiorrespiratório podem ter suas raízes, ao menos em parte, na plasticidade fenotípica. Estudos com ratos têm demonstrado que o consumo elevado de lipídios na dieta materna durante os períodos de gestação, lactação e/ou após o desmame induz ao aumento nos níveis basais de pressão arterial na prole (FEOLI *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2005; XUE *et al.*, 2015), o qual persiste na vida adulta. Alguns estudos sugerem uma relação existente entre processos inflamatórios e disfunções no sistema nervoso autônomo (PATON; WAKI, 2009; ADLAN *et al.*, 2014).

O sistema nervoso autônomo pode ter uma importante participação no surgimento e progressão de doenças cardiovasculares (TOBALDINI *et al.*, 2017). O controle barorreflexo atua de forma direta sobre a modulação autonômica. Em situação de aumento pressórico, há uma estimulação do sistema de barorreflexo, o qual estimula a atividade cardíaca vagal e inibe o sistema nervoso simpático, levando à diminuição da frequência e da contratilidade cardíaca, da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, reduzindo a pressão arterial. Dessa forma, uma disfunção nos mecanismos de barorreceptor pode excitar a atividade simpática e inibir o sistema nervoso parassimpático, que em indivíduos saudáveis é essencial no controle cardíaco neural (LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015).

A condição inflamatória em algumas regiões do cérebro responsáveis pelo controle da atividade nervosa simpática, como o núcleo do trato solitário (NTS), a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) e o núcleo paraventricular (PVN), pode contribuir para o estabelecimento de patologias, como a hipertensão arterial (PATON; WAKI, 2009; ADLAN *et al.*, 2014). Tem sido observado que alterações no sistema imunológico constituem um dos fatores contribuintes para o aumento de pressão arterial (TIMPER; BRUNING, 2017). Estudos apontam que, em resposta à inflamação, as células de defesa do organismo, como os macrófagos e linfócitos, liberam citocinas pró-inflamatórias na circulação (IL-1 β , IL-6 e TNF α), as quais são capazes de aumentar a

atividade simpática e, por consequência, levar ao aumento de pressão arterial (PATON; WAKI, 2009; WAKI *et al.*, 2010).

Na inflamação, o aumento da aderência de leucócitos na microvasculatura do tronco encefálico (ou especificamente do NTS), pode levar à liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos, que alteram a atividade neuronal. A inflamação e o acúmulo dos leucócitos nesta microvasculatura do tronco encefálico podem elevar a resistência vascular. O acúmulo de leucócitos nos capilares é capaz de obstruir parcialmente o fluxo sanguíneo, reduzir a perfusão sanguínea e promover hipóxia localizada. Em consequência disso, ocorre aumento da atividade simpática e de pressão arterial (PATON; WAKI, 2009). Dentro da RVLM, região geradora de atividade destinada aos neurônios motores pré-ganglionares simpáticos, há neurônios intrinsecamente sensíveis à hipóxia (WANG *et al.*, 2001). Assim, promove-se um mecanismo de transdução pelo qual a baixa perfusão do tronco encefálico resulta em excitação simpática para tentar assegurar uma perfusão adequada (PATON; WAKI, 2009).

O desbalanço do sistema nervoso autonômico, com predominância do tônus simpático é um importante fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial em modelos de restrição proteica (BARROS *et al.*, 2015; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016). Estudos sugerem que a dieta hiperlipídica também pode ter um impacto significativo na regulação da atividade simpática em neurônios de regiões-chave do controle cardiorrespiratório, como o NTS (BARDGETT; SHARPE; TONEY, 2014; VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

O consumo de dieta hiperlipídica por ratos adultos durante um período de 3 ou 6 semanas induz ao aumento dos níveis pressóricos associado à maior ativação de citocinas pró-inflamatórias e à maior expressão gênica de componentes do sistema renina-angiotensina no NTS, com a expressão diferindo de acordo com o tempo de exposição ao insulto nutricional (SPERETTA *et al.*, 2014). Já o consumo de dieta hiperlipídica materna durante a gestação e lactação induz na prole adulta o aumento de pressão arterial, com redução da sensibilidade barorreflexa, associada ao desbalanço autonômico e evidente aumento no tônus do sistema nervoso simpático para o coração. Esses dados sugerem que as alterações decorrentes do consumo excessivo de lipídios, através de uma dieta com 32% de energia fornecida pelas gorduras (68% de ácidos graxos saturados, 16% monoinsaturados e 16% poli-insaturados) consumida pelas mães favorecem a instalação da hipertensão arterial nessa condição experimental (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

2.4 Dieta hiperlipídica materna e alterações respiratórias e cardiovasculares na prole

Ao longo da vida, a respiração sofre ajustes, sendo capaz de suprir as demandas impostas por diversas situações, tais como gestação, envelhecimento, exercício físico e doença, exibindo

um padrão de plasticidade funcional (MIRONOV, 2009) como qualquer comportamento motor em resposta ao estresse e às condições ambientais, principalmente no início da vida. Os movimentos gerados durante a atividade respiratória são comandados pelo tronco cerebral, mais especificamente na região da medula ventrolateral, também chamada de complexo Pré-Bötzing (Pré-böt C). Lá ocorre a ação dos grupos de neurônios localizados no NTS (BANJAI *et al.*, 2009), núcleo ambíguo (MIRONOV, 2009), núcleo hipoglosso, núcleo espinhal do trigêmeo e núcleo olivar inferior. Doenças cardíacas e pulmonares constituem os principais precedentes de distúrbios no ritmo respiratório (MIRONOV, 2009).

O sistema nervoso autônomo pode desempenhar um importante papel no surgimento e progressão de doenças cardiovasculares. O controle barorreflexo atua de maneira direta sobre a modulação autonômica. Quando a pressão arterial se eleva, ocorre estimulação sobre o sistema de barorreflexo, que estimula a atividade cardíaca vagal e inibe o sistema nervoso simpático, levando à diminuição da frequência e da contratilidade cardíaca, da resistência vascular periférica e consequentemente à redução da pressão arterial. A disfunção nos mecanismos de barorreceptor pode excitar a atividade simpática e inibir o sistema nervoso parassimpático, que em indivíduos saudáveis é fundamental no controle cardíaco neural (LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015). A obesidade foi associada ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático no mecanismo de desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos adultos, com disfunção do reflexo barorreceptor no controle da pressão arterial a curto prazo (SCHREIHOFFER *et al.*, 2007). A modulação do barorreflexo sobre a regulação da pressão arterial é o resultado da interação de áreas centrais e vias aferentes das áreas reflexogênicas do coração, pulmão e vasos (LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015).

Estudos do nosso laboratório têm investigado o desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta e seus mecanismos, subjacente ao modelo de desnutrição perinatal. Observou-se que animais submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação apresentam aumento de pressão arterial aos 90 dias de vida, com elevação de frequência respiratória já aos 30 dias de vida, a qual persiste na vida adulta. Além disso, esses animais apresentam maior sensibilidade ao O₂ e CO₂ em situações de hipóxia e hipercapnia, apresentando maior resposta ventilatória aos 30 e 90 dias (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). Tal fato demonstra o envolvimento do sistema respiratório nos mecanismos de desenvolvimento da hipertensão arterial associada à desnutrição durante gestação e lactação. Paralelo a isso, investigou-se também o controle autonômico vascular, observando nos animais desnutridos uma elevação da razão entre as bandas de baixa e alta frequência (LF/HF), sugerindo aumento da atividade simpática, o que pode contribuir para

elevação da pressão arterial associada a um desbalanço no controle autonômico cardiovascular (BARROS *et al.*, 2014).

Posteriormente, confirmou-se que esses animais submetidos à desnutrição perinatal e que apresentavam aumento da pressão arterial aos 90 dias também haviam apresentado previamente aos 30 dias de vida maior atividade excitatória simpática bem como maior atividade motora inspiratória e do nervo frênico, em condições basais, com ativação do quimiorreflexo periférico. Ainda aos 30 dias, foi observado que os animais desnutridos apresentam maior expressão do fator indutor de hipóxia - 1α (HIF- 1α) nos corpos carotídeos, o qual está envolvido na resposta celular à oferta insuficiente de oxigênio e energia, e que pode gerar respostas adaptativas (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o sistema cardiorrespiratório e se os mecanismos observados na instalação da hipertensão arterial secundária à desnutrição proteica materna também estão presentes na situação de ingestão excessiva de gorduras.

Um estudo observou que ratos expostos à dieta hiperlipídica (32% de lipídios) durante a gestação e lactação apresentaram aumento da pressão arterial e frequência cardíaca no início da vida adulta. Esses animais também apresentaram prejuízo na sensibilidade do barorreflexo, provavelmente associado à hiperglicemia, a qual promove um desbalanço do sistema nervoso autônomo, com estimulação simpática e redução no controle parassimpático, além de disfunção endotelial (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

Ademais, há evidências de que a HFD materna também induz mudanças na microbiota da prole em primatas não-humanos (MA *et al.*, 2014). Consequentemente, como a microbiota materna se relaciona com a do bebê, a otimização da dieta materna e da composição da microbiota podem, portanto, melhorar o desenvolvimento da microbiota infantil (BÄCKHED *et al.*, 2015). Embora tenha sido demonstrado que o consumo de dietas ricas em gordura prejudiquem o equilíbrio microbiano intestinal e induzam obesidade por inflamação, evidências sugerem que os ácidos graxos saturados e poliinsaturados (PUFAs) diferem em sua interação com a microbiota intestinal e os resultados metabólicos subsequentes (PATTERSON *et al.*, 2014; CAESAR *et al.*, 2015).

2.5 Ômega (ω)-3 como estratégia nutricional em dietas hiperlipídicas

A inflamação aguda e crônica está na base da patogênese e progressão de várias doenças cardiovasculares, incluindo miocardite, infarto do miocárdio, dissecção aórtica, aterosclerose e remodelação cardíaca (ENDO; ARITA, 2016). É amplamente aceito que as propriedades antiinflamatórias dos PUFAs ω -3 contribuem para seus efeitos cardioprotetores. Na verdade, a

ingestão dietética de PUFA ω -3 é capaz de diminuir as concentrações circulantes de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), IL 1b e IL-6, além de melhorarem a capacidade funcional do ventrículo esquerdo em cardiomiopatia dilatada não isquêmica (NODARI *et al.*, 2011). A ingestão de ω -3 está relacionada à diminuição de eventos cardiovasculares que levam ao risco de morte súbita (HOWE, 1997). No entanto, os mecanismos subjacentes aos efeitos cardioprotetores dos PUFA ω -3 não são totalmente compreendidos.

Os PUFA ω -3 podem ser incorporados na bicamada fosfolipídica de membranas da célula e podem afetar a fluidez da membrana, a formação do microdomínio lipídico e a sinalização através de membranas. Uma vez que os PUFA ω -3 têm muitas ligações e carbonos de cadeia longa, sua incorporação nos fosfolipídios dentro de uma membrana pode alterar suas propriedades e influenciar a função de várias proteínas de membrana, incluindo a supressão da sinalização teta da proteína C quinase e a produção da interleucina (IL)-2 (FAN *et al.*, 2004), além da interrupção da dimerização e recrutamento do receptor *toll-like 4* (WONG *et al.*, 2009). Vale ressaltar que a alteração do microambiente lipídico em cardiomiócitos por meio da inclusão de PUFA ω -3 podem modular a função do canal iônico, levando a efeitos antiarrítmicos (HALLAQ; SMITH; LEAF, 1992).

Além disso, os PUFA ω -3 também evitam a conversão de ácido araquidônico a partir dos PUFA ω -6 em eicosanóides pró-inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos) servindo como um substrato alternativo para ciclooxigenase ou lipoxigenase, e resultando na produção de produtos menos potentes (como prostaglandinas da série 3 e tromboxanos e leucotrienos da série 5) (DYERBERG *et al.*, 1978; ENDO; ARITA, 2016). Dessa forma, a menor incidência de infarto do miocárdio em uma população que consome uma dieta rica em ω -3 PUFA pode ser devido, em parte, a uma redução na formação do prostanóide pró-trombótico TXA2 de AA. Além disso, os PUFA ω -3 são metabolizados em PGI3 (que possui antiplaquetários) e TXA3 (que não induz à agregação plaquetária) (DYERBERG *et al.*, 1978).

Os PUFA ω -3, como os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), possuem uma série de ações biológicas que melhoram a saúde cardiometabólica. Ambos regulam negativamente a expressão de genes relacionados à inflamação por meio da inibição da sinalização de NF- κ B pelo bloqueio da fosforilação de I κ B (ZHAO *et al.*, 2004) ou através do receptor nuclear PPAR α/γ (GANI; SYLTE, 2008). Além disso, os PUFA ω -3 são um ligante para GPR120, que atenua a sinalização pró-inflamatória mediada pelo receptor *toll-like 4* e TNF- α em macrófagos (TALUKDAR *et al.*, 2010). GPR120, um membro da família GPCR, também é altamente expresso em adipócitos maduros e a estimulação de GPR120 com PUFA ω -3 aumenta a expressão do

transportador de glicose GLUT4, promovendo maior captação de glicose nos adipócitos (TALUKDAR *et al.*, 2010).

O consumo de EPA e DHA também está associado a importantes ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-trombóticas e anti-arritmogênicas capazes de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (WANG *et al.*, 2016), além de melhorar os níveis de triglicerídeos (WANG *et al.*, 2016), metabolismo da glicose e função endotelial, principalmente quando usado de forma complementar à terapia com estatinas (ALFFADAGH *et al.*, 2017).

Em condições de hiperglicemia materna, como no diabetes *melittus*, o enriquecimento com óleo de linhaça (fonte vegetal de ω -3) na dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação interferiu positivamente na morfogênese do pâncreas, com aumento no percentual de ilhotas pequenas e expressão de células beta, e menor percentual de ilhotas grandes semelhante a um pâncreas normal (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2014). A hiperglicemia materna leva à hipertrofia e hiperplasia de ilhotas pancreáticas para maior produção de insulina como mecanismo compensatório (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2015).

Também tem sido demonstrado que a ingestão de ω -3 é capaz de desempenhar um papel hipotensor dose-dependente em indivíduos hipertensos (HOWE, 1997) devido, principalmente, à sua ação anti-inflamatória ao diminuir a síntese de derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E2, tromboxano A2, prostaciclina e leucotrieno B4 (KREMER, 2000). Foi evidenciado que o consumo de PUFA ω -3, como o DHA, está associado à diminuição da frequência cardíaca e ao aumento da variabilidade da frequência cardíaca em portadores de doenças cardíacas isquêmicas e diabetes *mellitus* (CHRISTENSEN; SCHMIDT, 2007).

O aumento da variabilidade cardíaca é considerado um preditor de saúde cardiovascular e a sua redução aumenta o risco de mortalidade, refletindo a diminuição da atividade vagal e responsividade cardíaca (CHRISTENSEN; SCHMIDT, 2007; LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015). A suplementação de 600mg/dia de DHA durante o segundo e terceiro trimestre gestacional aumentou os valores de variabilidade da frequência cardíaca no feto e associou-se a um melhor desempenho na escala de avaliação do comportamento neonatal em relação ao desenvolvimento do sistema motor e autônomo. O efeito do DHA sobre a frequência cardíaca e a variabilidade sugere que os PUFA ω -3 são capazes de modular o controle autonômico (GUSTAFSON *et al.*, 2013).

Além disso, a ingestão de EPA e DHA foi associada a um risco 11% menor de doença arterial (WANG *et al.*, 2016). Fatores de risco cardiovascular/metabólico e estado inflamatório

foram reduzidos quando associados com dieta mediterrânea e alimentos ricos em ω -3, onde os níveis de ω -3 mais elevados foram associados à redução do risco de doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas (HARRIS *et al.*, 2018). A suplementação com 1,86 g de EPA e 1,5 g de DHA diariamente associada ao tratamento com estatina contribui na prevenção da progressão da placa coronariana fibrosa em pacientes com doença arterial coronariana estável (ALFFADAGH *et al.*, 2017). Da mesma maneira, essa terapia contribui para a alteração do perfil lipídico e das subfrações das lipoproteínas de alta densidade em pacientes tabagistas, otimizando a saúde cardiovascular destes pacientes (PAPPIANI; DAMASCENO, 2016). Já dietas à base de peixe (4 refeições de peixe por semana) têm o potencial de aumentar o tamanho das partículas de HDL, resultando em benefícios em pacientes com doença cardíaca coronária, quando comparada a uma dieta rica em outros tipos de carne (ERKILLA *et al.*, 2014).

Os PUFA ω -3 também podem levar à melhora da função endotelial promovendo a liberação de óxido nítrico das células endoteliais, diminuir a pressão arterial sistólica e diastólica em repouso pela incorporação de EPA e DHA nos fosfolipídios da membrana e, portanto, aumentar a complacência arterial sistêmica (MASSARO *et al.*, 2008). Da mesma maneira, os PUFA ω -3 são capazes de influenciar diretamente a frequência cardíaca, pois podem inibir os canais de sódio dependentes de voltagem dos miócitos e prolongar o período refratário relativo. Além disso, os PUFA ω -3 têm a capacidade de diminuir os níveis séricos de triglicerídeos, em parte pela redução da síntese hepática de lipoproteínas de densidade muito baixa e, em parte, aumentando a degradação de ácidos graxos e acelerando a liberação de triglicérides do plasma (JACOBSON *et al.*, 2012).

A utilização de dietas enriquecidas com ω -3 durante a gestação e lactação está associada à redução de adiposidade, diminuição do tamanho do adipócito e diminuição dos níveis séricos de leptina na prole (KOROTKOVA *et al.*, 2002). A ingestão de ω -3 também está relacionada à melhora da sensibilidade à insulina (HUSSAIN *et al.*, 2013), a qual mostra-se diminuída com a idade na prole de ratos machos (SARDINHA *et al.*, 2013).

Ácidos graxos do tipo ω -3 e ω -6 desempenham papéis opostos na resposta inflamatória (CALDER, 2006). Os PUFA ω -6 normalmente regulam a inflamação, agindo como precursores de eicosanóides pró-inflamatórios, enquanto os PUFA ω -3 combatem a inflamação competindo dentro da mesma via enzimática. Quantidades excessivas de PUFA ω -6 e uma relação ω -6/ ω -3 muito alta, como é encontrada nas dietas ocidentais de hoje, promovem o surgimento de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças inflamatórias e autoimunes. Ao

contrário, níveis aumentados de PUFA ω -3 e uma razão ω -6/ ω -3 mais baixa exercem efeitos supressivos (SCHULZE *et al.*, 2020).

Há evidências de que reduzir a razão ω -6/ ω -3 pode restaurar o metabolismo que foi prejudicado no contexto das doenças crônicas (SIMOPOULOS, 2008; 2016). Do ponto de vista da infância, reduzir a proporção de ω -6/ ω -3 em mães obesas pode reduzir o ganho de peso da prole e o processo inflamatório associado, de acordo com resultados encontrados em camundongos (HEERWAGEN *et al.*, 2013).

Nas últimas três décadas, a ingestão de PUFA ω -6 aumentou e de PUFA ω -3 diminuiu, resultando em um grande aumento da proporção ω -6/ ω -3 de 1:1 para 20:1 ou até mais atualmente. Essa mudança na composição dos ácidos graxos é paralela ao aumento significativo na prevalência de sobrepeso e obesidade (SIMOPOULOS *et al.*, 2016). Considerando o atual consumo populacional de dietas ricas em ácidos graxos saturados, com uma alta razão de ω -6/ ω -3, e o risco de doenças crônicas não-transmissíveis associadas, nós decidimos estudar o efeito materno do enriquecimento dietético de ω -3 neste modelo de dieta sobre a saúde cardiometabólica da prole de ratos.

3 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a compreender a relação entre os efeitos adversos da ingestão excessiva de lipídios da dieta durante gestação e lactação e a etiologia da hipertensão arterial. Neste contexto, pretendemos ainda avaliar o papel modulador do enriquecimento dietético de ω -3 à dieta hiperlipídica sobre os parâmetros metabólicos e cardiorrespiratórios da prole de ratos. Apesar de diversos estudos demonstrarem a associação do consumo de dieta hiperlipídica materna e o aparecimento de hipertensão arterial na prole, ainda não estão claros os mecanismos subjacentes a essas alterações. Assim, os resultados alcançados nesse estudo poderão: subsidiar os profissionais da área da saúde no esclarecimento de como o consumo de dieta hiperlipídica materna pode interferir na formação e controle do sistema cardiorrespiratório e, consequentemente, levar ao desenvolvimento de hipertensão arterial; elucidar o papel modulador da ingestão materna de PUFA ω -3 sobre as alterações funcionais.

4 HIPÓTESE(S)

- A dieta materna hiperlipídica durante a gestação e lactação está associada à prejuízos na composição corporal, bioquímica, maturação e controle ventilatório neonatal e de variáveis cardiorrespiratórias na vida adulta, com maior ativação de neurônios da rede respiratória e do sistema nervoso simpático.
- A dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 durante gestação e lactação reduz os efeitos deletérios causados por uma dieta hiperlipídica não-enriquecida sobre o perfil metabólico, ventilatório e cardiovascular da prole de rato

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do enriquecimento de ω -3 à dieta hiperlipídica materna durante gestação e lactação sobre o perfil metabólico, a maturação ventilatória e os níveis pressóricos da prole de ratos.

5.2 Objetivos específicos

Na prole de ratos provenientes de mães submetidas às dietas controle, hiperlipídica e hiperlipídica enriquecida com ω -3 durante gestação e lactação:

- 5.2.1 Analisar o consumo alimentar;
- 5.2.2 Comparar medições murinométricas durante o crescimento;
- 5.2.3 Analisar parâmetros bioquímicos,
- 5.2.4 Examinar os efeitos da dieta sobre a maturação ventilatória basal e após indução de hipóxia;
- 5.2.5 Identificar os parâmetros ventilatórios e cardiovasculares basais;
- 5.2.6 Investigar a variabilidade respiratória;
- 5.2.7 Investigar a variabilidade da frequência cardíaca;
- 5.2.8 Avaliar o controle quimiorreflexo;
- 5.2.9 Avaliar o controle barorreflexo.

6 MÉTODOS

6.1 Animais e desenho experimental

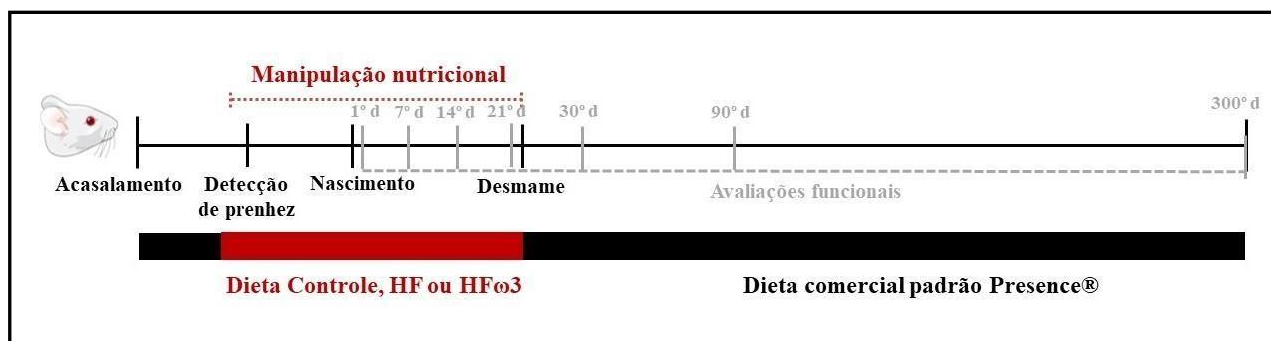
Foram utilizadas 30 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), com 85 a 90 dias de vida e peso corporal compreendido entre 220 e 260 g, bem como seus filhotes machos, provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados com o nº de registro 23076.041292/2017-17 pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFPE (ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA) e seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A determinação da prenhez foi realizada a partir da observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, definindo-se o primeiro dia de gestação. A partir do primeiro dia de gestação até o 21º dia de lactação, as ratas progenitoras foram separadas e colocadas em gaiolas individuais e alocadas aleatoriamente em suas respectivas dietas com água e ração *ad libitum*, sendo formados os seguintes grupos: grupo dieta Controle (n=10), grupo dieta hiperlipídica, HF (n=10); e grupo dieta hiperlipídica enriquecida com ω -3 (a partir do óleo de linhaça), HF ω 3 (n=10).

A temperatura e a umidade foram mantidas sob controle, dentro dos limites de 22 a 25 °C e 55 a 65%, respectivamente, com 12h de ciclo claro/escuro (luzes acesas das 06:00-18:00h). A prole proveniente de cada fêmea foi reduzida a 8 ratos por ninhada. Quando a ninhada foi composta por menos de 8 machos, fêmeas foram utilizadas para padronização do tamanho da ninhada até o desmame. A quantidade da prole de animais por grupo experimental a partir da dieta materna variou de 27 a 35 animais (Controle n=35; HF n=27; HF ω 3 n=27).

A Figura 1 demonstra o desenho experimental deste estudo, conforme os períodos das avaliações funcionais realizadas nos animais.

Figura 1 - Desenho experimental de acordo com o período de avaliação da prole de machos Wistar submetidos à dieta Controle (19% de lipídios), HF (33% de lipídios) e HF ω 3 (33% de lipídios enriquecida com ômega-3) durante a gestação e lactação. Trinta ratas foram colocadas para acasalar e, após a detecção da prenhez, foram separadas em três grupos de acordo com a dieta consumida (Controle, HF e HF ω 3) durante a gestação até o desmame das proles. Aos 22 dias de vida, as proles foram desmamadas e receberam dieta comercial padrão Presence® até os 300 dias de vida. As avaliações funcionais ocorreram no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 90º e 300º dia de vida da prole. A quantidade de animais por grupo experimental variou de 27 a 35 animais.



Fonte: A autora, 2021.

6.2 Manipulação nutricional

Para a manipulação nutricional foram utilizadas as seguintes dietas: Controle: dieta padrão cuja composição estava de acordo com a *American Institute of Nutrition* (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com 19% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 61% dos carboidratos; HF: dieta hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados, adaptada a partir da composição da dieta utilizada no estudo de Ferro Cavalcante (FERRO CAVALCANTE *et al.*, 2013), com 33% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 47% dos carboidratos; e HF ω 3: dieta hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados, enriquecida com ω -3, com 33% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 47% dos carboidratos (Tabela 1). A dieta padrão continha em torno de 3.5 kcal/g e as dietas hiperlipídicas em torno de 4,5 kcal/g. As dietas hiperlipídicas apresentavam maior teor de ácidos graxos saturados e a dieta enriquecida com ω -3 continha menor quantidade de ω -6 (Tabela 2). Após o desmame, aos 21 dias de vida, os animais receberam dieta padrão comercial para ratos (Presence®, Grupo Neovia, São Paulo, Brasil), formando três grupos: prole das mães alimentadas com dieta padrão (C), prole das mães alimentadas com dieta hiperlipídica com alto teor ácidos graxos saturados (HF) e prole mães alimentadas com dieta hiperlipídica com alto teor de ácidos graxos saturados enriquecida com ω -3 (HF ω 3).

Tabela 1 - Composição quanto aos ingredientes das dietas experimentais

Ingrediente/quantidade por 100g de dieta	AIN-93 G	Dieta hiperlipídica	Dieta Hiperlipídica suplementada com ômega 3
Amido de milho	39,7	15	15
Amido dextrinizado	13,2	-	-
Farinha de trigo	-	12	12
Biscoito maisena	-	7	7
Farinha de soja	-	6	6
Banha de porco	-	2	2
Manteiga	-	8	8
Caseína (>85%)	20	20	20
Goma guar	-	0,5	0,5
Sacarose	10	18	18
Óleo de linhaça	-	-	3,5
Óleo de soja	7	7	3,5
Fibra (celulose)	5	0,3	0,3
Vitaminas	1	0,7	0,7
Mineral mix	3,5	2,5	2,5
DL-metionina	0,3	0,25	0,25
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
BTH	0,0014	0,014	0,014
Glutamato monossódico (12,3%)	-	0,2	0,2
Cloreto de sódio	-	0,3	0,3
Total (g)	100	100	100

Kcal /100g	3,69	4,52	4,51
% Gorduras totais	18,6	33,6	32,3
% Proteínas	20,2	19,6	18,2
%Carboidratos	61	46,8	49, 4

AIN-93G de acordo com Reeves et al., 1993; dieta hiperlipídica adaptada de Ferro Cavalcante *et al.*, 2013;

*Composição nutricional calculada a partir da análise centesimal das dietas realizada no laboratório de Bromatologia do Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

Fonte: Adaptada de Ferro Cavalcante *et al.*, 2013.

Tabela 2 - Composição percentual de ácidos graxos quanto à presença de dupla ligação na cadeia carbônica das dietas experimentais

Ácidos graxos	Composição percentual dos ácidos graxos		
	Dietas		Hiperlipídica com ômega 3
	AIN-93G	Hiperlipídica	
Saturados			
Ácido octanoico (C8:0)	0	0	0
Ácido decanoico (C10:0)	0	0,85	0,74
Ácido láurico (C12:0)	0	1,16	1,15
Ácido mirístico (C14:0)	0	4,22	4,37
Ácido pentadecanoato (C15:0)	0	0,47	0
Ácido palmítico (C16:0)	11,97	22,78	21,73
Ácido heptadecanoato (C17:0)	0	0	0
Ácido esteárico (C18:0)	4,62	7,53	8,07
Ácido araquídico(C20:0)	0,36	0	0
Ácido behênico(C22:0)	0,37	0	0
Total	17,32	37,01	36,06
Monoinsaturados			
Ácido miristoleico (C14:1)	0	0,46	0
Ácido palmitoleico (C16:1)	0	0,95	0,87
Ácido heptadecanoico (C17:1)	0	0	0

Ácido oleico (C18:1)	29,93	28,32	38,47
Total	29,93	29,73	39,34
Poli-insaturados			
Ácido linolênico (C18:3)	3,89	1,64	2,32
Ácido linoleico (C18:2)	48,87	31,63	22,28
Total	52,76	33,27	24,6
Ômega 3 (g/100g)	0,27	0,27	0,4
Ômega 6 (g/100g)	3,42	5,73	3,78
Razão ômega 6:3	12,66	21,22	9,45

Os ácidos graxos foram identificados segundo padrão externo (FAME Supelco™ mix C4-C24, Bellefonte, PA, USA) e o percentual (%) calculado conforme normalização das áreas dos picos pelo método de cromatografia gasosa no Laboratório de Fitoquímicos e processos do Centro de Tecnologias e Estratégias do Nordeste. A partir da determinação percentual de ácido linolênico (ômega 3) e linoléico (ômega 6) foram calculadas as quantidades (g/100g de dieta) desses ácidos graxos e obteve-se a razão de ômega 6 / 3. A nomenclatura dos ácidos graxos seguiu a classificação determinada pela I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular (Santos *et al.*, 2013).

