

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

ALINE MARIA NUNES DE LIRA GOMES BLOISE

**O ENRIQUECIMENTO DE DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA COM ÔMEGA-3
DIMINUI PREJUÍZOS METABÓLICOS, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
PREVINE A HIPERTENSÃO ARTERIAL PRECOCE NA PROLE DE RATOS**

RECIFE

2023

ALINE MARIA NUNES DE LIRA GOMES BLOISE

**O ENRIQUECIMENTO DE DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA COM ÔMEGA-3
DIMINUI PREJUÍZOS METABÓLICOS, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
PREVINE A HIPERTENSÃO ARTERIAL PRECOCE NA PROLE DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

RECIFE

2023

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

B652e Bloise, Aline Maria Nunes de Lira Gomes.
O enriquecimento de dieta materna hiperlipídica com ômega-3 diminui prejuízos metabólicos, marcadores inflamatórios e previne a hipertensão arterial precoce na prole de ratos / Aline Maria Nunes de Lira Gomes Bloise. – 2023.
160 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, 2023.

Inclui referências, apêndices e anexo.

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

613

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2023-108)

ALINE MARIA NUNES DE LIRA GOMES BLOISE

**O ENRIQUECIMENTO DE DIETA MATERNA HIPERLIPÍDICA COM ÔMEGA-3
DIMINUI PREJUÍZOS METABÓLICOS, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
PREVINE A HIPERTENSÃO ARTERIAL PRECOCE NA PROLE DE RATOS**

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: 28/02/2023

Banca examinadora:

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

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

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Bruno de Melo Carvalho (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o autor da minha vida, sem Ele nada sou e não teria conseguido chegar até aqui.

A minha família, especialmente a minha mãe Mônica e minha avó Iraci, por todo amor, carinho, cuidado, força e compreensão nos momentos difíceis desta trajetória. Ao meu esposo Alfredo, por todo amor, paciência e força constante, por ser meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, seu apoio foi fundamental para essa conquista. Ao nosso filho Gabriel que ainda está a caminho, mas que já me traz tanta força e alegria, sendo um dos impulsos para a finalização deste trabalho.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva, pelos ensinamentos, pela confiança, paciência e orientações durante esses vários anos da minha trajetória acadêmica e na condução deste trabalho.

A todos os membros do grupo de pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica por toda colaboração, apoio, amizade, incentivo e aprendizado que cada um me proporcionou. Em especial aos alunos de iniciação científica, Reginaldo Rocha, Luiza Menezes e Elionay Silva, pela colaboração em vários momentos de experimentação. Aos doutores Danilo Fontes, Nelson Lima, Vinícius Vasconcelos, Juliete Lira e mestres Laura Mata, Taís Helena, Ana Paula Arcoverde por toda ajuda prestada.

Aos meus amigos, em especial a Débora, pela sua amizade, seu apoio, contribuições e pelas palavras de encorajamento. Agradeço também pela parceria nos experimentos e por ter me ensinado diversas técnicas no laboratório.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício do Centro Acadêmico de Vitória, em especial a Prof. Dra. Mariana Fernandes e Gisele pela contribuição nas análises dos experimentos de estresse oxidativo.

Aos meus colegas de doutorado, em especial a Renata Emmanuele e Gerffeson Martins pelo companheirismo, pelas trocas de conhecimentos, pela amizade e convívio acolhedor durante todas as aulas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFPE e ao Centro Acadêmico de Vitória-UFPE, que me deram o suporte necessário para que eu pudesse realizar a minha pesquisa.

A FIOCRUZ, em especial a pesquisadora Dra. Tatiany Pompílio por toda a atenção, ensinamentos e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos de biologia molecular. Agradeço também a prof. Dra. Viviane Nogueira pelos ensinamentos de RT-PCR.

Aos órgãos de fomento CNPq, FACEPE e CAPES, pelo suporte financeiro para execução desta 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.

A todos do Laboratório CarMeN – Lyon/Fr, em especial ao diretor geral, Dr. Hubert Vidal. A minha supervisora na França, Dra. Beatrice Morio, por toda receptividade, cuidado, atenção e ensinamentos durante o estágio em Lyon.