Fonte: Silva *et al.*, 2019

6.3 Consumo alimentar

O consumo de água e ração foi avaliado em dias alternados no início do período claro (às oito horas da manhã), pela diferença entre a quantidade ofertada e a sobra da gaiola. Os filhotes foram acompanhados desde o desmame (aos 22 dias) até os 300 dias de vida. A partir da avaliação do consumo alimentar e do ganho ponderal por meio da aferição da massa corporal foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) segundo a equação: $CEA = \text{ganho de peso no período avaliado} / \text{consumo alimentar no mesmo período}$ (NERY *et al.*, 2011). A quantidade de calorias consumidas bem como de macronutrientes foi obtida a partir da composição centesimal das dietas utilizadas.

6.4 Medidas murinométricas

Foram realizadas as medições murinométricas (peso corporal, comprimento naso-anal e circunferência abdominal) no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 90º e 300º dia de vida. Após obtenção das medidas, foi calculado o Índice de Lee no 90º e 300º dia de vida a partir da relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal do animal. As medições foram realizadas de acordo com o estudo de Novelli (NOVELLI *et al.*, 2007).

6.5 Avaliação bioquímica

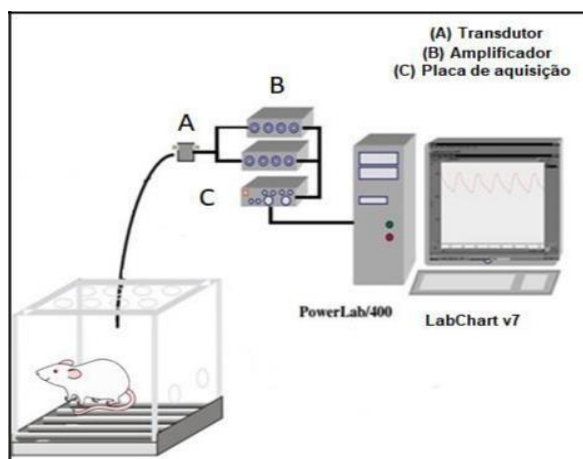
Nas idades de 22 (após o desmame), 30, 90 e 300 dias de vida, as proles foram submetidas ao jejum de 12 horas (*overnight*) e, em seguida, anestesiadas com Ketamina (80mg/Kg i.p) e xilazina (10mg/Kg i.p) para coleta de amostras de sangue através do rompimento do plexo retro

orbital. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3500 RPM por 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi transferido para um tubo Eppendorf e armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas por meio do equipamento Automatic Chemistry Analyzer (ver. 4e) (Pioway Medical Lab Equipament Co., Ltd.). Foram analisados: Glicemia de jejum, Triglicerídeos, Proteínas totais, Albumina, Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Colesterol total. A partir da dosagem de triglicerídeos foi obtido o valor de VLDL-colesterol pela fórmula de Friedewald = $TG/5$, conforme estabelecido na IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SPOSITO *et al.*, 2007).

6.6 Medidas de ventilação pulmonar

Nas idades de 1, 7, 14, 21, 30, 90 e 300 dias de vida foram avaliadas as medidas de ventilação pulmonar nas proles em repouso. Tais medidas foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Figura 2), em um sistema fechado (MALAN, 1973). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações causadas pela ventilação do animal foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal foi então enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments). Três variáveis respiratórias foram medidas: a frequência respiratória (FR), o volume corrente (VT) e a ventilação (VE) (MALAN, 1973).

Figura 2 – Pletismografia de corpo inteiro representada por um desenho esquemático (adaptado de Penitente *et al.*, 2007) e uma imagem de um animal não anestesiado, no dia do experimento, em uma caixa pletismográfica de corpo inteiro. Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar da caixa foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações causadas pela ventilação do animal foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais. O sinal foi então enviado à placa de aquisição e análise de dados (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments).



Fonte: Adaptado de Penitente *et al.*, 2007.



Fonte: A autora, 2021.

6.7 Ativação dos quimiorreceptores periféricos

Nas idades de 7, 14, 21 e 30 dias de vida foi realizada a ativação dos quimiorreceptores respiratórios periféricos e, conseqüentemente, a ativação do quimiorreflexo. Para tal, foi insuflada uma mistura hipóxica (contendo 7% de O₂) dentro da câmara pletismográfica por 1 min, num fluxo de 1 L/min, adaptado de De-Brito-Alves (DE-BRITO-ALVES *et al.* 2014).

6.8 Análise da variabilidade respiratória

A variabilidade respiratória dos animais foi avaliada nas idades de 1, 7, 14, 21, 30, 90 e 300 dias de vida. Para isso, analisou-se o intervalo respiração-a-respiração (BBn) e o intervalo subsequente (BBn + 1) de 200 ciclos respiratórios, conforme previamente descrito (PENG *et al.*, 2011). A variabilidade de curto prazo (SD1) e a variabilidade a longo prazo (SD2) foram calculadas como um índice de variabilidade respiratória. A avaliação da variabilidade respiratória foi realizada com animais em repouso (momento basal), e os registros realizados nos momentos de farejamento ou movimento do animal foram excluídos.

6.9 Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca

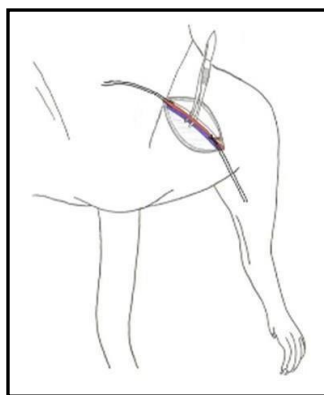
A avaliação autonômica cardiovascular foi realizada utilizando a análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência por um programa de software apropriado (CardioSeries-v.2.4; www.danielpenteado.com). Os espectros foram integrados no LF

(0,2-0,75 Hz) e as faixas de HF (0,75-3 Hz). Para avaliar o índice simpato-vagal, foi calculado a relação LF / HF da variabilidade.

6.10 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria e veia femoral

Na idade de 90 dias de vidas, metade dos animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de inserção de cateter (canulação) de polietileno na artéria femoral (para registro da pressão arterial) e na veia femoral (para infusão de drogas), sendo previamente anestesiados com ketamina (80 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg, ip), como descrito por De-Brito-Alves (DE-BRITO-ALVES *et al.* 2015). A outra metade dos animais foi submetida a este mesmo procedimento cirúrgico na idade de 300 dias.

Figura 3 – Desenho esquemático do implante de cateter em veia e artéria femoral em ratos. Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados em animais não-anestesiados por meio da conexão da cânula da artéria femoral com o transdutor mecanoelétrico de pressão, cujo sinal foi devidamente amplificado (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivadas da pressão arterial pulsátil (PAP) por meio deste sistema de aquisição.



Fonte: Jespersen *et al.*, 2012.

6.11 Estudo do tônus simpático sobre o sistema cardiovascular

O quimiorreflexo arterial foi ativado através da administração endovenosa de cianeto de potássio (KCN). Para tal, no momento do registro das variáveis hemodinâmicas, o cateter da veia femoral foi passado através do orifício na câmara fechada e conectado a um cateter PE-50, que por sua vez foi conectado a uma seringa contendo KCN. Foi injetada uma solução de KCN a 0,04% em dose única de 0,1ml por animal e observada as respostas hemodinâmicas, como descrito por Barros (BARROS *et al.*, 2015).

6.12 Avaliação do barorreflexo

Em sequência, após o retorno dos valores hemodinâmicos basais, foi realizada a ativação do barorreflexo arterial dos animais. Essa ativação foi feita através da razão da variação da frequência cardíaca (FC) refletida pela variação na pressão arterial média (PAM) induzida por drogas vasoativas. A fenilefrina (Fen), um alfa-agonista de receptores adrenérgicos, foi utilizada para aumentar a pressão arterial e ativar o barorreflexo. Foi injetada uma solução de Fen a 0,01% / kg. Após observação das respostas hemodinâmicas e retorno aos valores basais, foi administrado nitroprussiato de sódio (SNP), um potente vasodilatador usado para diminuir a pressão e bloquear a resposta barorreflexa. Foi injetada uma solução de SNP a 0,16% / kg. Assim, foram obtidas a variação da PAM e a resposta reflexa da FC diante das doses/drogas nos animais, sendo demonstrado como variação da PAM (Δ PAM; em mmHg) e FC (Δ FC; em bpm), como descrito por Paulino-Silva (PAULINO-SILVA; COSTA-SILVA, 2016).

6.13 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ epm (APÊNDICE A – PAPER 1; APÊNDICE B – PAPER 2). A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA one-way. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

7 Resultados

7.1 Consumo alimentar das proles de 22 a 300 dias de vida

O consumo alimentar foi verificado na prole com 22 a 30, 30 a 60, 60 a 90 e 90 a 300 dias de idade, obtendo-se o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) nos períodos avaliados (Tabela 3). No período de 22 a 30 dias, o grupo HF apresentou menor ingestão de gramas, calorias e macronutrientes quando comparados ao grupo C. Não houve diferença entre os grupos no valor do CEA. De 30 a 60 dias, não foi observada diferença no consumo entre os grupos, porém a prole HF ω 3 apresentou valores de CEA maiores que o grupo C ($p < 0,05$), sem diferença na prole HF. Na idade de 60 a 90 e 90 a 300 dias, não foram encontradas diferenças nos valores de consumo e CEA entre os grupos.

Tabela 3 - Consumo alimentar em gramas, calorias e macronutrientes e o coeficiente de eficiência alimentar após o desmame da prole de ratos submetidos à dieta Controle (C), Hiperlipídica (HF) e Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.

Período/ Nutriente	Grupo		
	C	HF	HF ω 3
	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM
22 a 30 dias			
Consumo (g)	110 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2*	106 $\pm$ 1
Calorias (Kcal)	380 $\pm$ 4	346 $\pm$ 6*	367 $\pm$ 3
Proteína (g)	28 $\pm$ 0,3	25 $\pm$ 0,4*	27 $\pm$ 0,6
Carboidrato (g)	60 $\pm$ 0,7	55 $\pm$ 0,9*	58 $\pm$ 0,5
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,4 $\pm$ 0,009	0,4 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01
30 a 60 dias			
Consumo (g)	727 $\pm$ 9	735 $\pm$ 17	741 $\pm$ 7
Calorias (Kcal)	2503 $\pm$ 33	2528 $\pm$ 58	2550 $\pm$ 24
Proteína (g)	184 $\pm$ 2	186 $\pm$ 4	191 $\pm$ 1
Carboidrato (g)	397 $\pm$ 5	401 $\pm$ 9	404 $\pm$ 3
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,2 $\pm$ 0,009	0,2 $\pm$ 0,006	0,3 $\pm$ 0,009*
60 a 90 dias			
Consumo (g)	618 $\pm$ 30	597 $\pm$ 14	615 $\pm$ 8
Calorias (Kcal)	2128 $\pm$ 105	2056 $\pm$ 48	2115 $\pm$ 27
Proteína (g)	157 $\pm$ 7	151 $\pm$ 3	156 $\pm$ 2
Carboidrato (g)	337 $\pm$ 16	326 $\pm$ 7	335 $\pm$ 4
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,1 $\pm$ 0,008	0,1 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,007

90 a 300 dias

Consumo (g)	10218 ± 5	8259 ± 2 [*]	10611 ± 5 [#]
Calorias (Kcal)	35149 ± 2	28410 ± 1 [*]	36501 ± 2
Proteína (g)	740 ± 0,3	607 ± 0,2	780 ± 0,3
Carboidrato (g)	1609 ± 0,5	1300 ± 0,3	1671 ± 0,4
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HFω3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média ± epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: a autora, 2021.

7.2 Medidas murinométricas das proles de 1 a 300 dias de vida

O grupo HF apresentou maior peso corporal com 1 dia de vida quando comparado aos demais (Tabela 4). Aos 7 dias (p <0,0001) e aos 14 dias (p <0,0001) os grupos HF e HFω3 apresentaram maior peso corporal. Aos 21 dias de idade (p = 0,002), o grupo HFω3 apresentou maior peso corporal quando comparado aos outros. Aos 30, 90 e 300 dias de idade, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos.

Ambos os grupos HF e HFω3 apresentaram circunferência abdominal aumentada no 1º dia de vida (p = 0,002). Aos 7 dias (p = 0,005) e 14 dias (p = 0,0009) apenas o grupo HF apresentou circunferência aumentada. Aos 21 dias, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Porém, aos 30 dias (p = 0,004), o grupo HF apresentou circunferência abdominal aumentada. Aos 90 e 300 dias de idade, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos.

O grupo HF apresentou comprimento naso-anal aumentado em relação ao C e ao HFω3 com 1 dia (p = 0,004) e 7 dias de vida (p <0,0001). Aos 14 dias, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Aos 21 dias (p <0,0001) tanto HF quanto HFω3 foram maiores em relação ao grupo C. Porém, apenas o grupo HF permaneceu maior aos 30 dias (p <0,0001) quando comparado aos demais. Aos 90 e 300 dias de idade, os grupos apresentaram crescimento corporal similar, e nenhuma diferença foi encontrada. Quanto ao Índice de Lee aos 90 e 300 dias, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 4 - Parâmetros murinométricos da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta Controle (C), Hiperlipídica (HF) ou Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HFω3) durante gestação e lactação.

Dias de vida / Variáveis

Grupo

	C M ± EPM	HF M ± EPM	HFω3 M ± EPM
1 dia			
Peso corporal (g)	6 ± 0,1	7 ± 0,1*	6 ± 0,1 [#]
Circunferência abdominal (cm)	4 ± 0,1	4 ± 0,1*	4 ± 0,1*
Comprimento naso-anal (cm)	5 ± 0,1	5 ± 0,1*	5 ± 0,1 [#]
7 dias			
Peso corporal (g)	18 ± 0,2	20 ± 0,1*	20 ± 0,5*
Circunferência abdominal (cm)	6 ± 0,1	6 ± 0,1*	6 ± 0,1
Comprimento naso-anal (cm)	7 ± 0,1	7 ± 0,1*	7 ± 0,1 [#]
14 dias			
Peso corporal (g)	32 ± 0,3	34 ± 0,5*	36 ± 0,6*
Circunferência abdominal (cm)	8 ± 0,1	8 ± 0,1*	8 ± 0,1
Comprimento naso-anal (cm)	8 ± 0,1	8 ± 0,1	8 ± 0,1
21 dias			
Peso corporal (g)	54 ± 0,6	54 ± 0,8	57 ± 0,7* [#]
Circunferência abdominal (cm)	10 ± 0,1	10 ± 0,1	10 ± 0,1
Comprimento naso-anal (cm)	10 ± 0,1	11 ± 0,1*	11 ± 0,2*
30 dias			
Peso corporal (g)	93 ± 2	97 ± 2	100 ± 2
Circunferência abdominal (cm)	12 ± 0,1	12 ± 0,2*	11 ± 0,2 [#]
Comprimento naso-anal (cm)	13 ± 0,1	15 ± 0,3*	13 ± 0,1 [#]
90 dias			
Peso corporal (g)	370 ± 6	358 ± 4,3	380 ± 7
Circunferência abdominal (cm)	19 ± 0,3	18 ± 0,3	20 ± 0,3
Comprimento naso-anal (cm)	22 ± 0,5	22 ± 0,4	22 ± 0,4
Índice de Lee (g/cm ³)	0,3 ± 0,007	0,3 ± 0,005	0,3 ± 0,005
300-d-old			
Peso corporal (g)	472 ± 14	498 ± 16	511 ± 15
Circunferência abdominal (cm)	20 ± 0,5	21 ± 0,4	21 ± 0,4
Comprimento naso-anal (cm)	24 ± 1	26 ± 0,3	25 ± 1,0
Índice de Lee (g/cm ³)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,005	0,3 ± 0,017

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HFω3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média ±epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: A autora, 2021.

7.3 Parâmetros bioquímicos das proles aos 22, 30, 90 e 300 dias de vida

Aos 22 dias de vida, não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de Albumina, Proteínas totais, HDL-c, LDL-c e AST entre os grupos. Em relação à Glicemia de jejum, apenas o grupo HF apresentou níveis superiores (p = 0,02) quando comparado ao C. O grupo HF também

apresentou níveis séricos mais elevados de Colesterol total ($p = 0,003$), ALT ($p = 0,001$) e níveis mais baixos em relação à razão AST / ALT ($p = 0,004$) quando comparados aos demais grupos. Já o grupo HF ω 3 apresentou níveis mais baixos de TRI ($p = 0,02$) e VLDL-c ($p = 0,01$) quando comparado ao grupo C (Tabela 5).

Aos 30 dias, diferenças foram encontradas apenas nos níveis séricos de LDL-c, com o grupo HF apresentando níveis mais elevados ($p = 0,001$) quando comparado ao grupo C (Tabela 5).

Aos 90 dias de vida, não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de Albumina, Proteínas totais, HDL-c, LDL-c e ALT entre os grupos. Em relação à Glicemia de jejum, o grupo HF apresentou níveis mais elevados ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais grupos. O grupo HF também apresentou níveis séricos mais elevados de Colesterol total ($p = 0,01$), Triglicerídeos ($p = 0,02$) e VLDL-c ($p = 0,02$) quando comparado ao C. Já o grupo HF ω 3 apresentou menores níveis de AST ($p = 0,0007$) e relação AST / ALT ($p = 0,0002$) quando comparado aos grupos C e HF (Tabela 5).

Aos 300 dias de idade, não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de Glicemia de jejum, Proteínas totais, HDL-c, LDL-c e ALT entre os grupos. Em relação à Albumina, o grupo HF apresentou níveis mais elevados ($p = 0,01$) quando comparado ao grupo C. Os grupos HF e HF ω 3 apresentaram níveis séricos mais elevados de Colesterol total ($p = 0,008$), Triglicerídeos ($p = 0,0002$) e VLDL-c ($p = 0,002$) quando comparados ao grupo C. Já os grupos HF e HF ω 3 apresentaram menores níveis de AST ($p = 0,0001$) e relação AST / ALT ($p = 0,0001$) quando comparados ao grupo C (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil bioquímico em jejum aos 22, 30, 90 e 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.

Idade / Variáveis	Grupo		
	C M $\pm$ EPM	HF M $\pm$ EPM	HF ω 3 M $\pm$ EPM
22 dias			
Albumina (g/dL)	4 $\pm$ 0,02	4 $\pm$ 0,01	4 $\pm$ 0,02
Proteínas totais (g/dL)	5 $\pm$ 0,02	5 $\pm$ 0,03	5 $\pm$ 0,03
Triglicerídeos (mg/dL)	138 $\pm$ 6	124 $\pm$ 6	116 $\pm$ 4*
Colesterol total (mg/dL)	116 $\pm$ 1	126 $\pm$ 3*	117 $\pm$ 2 [#]
HDL-c (mg/dL)	23 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4
LDL-c (mg/dL)	51 $\pm$ 7	63 $\pm$ 9	61 $\pm$ 6
VLDL-c (mg/dL)	28 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1	23 $\pm$ 0,8*
Glicose (mg/dL)	108 $\pm$ 3	119 $\pm$ 3*	117 $\pm$ 1
ALT (U/L)	17 $\pm$ 0,7	22 $\pm$ 1*	17 $\pm$ 0,6 [#]
AST (U/L)	152 $\pm$ 4	137 $\pm$ 3	142 $\pm$ 4

AST/ALT	8 ± 0,7	5 ± 0,8*	8 ± 0,4 [#]
30 dias			
Albumina (g/dL)	4 ± 0,02	4 ± 0,03	4 ± 0,03
Proteínas totais (g/dL)	5 ± 0,03	5 ± 0,03	5 ± 0,05
Triglicerídeos (mg/dL)	162 ± 11	151 ± 10	183 ± 15
Colesterol total (mg/dL)	120 ± 2	123 ± 2	125 ± 3
HDL-c (mg/dL)	26 ± 1	27 ± 3	31 ± 2
LDL-c (mg/dL)	64 ± 2	78 ± 4*	60 ± 2
VLDL (mg/dL)	28 ± 2	22 ± 2	24 ± 3
Glicose (mg/dL)	90 ± 5	88 ± 3	100 ± 4
ALT (U/L)	30 ± 1	34 ± 2	38 ± 2
AST (U/L)	149 ± 4	143 ± 6	141 ± 0,04
AST/ALT	5 ± 0,3	4 ± 0,6	3 ± 0,4
90 dias			
Albumina (g/dL)	4 ± 0,03	4 ± 0,04	4 ± 0,04
Proteínas totais (g/dL)	5 ± 0,04	5 ± 0,1	5 ± 0,09
Triglicerídeos (mg/dL)	97 ± 1	110 ± 1*	108 ± 4
Colesterol total (mg/dL)	80 ± 1	87 ± 1*	82 ± 1
HDL-c (mg/dL)	13 ± 0,5	12 ± 1	10 ± 0,7
LDL-c (mg/dL)	47 ± 1	52 ± 3	46 ± 3
VLDL (mg/dL)	19 ± 0,3	22 ± 1*	21 ± 0,8
Glicose (mg/dL)	120 ± 3	142 ± 3*	126 ± 3 [#]
ALT (U/L)	44 ± 1	44 ± 1	45 ± 1
AST (U/L)	143 ± 4	134 ± 6	115 ± 3 ^{*#}
AST/ALT	3 ± 0,1	3 ± 0,1	2 ± 0,08 ^{*#}
300-d-old			
Albumina (g/dL)	4 ± 0,06	4 ± 0,04*	4 ± 0,04
Proteínas totais (g/dL)	6 ± 0,04	6 ± 0,04	6 ± 0,04
Triglicerídeos (mg/dL)	59 ± 3	83 ± 4*	86 ± 5*
Colesterol total (mg/dL)	78 ± 3	87 ± 2*	88 ± 2*
HDL-c (mg/dL)	52 ± 6	54 ± 6	55 ± 4
LDL-c (mg/dL)	25 ± 5	21 ± 4	25 ± 4
VLDL (mg/dL)	12 ± 0,7	16 ± 0,8*	16 ± 1*
Glicose (mg/dL)	126 ± 10	135 ± 7	135 ± 4
ALT (U/L)	55 ± 3	53 ± 7	62 ± 4
AST (U/L)	175 ± 7	139 ± 9*	115 ± 5*
AST/ALT	3,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2*	1,9 ± 0,1*

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: A autora, 2021.

7.4 Parâmetros ventilatórios das proles de 1 a 300 dias de vida

Os parâmetros respiratórios basais da prole foram analisados no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 90º e 300º dia de vida a partir da frequência respiratória (FR), obtendo-se também os valores de volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE).

No 1º dia de vida, o grupo HF apresentou maiores valores de FR em relação aos demais grupos ($p = 0,03$), conforme mostrado na Tabela 6. No 7º dia, o grupo HF ω 3 apresentou menor FR quando comparado ao HF ($p < 0,001$). No 14º dia, o HF apresentou valores de RF aumentados em relação aos demais grupos ($p = 0,02$). No entanto, não foram encontradas diferenças na FR no 21º dia ($p = 0,42$), 30º ($p = 0,09$), 90º ($p = 0,07$) e 300º ($p = 0,38$) dia de vida entre os grupos (Tabela 6).

Em relação à análise do VT, não foi encontrada diferença significativa no 1º ($p = 0,11$) e no 7º ($p = 0,18$) dias de vida. No 14º dia, o grupo HF ω 3 apresentou menor VT quando comparado ao HF ($p = 0,01$) (Tabela 6). Ademais, não foram encontradas diferenças no 21º ($p = 0,07$), 30º ($p = 0,07$), 90º ($p = 0,61$) e 300º ($p = 0,34$) dia de vida (Tabela 6).

Na análise de VE, não foram encontradas diferenças entre os grupos no 1º ($p = 0,42$) e no 7º ($p = 0,12$) dia de vida. No 14º dia, menores valores de VE foram observados no grupo HF ω 3 quando comparado ao grupo HF ($p = 0,003$). Da mesma forma, no 21º dia o grupo HF ω 3 também apresentou menores valores de VE quando comparado ao HF ($p = 0,04$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas demais idades avaliadas, ou seja, 30º ($p = 0,12$), 90º ($p = 0,43$) e 300º ($p = 0,88$) dias de vida (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros respiratórios basais de frequência respiratória (RF), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE) de 1 a 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.

Dias de vida	Grupo		
	C	HF	HF ω 3
	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM
1 dia			
FR (cpm)	101,4 $\pm$ 2,9	114,0 $\pm$ 4,3*	103,5 $\pm$ 3,6
VT (mL/Kg)	9,6 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 0,4
VE (mL/Kg/min)	976,0 $\pm$ 69,7	939,3 $\pm$ 45,6	861,3 $\pm$ 64,6
7 dias			
FR (cpm)	151,0 $\pm$ 5,4	164,2 $\pm$ 4,6	138,1 $\pm$ 2,1 [#]
VT (mL/Kg)	10,2 $\pm$ 0,7	8,7 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 0,5
VE (mL/Kg/min)	1628 $\pm$ 157,2	1440 $\pm$ 83,5	1282 $\pm$ 70,4
14 dias			
FR (cpm)	120,9 $\pm$ 2,7	132,1 $\pm$ 4,1*	122,0 $\pm$ 2,2
VT (mL/Kg)	9,5 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,3 [#]
VE (mL/Kg/min)	1152 $\pm$ 73,2	1338 $\pm$ 106,2	934,7 $\pm$ 44,2 [#]
21 dias			
FR (cpm)	100,9 $\pm$ 2,7	105,2 $\pm$ 1,6	101,3 $\pm$ 2,6
VT (mL/Kg)	16,4 $\pm$ 1,0	14,6 $\pm$ 0,7	13,6 $\pm$ 0,6
VE (mL/Kg/min)	1516 $\pm$ 81,3	1641 $\pm$ 67,2	1364 $\pm$ 61,6 [#]

30 dias			
FR (cpm)	97,0 ± 2,0	102,2 ± 1,9	102,9 ± 2,3
VT (mL/Kg)	12,7 ± 0,5	12,8 ± 0,5	11,1 ± 0,5
VE (mL/Kg/min)	1257 ± 55,8	1361 ± 65,8	1177 ± 61,2
90 dias			
FR (cpm)	98,1 ± 2,6	103,7 ± 1,7	93,5 ± 3,6
VT (mL/Kg)	8,3 ± 0,4	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,3
VE (mL/Kg/min)	837,2 ± 48,6	801,2 ± 58,2	736,9 ± 49,4
300 dias			
FR (cpm)	93,3 ± 4,9	100,6 ± 2,4	95,6 ± 2,8
VT (mL/Kg)	12,5 ± 0,5	11,4 ± 0,5	12,6 ± 0,5
VE (mL/Kg/min)	1172 ± 77,9	1172 ± 70,9	1217 ± 76,9

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: A autora, 2021.

7.5 Indução de hipóxia nas proles de 7 a 30 dias de vida

A resposta à hipóxia aguda induzida sobre FR, VT e VE foi avaliada no 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida, idades relativas à maturação pós-natal do controle neural respiratório. Em relação ao Δ RF, não foi observada diferença no 7º (p = 0,08), 14º (p = 0,11), 21º (p = 0,33) e 30º (p = 0,97) dia de vida entre os grupos (Tabela 3). Da mesma forma, em relação aos valores de Δ VT, nenhuma diferença foi encontrada no 7º (p = 0,30), 14º (p = 0,92), 21º (p = 0,50) e 30º (p = 0,27) dias de vida entre os grupos (Tabela 7).

Porém, no 14º dia de vida, tanto o grupo HF quanto o grupo HF ω 3 apresentaram valores menores de Δ VE (p = 0,02) quando comparados ao Controle. No 21º dia de vida apenas o HF apresentou valores menores de Δ VE (p = 0,03) quando comparado aos demais grupos. Não foram observadas diferenças na Δ VE no 7º (p = 0,12) e 30º (p = 0,86) dias de vida entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de variação (Δ) de frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE) após indução de hipóxia de 7 a 30 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.

Dias de vida	Grupo		
	C	HF	HF ω 3
	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM

7 dias			
Δ FR (cpm)	$-35,2 \pm 10,4$	$-42,9 \pm 17,5$	$-38,0 \pm 13,7$
Δ VT (mL/Kg)	$1,6 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,3$
Δ VE (mL/Kg/min)	$-461,2 \pm 148,3$	$-475,4 \pm 124,9$	$-89,9 \pm 105,7$
14 dias			
Δ FR (cpm)	$72,2 \pm 8,2$	$48,4 \pm 8,6$	$66,3 \pm 8,0$
Δ VT (mL/Kg)	$-0,5 \pm 0,6$	$-0,2 \pm 0,4^*$	$-0,4 \pm 0,3$
Δ VE (mL/Kg/min)	$799,4 \pm 115,0$	$482,7 \pm 67,5^*$	$467,6 \pm 77,0^*$
21 dias			
Δ FR (cpm)	$45,7 \pm 8,6$	$35,8 \pm 11,1$	$59,8 \pm 10,4$
Δ VT (mL/Kg)	$6,1 \pm 2,2$	$4,9 \pm 0,9$	$8,8 \pm 2,0$
Δ VE (mL/Kg/min)	$1691 \pm 236,6$	$1037 \pm 217,7^*$	$2001 \pm 148,9$
30 dias			
Δ FR (cpm)	$50,5 \pm 5,7$	$49,9 \pm 4,7$	$51,5 \pm 3,9$
Δ VT (mL/Kg)	$2,1 \pm 1,8$	$5,5 \pm 1,7$	$4,9 \pm 0,7$
Δ VE (mL/Kg/min)	$1488 \pm 137,1$	$1370 \pm 242,3$	$1363 \pm 112,9$

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: A autora, 2021.

7.6 Variabilidade respiratória das proles de 1 a 300 dias de vida

A variabilidade respiratória foi avaliada na condição de repouso no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 90º e 300º dia de vida da prole.

Não foram encontradas diferenças no 1º dia de vida nos componentes SD1 (p = 0,25) e SD2 (p = 0,19) entre os grupos. Porém, no 7º dia de vida, o grupo HF apresentou valores menores de SD1 (p = 0,009) quando comparado ao Controle, e tanto HF quanto HF ω 3 apresentaram valores menores de SD2 (p = 0,009) em relação ao Controle. Aos 14 dias de vida, não foi observada diferença nos valores de SD1 (p = 0,40) entre os grupos, mas o grupo HF apresentou valores aumentados de SD2 (p = 0,03) quando comparado aos demais grupos. No 21º dia o grupo HF ω 3 apresentou valores aumentados de SD1 em comparação aos demais grupos, mas não foi observada diferença no SD2 (p = 0,30) entre os grupos. Além disso, não foram encontradas diferenças no 30º dia de vida no SD1 (p = 0,72) e no SD2 (p = 0,11), bem como no 90º dia de vida no SD1 (p = 0,63) e SD2 (p = 0,77), e no 300º dia de vida em SD1 (p = 0,56) e SD2 (p = 0,64) entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8 - Componentes SD1 (*standard deviation 1*) e SD2 (*standard deviation 2*) da variabilidade respiratória de 1 a 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C),

dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação.

Dias de vida	Grupo		
	C	HF	HF ω 3
	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM	M $\pm$ EPM
1 dia			
SD1	77,4 $\pm$ 11,1	60,4 $\pm$ 6,4	83,2 $\pm$ 9,2
SD2	114,3 $\pm$ 13,6	88,4 $\pm$ 8,4	118,6 $\pm$ 11,8
7 dias			
SD1	55,6 $\pm$ 4,4	35,2 $\pm$ 6,1 ^s	42,8 $\pm$ 2,8
SD2	102,9 $\pm$ 5,0	76,5 $\pm$ 10,1 [*]	79,6 $\pm$ 3,6 [*]
14 dias			
SD1	39,0 $\pm$ 3,9	49,7 $\pm$ 7,7	45,7 $\pm$ 5,5
SD2	60,7 $\pm$ 5,1	87,3 $\pm$ 8,9 [*]	63,8 $\pm$ 7,3
21 dias			
SD1	63,9 $\pm$ 6,5	68,7 $\pm$ 12,5	105,5 $\pm$ 16,0 [*]
SD2	105,6 $\pm$ 18,1	101,4 $\pm$ 16,6	137,7 $\pm$ 17,6
30 dias			
SD1	48,0 $\pm$ 5,3	46,1 $\pm$ 4,9	42,7 $\pm$ 4,0
SD2	75,8 $\pm$ 7,5	56,4 $\pm$ 5,6	77,8 $\pm$ 6,5
90 dias			
SD1	54,7 $\pm$ 5,6	48,5 $\pm$ 3,2	49,2 $\pm$ 5,8
SD2	89,0 $\pm$ 10,3	80,7 $\pm$ 6,5	80,1 $\pm$ 12,3
300 dias			
SD1	55,6 $\pm$ 8,1	51,4 $\pm$ 6,6	47,7 $\pm$ 7,6
SD2	85,6 $\pm$ 5,1	81,4 $\pm$ 8,2	87,7 $\pm$ 7,4

As proles foram submetidas durante a gestação e lactação às dietas controle (C, 19% de lipídios) ou hiperlipídica, (HF, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3, 33% de lipídios e 3,5% de óleo de linhaça), de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos como média $\pm$ epm. As análises foram feitas com a utilização de teste estatístico ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (N = 12-17) ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal. * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HF.

Fonte: A autora, 2021.

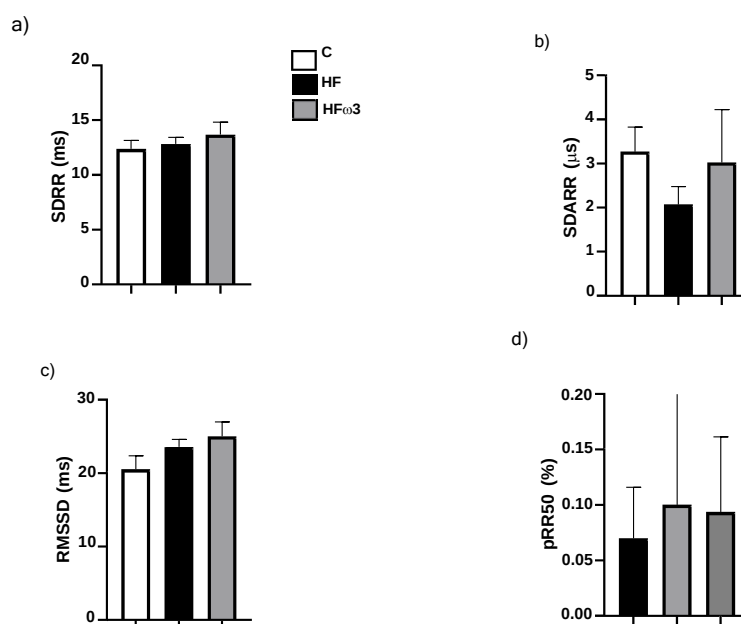
7.7 Variabilidade da frequência cardíaca das proles aos 90 e 300 dias de vida

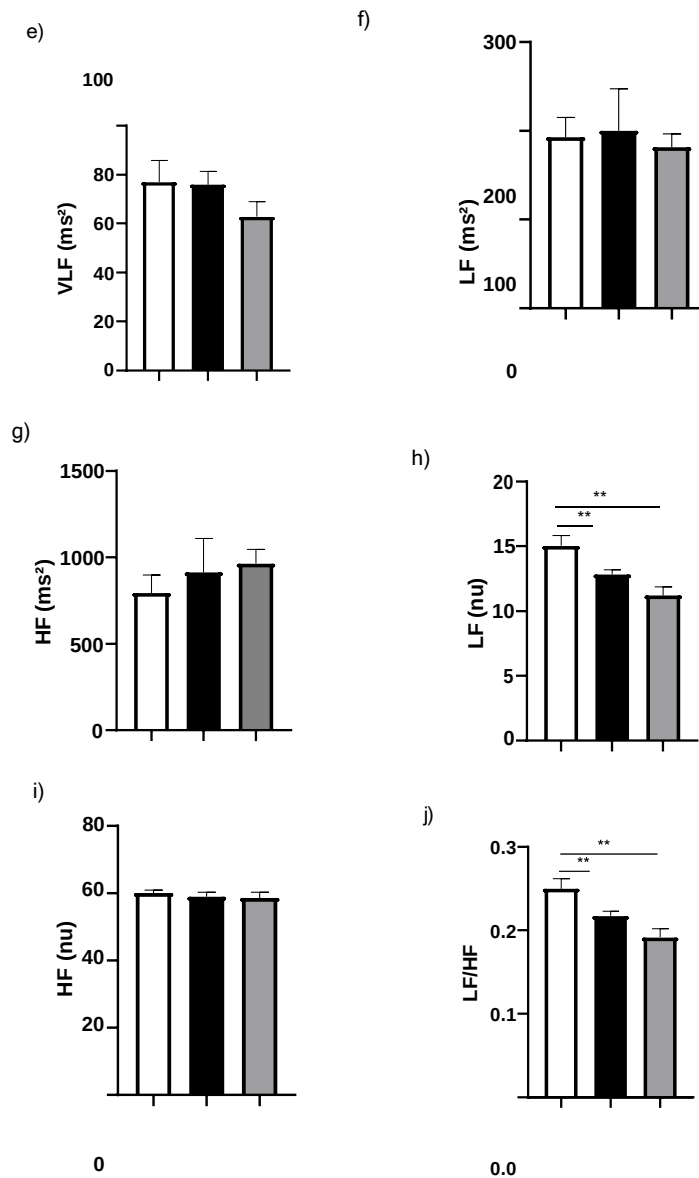
A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi avaliada no domínio da frequência e no domínio do tempo no momento basal, aos 90 e 300 dias de vida da prole.

Quanto à VFC no domínio do tempo aos 90 dias, não foram encontradas diferenças no 90º dia de vida em SDRR (p = 0,60) (Fig 4a), SDARR (p = 0,60) (Fig 4b), RMSSD (p = 0,23) (Fig 4c) e pRR50 (p = 0,94) (Fig 4d). Em relação à VFC no domínio da frequência aos 90 dias, não foram encontradas diferenças no componente de muito baixa frequência (VLF - ms²) (p = 0,36) (Fig. 4e), bem como no componente de baixa frequência (LF - ms²) (p = 0,87) (Fig 4f) e

componentes de alta frequência (HF - ms^2) ($p = 0,47$) (Fig 4g) entre os grupos. Porém, ambos os grupos HF e HF ω 3 apresentaram menor LF (un) ($p = 0,005$) (Fig. 4h), bem como diminuição da relação LF / HF ($p = 0,005$) (Fig. 4j), quando comparados ao grupo Controle. Não foi observada diferença na HF (nu) ($p = 0,71$) (Fig 4i) entre os grupos.

Figura 4 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores do desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDRR) (painel a), desvio padrão das médias dos intervalos RR normais (SDARR) (painel b), raiz quadrada da média das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes em um intervalo de tempo (RMSSD) (painel c) e porcentagem dos intervalos RR adjacentes (pRR50) (painel d) em repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas), e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinza) no 90º dia de vida. Os valores são expressos como a média $\pm$ SEM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com os grupos controle (teste ANOVA one-way).



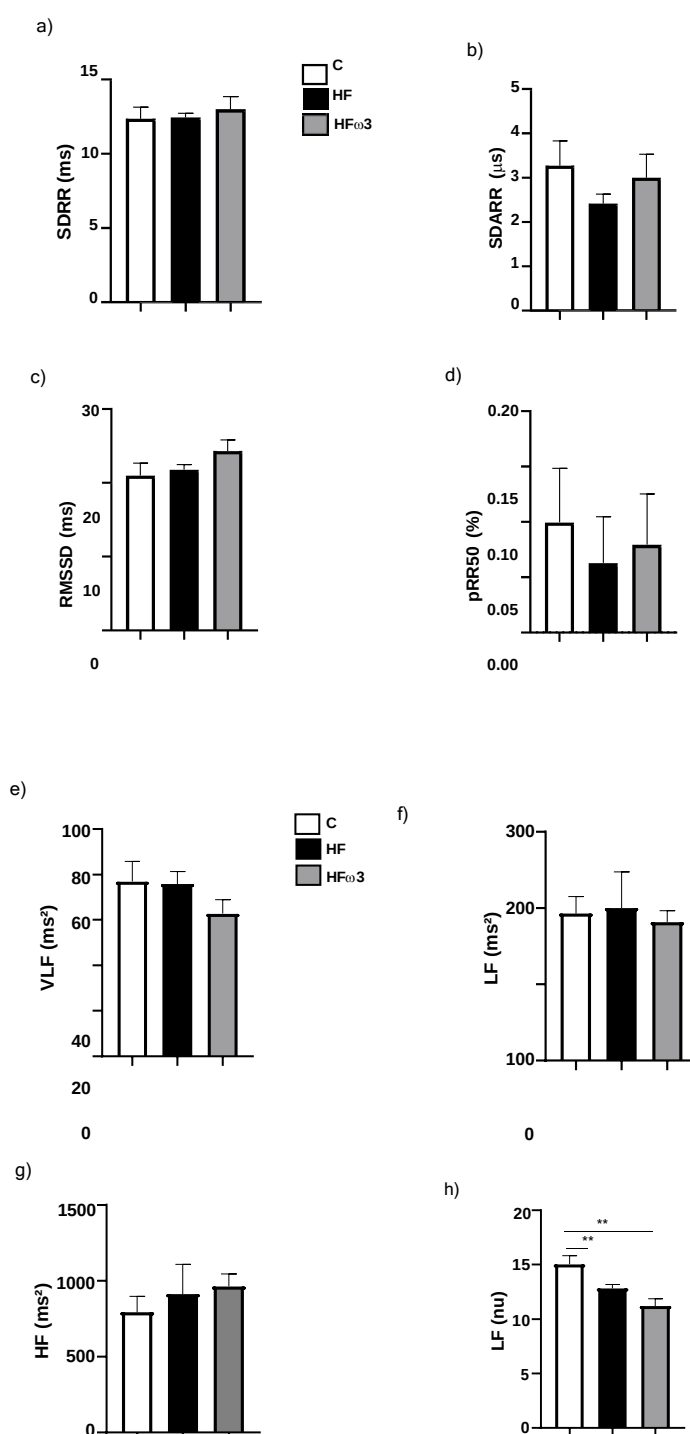


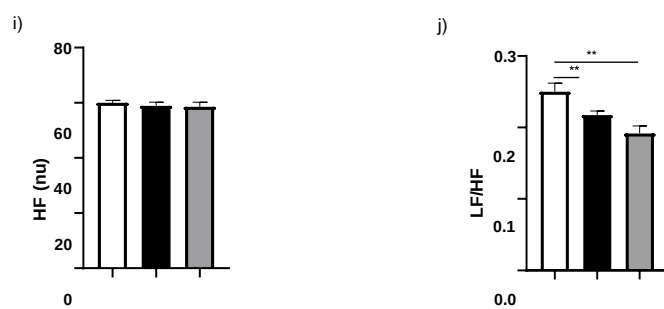
Fonte: A autora, 2021.

Da mesma forma, não foram encontradas diferenças no 300º dia de vida em SDRR ($p = 0,78$) (Fig 5a), SDARR ($p = 0,45$) (Fig 5b), RMSSD ($p = 0,20$) (Fig 5c) e pRR50 ($p = 0,86$) (Fig 5d). Além disso, não foram encontradas diferenças no 300º dia de vida no componente VLF ($p = 0,50$) (Fig 5e), bem como LF ($p = 0,76$) (Fig 5f), e HF ($p = 0,49$) (Fig 5g) componentes entre os grupos. Porém, ambos os grupos HF e HF+3 apresentaram menor LF (nu) ($p = 0,001$) (Fig 5h), bem como diminuição da relação LF / HF ($p = 0,006$) (Fig 5j) quando comparados ao grupo

Controle. Não foi observada diferença na HF (nu) ($p = 0,26$) (Fig 5i) entre os grupos.

Figura 5 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores do desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDRR) (painel a), desvio padrão das médias dos intervalos RR normais (SDARR) (painel b), raiz quadrada da média das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes em um intervalo de tempo (RMSSD) (painel c) e porcentagem dos intervalos RR adjacentes (pRR50) (painel d) em repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas), e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinza) no 300º dia de vida. Os valores são expressos como a média $\pm$ SEM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com os grupos controle (teste ANOVA one-way).



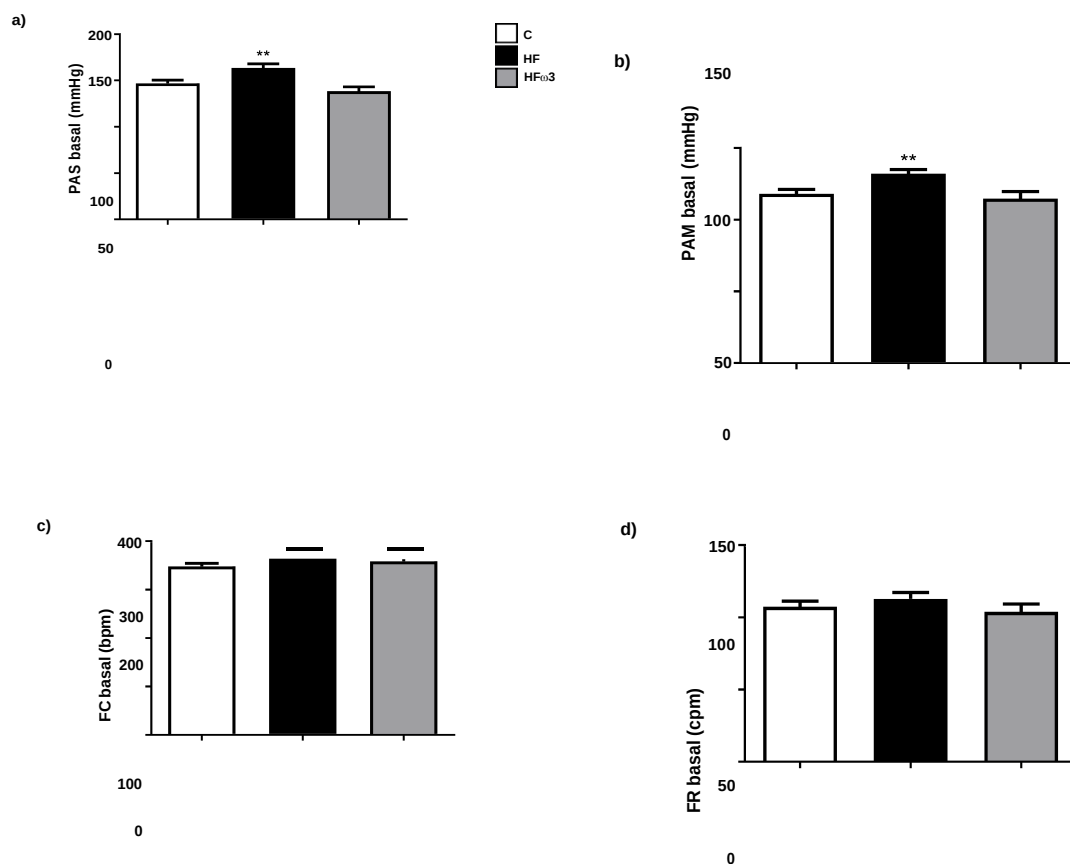


Fonte: A autora, 2021.

7.8 Parâmetros hemodinâmicos basais das proles aos 90 e 300 dias de vida

Aos 90 dias de vida, a prole HF exibiu aumento de PAS ($p = 0,0007$) (Fig 6a) e PAM ($p = 0,001$) (Fig 6b) quando comparada aos demais grupos, sem alterações na FC ($p = 0,144$) (Fig 6c) e FR ($p = 0,415$) (Fig 6d).

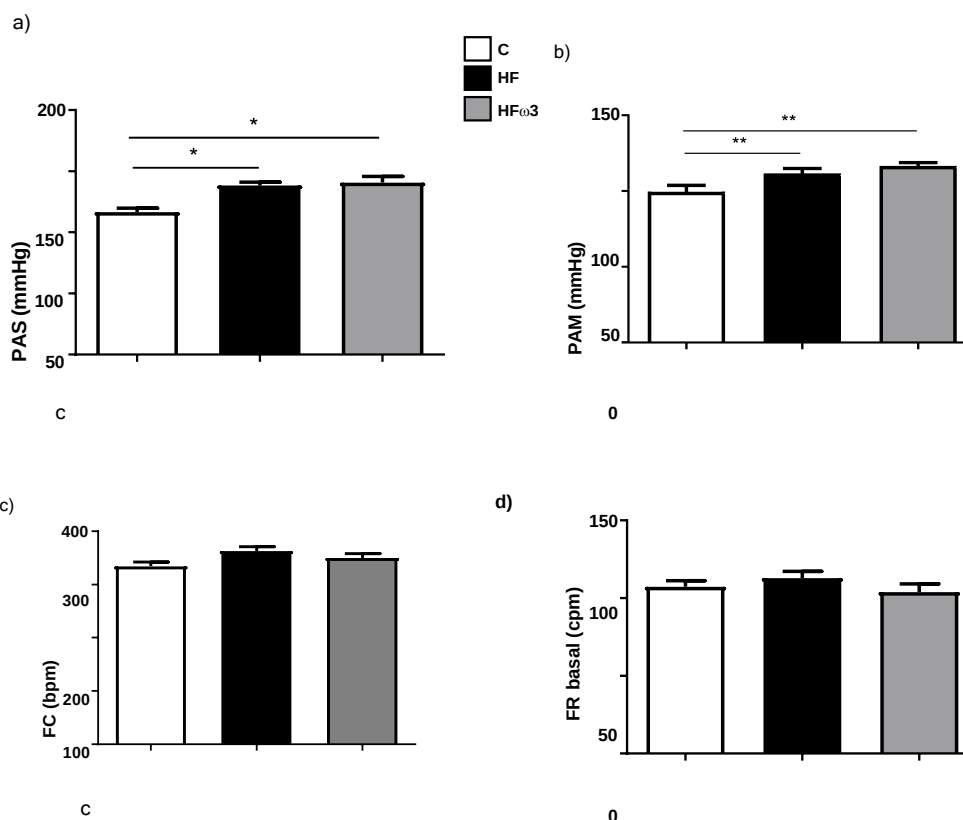
Figura 6. Valores hemodinâmicos basais aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores da pressão arterial sistólica (PAS) (painel a), pressão arterial média (PAM) (painel b), frequência cardíaca (FC) (painel c) e frequência respiratória (FR) (painel d) em repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 90 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).



Fonte: A autora, 2021.

Porém, aos 300 dias de vida, tanto os grupos HF quanto HF ω 3 apresentaram aumento da PAS ($p = 0,001$) (fig 7a) e aumento da PAM ($p = 0,004$) (fig 7b). Não foi encontrada diferença na FC ($p = 0,85$) (fig 7c) e FR (fig 7d) entre os grupos.

Figura 7. Valores hemodinâmicos basais aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores da pressão arterial sistólica (PAS) (painel a), pressão arterial média (PAM) (painel b), frequência cardíaca (FC) (painel c) e frequência respiratória (FR) (painel d) em repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 300 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, n = 9-19. (*) p < 0,05 em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).

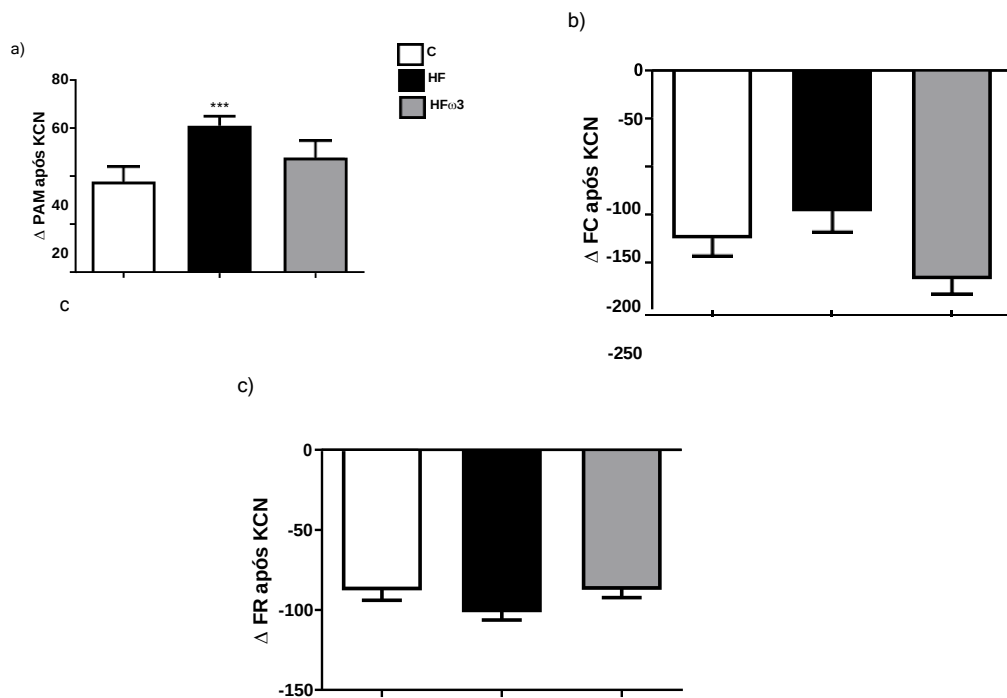


Fonte: A autora, 2021.

7.9 Ativação quimiorreflexa das proles aos 90 e 300 dias de vida

Aos 90 dias de vida, o grupo HF apresentou maior Δ PAM ($p = 0,02$) (Fig 8^a) após KCN em relação aos demais grupos. Não houve diferença entre os grupos nos valores de Δ FC ($p = 0,140$) (Fig 8b) e Δ FR ($p = 0,185$) (Fig 8c) após administração de KCN.

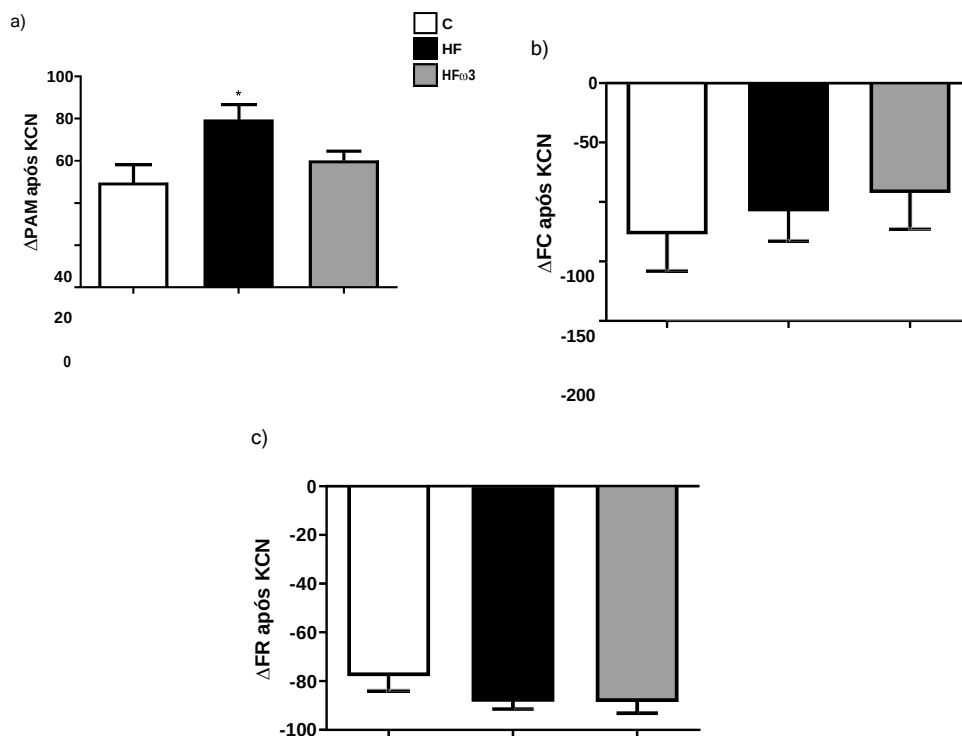
Figura 8. Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração de KCN endovenosa aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores de Δ da pressão arterial média (PAM) (painel a), Δ da frequência cardíaca (FC) (painel b) e Δ da frequência respiratória (FR) (painel c) após infusão endovenosa de cianeto de potássio (KCN a 0,04%) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 90 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, n = 9-19. (*) p < 0,05 em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).



Fonte: A autora, 2021.

Similarmente, aos 300 dias de vida o grupo HF apresentou maior Δ PAM ($p = 0,014$) (Fig 9a) após KCN em relação aos demais grupos. Não houve diferença entre os grupos nos valores de Δ FC ($p = 0,707$) (Fig 9b) e Δ FR ($p = 0,204$) (Fig 9c) após administração de KCN.

Figura 9 – Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração de KCN endovenosa aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HFω3) durante a gestação e lactação. Os valores de Δ da pressão arterial média (PAM) (painel a), Δ da frequência cardíaca (FC) (painel b) e Δ da frequência respiratória (FR) (painel c) após infusão endovenosa de cianeto de potássio (KCN a 0,04%) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HFω3, barras cinzas) aos 300 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).

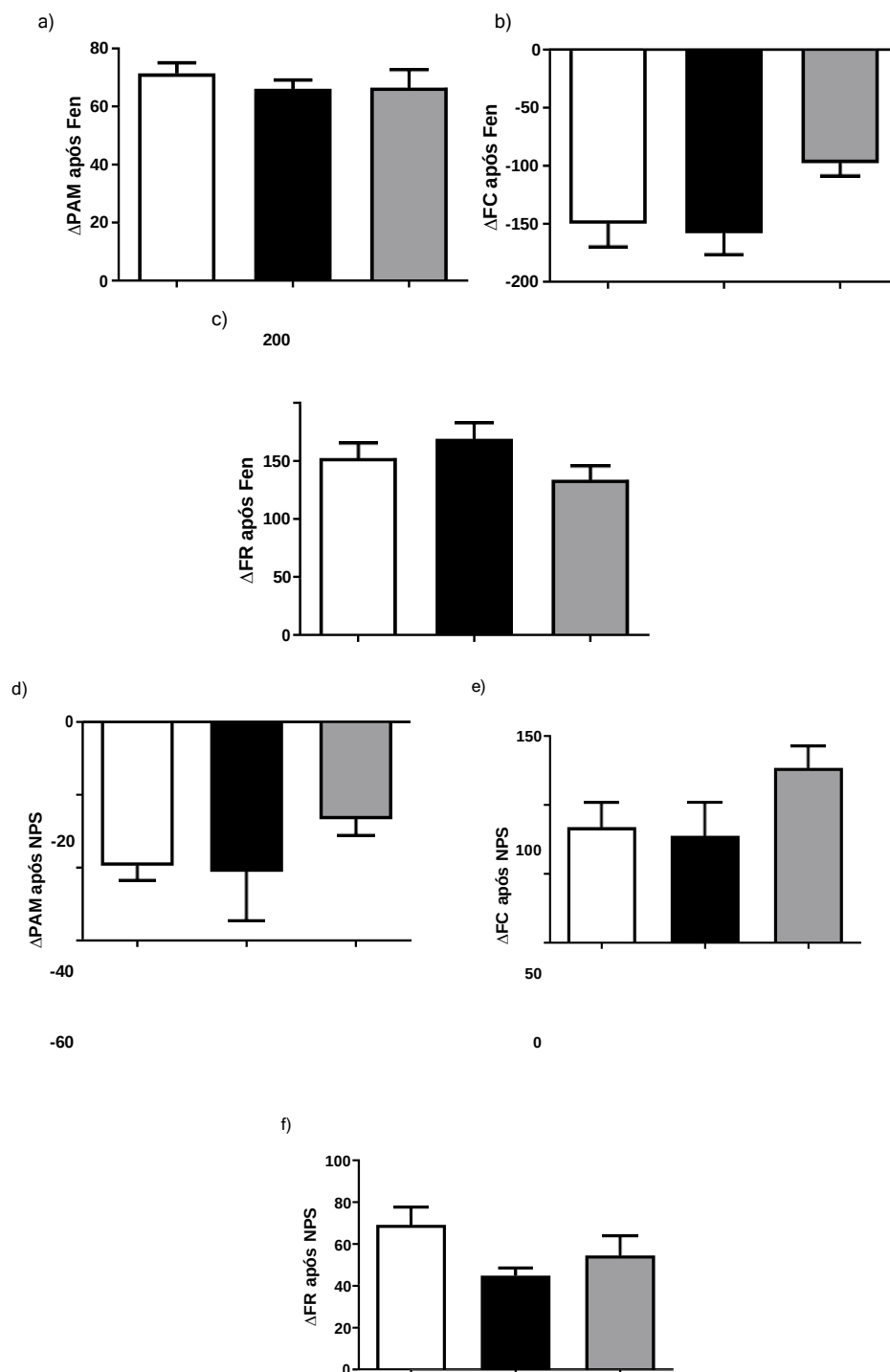


Fonte: A autora, 2021.

7.10 Balanço barorreflexo das proles aos 90 e 300 dias de vida

Aos 90 dias de vida, não houve diferença entre os grupos nos valores de variação de Δ PAM ($p = 0,580$) (Fig 10a), Δ FC ($p = 0,080$) (Fig 10b) e Δ FR ($p = 0,607$) (Fig 10c) após administração de Fen. Também não foi observada diferença significativa entre os grupos nos valores de variação de Δ PAM ($p = 0,430$) (Fig 10d), Δ FC ($p = 0,186$) (Fig 10e) e Δ FR ($p = 0,114$) (Fig 10f) após administração de NPS.

Figura 10. Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração endovenosa de Fen e NPS aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores de Δ da pressão arterial média (PAM) (painel a), Δ da frequência cardíaca (FC) (painel b) e Δ da frequência respiratória (FR) (painel c) após infusão endovenosa de Fenilefrina (Fen a 0,01%) e Nitroprussiato de sódio (NPS a 0,16%) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 90 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).