A CAPES – COFECUB pelo apoio financeiro durante o estágio de doutorado sanduíche na França.

Agradeço também aos professores que tiveram a gentileza de ler essa tese, contribuir e participar como membros da minha banca final.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O consumo materno de dieta hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados durante gestação e lactação está relacionado ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na idade adulta da prole. Investigamos se o enriquecimento com ômega-3 à dieta hiperlipídica é capaz de atenuar as alterações metabólicas, o aumento de marcadores inflamatórios e distúrbios cardiorrespiratórios resultantes do consumo da mesma. As proles de ratos *Wistar* foram alimentadas com dieta controle (C: 19% de lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 12,66$), HL (HL: 33% lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 21,22$) ou HL enriquecida com ômega-3 (HL $\omega 3$: 33% de lipídios e razão $\omega 6:\omega 3 = 9,45$) durante a gestação e lactação e seus filhotes machos foram avaliados. Foram avaliados o consumo alimentar da prole, medidas murinométricas, parâmetros bioquímicos séricos e ventilatórios ao longo da vida (1, 7, 14, 21, 30, 90 e 300 dias). Os testes de tolerância à glicose e ao piruvato (TTG e TTP), testes de sensibilidade à insulina (TSI), estresse oxidativo, expressão gênica de marcadores inflamatórios e enzimas antioxidantes no fígado foram analisados aos 90 e 300 dias. As medidas diretas da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) também foram avaliadas aos 90 e 300 dias. A comparação dos grupos foi feita através da ANOVA one-way e foi considerado $p < 0,05$ como significativo. O grupo HL apresentou maior peso corporal (PC) no 1º dia de vida. Ambos os grupos HL e HL $\omega 3$ apresentaram maior PC no 7º e 14º dia. Quanto a circunferência abdominal (CA), o HL e HL $\omega 3$ apresentaram maior CA no 1º dia. No entanto, a partir do 7º dia, o HL $\omega 3$ apresentou CA semelhante ao C nas idades avaliadas. O HL apresentou dislipidemia e hiperglicemia no 22º e 90º dia e o HL $\omega 3$ apresentou menores valores no perfil lipídico e glicêmico. O HL $\omega 3$ apresentou níveis mais baixos de ALT aos 22 dias de idade, quando comparado ao HL. Na idade de 30 dias, somente o HL apresentou maior valor de LDL. No 90º dia, HL $\omega 3$ apresentou níveis de AST mais baixos que os demais grupos. Porém, em nosso estudo aos 300 dias de vida não encontramos melhora no perfil lipídico e nos níveis de transaminases hepáticas no grupo HL $\omega 3$, quando comparado ao HL. O grupo HL $\omega 3$ exibiu uma melhor resposta antioxidante e menor expressão gênica de marcadores inflamatórios no fígado. O HL apresentou aumento da FR no 1º e 14º dia. Em relação aos parâmetros cardiovasculares, o HL apresentou aumento da PAM no 90º dia, e tanto HL quanto HL $\omega 3$ apresentaram PAM aumentada no 300º dia. Em geral, nosso estudo

desmonstra que o consumo de dieta materna HL enriquecida com ômega-3 é capaz de atenuar ou prevenir prejuízos metabólicos induzidos pela dieta hiperlipídica até o início da idade adulta, mas não em idades mais tardias. Além disso, o enriquecimento com ômega-3 mitigou os efeitos deletérios da dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os parâmetros ventilatórios durante o período de maturação da rede neural e o desenvolvimento da instalação precoce da hipertensão arterial na prole adulta.

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

ABSTRACT

Maternal consumption of a hyperlipidic diet with a high content of saturated fatty acids during pregnancy and lactation is related to a higher risk of developing cardiometabolic diseases in adulthood offspring. We investigated whether the enrichment with omega-3 to the high fat diet is able to attenuate the metabolic alterations, the increase of inflammatory markers and cardiorespiratory disorders resulting from its consumption. Wistar rat dams were fed with control (C: 19% of lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 12.66), HL (HL: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 21.22) or HL enriched with omega-3 (HL $\omega 3$: 33% lipids and $\omega 6:\omega 3$ ratio = 9.45) diet during gestation and lactation, and their male offspring were evaluated. The food intake of the offspring, murinometric measurements, serum biochemical and ventilatory parameters were evaluated throughout life at 1st, 7th, 14th, 21st, 30th, 90th and 300th days of life. The Glucose and pyruvate tolerance test (GTT et PTT) and insulin sensitivity test (IST), oxidative stress, gene expression of inflammatory markers and antioxidant enzymes in the liver were analyzed at 90th and 300th days of life. Direct measurements of mean arterial pressure, heart rate (HR) were also evaluated at 90th and 300th days of life. The groups were compared using ANOVA one-way and it was considered $p < 0.05$ as significant. The HL group had a higher body weight (BW) on the first day of life. Both groups HL and HL $\omega 3$ had a higher BW at 7th and 14th days. As for abdominal circumference (AC), HL and HL $\omega 3$ presented a higher AC at 1st day. However, from of the 7th day, HL $\omega 3$ presented AC similar to C at the ages evaluated. HL presented dyslipidemia and hyperglycemia at 22th and 90th day and HL $\omega 3$ presented better values in the lipid and glycemic profile. HL $\omega 3$ showed lower ALT levels at 22-d-old., when compared to HL. At 30-d-old, only HL showed a higher LDL value. At 90-d-old, HL $\omega 3$ had lower AST levels than the other groups. However, in our study at 300-d-old, we found no improvement in the lipid profile and levels of hepatic transaminases in the HL $\omega 3$ group, when compared to the HL. The HL $\omega 3$ group exhibited a better antioxidant response and lower gene expression of inflammatory markers in the liver. The HL group showed an increase in baseline RF at 1st and 14th days. In relation to cardiovascular parameters, HL showed an increase in MAP at 90th day, and both HL and HL $\omega 3$ showed an increase in MAP at 300th day. In general our study demonstrates that the consumption of a maternal HL diet enriched with omega-3 is able to attenuate or prevent metabolic damage induced by

the high-fat diet until early adulthood, but not at later ages. In addition, enrichment with omega-3 attenuated the deleterious effects of a diet rich in saturated fatty acids on ventilatory parameters during the period of neural network maturation and the development of early installation of arterial hypertension in adult offspring.