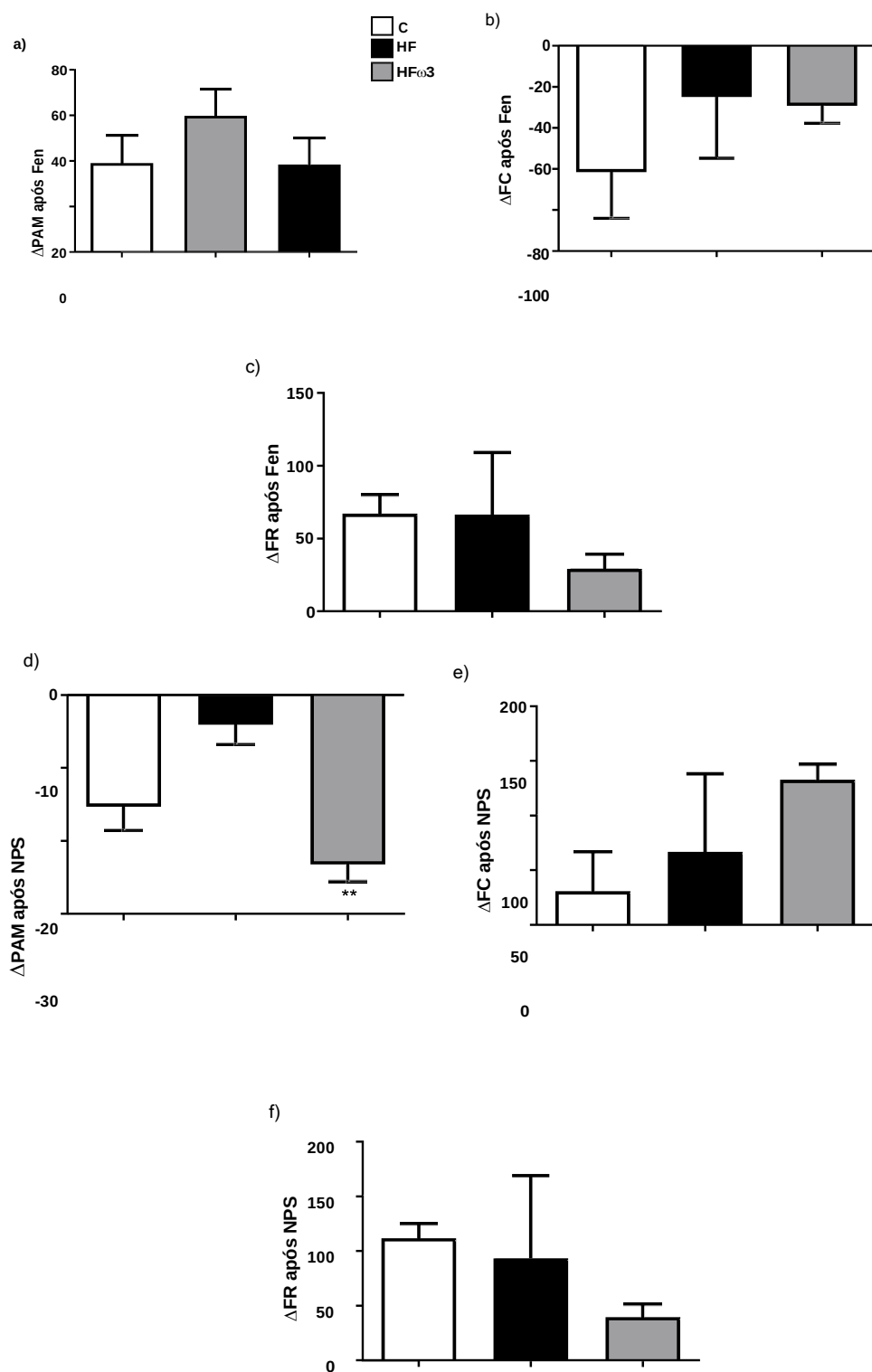


Fonte: A autora, 2021.

Aos 300 dias de vida, não houve diferença entre os grupos nos valores de variação de Δ PAM ($p = 0,204$) (Fig 11a), Δ FC ($p = 0,354$) (Fig 11b) e Δ FR ($p = 0,646$) (Fig 11c) após administração de Fenilefrina. Foi observada maior variação de Δ PAM no grupo HF ω 3 ($p = 0,003$)

(Fig 11d) após administração de NPS, sem diferença nos valores de variação de ΔFC ($p = 0,498$) (Fig 11e) e ΔFR ($p = 0,144$) (Fig 11f).

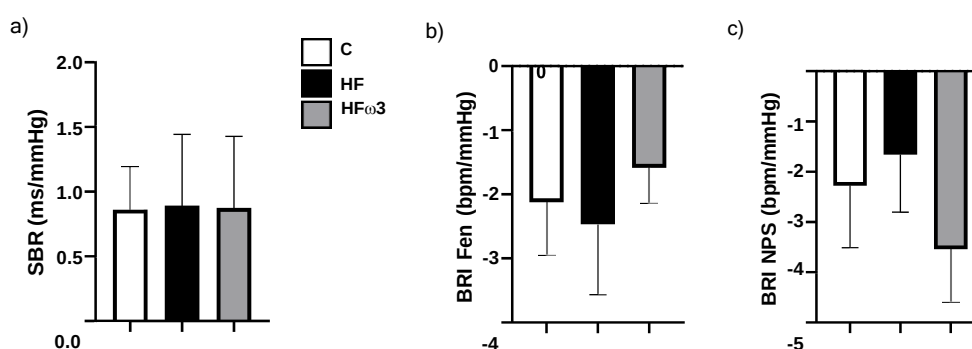
Figura 11. Valores de variação (Δ) hemodinâmica após administração endovenosa de Fen e NPS aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores de Δ da pressão arterial média (PAM) (painel a), Δ da frequência cardíaca (FC) (painel b) e Δ da frequência respiratória (FR) (painel c) após infusão endovenosa de Fenilefrina (Fen a 0,01%) e Nitroprussiato de sódio (NPS a 0,16%) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 300 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).



Fonte: A autora, 2021.

Aos 90 dias não foi observada diferença entre os grupos quanto à análise da sensibilidade barorreflexa (SBR) espontânea ($p = 0,994$) (Fig 12a). Também não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à sensibilidade barorreflexa induzida, tanto na ativação com Fen ($p = 0,230$) (Fig 12b) quanto na inibição com NPS ($p = 0,092$) (Fig 12c).

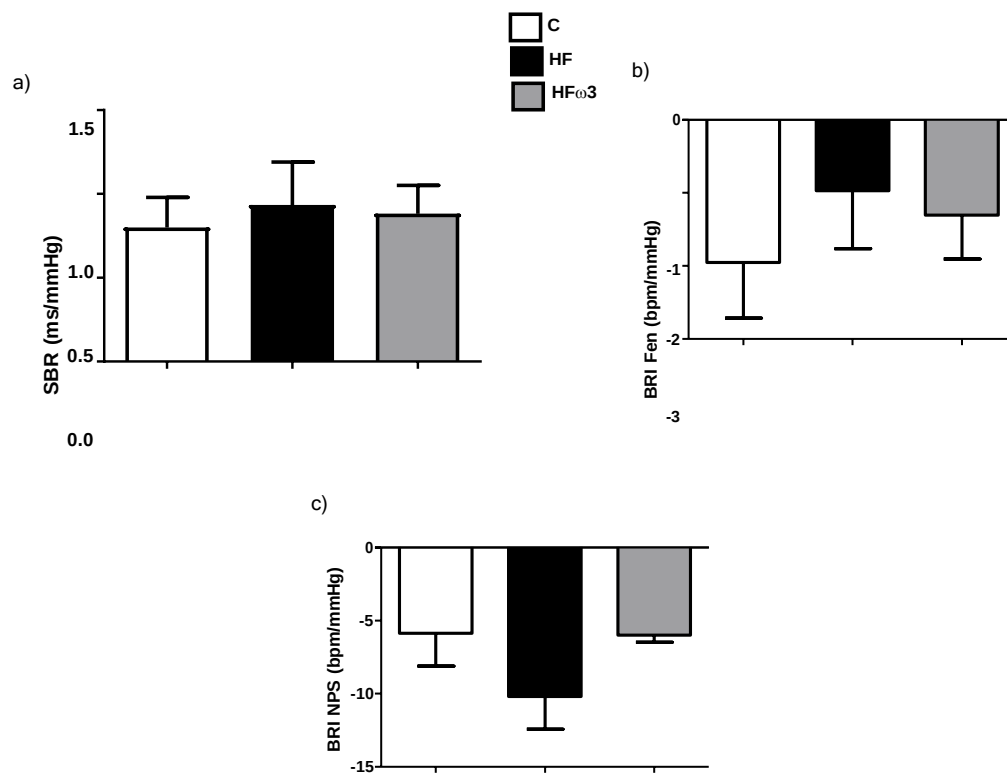
Figura 12. Barorreflexo espontâneo (SBR) e induzido (BRI) após administração endovenosa de Fen e NPS aos 90 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores do barorreflexo espontâneo (SBR) (painel a), barorreflexo induzido após Fenilefrina a 0,01%, (BRI Fen) (painel b) e barorreflexo induzido após Nitroprussiato de sódio a 0,16% (BRI NPS) (painel c) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 90 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).



Fonte: A autora, 2021.

Similarmente, aos 300 dias não foi observada diferença entre os grupos quanto à análise da sensibilidade barorreflexa (SBR) espontânea ($p = 0,892$) (Fig 13a). Também não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à sensibilidade barorreflexa induzida, tanto na ativação com Fen ($p = 0,636$) (Fig 13b) quanto na inibição com NPS ($p = 0,181$) (Fig 13c).

Figura 13. Barorreflexo espontâneo (SBR) e induzido (BRI) após administração endovenosa de Fen e NPS aos 300 dias de vida da prole de ratos cujas mães receberam dieta Controle (C), dieta Hiperlipídica (HF) e dieta Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HF ω 3) durante a gestação e lactação. Os valores do barorreflexo espontâneo (SBR) (painel a), barorreflexo induzido após Fenilefrina a 0,01%, (BRI Fen) (painel b) e barorreflexo induzido após Nitroprussiato de sódio a 0,16% (BRI NPS) (painel c) do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HF, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HF ω 3, barras cinzas) aos 300 dias de vida. Os valores estão expressos em média $\pm$ EPM, $n = 9-19$. (*) $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (teste ANOVA one-way).



Fonte: A autora, 2021.

8 DISCUSSÃO

Neste estudo, os parâmetros metabólicos da prole de ratos foram avaliados no início da vida e na idade adulta, após a exposição perinatal à dieta materna controle vs. dieta hiperlipídica vs. dieta hiperlipídica enriquecida com ω -3. Demonstramos que os filhotes de ratos expostos a uma dieta materna rica em ω -3 mostraram considerável atenuação das consequências metabólicas adversas; não houve, no entanto, diferenças observadas posteriormente na idade adulta.

O consumo materno diário em gramas durante a gestação não diferiu entre os grupos em nossa pesquisa. Os animais costumam apresentar redução no consumo de ração ao receber dieta com maior densidade calórica em regime *ad libitum*, pois tendem a consumir uma quantidade constante de calorias (CARVALHO *et al.*, 2013). As HFDs têm menor teor de carboidratos e maior teor de lipídios em comparação com a AIN-93. Isso contribuiu para a redução do consumo de carboidratos em mães alimentadas com HFD enriquecido com ω -3, bem como contribuiu para o maior consumo de lipídios entre os dois grupos em relação ao Controle (FERRO-CAVALCANTE *et al.*, 2013).

Neste estudo, ratas prenhes alimentadas com HFD também apresentaram maior consumo de lipídios na última semana de gestação em detrimento do consumo de carboidratos. Na avaliação do consumo alimentar dos filhos, não houve diferença significativa entre os grupos, embora tenha sido observada menor ingestão alimentar nos filhotes HF. É relatado que os animais que receberam HFD durante a gravidez apresentam menor ingestão de alimentos em comparação com aqueles que receberam uma dieta normolipídica. Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al.*, 2013) encontraram redução de 30% no consumo de HFD com maior teor de gordura saturada quando comparada à dieta padrão. O aumento da densidade calórica da dieta reduz a ingestão alimentar, pois na dieta *ad libitum* os animais consomem uma quantidade constante de calorias (LLOPIS *et al.*, 2014).

Assim como um estudo anterior (KOJIMA *et al.*, 2016), neste trabalho o grupo HF exibiu aumento do tamanho corporal quando comparado ao C. Da mesma forma, o HF ω 3 apresentou aumento de peso em relação ao C na maioria das idades avaliadas. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que o aumento do consumo materno de ω -3 durante a gravidez não foi eficaz na redução do tamanho corporal no início da vida dos filhotes de mães alimentadas com a HFD. Isso pode ser devido ao efeito dos ácidos graxos saturados elevados presentes nas HFDs, que estão associados ao aumento da massa corporal na prole (CASTOLDI *et al.*, 2017). Uma revisão sistemática realizada com estudos em animais, relatou que não estava claro se o aumento da oferta de ω -3 durante o período perinatal poderia influenciar a massa de gordura corporal na prole

(ZULKAFI; WADDELL; MARK, 2013). No início da vida, o grupo HF apresentou circunferência maior do que o C. Foi proposto que o consumo materno de HFD leva ao aumento da gordura visceral na prole (VOLPATO *et al.*, 2012). Em todas as idades avaliadas, o HF ω 3 apresentou circunferência semelhante nos ratos do grupo C. Também foi demonstrado em animais que a suplementação materna de DHA durante a gestação e lactação reduz o tecido adiposo visceral e subcutâneo, o que está associado ao risco de desenvolvimento de obesidade (BAGLEY *et al.*, 2013).

As proles HF apresentaram hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Nossos dados estão de acordo com outros estudos que usaram HFD durante a gravidez e a lactação. Esses estudos encontraram alterações metabólicas, como hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de colesterol total e LDL-c (VIDAL *et al.*, 2017). Além disso, colesterol e triglicerídeos elevados são fatores de risco para disfunção endotelial (LUNDMAN *et al.*, 2001) e aterosclerose (KANDEL *et al.*, 1971). Nosso estudo descobriu que a prole HF ω 3 apresentou redução nos níveis de triglicerídeos. Foi demonstrado que o ω -3 pode melhorar o perfil lipídico, reduzindo os níveis de triglicerídeos, colesterol total e fração de LDL-c (ZULKAFI; WADDELL; MARK, 2013).

Vários estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos indicaram que o ω -3 é capaz de diminuir o risco de doenças cardiovasculares, em parte, melhorando a função vascular e prevenindo o processo aterosclerótico. Três PUFA ω -3 foram apontados por sua ação vasoprotetora: ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido alfa-linolênico (ALA). Nos vasos sanguíneos, os PUFA ω -3 diminuem o acúmulo de placa arterial (RENIER *et al.*, 1993), aumentam as propriedades antiinflamatórias (CALDER, 2006), melhoram a vasodilatação dependente do endotélio (WIEST; WALSH-WILCOX; WALKER, 2017), diminuem a pressão arterial (ULU *et al.*, 2014), promovem a vasodilatação através do relaxamento das células do músculo liso (COLUSSI *et al.*, 2017), exercem ações antioxidantes, antiinflamatórias e antitrombóticas (THORLAKSDOTTIR *et al.*, 2017; VERVENIOTIS *et al.*, 2018), retardam o desenvolvimento das placas e aumentam sua estabilidade (BAKER *et al.*, 2018) e diminuem o enrijecimento da parede do vaso (CARRACEDO *et al.*, 2019).

Os ácidos graxos ω -3 podem contribuir para reduzir a inflamação crônica sistêmica, que está presente na hipercolesterolemia, diabetes, hipertensão e obesidade, tanto reduzindo os estímulos pró-inflamatórios quanto estimulando a resolução da inflamação. Esses mecanismos requerem metabolismo enzimático específico de ácidos graxos em mediadores lipídicos bioativos. É conhecido que a troca de substrato para a formação de tromboxano dependente de ciclooxigenase (TX) de ácido graxo ω -6 araquidônico (AA) para ácido graxo ω -3 EPA irá alterar o produto enzimático do TXA2 protrombótico para o metabólito TXA3 inativo (BÄCK, 2017).

Além disso, os leucotrienos (outro grupo de mediadores lipídicos) exibem menos atividade pró-inflamatória quando derivados do metabolismo da lipoxigenase usando EPA em vez de AA como substrato. Visto que os leucotrienos transduzem a sinalização pró-aterosclerótica (BÄCK; HANSSON, 2006) e o antagonismo do receptor de leucotrienos reduz o risco cardiovascular (INGELSSON; YIN; BÄCK, 2012), o ω -3 tem o potencial de diminuir uma importante via pró-inflamatória na parede vascular (BÄCK; HANSSON, 2015).

O consumo de dieta rica em gorduras saturadas aumenta a expressão de genes que sinalizam vias adipogênicas no fígado (LEIKIN-FRENKEL *et al.*, 2015), além de induzir e/ou agravar a lesão hepática, com consequente aumento dos níveis plasmáticos das transaminases (TAIN *et al.*, 2017; KAI *et al.*, 2017). Isso pode explicar os altos níveis de ALT no grupo HF aos 22 dias de idade. Em contraste, a ingestão de ω -3 reduz os níveis de transaminases, principalmente ALT em indivíduos com doença hepática gordurosa não-alcoólica (HE *et al.*, 2016; LE YU; WANG, 2017).

Neste estudo, o grupo HF apresentou maiores níveis de glicemia de jejum, enquanto que o HF ω 3 não diferiu do C. Além de seu papel hipolipemiante, a ingestão de ω -3 está associada ao aumento da sensibilidade à insulina, reduzida com a idade, conforme observado em filhotes de ratos (SARDINHA *et al.*, 2013). Estudos encontraram em ratos adultos cujas mães receberam dieta rica em ω -3 aumento no número de ilhotas pancreáticas, sem alteração no volume do pâncreas (SIEMELINK *et al.*, 2002). A progressão do diabetes *mellitus* passa por estágios intermediários, desde alteração da glicemia de jejum e intolerância à glicose, e esses estágios são decorrentes da resistência à insulina associada à disfunção das células β pancreáticas. A hiperglicemia de jejum nesses animais pode fornecer evidências de disfunção das células β (DAVIES *et al.*, 2000). Nesse caso, é possível que a idade mais avançada prejudique a tolerância à glicose, ao piruvato e à sensibilidade à insulina.

Este estudo demonstrou, no início da vida, que filhotes de mães alimentadas com dieta HF durante a gestação e lactação exibiam parâmetros respiratórios alterados, apresentavam diminuição da variabilidade cardiovascular e desenvolviam hipertensão no início da idade adulta. Enquanto isso, a prole HF ω 3 não mostrou alterações nos parâmetros respiratórios no início da vida e não desenvolveram hipertensão precoce na idade adulta, mas também apresentaram diminuição da variabilidade cardíaca e, como resultado, desenvolveram hipertensão posterior aos 300 dias de vida. Nossos resultados sugerem que a dieta HF perinatal nas mães pode afetar a função respiratória e cardíaca da prole, e o enriquecimento dietético com ω -3 é capaz de atenuar alguns dos danos causados pelo consumo materno da dieta HF.

Na avaliação dos parâmetros respiratórios, nas primeiras idades de vida (1º e 14º dias), o grupo HF apresenta aumento da frequência respiratória, associado à diminuição do componente SD1 (ao 7º dia) e aumento do componente SD2 (14º dia) valores quando comparados ao controle. Vale ressaltar que na faixa etária de 1 a 30 dias de vida o sistema respiratório ainda está em processo de maturação, apresentando um ritmo diferente do adulto ou demonstrando que a maturação desse sistema ocorre no período pós-natal. Isso sugere que o período de lactação tem importante papel no seu desenvolvimento. (PATON; RAMIREZ; RICHTER, 1994).

As alterações respiratórias encontradas no grupo HF no início da vida podem ser melhor compreendidas a partir da relação entre o aumento da atividade dos corpos carotídeos (CB) e o aumento da frequência respiratória. Os CB são quimiorreceptores periféricos que percebem hipóxia, hipercapnia e acidose, respondendo com um aumento na frequência do potencial de ação em seu nervo sensível ou no nervo carotídeo (NCS). A atividade do NCS é integrada ao tronco encefálico para induzir respostas respiratórias, aplicadas principalmente à normalização dos gases sanguíneos via hiperventilação (GONZALEZ *et al.*, 1994), regulando a pressão arterial e o desempenho cardíaco por meio da ativação do sistema nervoso simpático (MARSHALL, 1994). Foi observado em modelos animais de síndrome metabólica associação entre padrões de atividade do CB e hiperinsulinemia, onde foi demonstrado que a insulina estimula os quimiorreceptores periféricos nos CBs, que são cruciais para desencadear uma hiperatividade simpatoadrenal induzida pelo CB, contribuindo assim para a resistência à insulina e hipertensão observada em distúrbios metabólicos (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Têm sido demonstrado que uma maior atividade dos CB está associada ao aumento da frequência respiratória, gerando um quadro de alcalose respiratória. Como resultado, ocorre inibição dos quimiorreceptores periféricos, causando também diminuição da frequência respiratória. O aumento da variação neste sistema pode ser visto a partir de mudanças na variabilidade respiratória (NADURI *et al.*, 2011). Já é reconhecido que a desnutrição proteica materna está associada ao aumento da frequência respiratória entre 30 e 90 dias de vida, como mecanismo subjacente ao desenvolvimento da hipertensão arterial (DE BRITO ALVES, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da dieta materna rica em gordura neste processo de maturação, bem como do papel do ω -3.

Em idades mais avançadas, não houve alterações nos parâmetros respiratórios dos animais avaliados. Semelhante ao nosso estudo, Guimarães *et al.* (2017) também não mostraram diferenças nos valores basais de frequência respiratória, volume corrente e ventilação pulmonar aos 90 dias de animais submetidos à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação. Porém, quando esses animais foram expostos à condição de hipercapnia (7% CO₂), houve aumento da frequência

respiratória e da ventilação pulmonar em resposta ao evento adverso, demonstrando maior sensibilização dos quimiorreceptores (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Enquanto isso, o feto pode produzir respostas adaptativas preditivas a partir dos sinais recebidos pelo ambiente intrauterino, como meio de proteção contra agressões ambientais, possibilitando sua adaptação pós-natal (KHAN *et al.*, 2005), o que poderia explicar a ausência de alterações na frequência respiratória na idade adulta.

Estudos sugeriram que a leptina é um importante estimulador da função respiratória, o que levanta a possibilidade de que pacientes obesos com resistência à leptina possam exibir hipoventilação como consequência, pelo menos em parte, do efeito reduzido da leptina no cérebro (MALLI *et al.*, 2010; MORRIS; RUI, 2009). No entanto, os mecanismos ativados pela leptina para estimular a ventilação não estão claros. Em nosso estudo, o grupo HF apresentou valores diminuídos de ΔVT e ΔVE no 14º dia, bem como diminuição da ΔVE no 21º dia em relação ao Controle. O HF ω 3 também apresentou diminuição na ΔVE no 14º dia em comparação ao Controle. Ribeiro *et al.* (2018) sugeriram que os efeitos facilitadores da leptina na atividade do corpo carotídeo são atenuados em ratos alimentados com HFD, o que pode explicar a diminuição da resposta induzida por hipóxia em descendentes com HFD.

Os índices de variabilidade da frequência cardíaca têm sido usados para compreender várias condições, tais como: doença arterial coronariana (CARNEY *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2005; CARNETHON *et al.*, 2002), cardiomiopatia (LIMONGELLI *et al.*, 2007), hipertensão arterial (KARAS *et al.*, 2008; TERATHONGKUM; PICKLER, 2004), infarto do miocárdio (LAROSA *et al.*, 2008), morte súbita (KUDAIBERDIEVA *et al.*, 2007), doença pulmonar obstrutiva crônica (PANTONI *et al.*, 2007), insuficiência renal (FURULAND *et al.*, 2008), acidente vascular cerebral (LAKUSIC *et al.*, 2005), entre outros distúrbios. Neste estudo, aos 90 e 300 dias de vida, os grupos HF e HF ω 3 apresentaram valores diminuídos do componente LF, bem como da relação LF / HF quando comparados ao grupo Controle, sugerindo que uma dieta rica em ácidos graxos saturados prejudicou a VFC, mesmo quando a dieta é enriquecida com PUFAS ω -3.

A redução da VFC é muitas vezes um indicador de adaptação anormal e insuficiente do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), implicando na presença de disfunção fisiológica no indivíduo (VANDERLEI *et al.*, 2009). Além disso, a baixa VFC foi identificada como um forte indicador de risco relacionado a eventos adversos em indivíduos normais e em pacientes com grande número de doenças, refletindo o papel vital que o SNA desempenha na manutenção da saúde (PUMPRLA *et al.*, 2002). Em doenças como hipertensão arterial (KARAS *et al.*, 2008; TERATHONGKUM; PICKLER, 2004), infarto agudo do miocárdio, insuficiência coronariana (NOVAIS *et al.*, 2004)

e aterosclerose (CARNETHON *et al.*, 2002), os índices de VFC são reduzidos. Menezes Jr *et al.* (2004) encontraram diminuição da VFC em hipertensos, quando comparados a normotensos, ao analisar os índices SDNN, RMSSD, pNN50, HF, LF, BF / HF, provavelmente devido à hiperatividade simpática.

Além disso, estudos têm demonstrado uma relação entre processos inflamatórios e disfunções do sistema nervoso autônomo. Está bem estabelecido que o consumo de uma HFD pode causar inflamação (DUAN *et al.*, 2018). A condição inflamatória em algumas regiões do cérebro que é controlada pela atividade do nervo simpático, como NTS, pode contribuir para o estabelecimento de patologias, como a hipertensão (PATON; WAKI, 2009; ADLAN *et al.*, 2014). Assim, alterações no sistema imunológico são um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do aumento da pressão arterial (TIMPER; BRUNING, 2017).

Paton e Waki (2009) sugeriram que na inflamação pode ocorrer aumento da aderência leucocitária na microvasculatura do tronco encefálico (ou especificamente no NTS), podendo levar à ativação de espécies reativas de citocinas pró-inflamatórias e induzidas por oxigênio, que alteram a atividade neuronal. A inflamação e o acúmulo de leucócitos nesta microvasculatura do tronco cerebral podem aumentar a resistência vascular. Um acúmulo de leucócitos nos capilares pode obstruir o fluxo sanguíneo, diminuir a perfusão sanguínea e resultar em hipóxia localizada, causando, conseqüentemente, um aumento da atividade simpática e da pressão arterial (PATON; WAKI, 2009). Esses estudos podem justificar nossos resultados de aumento da pressão arterial no grupo HF aos 90 dias, e de HF e HF ω 3 aos 300 dias de vida. Semelhante ao nosso estudo, Vidal *et al.* (2017) também encontraram aumento da pressão arterial em filhos de mães que receberam HFD durante a gestação e lactação.

Porém, em nosso estudo, aos 90 dias de vida, o grupo HF ω 3 apresentou pressão arterial semelhante ao Controle, sugerindo que o ω -3 parece ter ação cardioprotetora, evitando o aparecimento precoce da hipertensão. Isso pode ser devido ao consumo adequado da razão ω -6: ω -3 reduzir a formação de AA a partir do ácido linoléico, dependendo da disponibilidade de EPA e DHA e, conseqüentemente, a formação de mediadores antiinflamatórios via COX e LOX. Absorção e incorporação de ácido linolênico em fosfolipídios de membrana também com ação inibitória e uso da via COX e LOX sem AA, com reação de metabolismo pró-inflamatório: prostaglandina E2, tromboxano A2 e leucotrieno B4 (KHATIB *et al.*, 2016). O ácido A-linolênico também atua na redução dos mediadores inflamatórios circulantes no plasma: IL-6, TNF- α e PCR (OLLIVER *et al.*, 2016).

No entanto, o risco de desenvolver doenças cardiovasculares aumenta com a alta distribuição adiposa visceral, que tende a ocorrer com o envelhecimento. O tecido adiposo torna-

se disfuncional, com o caminho da diferenciação pré-adipócito aos adipócitos maduros ficando prejudicado, o que resulta em adipócitos disfuncionais menos capazes de armazenar gordura e subsequente redistribuição de gordura para locais ectópicos. A inflamação sistêmica de baixo grau é comumente observada no envelhecimento e pode levar à disfunção do tecido adiposo, pois as citocinas pró-inflamatórias são capazes de inibir a diferenciação dos adipócitos. Além do aumento da adiposidade ectópica, o efeito da função do tecido adiposo prejudicada é uma elevação dos ácidos graxos livres sistêmicos (AGL), uma característica comum de muitos distúrbios metabólicos. Os AGS podem ser considerados os mais prejudiciais do que os AGL, sendo capazes de induzir resistência à insulina e inflamação por meio de mediadores lipídicos, como a ceramida, que podem aumentar o risco de desenvolver aterosclerose. Altos níveis de AGL, em particular AGS, podem ser um fator determinante para aumento da resistência à insulina, risco de doença cardiovascular e inflamação em adultos idosos (SLAWIK; VIDAL-PUIG, 2006; HE *et al.*, 1999). Esses estudos podem justificar o aumento da pressão arterial apresentado no grupo HF ω 3 aos 300 dias de vida.

O grupo HF apresentou maior resposta à ativação quimiorreflexa a partir da administração de cianeto de potássio (KCN), sugerindo maior sensibilidade dos quimiorreceptores. A ativação de quimiorreceptores arteriais com KCN em ratos acordados produz não apenas respostas taquipneicas (HAIBARA *et al.*, 1995), mas também ajustes cardiovasculares, como aumento da PAM e bradicardia (FRANCHINI; KRIEGER, 1992, 1993; HAIBARA *et al.*, 1995, 1999). Estudos anteriores já sugeriram que o KCN é uma ferramenta apropriada para produzir a ativação dos quimiorreceptores arteriais em ratos (BARROS *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho, para testar a sensibilidade do barorreflexo (BR), utilizamos o método farmacológico com Fen e NPS e avaliamos as respostas de FC às alterações da PA por meio do índice de SBR (FARAH *et al.*, 1999). Como o BR representa o maior mecanismo reflexo envolvido na modulação fisiológica do tônus simpático, especula-se que a redução na influência inibitória exercida pelos receptores aórticos e carotídeos sobre o SNA poderia causar hiperatividade desse sistema e esta, por sua vez, contribuir para o estabelecimento da HAS (KUMADA *et al.*, 1990; JULIEN, 2008).

Os nossos dados apontam que a resposta reflexa sobre a FC, induzida por uma ativação ou inibição do BR nos animais submetidos à dieta hiperlipídica na gestação e lactação são semelhantes aos animais controle, sugerindo a integridade do BR em animais expostos à HFD perinatal. Diferentemente, Zhang e colaboradores (2018) encontraram na prole de ratas alimentadas com HFD (60% de lipídios) durante a gestação e lactação diminuição da sensibilidade barorreflexa cardíaca. Além disso, a HFD materna foi associada à deficiência da sensibilidade

barorreflexa e redução da variabilidade da FC, implicando em anormalidades no controle autonômico da prole (SAMUELSSON *et al.*, 2010). Embora neste estudo os animais submetidos à HFD tenham apresentado redução da variabilidade da FC, nossos achados sugerem que a hiperatividade simpática observada nos animais HF não deve estar associada à disfunção no mecanismo BR, ao menos nesta condição experimental.