Keywords: phenotypic plasticity; hyperlipid diet; alpha-linolenic acid; cardiometabolic diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho experimental de acordo com o período de avaliação da prole de machos *Wistar* submetidos à dieta Controle (19% de lipídios), HL (33% de lipídios) e HL ω 3 (33% de lipídios enriquecida com ômega-3) durante a gestação e lactação.....**41**
- Figura 2** - Desenho esquemático da pletismografia de corpo inteiro de um animal, adaptado de Penintente *et al.*, 2007.....**51**
- Figura 3** - Teste de tolerância à glicose e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**58**
- Figura 4** - Teste de tolerância ao piruvato e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**59**
- Figura 5** - Teste de sensibilidade à insulina e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**60**
- Figure 6** - Avaliação do estresse oxidativo e da resposta antioxidante do fígado de ratos submetidos à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 e 300 dias de vida.....**62**
- Figura 7** - Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) do fígado de ratos submetidos à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 e 300 dias de vida.....**65**
- Figura 8** - Avaliação da frequência respiratória no 1^o, 7^o, 14^o, 21^o, 30^o e 90^o e 300^o dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**67**
- Figura 9** - Avaliação da ventilação corrente no 1^o, 7^o, 14^o, 21^o, 30^o e 90^o e 300^o dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**68**
- Figura 10** - Avaliação da ventilação pulmonar no 1^o, 7^o, 14^o, 21^o, 30^o e 90^o e 300^o dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação.....**69**
- Figura 11** - Avaliações cardiovasculares basais de ratos submetidos à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 dias de vida.....**70**
- Figura 12** - Avaliações cardiovasculares basais da prole de ratas submetidas à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 300 dias de vida.....**71**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição quanto aos ingredientes das dietas experimentais.....**42**
- Tabela 2** - Composição percentual de ácidos graxos quanto à presença de dupla ligação na cadeia carbônica nas dietas experimentais formuladas.....**43**
- Tabela 3** - Sequência de primers que será utilizado para a realização do qRT-PCR.....**50**
- Tabela 4** - Consumo alimentar em gramas, calorias e macronutrients e coeficiente de eficiência alimentar após o desmame da prole de ratos submetidos à dieta Controle (C), Hiperlipídica (HL) e Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HL ω 3) durante a gestação e lactação.....**53**
- Tabela 5** - Parâmetros murinométricos da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HL ω 3) durante a gestação e lactação.....**55**
- Tabela 6** - Perfil bioquímico em jejum da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HL ω 3) durante a gestação e lactação.....**57**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AGS	Ácidos graxos saturados
AGS-CL	Ácidos graxos saturados de cadeia longa
AIN- 93	<i>American Institute of Nutrition</i> (em inglês); Instituto Americano de Nutrição
ALA	<i>Alpha-linolenic acid</i> (em inglês); Ácido alfa-linolênico
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AgRP	<i>Agouti-related peptide</i> (em inglês); Peptídeo relacionado à agouti
ARC	<i>Arcuate nucleus</i> (em inglês); Núcleo arqueado
AST	Aspartato aminotransferase
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> (em inglês); Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CCR2	<i>Chemokine receptor type 2</i> (em inglês); Quimiona receptor tipo 2
COX	Ciclooxigenase
CT	Colesterol total
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DHA	Ácido docosaexahenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i> (em inglês); Origens Desenvolvimentistas da saúde e doença
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Fatty acid synthase (em inglês); Ácido graxo sintase
FR	Frequência respiratória
GLI	Glicemia de jejum
GLUT- 4	<i>Glucose transporter type 4</i> (em inglês); Transportador de Glicose Tipo 4
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Rd	Glutaciona redutase
GSH-PX	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
GPR40	<i>G-protein-coupled receptor</i> (em inglês); Receptor acoplado a proteína G
HDL	<i>High density lipoprotein cholesterol</i> (em inglês); Lipoproteína de alta densidade
HF	<i>High frequency bands</i> (em inglês); Bandas de Alta Frequência
HL	Hiperlipídica (com alto teor em ácidos graxos saturados)
HL ω 3	Hiperlipídica enriquecida com ômega 3
IL	Interleucina

INF- γ	Interferon Gama
JNK1	<i>c-Jun N-terminal kinase 1</i> (em inglês); c- Jun N-Terminal quinase
LA	<i>Linoleic acid</i> (em inglês); Ácido linoleico
LDL	Low-density lipoprotein <i>cholesterol</i> (em inglês); Lipoproteína de baixa densidade
LH	Low frequency bands (em inglês); Bandas de Baixa Frequência
LOX	Lipoxigenase
MaR1	Maresina R1
MDA	Malondialdeído
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein- 1</i> (em inglês); Proteína Químioatraente de Monócitos
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PCR-as	Proteína C-reativa de alta sensibilidade
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (em inglês); Receptor ativado por proliferador de peroxissomas-gama
PT	Proteínas totais
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> (em inglês); Ácidos graxos poli-insaturados

PUFAS-LC	<i>Long chain polyunsaturated fatty acids</i> (em inglês); Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
PVN	<i>Paraventricular nucleus</i> (em inglês); Núcleo Paraventricular
RNA _m	RNA mensageiro
RVLM	<i>Rostral ventrolateral medulla</i> (em inglês); Rostro Ventrolateral do Bulbo
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i> (em inglês); Proteína reguladora de ligação ao elemento esterol
TG	Triglicerídeos
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (em inglês); Fator de necrose tumoral- α
TSI	Teste de sensibilidade à insulina
TTG	Teste de tolerância à glicose
TTP	Teste de tolerância ao piruvato
VLDL	<i>Very low density lipoprotein cholesterol</i> (em inglês); Lipoproteína de muito baixa densidade
VE	Ventilação pulmonar
VT	Volume corrente
ω -3	Ômega 3
ω -6	Ômega 6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	EPIGENÉTICA, NUTRIÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA	22
2.2	INFLUÊNCIA DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	24
2.3	DIETA HIPERLIPÍDICA E SEU IMPACTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
2.4	DIETA HIPERLIPÍDICA E ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS.....	29
2.5	EFEITOS DO ÔMEGA-3 SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E CARDIORRESPIRATÓRIOS.....	31
3	HIPÓTESES	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL.....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MÉTODOS	40
5.1	ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL	40
5.2	MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL	41
5.3	CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE	43
5.4	MEDIDAS MURINOMÉTRICAS	44
5.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	44
5.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)	45
5.7	TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)	45
5.8	TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA (TSI)	45

5.9	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	45
5.9.1	Preparo do homogeneizado do tecido hepático.....	46
5.9.2	Dosagem de proteína.....	46
5.9.3	Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico.....	46
5.9.4	Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas).....	47
5.9.5	Avaliação do conteúdo de sulfidril-SH.....	47
5.9.6	Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD).....	47
5.9.7	Avaliação da atividade enzimática da Catalase.....	48
5.9.8	Avaliação da atividade enzimática da Glutathione S-Transferase.....	48
5.9.9	Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG).....	48
5.10	ENSAIOS MOLECULARES	49
5.10.1	Coleta dos tecidos.....	49
5.10.2	Extração de mRNA.....	49
5.10.3	Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	49
5.11	MEDIDAS DE VENTILAÇÃO PULMONAR.....	50
5.12	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTE DE CATETER EM ARTÉRIA FEMORAL.....	51
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6	RESULTADOS	53
6.1	CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE	53
6.2	AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS	54
6.3	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROLE AOS 22, 30, 90, 300 DIAS DE VIDA.....	56

6.4	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA	58
6.5	TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA	59
6.6	TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA.....	60
6.7	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DO FÍGADO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA.....	61
6.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO (qRT-PCR) DO FÍGADO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA.....	65
6.9	AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS VENTILATÓRIOS BASAIS.....	66
6.10	AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR AOS 90 e 300 DIAS DE VIDA.....	69
7	DISCUSSÃO	72
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE A - TÉCNICAS DESENVOLVIDAS NA REALIZAÇÃO DO DOUTORADO SANDUÍCHE.....	103
	APÊNDICE B - PAPER 1.....	109
	APÊNDICE C - PAPER 2.....	122
	APÊNDICE D - PAPER 3.....	133
	APÊNDICE E - PAPER 4	147
	ANEXO A - APROVAÇÃO DA CEUA	160

1 INTRODUÇÃO

A transição nutricional trouxe como consequência a prevalência principalmente entre a população adulta e idosa, das doenças crônicas, tais como a *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), obesidade e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (DENG, WANG e YUAN, 2020). Essas comorbidades estão associadas à alimentação hipercalórica, rica em gorduras trans, ácidos graxos saturados, açúcares simples, sal e outras práticas não saudáveis relacionadas ao estilo de vida ocidental (BATISTA FILHO e BATISTA, 2010).

As doenças crônicas são responsáveis pela morte de 41 milhões de pessoas por ano, o equivalente a 71% das mortes no mundo. Por ano, 15 milhões de pessoas morrem de uma doença crônica entre 30 e 69 anos; mais de 85% dessas mortes "prematargas" ocorrem em países de baixa e média renda. As doenças cardiovasculares são a causa da maioria das mortes por doenças crônicas, por 17,9 milhões de pessoas anualmente, seguidas por cânceres (9,0 milhões), doenças respiratórias (3,9 milhões) e DM2 (1,6 milhão). Dietas não saudáveis são um dos fatores que aumentam o risco de morte por doenças crônicas (WHO, 2018). No Brasil, 7,4% da população tem DM, 24,5% HAS e 20,3% obesidade (VIGITEL, 2019).