Este estudo traz à luz a necessidade da continuidade na investigação sobre a origem da hiperativação simpática observada nos animais HF, para uma compreensão completa dos mecanismos centrais envolvidos no desequilíbrio autonômico encontrado em indivíduos submetidos à HFD materna. São exemplos: a avaliação da rede de neurotransmissão excitatória e inibitória, a sensibilidade de receptores dos principais neurotransmissores e as cascatas de sinalização intracelular dos neurônios de regiões-chave do controle autonômico.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, demonstramos que melhorar a qualidade da dieta hiperlipídica não supera as consequências adversas do alto consumo materno de AGS, embora tenha sido observado que a exposição ao ω -3 de filhotes de mães com dieta hiperlipídica pode ter alguns benefícios ao curto prazo. Este estudo contribuiu para elucidar que o ω -3 pode servir como estratégia de prevenção primária para doenças cardiometabólicas, mas não a única. Ao comer uma dieta rica em AGS concomitantemente, foi observado nesta pesquisa que os benefícios do ω -3 foram de curta duração e insuficientes para contraprogramar as consequências adversas da supernutrição.

Além disso, o presente estudo demonstrou que o consumo materno da dieta hiperlipídica rica em AGS pode afetar os mecanismos centrais envolvidos na regulação respiratória e cardiovascular, levando ao aumento da frequência respiratória durante o período de maturação da rede neural respiratória, diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e início precoce da hipertensão na prole adulta. O consumo de dieta hiperlipídica enriquecida com ω -3 foi capaz de mitigar os efeitos deletérios sobre os parâmetros ventilatórios durante o período de maturação da rede neural e preveniu o aparecimento precoce de hipertensão na prole.

No entanto, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos relacionados às alterações cardiometabólicas desencadeadas pelo consumo da HFD materna, bem como o papel do ω -3 durante o período perinatal. Uma compreensão completa desses mecanismos e do papel do ω -3 pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas e políticas governamentais para melhorar a saúde da população.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD-TILLERY, K.M., *et al.* (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. **JMol Endocrinol**, (2):91-102. doi: 10.1677/JME-08-0025.
- ALFADDAGH, A., ELAJAMI, T. K., ASHFAQUE, H., SALEH, M., BISTRAN, B. R., & WELTY, F. K. (2017). Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids added to statintherapy on coronary artery plaque in patients with coronary artery disease: a randomized clinical trial. **Journal of the American Heart Association**, 6(12), e006981.
- APPEL, L.J. *et al.* (1993). Does Supplementation of Diet With 'Fish Oil' Reduce BloodPressure? A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials. **Arch Intern Med**, 1993;153(12):1429-1438, doi:10.1001/archinte.1993.00410120017003.
- BÄCK, M. (2017). Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. **Future Science OA**, 3(4), FSO236.
- BÄCK, M., & HANSSON, G. K. (2006). Leukotriene receptors in atherosclerosis. **Annals of medicine**, 38(7), 493-502.
- _____. (2015). Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. **Nature ReviewsCardiology**, 12(4), 199.
- BÄCKHED, F., ROSWALL, J., PENG, Y., FENG, Q., JIA, H., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., ... & WANG, J. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during thefirst year of life. **Cell host & microbe**, 17(5), 690-703.
- BAKER, E. J., YUSOF, M. H., YAQOOB, P., MILES, E. A., & CALDER, P. C. (2018). Omega-3 fatty acids and leukocyte-endothelium adhesion: Novel anti-atherosclerotic actions. **Molecular Aspects of Medicine**, 64, 169-181.
- BARBOSA, C. M., FIGUEIREDO, V. P., BARBOSA, M. A., CARDOSO, L. M., & ALZAMORA, A. C. (2019). Maternal high-fat diet displayed disorders characteristic of metabolic syndrome that were transferred to first-and second-generation offspring. **The Britishjournal of nutrition**, 1-27.
- BARDGET, M.E.; SHARPE, A.L.; TONEY, G.M. (2014). Activation of corticotropin- releasing factor receptors in the rostral ventrolateral medulla is required for glucose-induced sympathoexcitation. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Vol. 307 no. 10, doi:

10.1152/ajpendo.00291.2014.

BARKER, D.J., OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heartdisease in England and Wales. **Lancet**. 1986 May 10;1(8489):1077–1081.

BARNETT, W.H. *et al.* (2016). Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits.

Exp Neurol, (16)30156-X. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.05.036.

BARROS, R. C., BONAGAMBA, L. G., OKAMOTO-CANESIN, R., DE OLIVEIRA, M.,

BRANCO, L. G., & MACHADO, B. H. (2002). Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience**,97(2), 110-115.

BARROS, M. A. V. *et al.* (2015). Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**25,123–130.doi:10.1016/j.numecd.2014.07.011.

BILBO, S. D., & TSANG, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for braininflammation and behavior of offspring. **The FASEB Journal**, 24(6), 2104-2115.

BLAY, R. M. (2021). Maternal Nutrition and the Risk of Cardiovascular Diseases in Offspring. **Contemporary Healthcare Issues in Sub-Saharan Africa: Social, Economic, and Cultural Perspectives**, 209.

BRACCIALLI, A.L., BONAGAMBA, L.G., MACHADO, B.H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. **RespirPhysiol Neurobiol**. 2008 May 31;161(3):246-52.

BRAGA, V.A., SORIANO, R.N., MACHADO, B.H. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittenthypoxia. **Exp Physiol**. 2006 Nov;91(6):1025-31.

BRAY, G.A., *et al.* (2004). Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical andepidemiological studies. **Physiology & Behavior**, vol. 83, no. 4, p.549-555.

BURGGREN, W.W. (2020). Phenotypic Switching Resulting From DevelopmentalPlasticity: Fixed or Reversible?. **Frontiers in Physiology**, 10, p.1634.

CALDER, P. C. (2006). n– 3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American journal of clinical nutrition**, 83(6), 1505S-1519S.

CARRACEDO, M., ARTIACH, G., ARNARDOTTIR, H., & BÄCK, M. (2019). The resolution of inflammation through omega-3 fatty acids in atherosclerosis, intimal hyperplasia, and vascular calcification. In **Seminars in immunopathology** (Vol. 41, No. 6, pp. 757-766). Springer Berlin Heidelberg.

CARVALHO, M. F., COSTA, M. K. M. E. D., MUNIZ, G. D. S., CASTRO, R. M. D., & NASCIMENTO, E. D. (2013). Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. **Revista de Nutrição**, 26(2), 177-196.

CIRIELLO, J., HOCHSTENBACH, S.L., RODER, S. (1994). Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat. Nucleus of the Solitary Tract. Edited by Robin A. Barraco, **CRC Press**, London, p.35-50.

COLUSSI G, CATENA C, NOVELLO M, BERTIN N, SECHI L. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. 2017;27(3):191-200.

CONNOR, K.L.; VICKERS, M.H.; BELTRAND, J. et al. (2012). Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **J Physiol**. 590:2167–2180.

CORREIA-SANTOS, A. M., SUZUKI, A., VICENTE, G. C., DOS ANJOS, J. S., PEREIRA, A. D. A., LENZI-ALMEIDA, K. C., & BOAVENTURA, G. T. (2014). Effect of maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation on glucose metabolism and pancreas histomorphometry of male offspring from diabetic rats. **Diabetes research and clinical practice**, 106(3), 634-642.

_____. (2015). Maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation prevents morphological alterations in pancreas of female offspring from rat dams with experimental diabetes. **International journal of experimental pathology**, 96(2), 94-102.

COSTA-SILVA, J.H., ZOCCAL, D.B., MACHADO, B.H. (2010). Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol**. 2010 Apr;103(4):2095-106.

_____. (2010) Chronic intermittent hypoxia alters glutamatergic control of sympathetic and respiratory activities in the commissural NTS of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 302, R785–R793. doi:10.1152/ajpregu.00363.2011.

COSTA-SILVA, J.H., *et al.* (2015) New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. **Frontiers in Physiology**. 2015 Nov; doi: 10.3389/fphys.2015.00345.

CSERJÉSI, R., MOLNÁR, D., LUMINET, O., & LÉNÁRD, L. (2007). Is there any relationship between obesity and mental flexibility in children?. **Appetite**, 49(3), 675-678.

D'ASTI, E., LONG, H., TREMBLAY-MERCIER, J., GRAJZER, M., CUNNANE, S. C., DI MARZO, V., & WALKER, C. D. (2010). Maternal dietary fat determines metabolic profile and the magnitude of endocannabinoid inhibition of the stress response in neonatal rat offspring. **Endocrinology**, 151(4), 1685-1694.

DE BRITO ALVES, J.L., *et al.* (2014). Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**. 111,606–615. doi: 10.1017/S0007114513002833.

DE BRITO ALVES, J.L., *et al.* (2015). Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **J Nutr**. 145,907–914. doi:10.3945/jn.114.202804.

DE-BRITO-ALVES, J.L., *et al.* (2016). Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, doi: 10.1111/1440-1681.12667.

DEL RIO, R.; MOYA, E.A.; ITURRIAGA, R. (2010). Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. **Eur Respir J**, 36(1):143-50. doi: 10.1183/09031936.00158109.

DENG, X., WANG, P., & YUAN, H. (2020). Epidemiology, risk factors across the spectrum of age-related metabolic diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61, 126497.

DESAI, MINA, *et al.* (2014) "Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome." **American journal of obstetrics and gynecology** 211.3: 237-e1.

DESAI, MINA, *et al.* (2020) "Maternal High Fat Diet Programs Male Mice Offspring Hyperphagia and Obesity: Mechanism of Increased Appetite Neurons via Altered Neurogenic Factors and Nutrient Sensor AMPK." **Nutrients** 12.11: 3326.

DOBRIAN, A.D., *et al.* (2000). Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, 35: 1009-1015.

- ENDO, J., & ARITA, M. (2016). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of cardiology**, 67(1), 22-27.
- ERKKILÄ, A. T., SCHWAB, U. S., LEHTO, S., DE MELLO, V. D., KANGAS, A. J., SOININEN, P., ... & UUSITUPA, M. I. (2014). Effect of fatty and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: a controlled trial. **Journal of Clinical lipidology**, 8(1), 126-133.
- FAN, Y. Y., LY, L. H., BARHOUMI, R., MCMURRAY, D. N., & CHAPKIN, R. S. (2004). Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C θ lipid raft recruitment and IL-2 production. **The Journal of Immunology**, 173(10), 6151-6160.
- FARAH, V. M.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; *et al.* (1999). Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 3, p. 361-9.
- FEOLI, A.M., *et al.* (2003). Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, vol. 16, no. 9, p. 789-793.
- FERRO CAVALCANTE, T.C. *et al.*, (2013). Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**. 2013; 48, 1157- 1168.
- FRANCHINI, K.G., KRIEGER, E.M. (1992). Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rat. **Am. J. Physiol.** 262, R677 –R683 (Regul. Integr. Comp. Physiol., 31).
- FRANCHINI, K.G., KRIEGER, E.M. (1993). Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. Syst.** 42, 63 –70.
- GANI, O. A., & SYLTE, I. (2008). Molecular recognition of Docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor α . **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 27(2), 217-224.
- GAIVA, M.H., *et al.* (2003). Diets rich in polyunsaturated fatty acids: Effect on hepatic metabolism in rats. **Nutrition**, vol. 19, no. 2, p. 144-149.
- GAWLIŃSKA, K., GAWLIŃSKI, D., FILIP, M., & PRZEGALIŃSKI, E. (2020). Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health. **Nutrition Reviews**.
- GOMES, R. M., BUENO, F. G., SCHAMBER, C. R., DE MELLO, J. C. P., DE OLIVEIRA, J. C., FRANCISCO, F. A., ... & NATALI, M. R. M. (2018). Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese

phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. **The Journal of nutritional biochemistry**, 61, 24-32.

GREENBERG, H. E., *et al.* (1999). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. **J App. Physiol.** 86, 298–305.

GUO, F., & JEN, K. L. C. (1995). High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiology & behavior**, 57(4), 681-686.

HAIBARA, A.S., COLOMBARI, E., CHIANCA JR., D.A., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. (1995). NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am. J. Physiol.** 269, H1421 –H1427 (Heart Circ. Physiol., 38).

HAIBARA, A.S., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. (1999). Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **Am. J. Physiol.** 276, R69 –R80 (Regul. Integr. Comp. Physiol., 45).

HALES, C. N., BARKER, D. J., CLARK, P. M., COX, L. J., FALL, C., OSMOND, C., & WINTER, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British medical journal**, 303(6809), 1019-1022.

HALLAQ, H., SMITH, T. W., & LEAF, A. (1992). Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89(5), 1760-1764.

HARRIS, W.S.; CONNOR, W.E.; LINSEY, S. (1984). Will dietary omega-3 fatty acids change the composition of breast milk? **Am J Nutr**, 1984; 40:780–785.

HARRIS, W. S., TINTLE, N. L., ETHERTON, M. R., & VASAN, R. S. (2018). Erythrocyte long-chain omega-3 fatty acid levels are inversely associated with mortality and with incident cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. **Journal of clinical lipidology**, 12(3), 718-727.

HARWOOD JR, H. J. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. **Neuropharmacology**, 63(1), 57-75.

HE, X. X., WU, X. L., CHEN, R. P., CHEN, C., LIU, X. G., WU, B. J., & HUANG, Z. M. (2016). Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One**, 11(10), e0162368.

HOWE, P.R.C. (1997). Dietary Fats and Hypertension Focus on Fish Oil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 827: 339–352. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb51846.

HUNT, B. E.; FARQUHAR, W. B. (2005). Nonlinearities and Asymmetries of the Human Cardiovascular Baroreflex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**.

HUSSAIN, A., NOOKAEW, I., KHOOMRUNG, S., ANDERSSON, L., LARSSON, I., HULTHÉN, L., ... & HOLMÄNG, A. (2013). A maternal diet of fatty fish reduces body fat of offspring compared with a maternal diet of beef and a post-weaning diet of fish improves insulin sensitivity and lipid profile in adult C 57 BL/6 male mice. **Acta Physiologica**, 209(3), 220-234.

INGELSSON, E., YIN, L., & BÄCK, M. (2012). Nationwide cohort study of the leukotriene receptor antagonist montelukast and incident or recurrent cardiovascular disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 129(3), 702-707.

ITURRIAGA, R. *et al.* (2016). Carotid body chemoreceptors, sympathetic neural activation, and cardiometabolic disease. **Biological Research**, doi: 10.1186/s40659-016-0073-8.

JACOBSON, T. A., GLICKSTEIN, S. B., ROWE, J. D., & SONI, P. N. (2012). Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. **Journal of clinical lipidology**, 6(1), 5-18.

JANTHAKHIN, Y., RINCEL, M., COSTA, A. M., DARNAUDÉRY, M., & FERREIRA, G. (2017). Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. **Psychoneuroendocrinology**, 83, 49-57.

JESPERSEN, BRIAN, LAUREN KNUPP, AND CARRIE A. NORTHCOTT. (2012). Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements. **Journal of Visualized Experiments**, 59: e3496.

JULIEN C. Baroreflex control of sympathetic nerve activity and blood pressure variability. (2008). **Clin Exp Pharmacol Physiol** 2008;35:512–5.

KANNEL, W. B., CASTELLI, W. P., GORDON, T., & MCNAMARA, P. M. (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease: the Framingham Study. **Annals of internal medicine**, 74(1), 1-12.

KHAN, I.Y., *et al.* (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Am J**

Physiol, vol. 288 no. 1 R127-R133.

KISLAL, S., SHOOK, L. L., & EDLOW, A. G. (2020). Perinatal exposure to maternal obesity: Lasting cardiometabolic impact on offspring. **Prenatal Diagnosis**, 40(9), 1109-1125.

KOJIMA, S.; CATAVERO, C.; RINAMAN, L. (2016) Maternal high-fat diet increases independent feeding in pré-weanling rats pups. **Physiology & Behavior**, v. 157, p. 237-245.

KOLETZKO, B.; CETIN, I.; BRENNAN, T. (2007). Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. **British Journal of Nutrition**, 98(5):873-7.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W.S.; APPEL, L.J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, 106(21):2747-57.

KUMADA, M.; TERUI, N.; KUWAKI, T. (1990). Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 35, p. 331-61.

LAPILLONNE, A. (2011). Intrauterine growth retardation and adult outcome. **Bull Acad Natl Med** 195:477-84.

LE YU, M. Y., & WANG, L. (2017). The effect of omega-3 unsaturated fatty acids on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of RCTs. **Pakistan journal of medical sciences**, 33(4), 1022.

LEIKIN-FRENKEL, A., SHOMONOV-WAGNER, L., JUKNAT, A., & PASHANIK-CHOR, M. (2015). Maternal Diet Enriched with α -Linolenic or Saturated Fatty Acids Differentially Regulates Gene Expression in the Liver of Mouse Offspring. **Lifestyle Genomics**, 8(4-6), 185-194.

LI, D. P. *et al.* (2008). Pre- and postsynaptic plasticity underlying augmented glutamatergic inputs to hypothalamic presympathetic neurons in spontaneously hypertensive rats. **J Physiol**, v. 586, n. 6, p. 1637-47.

LI, D. P. *et al.* (2014). mGluR5 Upregulation increases excitability of hypothalamic presympathetic neurons through NMDA receptor trafficking in spontaneously hypertensive rats. **J Neurosci**, v. 34, n. 12, p. 4309-17.

LLOPIS, M., SANCHEZ, J., PRIEGO, T., PALOU, A., & PICO, C. (2014). Maternal fat supplementation during late pregnancy and lactation influences the development of hepatic steatosis in offspring depending on the fat source. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62(7), 1590-1601.

LUNDMAN, P., ERIKSSON, M. J., STÜHLINGER, M., COOKE, J. P., HAMSTEN, A., &

TORNVALL, P. (2001). Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. **Journal of the American College of Cardiology**, 38(1), 111-116.

MA, J., PRINCE, A. L., BADER, D., HU, M., GANU, R., BAQUERO, K., ... & AAGAARD, K. M. (2014). High-fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a primate model. **Nature communications**, 5(1), 1-11.

MACHADO, B.H., BONAGAMBA, L.G. (2005). Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. **Auton Neurosci**, 117:25–32.

MALAN, A. (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir Physiol**, v. 17, n. 1, p. 32-44.

MALOYAN, A. et al., (2013). Identification and comparative analyses of myocardial miRNAs involved in the fetal response to maternal obesity. **Physiol. Genomics**. 2013;45:889– 900.

MASSARO, M., SCODITTI, E., CARLUCCIO, M. A., & DE CATERINA, R. (2008). Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 79(3-5), 109-115.

MORAES, D.J., *et al.* (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **J Physiol**. 592(Pt9), 2013 2033. doi:10.1113/jphysiol.2013.262212.

MORAHAN, H. L., LEENAARS, C. H. C., BOAKES, R. A., & ROONEY, K. B. (2020). Metabolic and behavioural effects in offspring exposed to maternal sucrose consumption: a systematic review and meta-analysis of data from rodent models. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, 1-16.

MORRIS, M.C. *et al.* (1993). Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. **Circulation**, vol. 88 no. 2 523-533.

NANDURI, J.; PRABHAKAR, N.R. (2016). Epigenetic regulation of Carotid Body Oxygen Sensing: Clinical Implications. **Adv Exp Med Biol**, 860: 1–8, doi: 10.1007/978-3-319-18440-1_1.

NARAYANAN, U. *et al.* (2008). S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. **J Biol Chem**, v. 283, n. 27, p. 18478-82.

NASSAR, RADUAN (1997). Mãozinhas de seda. In: NASSAR, Raduan. Menina caminho: e outros textos. São Paulo: **Companhia das Letras**, 1997.

NERY, C.S. *et al.* (2011). Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidas ou não ao exercício de natação. **Rev Bras Med Esporte**, v.17, n.1, p.49-55.

NODARI, S., TRIGGIANI, M., CAMPIA, U., MANERBA, A., MILESI, G., CESANA, B.

M., ... & DEI CAS, L. (2011). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, 57(7), 870-879.

NOVELLI, E.L.B. *et al.* (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.

Lab Anim, v.41, n.111, p.1-10.

OTTESEN, N. M., MELUKEN, I., FRIKKE-SCHMIDT, R., PLOMGAARD, P., SCHEIKE, T.,

FERNANDES, B. S., ... & VINBERG, M. (2020). Are remitted affective disorders and familial risk of affective disorders associated with metabolic syndrome, inflammation and oxidative stress?—a monozygotic twin study. **Psychological medicine**, 50(10), 1736-1745.

PAPPIANI, C., & DAMASCENO, N. R. T. (2016). Impacto da suplementação com ácidos graxos ômega-3 nas subfrações da lipoproteína de alta densidade de indivíduos tabagistas. **Revista de Nutrição**, 29(4), 507-518.

PATTERSON, E., O'DOHERTY, R. M., MURPHY, E. F., WALL, R., O'SULLIVAN, O.,

NILAWEEERA, K., ... & STANTON, C. (2014). Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**, 111(11), 1905-1917.

PAULINO-SILVA, K. M., & COSTA-SILVA, J. H. (2016). Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 43(11), 1046-1053.

PENG, ROGER D., *et al.* (2011). Both the variability and level of mouse allergen exposure influence the phenotype of the immune response in workers at a mouse facility. **Journal of allergy and clinical immunology**, 128.2: 390-396. e7.

PENITENTE, A. R.; FERNANDES, L. G.; CARDOSO, L. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M.L.; SILVA, A. L.; HAIBARA, A. S.; MORAES, M. F. D.;

CHIANCA JR., D. A. (2007).

Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **LifeSciences**, v. 81, n. 7, p. 609-614.

PURCELL, RH; SUN, B; PASS, LL et al. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. **Physiol Behav.** 104:474–479.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 123:1939–51.

RENIER, G., SKAMENE, E., DESANCTIS, J., & RADZIOCH, D. (1993). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. **Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology**, 13(10), 1515-1524.

ROFEY, D. L., KOLKO, R. P., IOSIF, A. M., SILK, J. S., BOST, J. E., FENG, W., ... & DAHL, R. E. (2009). A longitudinal study of childhood depression and anxiety in relation to weight gain. **Child psychiatry and human development**, 40(4), 517-526.

RUDAS L, CROSSMAN AA, MORILLO CA, HALLIWILL JR, TAHVANAINEN KU, KUUSELA TA, ECKBERG DL (1999). Human sympathetic and vagal baroreflex responses to sequential nitroprusside and phenylephrine. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; 276:H1691–8.

SAMUELSSON, A. M., MORRIS, A., IGOSHEVA, N., KIRK, S. L., POMBO, J. M., COEN, C. W., ... & TAYLOR, P. D. (2010). Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. **Hypertension**, 55(1), 76-82.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; BARBIERI, M.A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v.83, n. 6, p. 494-504, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental biology and medicine**, 233(6), 674-688.

SIMOPOULOS, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, 8(3), 128.

SPERETTA, G. *et al.* (2014). Arterial pressure and gene expression in the nucleus of the solitary tract in rats fed with high-fat diet. **The FASEB Journal**, vol. 28 no. 1 Supp 874.4.

STOCKER, S.D.; MEADOR, R.; ADAMS, J.M. (2007). Neurons of the

Rostral Ventrolateral Medulla Contribute to Obesity-Induced Hypertension in Rats. **Hypertension**, vol. 49 no. 3 640-646.

SPOSITO, A.C. *et al.* (2007). IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq.Bras. Cardiol.**, v. 88, supl. 1, p. 2-19.

SULLIVAN, E. L., NOUSEN, E. K., & CHAMLOU, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. **Physiology & behavior**, 123, 236-242.

SANTOS, R. D., GAGLIARDI, A. C. M., XAVIER, H. T., MAGNONI, C. D., CASSANI, R., LOTTENBERG, A. M. P., ... & RAMOS, S. (2013). I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 100(1), 1-40.

SARDINHA, F. L., FERNANDES, F. S., TAVARES DO CARMO, M. G., & HERRERA, E. (2013). Sex-dependent nutritional programming: fish oil intake during early pregnancy in rats reduces age-dependent insulin resistance in male, but not female, offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 304(4), R313-R320.

SCHULZE, M. B., MINIHANE, A. M., SALEH, R. N. M., & RISÉUS, U. (2020). Intake and metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: nutritional implications for cardiometabolic diseases. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**.

SMYTH, H. S.; SLEIGHT, P.; PICKERING, G. W. (1969). Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man: a quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. **CircRes**, v. 24, p. 109-21.

SONG, Y., YU, Y., WANG, D., CHAI, S., LIU, D., XIAO, X., & HUANG, Y. (2015). Maternal high-fat diet feeding during pregnancy and lactation augments lung inflammation and remodeling in the offspring. **Respiratory physiology & neurobiology**, 207, 1-6.

SUTER, D.M. *et al.* (2011). Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics. **Science**, 332(6028):472-4. doi: 10.1126/science.1198817.

TAIN, Y. L., LIN, Y. J., SHEEN, J. M., YU, H. R., TIAO, M. M., CHEN, C. C., ... & HSU, C. N. (2017). High fat diets sex-specifically affect the renal transcriptome and program obesity, kidney injury, and hypertension in the offspring. **Nutrients**, 9(4), 357.

TALUKDAR, S., BAE, E. J., IMAMURA, T., MORINAGA, H., FAN, W., LI, P., ... & OLEFSKY, J. M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, 142(5), 687-698.

TELLECHEA, M. L., MENEGUE, M. F., & PIROLA, C. J. (2017). The association between high fat diet around gestation and metabolic syndrome-related phenotypes in rats: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, 7(1), 1-18.

THORLAKSDOTTIR, A. Y., SKULADOTTIR, G. V., PETURSDOTTIR, A. L., TRYGGVADOTTIR, L., OGMUNDSDOTTIR, H. M., EYFJORD, J. E., & JONSSON, J. J. (2006). Positive association between plasma antioxidant capacity and n-3 PUFA in red blood cells from women. **Lipids**, 41(2), 119-125.

TOBALDINI, E., COSTANTINO, G., SOLBIATI, M., COGLIATI, C., KARA, T., NOBILI, L., & MONTANO, N. (2017). Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 74, 321-329.

VALLADOLID-ACEBES, I., *et al.* (2012). High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 302(4):E396-402. doi: 10.1152/ajpendo.00343.2011.

VERVENIOTIS, A., SIASOS, G., OIKONOMOU, E., TSIGKOU, V., PAPAGEORGIOU, N., ZAROMITIDOU, M., ... & TOUSOULIS, D. (2018). The impact of omega 3 fatty acids in atherosclerosis and arterial stiffness: an overview of their actions. **Current pharmaceutical design**, 24(17), 1865-1872.

VINSON, C.; CHATTERJEE, R. (2012). CG methylation. **Epigenomics**, (6):655-63. doi:10.2217/epi.12.55.

VOLPATO, A.M.; SCHULTZ, A.; MAGALHÃES-DA-COSTA, E. *et al.* (2012). Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. **Neuroendocrinology**. 96:272–284.

WANG, D. D., LI, Y., CHIUVE, S. E., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E., RIMM, E. B., ... & HU, F. B. (2016). Association of specific dietary fats with total and cause-specific mortality. **JAMA internal medicine**, 176(8), 1134-1145.

WARING, M. E., & LAPANE, K. L. (2008). Overweight in children and adolescents in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a national sample. **Pediatrics**, 122(1), e1-e6.

WONG, S. W., KWON, M. J., CHOI, A. M., KIM, H. P., NAKAHIRA, K., & HWANG, D. H.

(2009). Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, 284(40), 27384-27392.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Statistics, 2013. Disponível em:

http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013/en/.

Acesso em: 23 set 2016.

WILDE, D.W. *et al.* (2000). High-Fat Diet Elevates Blood Pressure and Cerebrovascular Muscle Ca²⁺ Current. **Hypertension**, vol. 35 no. 3 832-837.

WILLIAMS, L.; SEKI, Y.; VUGUIN, P.M. *et al.* (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. **Biochim Biophys Acta**. 1842:507–519.

XUE, B. *et al.* (2015). Central Renin–Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II–Elicited Hypertension. **Hypertension**, vol. 67 no. 1 163-170.

YE, Z. Y.; LI, D. P.; PAN, H. L. (2013). Regulation of Hypothalamic Presympathetic Neurons and Sympathetic Outflow by Group II Metabotropic Glutamate Receptors in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 255-62.

YOKOMIZO, H., INOBUCHI, T., SONODA, N., SAKAKI, Y., MAEDA, Y., INOUE, T., ... & TAKAYANAGI, R. (2014). Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 306(10), E1163-E1175.

ZHANG, J., MIFFLIN, S.W. (1993). Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. **Am J Physiol**, 265, H770-H773.

ZHANG, Y. P., HUO, Y. L., FANG, Z. Q., WANG, X. F., LI, J. D., WANG, H. P., ... & XUE, B. (2018). Maternal high-fat diet acts on the brain to induce baroreflex dysfunction and sensitization of angiotensin II-induced hypertension in adult offspring. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 314(5), H1061-H1069.

ZHAO, Y., JOSHI-BARVE, S., BARVE, S., & CHEN, L. H. (2004). Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. **Journal of the American College of Nutrition**, 23(1), 71-

78.

ZINKHAN, E. K., YU, B., & SCHLEGEL, A. (2018). Prenatal exposure to a maternal highfat diet increases hepatic cholesterol accumulation in intrauterine growth restricted rats in part through microRNA-122 inhibition of Cyp7a1. **Frontiers in physiology**, 9, 645.

ZOCCAL, D.B., MACHADO, B.H. (2011) Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. **Curr Hypertens Rep**13, 229-236.

ZULKAFI, I. S., WADDELL, B. J., & MARK, P. J. (2013). Postnatal dietary omega-3 fattyacid supplementation rescues glucocorticoid-programmed adiposity, hypertension, and hyperlipidemia in male rat offspring raised on a high-fat diet. **Endocrinology**, 154(9), 3110- 3117.

APÊNDICE A – PAPER 1

Enrichment with omega-3 attenuates the deleterious effects of consuming a diet rich in saturated fatty acids during pregnancy and lactation over the cardiorespiratory control of the offspring rats

Debora Santos Alves¹, Aline Maria Nunes de Lira Gomes Bloise¹, Luiza Gabrielly da Silva Menezes¹, Elionay Gomes dos Santos Silva¹, Viviane de Oliveira Nogueira Souza¹, João Henrique Costa-Silva^{1*}

¹Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Department of Physical Education and Sport Sciences, Federal University of Pernambuco, UFPE, Vitória de Santo Antão – PE, 55608-680, Brazil.

***Corresponding author:**

João Henrique Costa-Silva

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV - UFPE

Rua Alta do Reservatório, S/N, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE.