Estudos têm demonstrado que o consumo de dieta rica em lipídios durante períodos críticos da vida, como a gestação e lactação está relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de obesidade (DESAI *et al.*, 2020), DM2 (MURABAYASHI *et al.*, 2013), HAS (GUBERMAN *et al.*, 2013) e síndrome metabólica (DESAI *et al.*, 2014) na prole. É verificado que o elevado consumo de dieta materna hiperlipídica promove o aumento dos níveis de ácidos graxos livres (AGL) circulantes e estimula a ativação de vias inflamatórias, aumentando o risco de inflamação crônica de baixo grau na prole (GRUBER *et al.*, 2015). A inflamação relacionada à dieta hiperlipídica induz a disfunção de adipócitos em remover eficazmente os AGL circulantes e é relacionada com o desenvolvimento de complicações, como a DM2, doença hepática, aterosclerose e doenças cardiovasculares (DUAN, YE HUI *et al.*, 2018).

Em resposta a inflamação, as células de defesa do organismo (macrófagos e linfócitos) residentes na área lesada liberam citocinas pró-inflamatórias na circulação

(IL-1 β , IL-6 e TNF- α), as quais são capazes de aumentar a atividade simpática e promover o aumento de pressão arterial (WAKI *et al.*, 2010). É verificado que o desbalanço do sistema nervoso autônomo, com predominância do tônus simpático, constitui importante fator de risco para o desenvolvimento da HAS (ALVES *et al.*, 2016).

Estudos também demonstram que a dieta hiperlipídica pode ter um impacto negativo na regulação da atividade simpática em neurônios de regiões-chave do controle cardiorrespiratório, como o núcleo do trato solitário (NTS) (BARDGETT, SHARPE e TONEY, 2014). Ratos provenientes de mães que consumiram dieta hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados) durante a gestação e lactação apresentaram aos 60 dias de vida, a instalação da HAS, com redução da sensibilidade barorreflexa, associada ao desbalanço autonômico e evidente aumento no tônus do sistema nervoso simpático para o coração. Foram verificadas também alterações metabólicas, como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de LDL e diminuição de HDL (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

Ainda tem sido verificado que alterações na geração e modulação do ritmo respiratório basal (MORAES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2015) e modificações na quimiossensibilidade periférica e central ao O₂ e CO₂ podem desencadear a hiperativação do sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, a HAS (GREENBERG *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2006; ZOCCAL, 2011; MORAES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2012, 2015), sugerindo que mecanismos respiratórios também podem estar relacionados ao processo de instalação dessa patologia.

No entanto, muitas evidências demonstram que o ômega-3 atua na diminuição da pressão arterial. É demonstrado que o ômega-3 possui propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (SIMOPOULOS, 2002; SINGER *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ, SVAHN e JOHANSSON, 2019). Essa propriedade anti-inflamatória pode permitir que ocorra uma eficácia direta sobre os eventos hipertensivos. Sobretudo devido a sua ação anti-inflamatória de diminuir a síntese de derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E₂, tromboxano A₂, prostaciclina e leucotrieno B₄ (KREMER, 2000). Estudos demonstram que a pressão arterial é mais baixa em indivíduos que habitualmente consomem maiores fontes de ômega-3, sugerindo que o ômega-3 seria importante do ponto de vista de prevenção primária da HAS (COLLINS, 2009).

O consumo de dieta enriquecida com ômega-3 durante a gestação e lactação também reduz a adiposidade e melhora a sensibilidade à insulina na prole (KOROTKOVA *et al.*, 2002; SARDINHA *et al.*, 2012). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa (PUFA-LC) por meio de sua ligação ao PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptor*) podem ser capazes de atuar no metabolismo de lipídios e na melhora da expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (KHAIRE, KALE e JOSHI, 2015).

Estudos recentes ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa encontraram em ratos provenientes de mães que consumiram dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 durante a gestação e lactação, uma diminuição dos níveis de biomarcadores do estresse oxidativo no tecido hepático, como o malondialdeído (MDA), quando comparado ao grupo submetido à dieta materna hiperlipídica, sem enriquecimento com ômega-3. O MDA se relaciona positivamente com a gordura visceral, por ser um preditor de peroxidação lipídica, é também um indicador de dano celular por aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS). Além disso, o enriquecimento com ômega-3 demonstrou melhorar a capacidade antioxidante, prejudicada pela dieta com alto teor de ácidos graxos saturados, com normalização dos níveis de enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione S-transferase (GST) (BIRBEN *et al.*, 2012).

Considerando que o estresse oxidativo e a sinalização de vias inflamatórias estão intimamente inter-relacionados (MORGAN e LIU, 2011), nosso estudo também propôs avaliar a expressão gênica de marcadores inflamatórios no fígado de ratos deste modelo experimental, tendo como pressuposto que o ômega-3 possa atenuar ou reverter à inflamação crônica de baixo grau provocada pela dieta com alto teor de ácidos graxos saturados. Sugerindo deste modo, que ômega-3 possa atuar como uma possível estratégia na prevenção de doenças cardiometabólicas, como a HAS, DM2 e a dislipidemia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIGENÉTICA, NUTRIÇÃO E PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Evidências demonstram uma grande relação entre fatores ambientais adversos no início da vida e a instalação de doenças crônicas, conseqüentemente devido a ajustes metabólicos precoces (SILVEIRA *et al.*, 2007). Estudos apontam que o período fetal é o mais sensível ao desenvolvimento de alterações epigenéticas, as quais conseguem influenciar a expressão gênica celular e a predisposição de doenças ao longo da vida (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2005; BOGDARINA *et al.*, 2007). A epigenética é definida como uma alteração reversível e hereditária que afeta a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA (*Deoxyribonucleic acid*). Com o avanço das ferramentas epigenéticas e tecnológicas, tentativas têm sido feitas para descobrir os mecanismos epigenéticos subjacentes à perturbação metabólica e inflamação crônica causada pela obesidade induzida pela dieta (YOON *et al.*, 2017).

A 'plasticidade fenotípica' é descrita como a flexibilidade de ajustar a trajetória de crescimento em resposta às diferentes condições ambientais, na qual um único genótipo pode ser capaz de produzir fenótipos diversos em resposta ao ambiente que se desenvolve (WEST-EBERHARD, 1989; HANSON *et al.*, 2011). Essas adaptações podem ser benéficas a curto prazo, garantindo a sobrevivência da espécie, porém os custos dessa adaptação, podem ser observadas a longo prazo, com o desenvolvimento de doenças crônicas, como DM2, HAS e doença coronariana (GLUCKMAN *et al.*, 2009).

Estudos de Barker e colaboradores foram os primeiros a mostrarem a associação entre baixo peso ao nascer, utilizado como modelo para nutrição fetal prejudicada com o maior risco de doenças crônicas, como a DM2 e HAS (BARKER e OSMOND, 1986; HALES *et al.*, 1991). A "programação fetal", atualmente denominada como *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), é descrita como a consequência de perturbações provocadas pelo meio ambiente durante o desenvolvimento, atingindo não somente os bebês pequenos para idade gestacional, como também os grandes para idade gestacional. Nos últimos anos, a prevalência de distúrbios metabólicos aumentou notadamente. Apesar dos hábitos e

estilo de vida contribuírem evidentemente com essas epidemias, há dados crescentes que sugerem que o ambiente nutricional materno durante os estágios críticos do desenvolvimento no útero promove um maior risco de doenças metabólicas na vida adulta (ALFARADHI e OZANNE, 2011; CHAVATTE-PALMER, TARRADE e ROUSSEAU-RALLIARD, 2016). A teoria da *Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença* (DOHaD) baseia-se no conceito de que as origens das doenças relacionadas ao estilo de vida são formadas no momento da fertilização, estágios embrionários, fetais e neonatais pela inter-relação entre os genes e o ambiente (nutrição, estresse ou produtos químicos ambientais) (ARIMA e FUKUOKA, 2020).