CEP: 55608-680

Phone/fax: 55 81 31144101

Email: joao.hcsilva@ufpe.br

Abstract

Purpose: High fat (HF) diet intake during gestation and lactation has been associated with an increased risk of developing cardiorespiratory disorders in adult offspring. We investigated whether a diet with omega-3 in HFD is able to attenuate the cardiorespiratory alterations resulting from the consumption of HFD consumption. **Methods:** Wistar rat dams were fed with control (GC: 19% of lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 12.66), HF (HF: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 21.22) or HF enriched with omega-3 (HF $\omega 3$: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 9.45) diet during gestation and lactation, and their male offspring were evaluated. Respiratory parameters of respiratory frequency (RF), tidal volume (VT) and ventilation (VE) were assessed at 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th, and 300th days of life. Direct measurements of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), respiratory frequency (RF) and respiratory (RV) and cardiac (CV) variabilities were assessed in consciousness at 90th and 300th days of life. The groups were compared using ANOVA one-way and it was considered $p < 0.05$ as significant. **Results:** HF group showed increased RF at 1st and 14th day in baseline moment, as well as decreased ΔVT at 14th and decreased ΔVE at 14th and 21st day in response to induced-hypoxia. In relation to respiratory variability, the HF group presented lower SD1 component at 7th day and higher SD2 component at 14th day. HF $\omega 3$ showed increased SD1 at 21st day. Moreover, both HF and HF $\omega 3$ showed decreased LF band and LF/HF ratio in the heart rate variability in the frequency domain at 90th and 300th day. However, only HF showed increased MAP at 90th day, and both HF and HF $\omega 3$ showed increased MAP at 300th day when compared to Control. **Conclusion:** Maternal HF

diet consumption leads to increased respiratory rate during the maturation period of the respiratory neural network, decreased heart rate variability and early onset of hypertension in the offspring. In addition, maternal HF diet enriched with omega-3 consumption was able to mitigate the deleterious effects on ventilatory parameters during the maturation period of the neural network and prevented the early onset of hypertension in the offspring.

Keywords: Phenotypic plasticity, high fat diet, alpha-linolenic, hypertension.

1 Introduction

Cardiovascular and metabolic diseases, such as hypertension, dyslipidemia and type II diabetes, have a high prevalence in the world. Such diseases are an important public health problem, since they increase the risk factors associated with the appearance of other pathologies, including coronary heart disease, stroke and heart failure (LANDSBERG *et al.*, 2013). Studies indicate that the etiology of cardiometabolic diseases comprises a complex phenotype, which emerges from several genetic, environmental, nutritional, behavioral and ethnic origins (LANDSBERG *et al.*, 2013; COSTA-SILVA, SIMÕES-ALVES, FERNANDES, 2016).

In this context, it was shown that eating habits and nutritional status [in](#) early ~~in~~-life can play an important role in the etiology of cardiometabolic diseases, leading to physiological dysfunctions. Studies show that maternal consumption of a high-fat diet during pregnancy and lactation is associated with an increased risk for the development of obesity, diabetes mellitus (BRINGHENTI *et al.*, 2014), hypertension (GUBERMAN *et al.*, 2013) and metabolic syndrome (DESAI *et al.*, 2014) in the descendants. In addition, studies with rats have shown that excessive and unbalanced consumption of lipids in the maternal diet during pregnancy, lactation and / or after weaning leads to an increase in baseline blood pressure levels in the offspring (KHAN *et al.*, 2005; WILDE *et al.*, 2000; FEOLI *et al.*, 2003; STOCKER; MEADOR; ADAMS, 2007; XUE *et al.*, 2015), which persists in adult life. However, the peripheral and central mechanisms that contribute to the increase in blood pressure levels in this experimental condition are still unclear.

Taking into account that the imbalance of the autonomic nervous system, with a predominance of sympathetic tone, constitutes an important risk factor for the development of hypertension (BARROS *et al.*, 2015; DE-BRITO-ALVES *et al.*, 2015, 2016), studies suggest that the high-fat diet may have a significant impact on the regulation of sympathetic activity in neurons in key regions of cardiorespiratory control (BARDGETT; SHARPE; TONEY, 2014), which could justify, at least in part, the baseline increase in blood pressure levels of animals submitted to maternal perinatal high fat diet.

Studies have shown that the intake of omega-3 fatty acids is capable of playing a dose-dependent hypotensive role in hypertensive individuals (HOWE, 1997). In a meta-analysis, Morris *et al.* (1993) found a significant reduction in blood pressure levels (between 2.0 to 3.4 mmHg) in hypertensive patients who consumed 5.6 g of omega-3 fatty acids per day. Likewise, Appel *et al.* (1993) found that the blood pressure of untreated hypertensive patients decreased between 3.5-5.5 mmHg with daily consumption of 3g of omega-3 fatty acids. The anti-inflammatory properties of omega-3 occur by reducing the metabolism of omega-6 and, consequently, the production of pro-inflammatory molecules, since the same group of

enzymes are required for the synthesis of pro-inflammatory molecules from the omega-6 and anti-inflammatory drugs from omega-3 (PERINI et al., 2010; AKERELE; CHEEMA, 2016). There are studies that have shown that omega-3 is associated with a lower risk of cardiovascular diseases, but the mechanisms adjacent to this are still unclear (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002; HARRIS; CONNOR; LINSEY, 1984).

Therefore, the aim of this study was to investigate whether the enrichment of omega-3 in maternal HF during gestation and lactation is able to attenuate the effects of HF consumption over cardiorespiratory profile in the offspring rats.

2 Materials and methods

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee (protocol 23076.049500/2016-37) of the Federal University of Pernambuco, Brazil. The Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals were followed and all efforts were made to minimize animal discomfort and the number of animals used.

2.1 Animals and experimental groups

Virgins female albino rats ($n = 20$) from the Wistar line (*Rattus norvegicus*) were obtained from the experimental animal room of the Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco, Brazil. At 85 to 90 days of life and body weight comprised between 220 and 260 g, the rats were placed for mating in the ratio of 1: 3 (male: female). The determination of pregnancy was performed from the observation of the presence of spermatozoa in the vaginal smear, defining the first day of pregnancy. From the first day of gestation until the 21st day of lactation, the progenitor rats were separated and placed in individual cages and randomly allocated according to their diets: C (Control, 19% lipids; $n=3$), HF (High AGS content, 33% lipids; $n=3$) and HF ω 3 (High content lipid in SFA, 33% lipids and enriched with omega-3; $n=3$) with chow and water *ad libitum*. After weaning, the male offspring were feed with standard chow for rats (Presence®, Neovia Group, São Paulo, Brazil) and water *ad libitum* and they were separated in three groups according to their mothers' diets: C ($n=35$), HF ($n=27$) and HF ω 3 ($n=27$) groups

Temperature and humidity were maintained within the range of 22 to 24 ° C and 55 to 65% respectively, with 12h light and dark cycle (lights on from 06:00 to 18:00h). Offspring from each female were reduced to 8 male rats per litter. In cases where the litter was composed of less than 8 male rats, female rats were used to standardize litter size until weaning.

2.2 Nutritional manipulation

The C group received a standard diet in accordance with AIN-93 (2) with 19% of the energy coming from the fat, 20% of the proteins and 61% of the carbohydrates, with ω 6: ω 3 ratio=12.66; the HF group received a diet rich in lipids and saturated fatty acids, which 33% of the energy coming from the

fats, 20% of the proteins and 47% of the carbohydrates, with ω 6: ω 3 ratio=21.22; and the HF ω 3 group received a high fat diet enriched with omega-3. The ω 6: ω 3 ratio of this group was 9.45 (Table 1).

The standard diet contained around 14,64 kJ/g and the high fat diets around 18,82 kJ/g. High fat diets had a higher content of saturated fatty acids and the diet enriched with omega-3 contained less omega 6. After weaning, at 21 days of age, the animals received commercial standard diet for rats (Presence®, Neovia Group, São Paulo, Brazil) *ad libitum*.

2.3 Evaluation of respiratory parameters of the offspring

As ventilation measures were performed by whole body plethysmography, in a closed system (MALAN, 1973) at the ages of 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th, and 300th days of life. During each ventilation measurement, the air flow was interrupted and the animal's chamber remained completely closed for short periods of time (~ 2 min). As the oscillations caused by the animal's ventilation were captured by a device connected to the chamber that contains the differential pressure transducer and signal amplifier (spirometer ML141, PowerLab, ADInstruments). The signal was then sent to the data acquisition and analysis system (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments). Three respiratory variables were measured: respiratory frequency (RF), tidal volume (VT) and ventilation (VE) (MALAN, 1973).

2.4 Activation of peripheral chemoreceptors in the young offspring

To stimulate the peripheral respiratory chemoreceptors and, consequently, activate the chemoreflex, the hypoxic mixture was inflated inside the chamber for 3 min, in a flow of 3 L / min, at ages of 7th, 14th, 21st, and 30th days of life, as previously described by De-Brito-Alves *et al.* (2014).

2.5 Respiratory variability of the offspring

In order to assess the respiratory variability, we performed the analysis of breath by breath (BB N) and the subsequent interval (BB N +1) of 200 breaths as previously described (PENG *et al.*, 2011). These parameters were calculated using a period of 2 minutes of respiratory recordings in conscious rats when they were quiet and presenting no body movements, as described by Souza *et al.* (2015). Short-term variability (SD1) and long-term variability (SD2) were calculated as an index of breathing variability for Control, HF and HF ω 3 groups.

2.6 Evaluation of cardiovascular baseline parameters of the adult offspring

At the ages of 90th and 300th days of life, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and the femoral artery was cannulated (PE-50 connected to PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) as described previously (BARROS *et al.*, 2015). Briefly, the catheters were filled with heparinized saline solution (NaCl 0.9%, in heparin concentration - 0.5%), tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. After surgery, the animals received

intramuscular injection anti-inflammatory (Ketoprofen - 0.1 mL, single dose, Merial, SP, Brazil) and were allowed to recover for 24 hours.

The next day, the pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) of unanesthetized freely moving rats were recorded by connecting the arterial catheter to a pressure transducer. The signals were amplified (ML866/P, Power Lab; ADInstruments), sampled at 2 kHz, and digitalized by using appropriate software (LabChart7 Pro; ADInstruments). Recordings of PAP, MAP, and HR were made for 30–50 minutes. Before recording baseline data, the rats were placed into a Plexiglas chamber (5 L) that was flushed with humidified room air and maintained at a temperature of 25° C. The cardiovascular parameters were analyzed in baseline moment. The signals were then captured by an acquisition system (PowerLab; ADInstruments) and data were analyzed offline with the use of appropriate software (LabChart 7 Pro; ADInstruments).

2.7 Heart rate variability of the adult offspring

The cardiovascular autonomic evaluation was performed using the analysis of heart rate variability in the time and frequency domain by an appropriate software program (CardioSeries-v.2.4; www.danielpenteado.com). The spectra were integrated in the LF (0.2-0.75 Hz) and the HF bands (0.75-3 Hz). To assess the sympathovagal index, the LF / HF ratio of the variability was calculated.

2.8 Statistical Analysis

The results were expressed as mean $\pm$ epm. The normality analysis of the sample was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. For comparison among the groups, the one-way ANOVA test was used. When applicable, Bonferroni's post hoc was used. The level of significance was considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Baseline respiratory parameters since 1 until 300 days of life

The baseline respiratory parameters of the offspring were analyzed on the 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th, and 300th day of life for respiratory rate (RF), also obtaining the values of tidal volume (VT) and pulmonary ventilation (VE).

On the 1st day of life, the HF group showed higher RF values compared to the other groups ($p = 0.03$) (Table 2). On the 7th day, the HF ω 3 group had a lower RF when compared to the HF group ($p < 0.001$) (Table 2). On the 14th day, the HF showed increased RF values compared to the other groups ($p = 0.02$) (Table 2). However, no differences were found in RF among the groups on the 21st day ($p = 0.42$) (Table 2), 30th ($p = 0.09$) (Table 2), 90th ($p = 0.07$) (Table 2), and 300th ($p = 0.38$) (Table 2) day of life.

Regarding the VT analysis, no significant difference was found in the 1st ($p = 0.11$) (Table 2) and 7th ($p = 0.18$) (Table 2) day of life. On the 14th day, the HF ω 3 group showed a lower VT when compared

to HF ($p = 0.01$) (Table 2). Besides, no differences were found in the 21st ($p = 0.07$) (Table 2), 30th ($p = 0.07$) (Table 2), 90th ($p = 0.61$) (Table 2), and 300th ($p = 0.34$) day of life.

In the VE analysis, no differences were found among the groups in the 1st ($p = 0.42$) (Table 2) and 7th ($p = 0.12$) (Table 2) day of life. On the 14th day of life, lower VE values were observed in the HF ω 3 group when compared to the HF ($p = 0.003$) (Table 2). Similarly, at 21st the HF ω 3 also showed lower values when compared to HF group ($p = 0.04$) (Table 2). No differences were found among groups at the other ages evaluated, that is 30th ($p = 0.12$) (Table 2), 90th ($p = 0.43$) (Table 2), and 300th ($p = 0.88$) day of life.

3.2 Respiratory response to activation of peripheral chemoreceptors since 7 until 30 days of life in the offspring

The response to acute hypoxia-induced over RF, VT, and VE was assessed at 7th, 14th, 21st, and 30th days of life, ages relative to postnatal maturation of respiratory neural control.

Regarding to Δ RF, no difference was observed at 7th ($p = 0.08$) (Table 3), 14th ($p = 0.11$) (Table 3), 21st ($p = 0.33$) (Table 3), and 30th ($p = 0.97$) (Table 3) day of life among the groups.

Similarly, in relation to the Δ VT values, no difference was found at 7th ($p = 0.30$) (Table 3), 14th ($p = 0.92$) (Table 3), 21st ($p = 0.50$) (Table 3), and 30th ($p = 0.27$) (Table 3) days of life among the groups.

Nevertheless, at 14th day of life both HF and HF ω 3 groups showed lower values of Δ VE ($p = 0.02$) (Table 3) when compared to the Control group. On the 21st day of life only HF presented lower values of Δ VE ($p = 0.03$) (Table 3) when compared to the others groups. No differences in Δ VE was observed at 7th ($p = 0.12$) (Table 3), and 30th ($p = 0.86$) (Table 3) day of life among the groups.

3.3 Respiratory variability since 1 until 300 days of life

The respiratory variability was assessed at resting condition at 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th, and 300th day of life of the offspring.

No differences were found at 1st day of life in SD1 ($p = 0.25$) (Table 4) and SD2 ($p = 0.19$) (Table 4) components among the groups. However, at 7th day of life the HF group showed lower values of SD1 ($p = 0.009$) (Table 4) when compared to the Control group, and both HF and HF ω 3 presented decreased values of SD2 ($p = 0.009$) (Table 4) when compared to the Control. At 14th day of life, no difference was observed in values of SD1 ($p = 0.40$) (Table 4) among the groups, but HF group showed increased values of SD2 ($p = 0.03$) (Table 4) when compared to the others groups. At 21st the HF ω 3 group presented increased values of SD1 ($p = 0.03$) (Table 4) in comparison to the others groups, but no difference was found in SD2 ($p = 0.30$) (Table 4) among the groups. Furthermore, no differences were observed at 30th day of life in SD1 ($p = 0.72$) (Table 4) and SD2 ($p = 0.11$) (Table 4), as well as at 90th day of life in SD1 ($p = 0.63$) (Table 4) and SD2 ($p = 0.77$) (Table 4), and at 300th day of life in SD1 ($p = 0.56$) (Table 4) and SD2 ($p = 0.64$) (Table 4) among the groups.

3.4 Cardiovascular assessment at 90 and 300 days of life

The offspring from dams exposed to high fat diet during pregnancy and lactation exhibited at 90th day of life an increased MAP ($p = 0.009$) (Fig 1b) when compared to the others groups, without changes in baseline systolic blood pressure (SBP) ($p = 0.06$) (Fig 1a) and HR ($p = 0.10$) (Fig 1c).

Nevertheless, at 300th day of life, both HF and HF ω 3 groups showed an increased SBP ($p = 0.001$) (Fig 1d), even as increased MAP ($p = 0.004$) (Fig 1e). No difference was found in HR ($p = 0.85$) (Fig 1f) among the groups.

3.5 Evaluation of the heart rate variability at 90 and 300 days of life

The heart rate variability (HRV) was assessed in the frequency domain and time domain on the baseline moment, at 90th and 300th days of life of the offspring.

Regarding to HRV in the frequency domain, no differences were found at 90th day of life in the very low frequency (VLF – ms^2) ($p = 0.36$) (Fig 2a) component, as well as low frequency (LF – ms^2) ($p = 0.87$) (Fig 2b), and high frequency (HF – ms^2) ($p = 0.47$) (Fig 2c) components among the groups. However, both HF and HF ω 3 groups presented lower LF (nu) ($p = 0.005$) (Fig 2d), as well as decreased LF/HF ratio ($p = 0.005$) (Fig 2f) when compared to the Control group. No difference was observed in HF (nu) ($p = 0.71$) (Fig 2e) among the groups.

Similarly, no differences were found at 300th day of life in the VLF ($p = 0.50$) (Fig 2g) component, as well as LF ($p = 0.76$) (Fig 2h), and HF ($p = 0.49$) (Fig 2i) components among the groups. However, both HF and HF ω 3 groups presented lower LF (nu) ($p = 0.001$) (Fig 2j), as well as decreased LF/HF ratio ($p = 0.006$) (Fig 2l) when compared to the Control group. No difference was observed in HF (nu) ($p = 0.26$) (Fig 2k) among the groups.

Regarding to HRV in the time domain, no differences were found at 90th day of life in SDRR ($p = 0.60$) (Fig 3a), SDARR ($p = 0.60$) (Fig 3b), RMSSD ($p = 0.23$) (Fig 3c), and pRR50 ($p = 0.94$) (Fig 3d).

Also, no differences were found at 300th day of life in SDRR ($p = 0.78$) (Fig 3e), SDARR ($p = 0.45$) (Fig 3f), RMSSD ($p = 0.20$) (Fig 3g), and pRR50 ($p = 0.86$) (Fig 3h).

4 Discussion

This study demonstrated at early life that offspring from dams fed on a HF diet during gestation and lactation displayed altered respiratory parameters, showed decreased cardiovascular variability and they develop increased MAP at early in adulthood. Meanwhile, offspring from dams fed on a HF ω 3 diet did not show changes in respiratory parameters in early life and did not develop early hypertension in adulthood, but they also showed decreased cardiac variability and, as a result, they developed later hypertension at 300 days of life. Our results suggest that perinatal HF in the dams can affect respiratory and cardiac function in the offspring, and dietary enrichment with omega-3 is able to attenuate some of the damage caused by maternal consumption of the HF diet.

In the evaluation of the respiratory parameters, at the earliest ages of life (1st and 14th days), the HF group presents an increase in respiratory rate, associated to decreased SD1 component (at 7th day) and increased SD2 component (at 14th day) values when compared to control. However, at other ages (21st, 30th, 90th and 300th days), there was a normalization of the values of FR, SD1 and SD2 of the HF group, with no difference among the groups. It is worth mentioning that at the ages of 1 to 30 days of life the respiratory system is still in the maturation process, showing a different rhythm compared to the adult or demonstrating that the maturation of this system occurs in the postnatal period (PATON; RAMIREZ; RICHTER, 1994). It suggests that the lactation period has an important role in its development.

The respiratory changes found in the HF group at the beginning of life can be better understood based on the relationship between increased activity of the carotid body and increased respiratory rate. Carotid bodies (CBs) are peripheral chemoreceptors that perceive hypoxia, hypercapnia and acidosis, responding with an increase in frequency of action potential in its sensitive nerve or the carotid nerve (CSN). CSN activity is integrated into the brainstem to induce respiratory responses, applied mainly to the normalization of blood gases via hyperventilation (GONZALEZ *et al.*, 1994), regulating blood pressure and cardiac performance through the activation of the sympathetic nervous system (MARSHALL, 1994). It was related to animal models of metabolic syndrome presented to CB activity patterns associated with hyperinsulinemia, and it has been shown that insulin stimulates peripheral chemoreceptor receptors in CBs, which are crucial to trigger a sympathoadrenal induced hyperactivity by CB, thus contributing to resistance to insulin and hypertension seen in metabolic disorders (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Studies have shown that a greater in the activity of the carotid body are associated with an increased in respiratory rate, generating a picture of respiratory alkalosis. As a result, there is an inhibition of peripheral chemoreceptors, also causing a decrease in respiratory rate. The increased variation in this system can be seen from changes in respiratory variability (NADURI *et al.*, 2011). It is already recognized that maternal protein malnutrition is associated with increased respiratory rate between 30 and 90 days of life, as a mechanism underlying the development of arterial hypertension (DE BRITO ALVES, 2014). However, little is known about the effects of maternal high-fat diet on this maturation process as well as the role of omega-3.

At later ages of life, there were no changes in the respiratory parameters of the evaluated animals. Similar to our study, Guimarães *et al.* (2017) also did not show differences in baseline values of respiratory rate, tidal volume and pulmonary ventilation at 90 days of animals submitted to a high-fat diet during pregnancy and lactation. However, when these animals were exposed to the condition of hypercapnia (7% CO₂) there was an increase in respiratory frequency and pulmonary ventilation in response to the adverse event, demonstrating greater sensitization of chemoreceptors (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Meantime, the fetus can produce predictive adaptive responses from the signals received by the intrauterine environment, as a means of protection against environmental insults, enabling its postnatal adaptation (KHAN *et al.*, 2005), which could explain the absence of changes in respiratory rate in adulthood.

Studies have suggested that leptin is an important stimulator of respiratory function which raises the possibility that obese patients with leptin resistance may exhibit hypoventilation as a consequence, at least in part, of reduced leptin effect in the brain (MALLI *et al.*, 2010; MORRIS; RUI, 2009). However, the mechanisms activated by leptin to stimulate ventilation are not clear. In our study HF group showed

decreased values in ΔVT and ΔVE at 14th day, as well as decreased ΔVE at 21st day in compared to Control. HF ω 3 also showed decreased in ΔVE at 14th day in compared to Control. Ribeiro *et al.* (2018) suggested that the facilitatory effects of leptin on carotid body activity is blunted in HFD fed rats, which might explain the decreased response induced by hypoxia in HFD offspring.

Heart rate variability indices have been used to understand several conditions, such as: coronary artery disease (CARNEY *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2005; CARNETHON *et al.*, 2002), cardiomyopathy (LIMONGELLI *et al.*, 2007), arterial hypertension (KARAS *et al.*, 2008; TERATHONGKUM; PICKLER, 2004), myocardial infarction (LAROSA *et al.*, 2008), sudden death (KUDAIBERDIEVA *et al.*, 2007), chronic obstructive pulmonary disease (PANTONI *et al.*, 2007), kidney failure (FURULAND *et al.*, 2008), stroke (LAKUSIC *et al.*, 2005), among others disorders. In this study, at 90th and 300th days of life, both HF and HF ω 3 groups showed decreased values of LF component, as well as LF/HF ratio when compared to the Control group, suggesting that a diet rich in saturated fatty acids impaired HRV, even when the diet is enriched with omega 3 fatty acids. The reduction in HRV is often an indicator of abnormal and insufficient adaptation of the autonomic nervous system (ANS), implying the presence of physiological malfunction in the individual (VANDERLEI *et al.*, 2009). Moreover, lower HRV has been identified as a strong risk indicator related to adverse events in normal individuals and in patients with a large number of diseases, reflecting the vital role that ANS plays in maintaining health (PUMPRLA *et al.*, 2002). In diseases such as arterial hypertension (KARAS *et al.*, 2008; TERATHONGKUM; PICKLER, 2004), acute myocardial infarction, coronary insufficiency (NOVAIS *et al.*, 2004) and atherosclerosis (CARNETHON *et al.*, 2002), HRV indices are reduced. Menezes Jr *et al.* (2004) found a decrease in HRV in hypertensive individuals, when compared to normotensive individuals, when analyzing the SDNN, RMSSD, pNN50, HF, LF, LF / HF indices, probably due to sympathetic hyperactivity.

Moreover, studies have demonstrated a relationship between inflammatory processes and dysfunctions in the autonomic nervous system. It is well established that consumption of a HD diet can cause inflammation (DUAN *et al.*, 2018). The inflammatory condition in some regions of the brain that is controlled by the sympathetic nerve activity, such as the nucleus of the solitary tract (NTS), can contribute to the establishment of pathologies, such as hypertension (PATON; WAKI, 2009; ADLAN *et al.*, 2014). Thus, changes in the immune system are one of the contributing factors for the development of increased blood pressure (TIMPER; BRUNING, 2017). Paton and Waki (2009) suggested that in inflammation may occur increase in leukocyte adherence in the brain stem microvasculature or specifically in the NTS, that can lead to an activation of reactive species of pro-inflammatory and oxygen-induced cytokines, which alter neuronal activity. Inflammation and accumulation of leukocytes in this brainstem microvasculature can increase vascular resistance. An accumulation of leukocytes in capillaries can obstruct blood flow, decrease blood perfusion and result in localized hypoxia, consequently causing an increase in sympathetic activity and blood pressure (PATON; WAKI, 2009). These studies may justify our results of increased blood pressure in HF at 90th day and both HF and HF ω 3 at 300th day of life. Similar to our study, Vidal *et al.* (2017) also found increased blood pressure in the offspring from dams that received HF diet during gestation and lactation.

However, in our study, at 90th day of life, the HF ω 3 group presented arterial blood pressure similar to Control, suggesting that omega-3 seems to have a cardioprotective action, preventing the onset

of early hypertension. This may be due the adequate consumption of the omega-6: omega-3 ratio reduces the formation of arachidonic acid from linoleic acid, depending on the availability of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) and, consequently, a formation of anti-inflammatory mediators via COX and LOX. Absorption and incorporation of linolenic acid in membrane phospholipids also with inhibitory action and use of the COX and LOX pathway without arachidonic acid, with pro-inflammatory metabolism reaction: prostaglandin E2, thromboxane A2 and leukotriene B4 (KHATIB *et al.*, 2016). A-linolenic acid also acts to reduce circulating inflammatory mediators in plasma: IL-6, TNF- α and PCR (OLLIVER *et al.*, 2016).

Nevertheless, the risk of developing cardiovascular disease increases with the high visceral adipose distribution, which tends to occur with aging. The adipose tissue becomes dysfunctional, with the path from pre-adipocyte differentiation to mature adipocytes becoming impaired, this results in dysfunctional adipocytes less able to store fat and subsequent redistribution of fat to ectopic sites. Low-grade systemic inflammation is commonly seen in aging and can lead to adipose tissue dysfunction, as pro-inflammatory cytokines are able to inhibit adipocyte differentiation. In addition to the increase in ectopic adiposity, the effect of impaired adipose tissue function is an elevation of systemic free fatty acids (FFA), a common feature of many metabolic disorders. Saturated fatty acids can be considered the most harmful of FFA, being able to induce insulin resistance and inflammation through lipid mediators such as ceramide, which can increase the risk of developing atherosclerosis. High FFA, in particular saturated fatty acids, may be a determining factor for increased insulin resistance, risk of cardiovascular disease and inflammation in elderly adults (SLAWIK; VIDAL-PUIG, 2006; HE *et al.*, 1999). These studies may justify the increased arterial blood pressure presented for the HF ω 3 group at 300th day of life.

In conclusion, the present study demonstrated that maternal HF diet consumption may affects the central mechanisms involved in respiratory and cardiovascular regulation, leading to increased respiratory rate during the maturation period of the respiratory neural network, decreased heart rate variability and early onset of hypertension in the offspring. In addition, consumption of a high-fat diet enriched with omega 3 was able to mitigate the deleterious effects on ventilatory parameters during the maturation period of the neural network and prevented the early appearance of hypertension in the offspring. However, further studies are necessary to determine the origin of arterial hypertension in this experimental model, to evaluate the participation of baroreflex and chemoreflex controls, as well as to evaluate the network of excitatory and inhibitory neurotransmission into NTS.

Disclosure of interest

The authors declare no competing financial interests.

References

- ADLAN, Ahmed M., et al. Autonomic function and rheumatoid arthritis—A systematic review. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders, 2014. p. 283-304.
- AKERELE, Olatunji Anthony; CHEEMA, Sukhinder Kaur. A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 2016, 5: 23-33.
- APPEL, Lawrence J., et al. Does supplementation of diet with fish oil reduce blood pressure?: A meta-analysis of controlled clinical trials. *Archives of internal medicine*, 1993, 153.12: 1429-1438.
- BARDGETT, Megan E.; SHARPE, Amanda L.; TONEY, Glenn M. Activation of corticotropin-releasing factor receptors in the rostral ventrolateral medulla is required for glucose-induced sympathoexcitation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2014, 307.10: E944-E953.
- BARROS, M. A. V., et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2015, 25.1: 123-130.
- BRINGHENTI, Rafael Nazario. Linfangiogênese no transplante renal: análise clínico-patológica e imunofenotípica de biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos. 2014. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.
- CARNETHON, Mercedes R., et al. Does the cardiac autonomic response to postural change predict incident coronary heart disease and mortality? The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *American journal of epidemiology*, 2002, 155.1: 48-56.
- CARNEY, Robert M., et al. Heart rate variability and markers of inflammation and coagulation in depressed patients with coronary heart disease. *Journal of psychosomatic research*, 2007, 62.4: 463-467.
- COSTA-SILVA, João H.; SIMÕES-ALVES, Aiany C.; FERNANDES, Mariana P. Developmental origins of cardiometabolic diseases: role of the maternal diet. *Frontiers in physiology*, 2016, 7: 504.
- DE BRITO ALVES, José Luiz, et al. Short-and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *British journal of nutrition*, 2014, 111.4: 606-615.
- DE BRITO ALVES, José L., et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *The Journal of nutrition*, 2015, 145.5: 907-914.
- DE BRITO ALVES, José L., et al. New insights on the use of dietary polyphenols or probiotics for the management of arterial hypertension. *Frontiers in physiology*, 2016, 7: 448.
- DUAN, Yehui, et al. Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 2649.
- FEOLI, Ana M., et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. *Nutrition*, 2003, 19.9: 789-793.
- FURULAND, Hans, et al. Heart rate variability is decreased in chronic kidney disease but may improve with hemoglobin normalization. *Journal of nephrology*, 2008, 21.1: 45-52.
- GONZALEZ, Norberto C., et al. Pulmonary gas exchange during hypoxic exercise in the rat. *Respiration physiology*, 1994, 96.2-3: 111-125.
- GUBERMAN, Cristiane, et al. Maternal high-fat diet programs rat offspring hypertension and activates the adipose renin-angiotensin system. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2013, 209.3: 262.e1-262.e8.

- GUIMARÃES, Keyth Sulamitta L., et al. Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. *British Journal of Nutrition*, 2017, 118.11: 930-941.
- HARRIS, William S.; CONNOR, William E.; LINDSEY, Saralyn. Will dietary ω -3 fatty acids change the composition of human milk?. *The American journal of clinical nutrition*, 1984, 40.4: 780-785.
- HE, Xi-Xi, et al. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 2016, 11.10.
- HOWE, Peter RC. Dietary fats and hypertension focus on fish oil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 827.1: 339-352.
- KARAS, Maria, et al. Attenuation of autonomic nervous system functions in hypertensive patients at rest and during orthostatic stimulation. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2008, 10.2: 97-104.
- KHAN, Imran Y., et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 288.1: R127-R133.
- KHATIB, Rasha, et al. Availability and affordability of cardiovascular disease medicines and their effect on use in high-income, middle-income, and low-income countries: an analysis of the PURE study data. *The Lancet*, 2016, 387.10013: 61-69.
- KRIS-ETHERTON, Penny M.; HARRIS, William S.; APPEL, Lawrence J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation*, 2002, 106.21: 2747-2757.
- KUDAIBERDIEVA, Gulmira; GÖRENEK, Bülent; TIMURALP, Bilgin. Heart rate variability as a predictor of sudden cardiac death. *Anatolian Journal of Cardiology/Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 2007, 7.
- LAKUŠIĆ, Nenad; MAHOVIĆ, Darija; BABIĆ, Tomislav. Gradual recovery of impaired cardiac autonomic balance within first six months after ischemic cerebral stroke. *Acta Neurologica Belgica*, 2005, 105: 39-42.
- LANDSBERG, Lewis, et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of the Obesity Society and the American Society of Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2013, 15.1: 14-33.
- LAROSA, Claudio, et al. Predictors of impaired heart rate variability and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 2008, 9.1: 76-80.
- LIMONGELLI, Giuseppe, et al. Heart rate variability is a weak predictor of sudden death in children and young patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 2007, 93.1: 117-118.
- MALAN, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respiration physiology*, 1973, 17.1: 32-44.
- MALLI, Foteini, et al. The role of leptin in the respiratory system: an overview. *Respiratory research*, 2010, 11.1: 152.
- MARSHALL JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiological reviews*. 1994 Jul1;74(3):543-94.
- MENEZES JUNIOR, Antônio da Silva; MOREIRA, Humberto Graner; DAHER, Murilo Tavares. Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina II. *Arq. Bras. Cardiol*, 2004, 165-168.
- MORRIS, Martha Clare; SACKS, Frank; ROSNER, Bernard. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*, 1993, 88.2: 523-533.

- MORRIS, David L.; RUI, Liangyou. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2009, 297.6: E1247-E1259.
- NANDURI, Jayasri; PRABHAKAR, Nanduri R. Epigenetic regulation of carotid body oxygen sensing: clinical implications. In: *Arterial Chemoreceptors in Physiology and Pathophysiology*. Springer, Cham, 2015. p. 1-8.
- NOVAIS, L. D., et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatias em treinamento físico. *Braz. j. phys. ther.(Impr.)*, 2004, 207-213.
- Olliver M, Veysey M, Lucock M, Niblett S, King K, MacDonald-Wicks L, Garg ML. Erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with biomarkers of inflammation in older Australians. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2016 Sep 1;5:61-9.
- PATON, Julian FR; RAMIREZ, Jan-Marino; RICHTER, Diethelm W. Mechanisms of respiratory rhythm generation change profoundly during early life in mice and rats. *Neuroscience letters*, 1994, 170.1: 167-170.
- PANTONI, C. B. F., et al. Estudo da modulação autonômica da frequência cardíaca em repouso de pacientes idosos com doença pulmonar obstrutiva crônica. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 2007, 11.1: 35-41.
- PATON, Julian FR; WAKI, Hidefumi. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2009, 33.2: 89-94.
- PENG, Roger D., et al. Both the variability and level of mouse allergen exposure influence the phenotype of the immune response in workers at a mouse facility. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2011, 128.2: 390-396. e7.
- PERINI, João Ângelo De Lima, et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de Nutrição*, 2010, 23.6: 1075-1086.
- PUMPRLA, Jiri, et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *International journal of cardiology*, 2002, 84.1: 1-14.
- RIBEIRO, Maria J., et al. Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes*, 2013, 62.8: 2905-2916.
- RIBEIRO, Maria J., et al. High fat diet blunts the effects of leptin on ventilation and on carotid body activity. *The Journal of physiology*, 2018, 596.15: 3187-3199.
- SLAWIK, Marc; VIDAL-PUIG, Antonio J. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing research reviews*, 2006, 5.2: 144-164.
- SOUZA, George Miguel PR, et al. Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. *Experimental physiology*, 2015, 100.3: 249-258.
- STOCKER, Sean D.; MEADOR, Rachel; ADAMS, Jule M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. *Hypertension*, 2007, 49.3: 640-646.
- TAKAHASHI, A. C., et al. Avaliação do controle autonômico da frequência cardíaca e determinação do limiar de anaerobiose em homens saudáveis e coronariopatias. *Braz. j. phys. ther.(Impr.)*, 2005, 157-164.
- TERATHONGKUM, Sangthong; PICKLER, Rita H. Relationships among heart rate variability, hypertension, and relaxation techniques. *Journal of Vascular Nursing*, 2004, 22.3: 78-82.
- TIMPER, Katharina; BRÜNING, Jens C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease models & mechanisms*, 2017, 10.6: 679-689.
- VANDERLEI, Luiz Carlos Marques, et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 2009, 24.2: 205-217.

VIDAL-SANTOS, R., et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. *Journal of developmental origins of health and disease*, 2017, 8.2: 216-225.

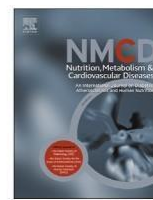
WILDE, Dixon W., et al. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca^{2+} current. *Hypertension*, 2000, 35.3: 832-837.

XUE, Baojian, et al. Central renin–angiotensin system activation and inflammation induced by high-fat diet sensitize angiotensin II–elicited hypertension.

APÊNDICE B – PAPER 2

Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcdMaternal consumption of $\omega 3$ attenuates metabolic disruption elicited by saturated fatty acids-enriched diet in offspring rats

Debora S. Alves-de-Oliveira^a, Aline M.N.L.G. Bloise^a, Laura M.L. Silva^a,
Reginaldo L. Rocha-Junior^a, Nelson C. Lima-Júnior^a, Luiza G.S. Menezes^a,
Elionay G.S. Silva^a, Yohanna De Oliveira^b, Almir G. Wanderley^c, José L. de-
Brito-Alves^b, Viviane O.N. Souza^a, João H. Costa-Silva^{a,*}

^a Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Department of Physical Education and Sport Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, 55608-680, Brazil

^b Department of Nutrition, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB, 58051-900, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, 50760-901, Brazil

Received 4 February 2021; received in revised form 8 September 2021; accepted 9 September 2021

Handling Editor: A. Siani

Available online 28 September 2021

KEYWORDS

Phenotypic plasticity;
High-fat diet; Alpha-
linolenic; Transmissible
chronic diseases

Abstract Background and aims: High-fat diet (HFD) intake during gestation and lactation has been associated with an increased risk of developing cardiometabolic disorders in adult offspring. We investigated whether metabolic alterations resulting from the maternal consumption of HFD are prevented by the addition of omega-3 ($\omega 3$) in the diet.

Methods and results: Wistar rat dams were fed a control (C: 19% of lipids and $\omega 6:\omega 3$ Z 12), HF (HF: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ Z 21), or HF enriched with $\omega 3$ (HFu3: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ Z 9) diet during gestation and lactation, and their offspring food consumption, murinometric measurements, serum levels of metabolic markers, insulin and pyruvate sensitivity tests were evaluated. The maternal HFD increased body weight at birth, dyslipidemia, and elevated fasting glucose levels in the HF group. The enrichment of $\omega 3$ in the maternal HFD led to lower birth weight and improved lipid, glycemic, and transaminase biochemical profile of the HFu3 group until the beginning of adulthood. However, at later adulthood of the offspring, there was no improvement in these biochemical parameters.

Conclusion: Our findings show the maternal consumption of high-fat $\omega 3$ -rich diet is able to attenuate or prevent metabolic disruption elicited by HFD in offspring until 90 days old, but not in the long term, as observed at 300 days old of the offspring.

© 2021 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Italian Diabetes Society, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University.

Introduction

The advent of nutritional transition, markedly characterized by increased consumption of high-fat and high-sugar diet associated with sedentary lifestyle, has been linked to increased prevalence of non-communicable diseases such as type 2 diabetes mellitus, obesity, and arterial hypertension in worldwide [1e3]. According to the World Health

* Corresponding author. Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, CAV, UFPE, Rua Alta do Reservatório, S/N, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, CEP: 55608-680, Brazil. Fax: +55 81 31144101.

E-mail address: joao.hcsilva@ufpe.br (J.H. Costa-Silva).

Organization, more than 1.9 billion adults had overweight and approximately 650 million were obese in the year 2016. In addition, approximately 41 million children under 5 years of age and 340 million children and adolescents (5e19 years old) had overweight or obesity, respectively [4]. It is found that a major number of obese subjects are resistant to insulin [5] and that obesity is associated with low-grade systemic inflammation [6], with the immune system related in the development of insulin resistance [7].

The excessive consumption of high-fat diet (HFD) rich in saturated fatty acid during pregnancy and/or lactation has been described as an important risk factor for the development of metabolic disorders, such as insulin resistance, dyslipidemias, and cardiorespiratory dysfunction in offspring later in life [8]. These findings suggest that nutritional strategies during pregnancy and breastfeeding periods could be considered as an important intervention window to prevent and reduce the risk of maternal lipid disturbances, thus protecting the offspring against the metabolic disorders later in life.

The consumption of diets enriched with $\omega 3$ during pregnancy and lactation was associated with reduced adiposity, decreased adipocyte size, and decreased serum leptin levels in rat offspring [9]. $\omega 3$ fatty acids have been shown anti-inflammatory properties, for example, via the suppression of the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor kappa B and activation of the anti-inflammatory transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ [10], having a positive effect in chronic non-communicable diseases. Moreover, they significantly decrease the appearance of metabolic and cardiovascular disease risk factors [11].

This survey focuses on the effects of pre- and early-postnatal exposure to altered dietary fat content and fatty acid ratio on rat offspring that have been weaned onto a standard laboratory diet. Therefore, rat offspring are no longer directly exposed to the maternal dietary intervention postweaning. Thus, we hypothesized that $\omega 3$ exposure to the rat offspring in a maternal HFD may improve growth and metabolic parameters, preventing the appearance of metabolic and cardiovascular diseases. The aim of this study was to investigate the effects of enrichment of $\omega 3$ in maternal HFD during gestation and lactation over murine measurements, food consumption, and biochemical profile in the rat offspring.

Methods

Animals and experimental groups

Virgin female albino rats (n Z 30) from the Wistar strain (*Rattus norvegicus*) were obtained from the experimental animal room of the Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco, Brazil. At 85e90 days old (-d-old) and body weight comprised between 220 and 260 g, the rats were placed for mating in the ratio of 1:3 (male:female). The determination of pregnancy was performed from the observation of the presence of spermatozoa in the vaginal smear, defining the 1st day of

pregnancy. From the 1st day of gestation until the 21st day of lactation, the progenitor rats were separated and placed in individual cages and randomly allocated according to their diets: C (control; n Z 10), HF (high in saturated fatty acids content; n Z 10), and HFu3 (high in saturated fatty acids content enriched with $\omega 3$; n Z 10) with chow and water ad libitum. After weaning, the male offspring were fed with standard chow for rats (Presença, Neovia Group, São Paulo, Brazil) and water ad libitum and they were separated into three groups according to their dams' diets: C (n Z 35), HF (n Z 27), and HFu3 (n Z 27) groups. Temperature and humidity were maintained within the range of 22e24 °C and 55e65%, respectively, with 12 h light and dark cycle (lights on from 06:00 to 18:00 h). Offspring from each dam were reduced to 8 male rats per litter. In cases where the litter was composed of less than 8 male rats, female rats were used to standardize litter size until weaning.

All procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, MCTI - Brazil) and has been approved by the institutional committee of the Federal University of Pernambuco, Brazil (protocol 23076.049500/2016-37).

Nutritional manipulation

The C group received a standard diet in accordance with AIN-93G [12] with 19% of the energy coming from the fat, 20% of the proteins, and 61% of the carbohydrates, with u6: u3 ratio Z 12.66; the HF received a HFD, which 33% energy from fat, 20% energy from protein and 47% energy from carbohydrate, with 6:u3 ratio Z 21.22; and the HFu3 received a HFD enriched with $\omega 3$, which 33% of the energy coming from the fats, 20% of the proteins, and 47% of the carbohydrates, with u6:u3 ratio Z 9.45. The standard diet contained around 14.6 kJ/g and the HFDs around 18.8 kJ/g. The HFDs had a higher content of saturated fatty acids and the HFD enriched with $\omega 3$ contained less $\omega 6$ (Table 1). After weaning, at 21-d-old, the animals received a commercial standard diet for rats (Presença, Neovia Group, São Paulo, Brazil) ad libitum.

Food consumption of dams and offspring

The water and food intake were evaluated on alternated days at the beginning of the light cycle (at 8 o'clock in the morning), by the difference between the quantity offered and the remnant of the cage. Food consumption was performed throughout the gestation and lactation period [13], and the pups were followed since 22 until 300-d-old. From the evaluation of dietary intake and weight gain by means of body mass measurement, the food efficiency coefficient (FEC) was calculated according to the equation: $FEC = \frac{\text{weight gain in the period}}{\text{food consumption in the same period}}$. The number of calories consumed as well as macronutrients was obtained from the centesimal composition of the diets used.

Table 1 Composition regarding the ingredients and centesimal composition of nutrients from formulated experimental diets.

Ingredient or nutrient/quantity per 100 g of diet	AIN-93 G	High fat diet	Omega-3 high-fat diet with flaxseed oil 3.5%
Corn starch	39.70	15	15
Dextrinized corn starch	13.20	e	e
Wheat flour	e	12	12
Corn flour biscuit	e	7	7
Soy flour	e	6	6
Lard	e	2	2
Butter	e	8	8
Casein (>85%)	20	20	20
Guar gum	e	0.50	0.50
Sucrose	10	18	18
Linseed oil	e	e	3.50
Soybean oil	7	7	3.50
Fiber (cellulose)	5	0.30	0.30
Vitamin mix	1	0.70	0.70
Mineral mix	3.50	2.50	2.50
DL-methionine	0.30	0.25	0.25
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
BTH	0.0014	0.014	0.014
Monosodium glutamate	e	0.20	0.20
Sodium chloride	e	0.30	0.30
Total (g)	100	100	100
kJ	15	19	18
Kcal	3.69	4.52	4.51
Lipids	6.10	17	16.20
Proteins	18.60	22.30	21
Carbohydrates	68.60	53.20	55.90
% Total fat	18.60	33.60	32.30
% Proteins	20.20	19.60	18.20
% Carbohydrates	61	46.80	49.40
% Omega-3	0.27	0.27	0.40
% Omega-6	3.42	5.73	3.78
Omega 6:3 ratio	12.60	21.20	9.40

The AIN-93G diet was adapted as recommended by Reeves et al., 1993; The hyperlipid diet was adapted from the study of Ferro

Cavalcante et al., 2013; the nutritional composition of calories and caloric percentage of fats, proteins, and carbohydrates was determined from the centesimal analysis of the diets carried out in the Laboratory of Bromatology of the Academic Center of Vitória of the Federal University of Pernambuco.

Murinometric measurements of the offspring

They were measured the body weight, naso-anal length, and abdominal circumference in the 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th, and 300th-d-old. After obtaining measurements, Lee index was calculated on the 90th and 300th-d-old from the relation between the cubic root of the body weight and the naso-anal length of the animal [14].

Biochemical analysis of dams and offspring

Dams at 19 days of pregnancy and offspring at 22 (sub-sequent to weaning), 30, 90, and 300-d-old were fasted overnight and then anesthetized with ketamine (80 mg/kg i.p) and xylazine (10 mg/kg i.p.) for collection of blood samples through the rupture of the retro-orbital plexus. After coagulation, the blood was centrifuged at 1372 g for

10 min to obtain the serum, which was transferred to an Eppendorf tube and stored at 20 until the accomplishment of the biochemical analyzes by means of the equipment Automatic Chemistry Analyzer (Pioway Medical Lab Equipment Co., Ltd.). The parameters analyzed were total proteins (TP), albumin (ALB), glycemia (GLY), triglycerides (TRI), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c). Levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-c) were obtained by Friedwald calculations [15].

Glucose tolerance test (GTT), pyruvate tolerance test (PTT), and insulin sensitivity test (IST) of the offspring

At 90 and 300-d-old, the rat offspring were submitted to GTT, PTT, and IST [16,17]. The GTT was performed in rats after a 6-h fast. For GTT, glucose load 20% glucose (2 mg/g by weight) was administered by oral gavage. Blood samples were taken from the tail vein before glucose administration (in duplicates) and, subsequently at T15, T30, T60, and T120 min. The PTT was performed after overnight, the animals were separated into individual cages. Glucose measurement at time T0 was performed in duplicate, and then the sodium pyruvate to 50% (2 g/kg of weight) was injected intraperitoneally, after this the blood glucose was measured (in duplicate) at T15, T30, T45, T60, and T120 min after administration sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, P2256). And the IST was performed after a 6-h fast, the animals were separated into individual cages. Glucose measurement at time T0 was performed in duplicate, and then the insulin (1 mU/g of weight, i.v.) after this the blood glucose was measured (in duplicate) at T15, T30, T45, T60, and T120 min after administration of regular human insulin (HUMULIN R, 100UI/ml).

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ (mean standard error). The analysis of sample normality was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. The comparison among the groups was performed using the one-way ANOVA and two-way ANOVA tests (for GTT, PTT, and IST), followed by the Bonferroni post-test. The trapezoidal rule was used to determine the area under the curve (AUC). The data were analyzed in the Graph Pad Prism program (GraphPad Software Corporation, version 5.0, 2007). The level of significance considered was $p < 0.05$.

Results

Food consumption evaluations of dams (gestation and lactation) and offspring (22e300-d-old)

The food intake during pregnancy was similar among the groups (Table 2), but the consumption of ω 3 was higher in the HFu3 ($p < 0.0007$).

Table 2 Food intake in grams, calories, and macronutrients and coefficient of dietary efficiency of dams fed a control, high-fat diet (HF), or high-fat diet enriched with omega-3-rich (HFu3) during gestation and lactation.

Variables	Group					
	C		HF		HFu3	
Gestation (1 day)						
Consumption (g)	14	1	13	1	10.1	0.8
Calories (Kcal)	52	5	59	4	46	4
Carbohydrates (g)	8.4	0.8	6.9	0.5	5.6	0.4*
Protein (g)	2.5	0.2	2.9	0.2	2.1	0.1
Lipids (g)	0.9	0.1	2.2	0.1*	1.6	0.1*
Omega-3 (g)	0.037	0.001	0.035	0.001	0.040	0.001*
1st week of lactation (7 days)						
Consumption (g)	162	13	166	18	181	21
Calories (Kcal)	599	48	753	84	819	95
Carbohydrates (g)	96	7	88	10	101	11
Protein (g)	28	2	37	4	38	4
Lipids (g)	11	1	28	3*	29	3*
Omega-3 (g)	0.43	0.01	0.44	0.02	0.72	0.04*
2nd week of lactation (14 days)						
Consumption (g)	215	31	265	17	213	14
Calories (Kcal)	798	115	1201	78	961	66
Carbohydrates (g)	127	18	141	9	119	8
Protein (g)	38	5	59	4*	44	3
Lipids (g)	14	2	45	3*	34	2*
Omega-3 (g)	0.58	0.03	0.71	0.02	0.85	0.03*
3rd week of lactation (21 days)						
Consumption (g)	281	72	291	31	265	64
Calories (Kcal)	1089	217	1319	140	1198	288
Carbohydrates (g)	166	42	155	16	148	35
Protein (g)	50	12	65	7	55	13
Lipids (g)	19	5	49	5*	43	10*
Omega-3 (g)	0.75	0.06	0.78	0.03	1.00	0.14*

The rats were fed during gestation and lactation to control diet (19% lipids) or high content of saturated fatty acids diet, HF (33% lipids) or high content of saturated fatty acids enriched with omega-3, HFu3 (3.5% flaxseed oil), according to the experimental group.

Values were expressed as mean $\pm$ se. There was no statistical difference after the application of one-way ANOVA and Bonferroni post-test (N 3) or Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test when values of the variables did not

*p < 0.05 vs. control; #p < 0.05 vs. HF.

In assessing consumption during lactation (Table 2), we observed that in the first week there was no significant difference among groups regarding consumption in grams, carbohydrates, and proteins. The rats that received HF and HFu3 had higher consumption of lipids (p > 0.005), and HFu3 consumed more ω 3 (p > 0.0002). In the second week of lactation, dams submitted to the HF diet had higher protein intake than the control group (p > 0.03). However, the food composition of the diets shows that the amount of protein is higher in HFDs due to the addition of ingredients that are sources of vegetable protein (Table 1). In this week, there was also an increase in the consumption of lipids in the HF and HFu3 compared to the C (p > 0.0004). HFu3 also consumed more ω 3 (p > 0.0002). No difference was observed over food intake in grams, calories, and carbohydrates among the groups. In the third week, the rats that received HF and HFu3 had higher consumption of lipids (p > 0.04), and HFu3 consumed more ω 3 (p > 0.02). There

was no difference in consumption in grams, calories, and others nutrients among groups.

Food consumption also was verified in the offspring at 22 to 30, 30 to 60, 60 to 90, and 90 to 300-d-old, obtaining the FEC in the periods evaluated (Table 3). From 22 to 30 days, the HF had alower intake of grams, calories, and macronutrients when compared to the C. There was no difference among the groups in the FEC value. From 30 to 60 days, no difference in consumption was observed among the groups, however, the HFu3 presented FEC values higher than the C (p < 0.05), with no difference in HF. At age 60 to 90 and 90 to 300 days, no differences were found in the consumption and FEC values among the groups.

Table 3 Food intake in grams, calories, and macronutrients and coefficient of dietary efficiency of offspring of rats subjected to the control (C), high-fat diet (HF), and high-fat diet enriched with omega-3-rich (HFu3) after lactation.

Period/nutrient	Group					
	C		HF		HFu3	
22 to 30-d-old						
Consumption (g)	110	1	100	2*	106	1
Calories (Kcal)	380	4	346	6*	367	3
Proteins (g)	28.0	0.3	25.5	0.4*	27.1	0.6
Carbohydrates (g)	60.3	0.7	55.0	0.9*	58.2	0.5
Food efficiency	0.440	0.009	0.46	0.01	0.47	0.01
Consumption (FEC)						
30 to 60-d-old						
Consumption (g)	727	9	735	17	741	7
Calories (Kcal)	2503	33	2528	58	2550	24
Proteins (g)	184	2	186	4	191	1
Carbohydrates (g)	397	5	401	9	404	3
Food efficiency	0.250	0.009	0.270	0.006	0.290	0.009*
Consumption (FEC)						
60 to 90-d-old						
Consumption (g)	618	30	597	14	615	8
Calories (Kcal)	2128	105	2056	48	2115	27
Proteins (g)	157	7	151	3	156	2
Carbohydrates (g)	337	16	326	7	335	4
Food efficiency	0.107	0.008	0.100	0.01	0.089	0.007
Consumption (FEC)						
90 to 300-d-old						
Consumption (g)	10,218	5	8259	2*	10,611	5 [#]
Calories (Kcal)	35,149	2	28,410	1*	36,501	2
Proteins (g)	740.0	0.3	607.1	0.2	780.0	0.3
Carbohydrates (g)	1609.2	0.5	1300.3	0.3	1671.2	0.4
Food efficiency	0.12	0.01	0.11	0.01	0.12	0.01
Consumption (FEC)						

The rats were submitted during gestation to a control diet (19% lipids) or with a high content of saturated fatty acids, HF, with 33% lipids or with a high content of saturated fatty acids enriched with omega-3 with 3.5% flaxseed oil, HFu3, according to the experimental group. Values were expressed as mean $\pm$ se. There was no statistical difference after the application of one-way ANOVA and Bonferroni post-test (N 12 to 17) or Kruskal-Wallis Test and Dunn's post-test when values of the variables did not present normal distribution. *p < 0.05 vs. control; #p < 0.05 vs. HF.

Evaluation of murinometric measurements of the offspring

The HF had higher body weight at 1-d-old when compared to the C and HFu3 (Table 4). At the 7-d-old ($p < 0.0001$) and 14-d-old ($p < 0.0001$), the HF and HFu3 presented higher body weight. At 21-d-old ($p \geq 0.002$), the HFu3 showed higher body weight when compared to the other groups. At 30, 90, and 300-d-old, no difference was found among the groups.

Both HF and HFu3 presented increased abdominal circumference at the 1-d-old ($p \geq 0.002$) when compared to the C. At 7-d-old ($p \geq 0.005$) and 14-d-old

($p \geq 0.0009$), only the HF showed increased circumference. At 21-d-old, no difference was found among the groups. However, at 30-d-old ($p \geq 0.004$), the HF showed increased abdominal circumference when compared to the other groups. At 90 and 300-d-old, no difference was found among the groups.

The HF showed increased naso-anal length in relation to the C and HFu3 at 1-d-old ($p \geq 0.004$) and 7-d-old ($p < 0.0001$). At 14-d-old, no difference was found among the groups. At 21-d-old ($p < 0.0001$), both HF and HFu3 were higher in relation to C. However, the HF was larger at 30-d-old ($p < 0.0001$) when compared to the other groups. At 90 and 300-d-old, the animals showed similar body growth.

As for Lee's index at 90 and 300-d-old, no difference was found among the groups.

Biochemical assessment in dams at 19 days of pregnancy

Serum levels of TP, ALB, GLY, TRI, CT, VLDL-c, ALT, and AST were similar among the groups at 19 days of gestation (Table 5). However, HF dams displayed increased serum levels of TC when compared with C and HFu3 dams (Table 5).

Biochemical assessment in male offspring

At 22-d-old (Table 5), no differences were found in serum levels of ALB, TP, HDL-c, LDL-c, and AST among the groups. In relation to GLY, only the HF presented higher levels ($p \geq 0.02$) when compared to the C. The HF also had higher serum levels of TC ($p \geq 0.003$), ALT ($p \geq 0.001$), and lower levels relative to the ratio AST/ALT ($p \geq 0.004$) when compared to the other groups. Already the HFu3 presented lower levels of TRI ($p \geq 0.02$) and VLDL-c ($p \geq 0.01$) when compared to the C.

At 30-d-old (Table 5), differences were found only in the serum levels of LDL-c, with the HF showing higher levels ($p \geq 0.001$) when compared to the C.

At 90-d-old (Table 5), no differences were found in serum levels of ALB, TP, HDL-c, LDL-c, and ALT among the groups. In relation to GLY, the HF presented higher levels ($p < 0.0001$) when compared to the other groups. The HF also presented higher serum levels of TC ($p \geq 0.01$), TRI ($p \geq 0.02$), and VLDL-c ($p \geq 0.02$) when compared to the C. Already the HFu3 presented lower levels of AST ($p \geq 0.0007$) and AST/ALT ratio ($p \geq 0.0002$) when compared to the C and HF.

At 300-d-old (Table 5), no differences were found in serum levels of GLY, TP, HDL-c, LDL-c, and ALT among the groups. In relation to ALB, the HF presented higher levels ($p \geq 0.01$) when compared to the C. Both HF and HFu3 presented higher serum levels of TC ($p \geq 0.008$), TRI ($p \geq 0.0002$), and VLDL-c ($p \geq 0.002$) when compared to the C. Already both HF and HFu3 presented lower levels of AST ($p \geq 0.0001$) and AST/ALT ratio ($p \geq 0.0001$) when compared to the C.

Table 4 Murinometric parameters of rat offspring whose dams were fed a control (C), high-fat diet (HF), or high-fat diet enriched with omega-3-rich (HFu3) diets during gestation and lactation.

Days old/Variables	Group					
	C		HF		HFu3	
1-d-old						
Body Weight (g)	5.9	0.1	7.1	0.1*	7.2	0.1 [#]
Abdominal circumference (cm)	4.3	0.1	4.5	0.1*	4.3	0.1*
Naso-anal-length (cm)	4.9	0.1	5.2	0.1*	5.4	0.1 [#]
7-d-old						
Body Weight (g)	18.7	0.2	20.3	0.1*	19.3	0.5*
Abdominal circumference (cm)	6.3	0.1	6.7	0.1*	6.5	0.1
Naso-anal-length (cm)	7.2	0.1	7.8	0.1*	7.2	0.1 [#]
14-d-old						
Body Weight (g)	32.4	0.3	34.6	0.5*	36.6	0.6*
Abdominal circumference (cm)	8.1	0.1	8.3	0.1*	8.3	0.1
Naso-anal-length (cm)	8.6	0.1	8.9	0.1	8.5	0.1
21-d-old						
Body Weight (g)	54.9	0.6	54.6	0.8	57.7	0.7**
Abdominal circumference (cm)	10.1	0.1	9.6	0.1	9.5	0.1
Naso-anal-length (cm)	10.3	0.1	11.6	0.1*	12.1	0.2*
30-d-old						
Body Weight (g)	93	2	97	2	100	2
Abdominal circumference (cm)	12.5	0.1	12.4	0.2*	11.8	0.2 [#]
Naso-anal-length (cm)	13.4	0.1	15.8	0.3*	14.1	0.1 [#]
90-d-old						
Body Weight (g)	370	6	358	4.3	380	7
Abdominal circumference (cm)	19.9	0.3	18.1	0.3	20.1	0.3
Naso-anal-length (cm)	22.6	0.5	22.3	0.4	22.6	0.4
Lee index (g/cm ³)	0.300		0.300		0.300	
	0.007		0.005		0.005	
300-d-old						
Body Weight (g)	472	14	498	16	511	15
Abdominal circumference (cm)	20.9	0.5	21.1	0.4	21.0	0.4
Naso-anal-length (cm)	24.5	1	26.2	0.3	25.6	1.0
Lee index (g/cm ³)	0.30	0.01	0.30	0.01	0.30	0.02

The offspring rats were separated into three groups according to their dams' diets during gestation and lactation: control diet, C group, (19% lipids) or high-fat diet, HF group, with 33% lipids, or high-fat diet omega-3-rich, HFu3 group, with 3.5% flaxseed oil.

Values were expressed as mean se. There was no statistical difference after the application of one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($N \geq 7 \times 35$). * $p < 0.05$ vs. C; $\#p < 0.05$ vs. HF.

Table 5 Fasting biochemical profile at 19 days of pregnant rats fed a control (C), high-fat diet (HF), or high-fat diet enriched with omega-3-rich (HFu3) diets during gestation and lactation and their offspring at 22, 30, 90, and 300-d-old.

Age/variables	Group					
	C		HF		HFu3	
19 days of gestation						
Albumin (g/dL)	4.8	0.1	4.7	0.1	4.5	0.1
Total protein (g/dL)	6.5	0.2	6.2	0.1	5.9	0.1
Triglycerides (mg/dL)	145	21	121	17	119	17
Total cholesterol (mg/dL)	73	1	90	3*	34	4 [#]
HDL-c (mg/dL)	9	1	9	2	16	3
LDL-c (mg/dL)	22	11	56	7*	23	7
VLDL-c (mg/dL)	34	6	24	3	23	3
Glucose (mg/dL)	120	4	129	6	109	10
ALT (U/L)	49	19	54	10	37	6
AST (U/L)	95	24	131	8	97	12
AST/ALT	2.0	0.3	3.4	0.5	2.6	0.7
22-d-old						
Albumin (g/dL)	4.01	0.02	4.15	0.01	4.11	0.02
Total protein (g/dL)	5.38	0.02	5.74	0.03	5.60	0.03
Triglycerides (mg/dL)	138	6	124	6	116	4*
Total cholesterol (mg/dL)	116	1	126	3*	117	2 [#]
HDL-c (mg/dL)	23	3	28	3	31	4
LDL-c (mg/dL)	51	7	63	9	61	6
VLDL-c (mg/dL)	28	1	24	1	23.5	0.8*
Glucose (mg/dL)	108	3	119	3*	117	1
ALT (U/L)	17.2	0.7	22	1*	17.3	0.6 [#]
AST (U/L)	152	4	137	3	142	4
AST/ALT	8.5	0.7	5.9	0.8*	8.2	0.4 [#]
30-d-old						
Albumin (g/dL)	4.27	0.02	4.22	0.03	4.29	0.03
Total protein (g/dL)	5.32	0.03	5.36	0.03	5.42	0.05
Triglycerides (mg/dL)	162	11	151	10	183	15
Total cholesterol (mg/dL)	120	2	123	2	125	3
HDL-c (mg/dL)	26	1	27	3	31	2
LDL-c (mg/dL)	64	2	78	4*	60	2
VLDL (mg/dL)	28	2	22	2	24	3
Glucose (mg/dL)	90	5	88	3	100	4
ALT (U/L)	30	1	34	2	38	2
AST (U/L)	149	4	143	6	141.20	0.04
AST/ALT	4.9	0.3	4.2	0.6	3.7	0.4
90-d-old						
Albumin (g/dL)	4.33	0.03	4.36	0.04	4.28	0.04
Total protein (g/dL)	5.38	0.04	5.7	0.1	5.60	0.09
Triglycerides (mg/dL)	97	1	110	1*	108	4
Total cholesterol (mg/dL)	80	1	87	1*	82	1
HDL-c (mg/dL)	13.0	0.5	12.1	1	10.0	0.7
LDL-c (mg/dL)	47	1	52	3	46	3
VLDL (mg/dL)	19.1	0.3	22	1*	21.5	0.8
Glucose (mg/dL)	120	3	142	3*	126	3 [#]
ALT (U/L)	44	1	44	1	45	1
AST (U/L)	143	4	134	6	115	3* [#]
AST/ALT	3.8	0.1	3.7	0.1	2.85	0.08* [#]
300-d-old						
Albumin (g/dL)	4.58	0.06	4.81	0.04*	4.66	0.04
Total protein (g/dL)	6.22	0.04	6.38	0.04	6.32	0.04
Triglycerides (mg/dL)	59	3	83	4*	86	5*
Total cholesterol (mg/dL)	78	3	87	2*	88	2*
HDL-c (mg/dL)	52	6	54	6	55	4
LDL-c (mg/dL)	25	5	21	4	25	4
VLDL (mg/dL)	12.2	0.7	16.4	0.8*	16	1*
Glucose (mg/dL)	126	10	135	7	135	4

Table 5 (continued)

Age/variables	Group					
	C		HF		HFu3	
ALT (U/L)	55	3	53	7	62	4
AST (U/L)	175	7	139	9*	115	5*
AST/ALT	3.2	0.1	2.4	0.2*	1.9	0.1*

The pregnant rats and their offspring were separated into three groups according to the dams' diets during gestation and lactation: control diet, C group, (19% lipids) or high-fat diet, HF group, with 33% lipids, or with high-fat diet omega-3-rich, HFu3 group, with 3.5% flaxseed oil. Values were expressed as mean $\pm$ se. There was no statistical difference after the application of one-way ANOVA and Bonferroni post-test (N Z 19e35). *p < 0.05 vs. C; #p < 0.05 vs. HF.

GTT, PTT, and IST of the offspring at 90 and 300-d-old

In the GTT at 90 (Fig. 1a) and 300 (Fig. 1c)-d-old, no difference was found in glycemia levels among the groups at T0, prior to glucose administration and in the T15, T30, T60, and T120 min after administration of glucose, even as no difference was found in the AUC for glucose at 90 (Fig. 1b) and 300 (Fig. 1d)-d-old among the groups.

In the PTT at 90 (Fig. 2a) and 300 (Fig. 2c)-d-old, no difference was found in glycemia levels among the groups at T0, prior to pyruvate administration and in the T15, T30, T45, T60, and T120 min after administration of pyruvate, even as no difference was found in the AUC for glucose at 90 (Fig. 2b) and 300 (Fig. 2d)-d-old among the groups.

Regarding the IST at 90 (Fig. 3a) and 300 (Fig. 3c)-d-old, no difference was found in glycemia among the groups at T0, before administration of insulin and in the T15, T30, T45, T60, and T120 min after administration of insulin, even as no difference was found in the AUC for glucose at 90 (Fig. 3b) and 300 (Fig. 3d)-d-old among the groups.

Discussion

In this study, the rat offspring metabolic parameters were evaluated in early life and adulthood after perinatal exposure to maternal control diet vs. high saturated fat diet vs. High-fat ω 3-rich diet. We demonstrated that young offspring exposed to maternal high-fat ω 3-rich diet showed some mitigation of adverse metabolic consequences, however, there were no differences seen in later adulthood.

Daily maternal consumption in grams during gestation did not differ among the groups in our survey. Animals often show reduction in feed intake when they receive a diet with higher caloric density under ad libitum regime, as they tend to consume a constant amount of energy [18]. The composition of HFDs have lower carbohydrate content and higher lipid content compared to AIN-93G, which contributed to the reduction in carbohydrate consumption in dams fed a HFD enriched with ω 3 and higher consumption of lipids between two groups in relation to the control group, according to Ferro Cavalcante et al. (2013) [28] who also showed higher consumption of lipids in the last week of pregnancy to the detriment of less

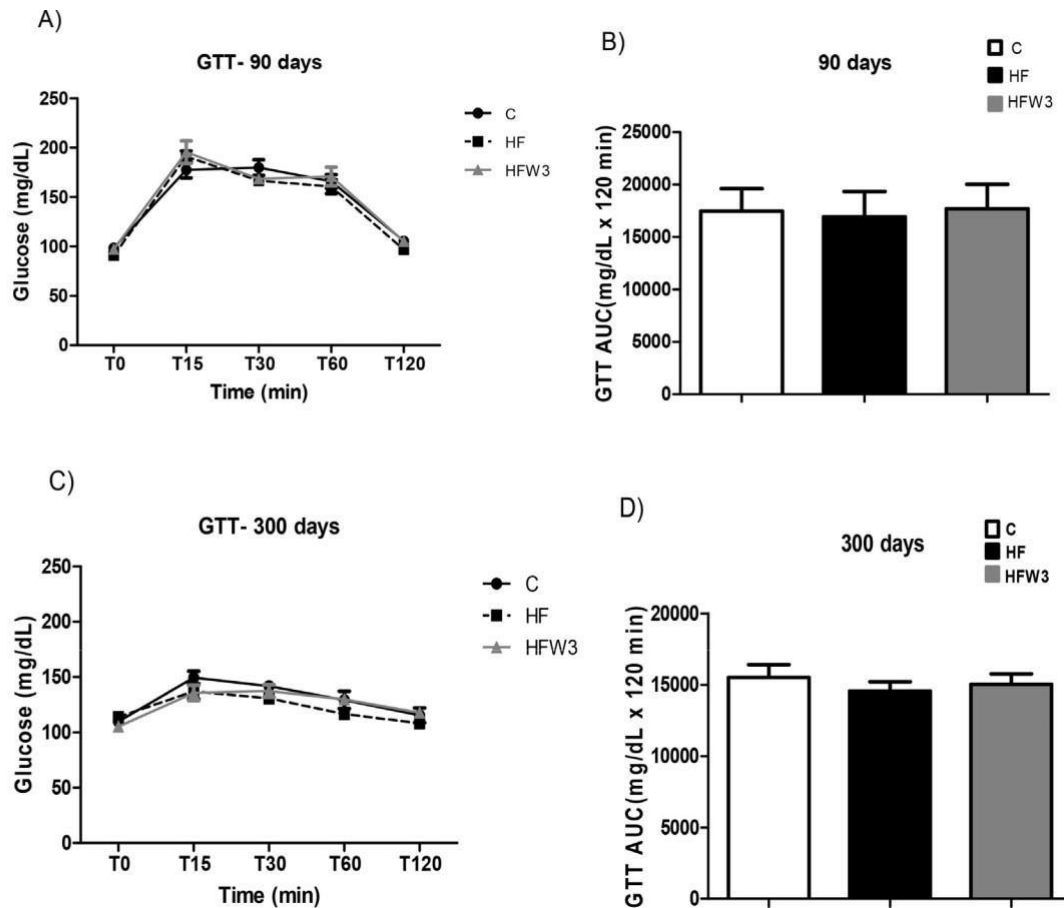


Figure 1 Glucose tolerance test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 33% lipids) or high content lipid in SFA and enriched with omega-3 (HFW3, 33% lipids), according to the experimental group. Glucose was measured at time 0 before glucose administration (after 6 h of fasting) at time 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration (panels A and C). The area under the curve (AUC) for glucose were calculated by using the trapezoidal rule (panels B and D). The black line or bar represents the control group, the dashed line or black bar the HF group and the gray line or bar the HFW3 group. The values were expressed as mean SEM, after the two-way ANOVA test (panels A and C) or one-way ANOVA test (panels B and D) followed by Bonferroni post-test. ($p < 0.05$ vs. Control, $\#p < 0.05$ vs. HF; $n \geq 10$ per group).

consumption of carbohydrates in pregnant rats fed a Westernized diet. In the assessment of offspring dietary intake, there was no significant difference among the groups, although lower food intake was observed in HF offspring. It is reported that animals receiving HFD during pregnancy show lower food intake compared to those receiving normolipidemic diet. Carvalho et al.

[19] found a 30% reduction in the consumption of HFD with higher saturated fat content when compared to the standard diet. Increasing the caloric density of the diet reduces food intake, because in the ad libitum diet animals consume a constant amount of energy [20].

In agreement with an early study, the HF exhibited increased body weight when compared to the C [21]. Similarly, the HFW3 had increased weight than the C in most of the ages evaluated. Taken together, these findings suggest that increased maternal ω 3 consumption during pregnancy was not effective to reduce body weight in early life of the offspring of dams fed with HFD. This may be due to the overwhelming effect of the high saturated fatty acids

present in the HFDs, which it was reported to be associated with increased body mass in the offspring [8]. According to a systematic review carried with animal studies, it is not clear whether increased ω 3 supply during the perinatal period influences body fat mass in the offspring yet [22]. At early life, the HF group showed a larger circumference than the C. It has been proposed that maternal HFD consumption leads to increased visceral fat in offspring [23]. In all ages evaluated, the HFW3 showed similar circumference of the control. It has also been shown in animals that maternal supplementation of DHA during pregnancy and lactation reduces visceral and sub-cutaneous adipose tissue, which is associated with the risk for the development of obesity [24].

Dams fed a HFD and their offspring exhibit hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Our data corroborate with other studies that used HFD during pregnancy and lactation and found metabolic changes such as hypertriglyceridemia, increased levels of TC, and LDL-c [25]. Moreover, elevated cholesterol and triglycerides are

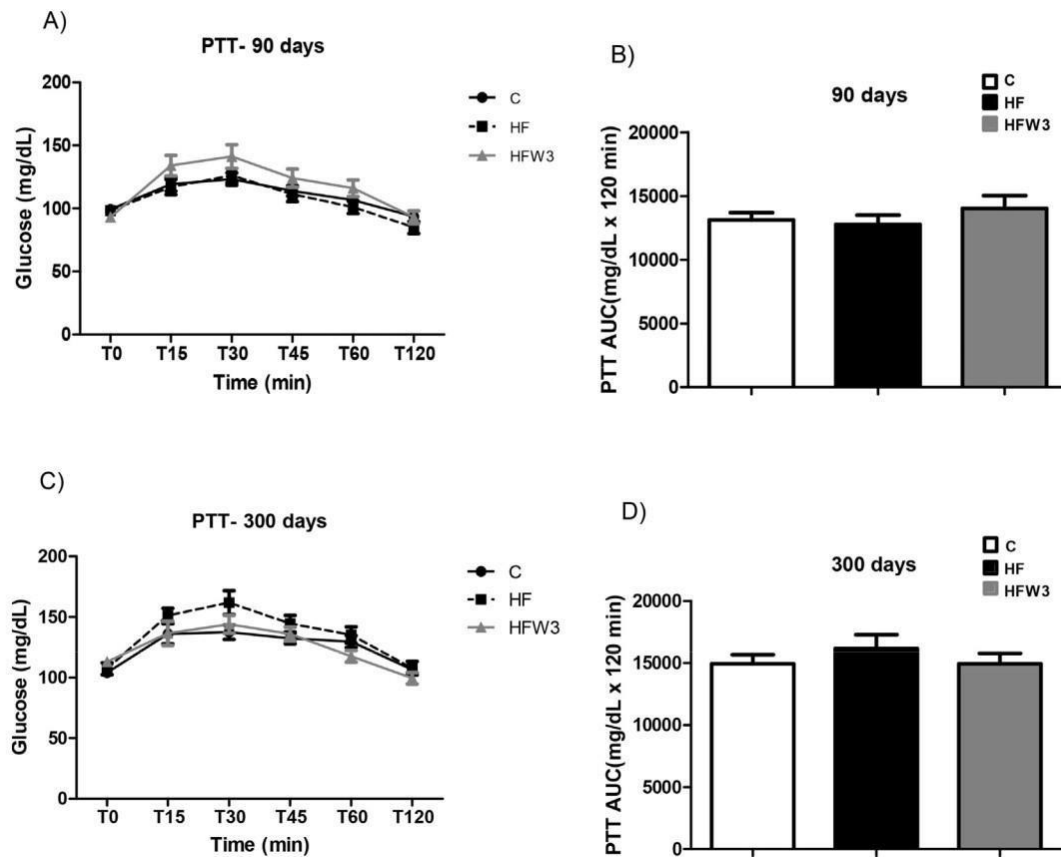


Figure 2 Pyruvate tolerance test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 33% lipids) or high content lipid in SFA and enriched with omega-3 (HFW3, 33% lipids), according to the experimental group. Glucose was measured at time 0 before glucose administration (after 12 h of fasting) at time 15, 30, 45, 60 and 120 min after pyruvate administration (panels A and C). The area under the curve (AUC) for glucose were calculated by using the trapezoidal rule (panels B and D). The black line or bar represents the control group, the dashed line or black bar the HF group and the gray line or bar the HFW3 group. The values were expressed as mean SEM, after the two-Way ANOVA test (panels A and C) or one-way ANOVA test (panels B and D) followed by Bonferroni post-test. ($p < 0.05$ vs. Control, $\#p < 0.05$ vs. HF; $n = 10$ per group).

risk factors for endothelial dysfunction [26] and athero-sclerosis [27]. Our study found that HFW3 offspring showed reduction in the TRI levels. It has been demonstrated that $\omega 3$ can improve lipid profile by lowering TRI levels, TC, and LDL-c fraction [22]. Several epidemiological, experimental, and clinical studies indicate that $\omega 3$ is able to decrease the risk of cardiovascular disease, in part, by improving vascular function and preventing many steps of the atherosclerotic process. Three $\omega 3$ polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been found to show vasoprotective action; eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and alpha-linolenic acid (ALA). In blood vessels, $\omega 3$ PUFA decrease arterial plaque buildup [28], increase anti-inflammatory properties [29], improve endothelial-dependent vasodilation [30], decreased blood pressure [31], promote vasodilation through relaxation of smooth muscle cells [32], exert antioxidant, anti-inflammatory, and antithrombotic actions [33,34], delay development of plaques and increase their stability [35], and decrease wall stiffening [36].

Fatty acids $\omega 3$ may contribute to reduce systemic chronic inflammation, which is present in

hypercholesterolemia, diabetes, hypertension, and obesity, both by reducing pro-inflammatory stimuli and by stimulating the resolution of inflammation. These mechanisms require specific enzymatic metabolism of fatty acids in bioactive lipid mediators. It is known that the substrate exchange for the formation of cyclooxygenase-dependent thromboxane (TX) from fatty acid $\omega 6$ arachidonic acid (AA) to fatty acid $\omega 3$ EPA will alter the enzymatic product of the prothrombotic TXA₂ for the inactive TXA₃ metabolite [37]. In addition, leukotrienes (another group of lipid mediators) exhibit less pro-inflammatory activity when derived from lipoxygenase metabolism using EPA instead of AA as a substrate. Since leukotrienes transduce pro-atherosclerotic signaling [38] and leukotriene receptor antagonism reduces cardiovascular risk [39], $\omega 3$ has the potential to decrease an important pro-inflammatory pathway in the vascular wall [40].

The consumption of diet rich in saturated fats increases the expression of genes that signal lipogenic pathways in the liver [41], besides inducing and/or aggravating liver injury with subsequent increase in plasma levels of transaminases [42,43], which may explain the high levels

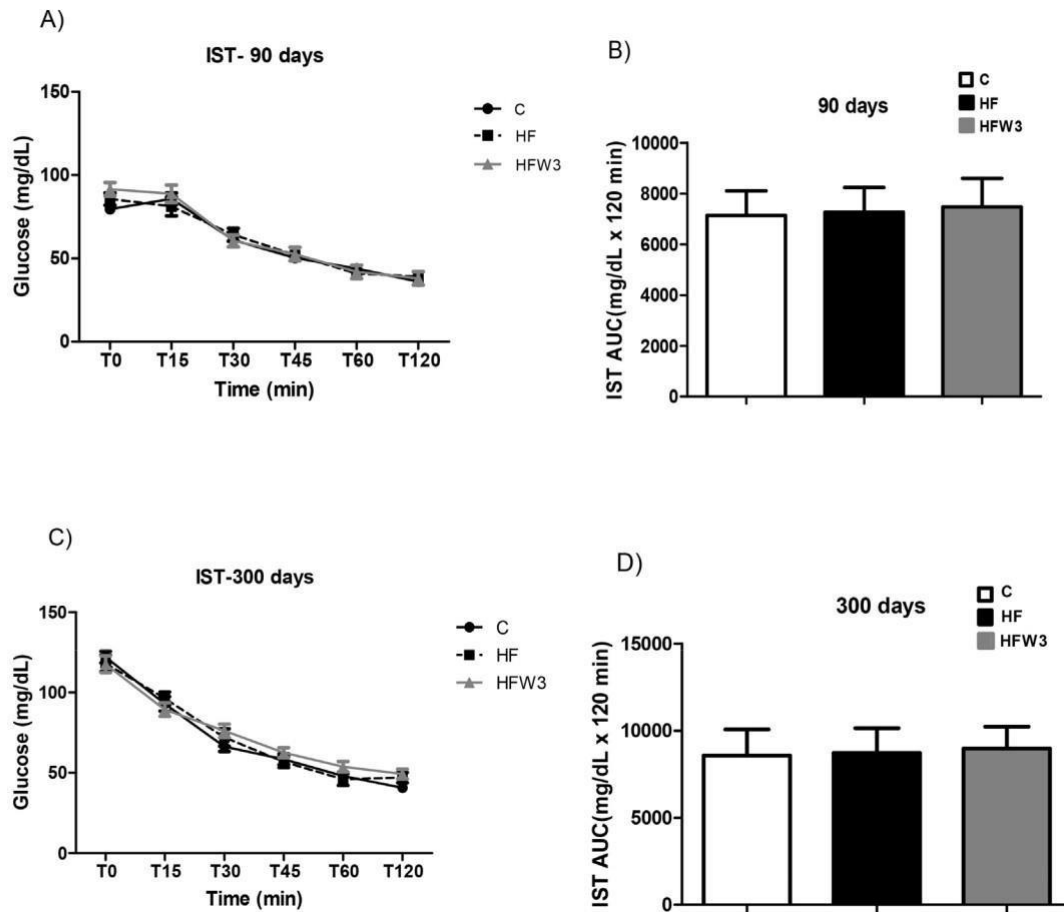


Figure 3 Insulin sensitivity test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 33% lipids) or high content lipid in SFA and enriched with omega-3 (HFW3, 33% lipids), according to the experimental group. Glucose was measured at time 0 before glucose administration (after 6 h of fasting) at time 15, 30, 45, 60 and 120 min after insulin administration (panels A and C). The area under the curve (AUC) for glucose were calculated by using the trapezoidal rule (panels B and D). The black line or bar represents the control group, the dashed line or black bar the HF group and the gray line or bar the HFW3 group. The values were expressed as mean SEM, after the two-Way ANOVA test (panels A and C) or one-way ANOVA test (panels B and D) followed by Bonferroni post-test. ($p < 0.05$ vs. Control, $\#p < 0.05$ vs. HF; $n \geq 10$ per group).

of ALT in the HF at 22-d-old. In contrast, ω 3 ingestion reduces levels of transaminases, mainly ALT in individuals with non-alcoholic fatty liver disease [44,45].

In this study, the HF presented higher fasting blood glucose levels. In addition to its lipid-lowering role, ω 3 intake is associated with increased insulin sensitivity, reduced with age, as observed in rat offspring [46]. Studies have found in the adult rat offspring of dams who received a diet rich in ω 3 increase in the number of pancreatic islets, without altering the volume of the pancreas [47]. The progression of diabetes mellitus goes through intermediate stages, from altered fasting glycemia and glucose intolerance, and these stages are due to insulin resistance associated with pancreatic β -cell dysfunction. Although we found no difference in GTT, PTT, and IST tests, our study verified a tendency to develop diabetes mellitus in the HF. Since fasting hyperglycemia in these animals may provide evidence of β -cell dysfunction [48], it is possible that in

a more advanced age impaired tolerance to glucose, pyruvate, and insulin sensitivity can be found in these animals.

In conclusion, we demonstrated that improving the quality of HFD does not overcome the adverse consequences of overnutrition from maternal HFD; however, it has been observed that ω 3 exposure to the offspring in a maternal HFD may have some benefits during a short period. This study elucidates that maintaining a low ω 6/ ω 3 ratio could serve as a primary prevention strategy for cardiometabolic diseases, but it should not be the only one when eating a diet rich in saturated fatty acids concomitantly, since it was observed in this survey that ω 3 benefits are short-lived and insufficient to counterprogram the adverse consequences of overnutrition. More studies are needed to evaluate the mechanisms related to metabolic changes elicited by the consumption of maternal HFD, as well as the role of the ω 3 during the perinatal period. A

complete understanding of these mechanisms and the role of $\omega 3$ may lead to the development of therapeutic strategies and government policies to improve public health.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco e PE, Brazil (grant n° PRONEM 0797e4.05/14; IBPG-1478-4.05/16; IBPG-0313-4.05/19) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (grant n° 311386/2019-9).

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

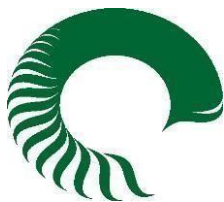
We thank Danilo Augusto Ferreira Fontes for the technical support.

References

- [1] Allison A, Fouladkhah A. Adoptable interventions, human health, and food safety considerations for reducing sodium content of processed food products. *Foods* 2018;7(2). Epub 2018/02/02.
- [2] Batista Filho M, Batista LV. Transição alimentar/nutricional ou mutação antropológica? *Ciencia e Cult* 2010;62:26e30.
- [3] Adair LS, Ng SW, Popkin BM. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* 2012;70(1): 3e21.
- [4] World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016. p. 121. viii p.
- [5] Castro AVB, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014;58(6):600e9.
- [6] Belkina AC, Denis GV. Obesity genes and insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17(5):472e7.
- [7] Castoldi A, Andrade-Oliveira V, Aguiar CF, Amano MT, Lee J, Miyagi MT, et al. Dectin-1 activation exacerbates obesity and insulin resistance in the absence of MyD88. *Cell Rep* 2017;19(11):2272e88.
- [8] Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, do Nascimento CMO, et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem* 2015;26(2):99e111.
- [9] Korotkova M, Gabriellsson B, Lönn M, Hanson L-Å, Strandvik B. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to α -linolenic acid in the maternal diet. *J Lipid Res* 2002;43(10): 1743e9.
- [10] Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Bio-phys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2015;1851(4):469e84.
- [11] Punia S, Sandhu KS, Siroha AK, Dhull SB. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits: A review 2019;10: 100162.
- [12] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939e51. Epub 1993/11/01.
- [13] Nery CdS, Pinheiro IL, Muniz GdS, Vasconcelos DAA, França SPd, Nascimento, editors. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev bras med esporte* 2011;17(1):49e55.
- [14] Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41(1):111e9. Epub 2007/01/20.
- [15] Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2007;88: 2e19.
- [16] Pinel A, Pitois E, Rigaudière J-P, Jouve C, De Saint-Vincent S, Laillet B, et al. EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a Western diet. *J Lipid Res* 2016; 57(8):1382e97.
- [17] Capel F, Chabrier G, Pitois E, Rigaudière JP, Plenier SL, Durand C, et al. Combining citrulline with atorvastatin preserves glucose homeostasis in a murine model of diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 2015;172(20):4996e5008.
- [18] Farias H. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. I Simpósio de Bioterismo da Fiocruz. 2010.
- [19] Carvalho MF, Costa MKMed, Muniz GdS, Castro RMD, Nascimento, editors. Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. *Rev Nutr* 2013;26(2):177e96.
- [20] Llopis M, Sanchez J, Priego T, Palou A, Pico C. Maternal fat supplementation during late pregnancy and lactation influences the development of hepatic steatosis in offspring depending on the fat source. *J Agric Food Chem* 2014;62(7):1590e601.
- [21] Kojima S, Catavero C, Rinaman L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. 2016.
- [22] Waddell BJ, Zulkafli IS, Mark PJ. Postnatal dietary omega-3 fatty acid supplementation rescues glucocorticoid-programmed adiposity, hypertension, and hyperlipidemia in male rat offspring raised on a high-fat diet. *Endocrinology* 2013;154(9): 3110e7.
- [23] Volpato AM, Schultz A, Magalhães-da-Costa E, de Gusmão Correia ML, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology* 2012;96(4):272e84.
- [24] Bagley HN, Wang Y, Campbell MS, Yu X, Lane RH, Joss-Moore LA. Maternal docosahexaenoic acid increases adiponectin and normalizes IUGR-induced changes in rat adipose deposition. *J Obes* 2013;2013:312153. Epub 2013/03/28.
- [25] Vidal-Santos R, Macedo FN, Santana MN, De Melo VU, de Brito Alves JL, Santos MR, et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. *J Dev Orig Health Dis* 2017;8(2):216e25. Epub 2016/12/10.
- [26] Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(1):111e6.
- [27] Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1971;74(1):1e12.
- [28] Renier G, Skamene E, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb: A Journal of Vascular Biology* 1993;13(10):1515e24.
- [29] Calder PC. n 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83(6):1505Se19S.
- [30] Wiest EF, Walsh-Wilcox MT, Walker MK. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect against cigarette smoke-induced oxidative stress and vascular dysfunction. *Toxicol Sci* 2017; 156(1):300e10.
- [31] Ulu A, Lee KSS, Miyabe C, Yang J, Hammock BG, Dong H, et al. An omega-3 epoxide of docosahexaenoic acid lowers blood pressure in angiotensin-II dependent hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;64(1):87.
- [32] Colussi G, Catena C, Novello M, Bertin N, Sechi L. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2017;27(3):191e200.
- [33] Thorlaksdottir A, Skuladottir G, Petursdottir A, Tryggvadottir L, Ogmundsdottir H, Eyfjord J, et al. Positive association between

- plasma antioxidant capacity and n 3 PUFA in red blood cells from women. *Lipids* 2006;41(2):119e25.
- [34] Verveniatis A, Siasos G, Oikonomou E, Tsigkou V, Papageorgiou N, Zoromitidou M, et al. The impact of omega 3 fatty acids in atherosclerosis and arterial stiffness: an overview of their actions. *Curr Pharmaceut Des* 2018;24(17):1865e72.
- [35] Baker EJ, Yusof MH, Yaqoob P, Miles EA, Calder PC. Omega-3 fatty acids and leukocyte-endothelium adhesion: novel anti-atherosclerotic actions. *Mol Aspect Med* 2018;64:169e81.
- [36] The resolution of inflammation through omega-3 fatty acids in atherosclerosis, intimal hyperplasia, and vascular calcification. In: Carracedo M, Artiach G, Arnardottir H, Bäck M, editors. *Seminars in immunopathology*. Springer; 2019.
- [37] Bäck M. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. *Future Science OA* 2017;3(4):FSO236.
- [38] Bäck M, Hansson GK. Leukotriene receptors in atherosclerosis. *Ann Med* 2006;38(7):493e502.
- [39] Ingelsson E, Yin L, Bäck M. Nationwide cohort study of the leukotriene receptor antagonist montelukast and incident or recurrent cardiovascular disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(3):702e707. e2.
- [40] Bäck M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2015;12(4):199.
- [41] Leikin-Frenkel A, Shomonov-Wagner L, Juknat A, Pasmanik-Chor M. Maternal diet enriched with α -linolenic or saturated fatty acids differentially regulates gene expression in the liver of mouse offspring. *Lifestyle Genom* 2015;8(4e6):185e94.
- [42] Tain Y-L, Lin Y-J, Sheen J-M, Yu H-R, Tiao M-M, Chen C-C, et al. High fat diets sex-specifically affect the renal transcriptome and program obesity, kidney injury, and hypertension in the offspring. *Nutrients* 2017;9(4):357.
- [43] Kai M, Miyoshi M, Fujiwara M, Nishiyama Y, Inoue T, Maeshige N, et al. A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. *J Surg Res* 2017;212:22e32.
- [44] He X-X, Wu X-L, Chen R-P, Chen C, Liu X-G, Wu B-J, et al. Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2016;11(10):e0162368. e.
- [45] Yu L, Yuan M, Wang L. The effect of omega-3 unsaturated fatty acid on non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *PaK J Med Sci* 2017;33(4):1022e8.
- [46] Sardinha FLC, Fernandes FS, Tavares do Carmo MG, Herrera E. Sex-dependent nutritional programming: fish oil intake during early pregnancy in rats reduces age-dependent insulin resistance in male, but not female, offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;304(4):R313e20.
- [47] Siemelink M, Verhoef A, Dormans JA, Span PN, Piersma AH. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. *Diabetologia* 2002;45(10):1397e403. Epub 2002/10/16.
- [48] Davies MJ, Raymond NT, Day JL, Hales CN, Burden AC. Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics. *Diabet Med* 2000;17(6):433e40.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil Fones: (55 81)
2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350 www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de novembro de 2017.

Ofício nº 108/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. João Henrique da Costa Silva**

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.041292/2017-17**

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeitos da suplementação de ômega-3 sobre os mecanismos glutamatérgicos e neurais do controle cardiorrespiratório de ratos submetido à dieta hiperlipídica durante gestação e lactação**”, registrada com o nº **23076.041292/2017-17** sob a responsabilidade de **Prof. João Henrique da Costa Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/11/2017 a 10/02/2019
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos/Wistar
Nº de animais	25
Peso/Idade	100g / 30 dias
Sexo	10 machos e 15 fêmeas
Origem	Biotério do CAV/UFPE.


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

Atenciosamente,