No avanço das ferramentas epigenéticas e tecnológicas, ensaios têm sido feitos para desvendar os mecanismos epigenéticos subjacentes à perturbação metabólica e inflamação crônica consequente a obesidade induzida pela dieta (YOON *et al.*, 2017). Conceitos anteriores que relatavam que a maturação do sistema cardiorrespiratório estava rigorosamente predeterminada por um mapa genético já cederam à uma visão atual diferente. Atualmente é verificado que as interações bastante complexas entre genes, fatores de transcrição, fatores de crescimento e outras variáveis genéticas moldam o sistema de controle cardiorrespiratório, e os insultos sofridos nas 'janelas do desenvolvimento' desempenham um papel-chave para conduzir o desenvolvimento normal ou não desse sistema (BURGGREN, 2020).

A *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) destacou a associação entre as fases pré-concepcional, fetal e infantil precoce da vida e o surgimento de obesidade e doenças metabólicas na vida adulta (VICKERS, 2014). A exposição precoce à dieta hiperlipídica, independente de obesidade materna, pode levar a prole ao aumento de peso e maior ingestão calórica, sem redução no consumo de leite materno, sugerindo um comportamento de hiperfagia e contribuindo para o desenvolvimento de um fenótipo obeso (KOJIMA, SAYURI, CATAVERO, CHRISTINA e RINAMAN, LINDA, 2016).

O consumo de dieta hiperlipídica no período de gestação e lactação predispõe a prole ao aumento de adiposidade, a níveis elevados de colesterol sérico (ZINKHAN, YU e SCHLEGEL, 2018; KISLAL, SHOOK e EDLOW, 2020), triglicerídeos, corticosterona, insulina, glicose (DESAI *et al.*, 2014), além de HAS que

são grandes fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta (ZINKHAN, YU e SCHLEGEL, 2018; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

2.2 INFLUÊNCIA DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A INFLAMAÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

A inflamação é detectada em vários tecidos de modelos animais genéticos e dietéticos de obesidade (ZHOU, URSO e JADEJA, 2020). Há um crescente conceito de que os ácidos graxos saturados de cadeia longa (AGS-CL) podem alterar 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 os tipos insaturados ajudam a elevar as células M2 no tecido adiposo. No processo de instalação da obesidade e hipertrofia dos adipócitos, ocorre infiltração no tecido adiposo de macrófagos pró-inflamatórios M1 e subconjuntos de células T (PIROLA e FERRAZ, 2017).

Os adipócitos hipertrofiados liberam *chemotactic monocyte protein* (MCP-1) (KANDA *et al.*, 2006), essa ativa os monócitos sanguíneos através do *chemokine receptor type 2* (CCR2) e induz a migração de monócitos para o tecido adiposo e diferenciação em macrófagos. Os macrófagos no tecido adiposo são ativados em resposta aos AGLs, como o ácido palmítico, liberados a partir de adipócitos hipertrofiados e produz desta forma maiores quantidades de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e MCP-1 (SUGANAMI, NISHIDA e OGAWA, 2005). *In vitro*, estudos também demonstraram que a exposição de adipócitos a altas concentrações de ácido palmítico aumentam as expressões de mRNA e proteínas de TNF- α e IL-6 (KENNEDY *et al.*, 2009). Enquanto ocorre o desenvolvimento da obesidade, é verificada uma elevação tanto no tecido adiposo como sistemicamente, de diversas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), TNF- α , interleucina-17 (IL-17) e interleucina-6 (IL-6) que estão associadas à progressão do fenótipo obeso ligado à síndrome metabólica (PIROLA e FERRAZ, 2017). A inflamação crônica de baixo grau está relacionada com o desenvolvimento de várias patologias associadas à obesidade, como a resistência a insulina, DM, doenças cardiovasculares e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (ZHOU, URSO e JADEJA, 2020).

A DHGNA é definida como o acúmulo excessivo de lipídios no fígado, ou seja, hepatoesteatose (ANGULO e LINDOR, 2002; NEUSCHWANDER-TETRI e CALDWELL, 2003). A DHGNA é a manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) (KIM e YOUNOSSI, 2008), e os fatores de risco para SM incluem obesidade, níveis plasmáticos elevados de TGs e colesterol LDL, colesterol HDL reduzido, pressão alta e hiperglicemia em jejum (ALBERTI, ZIMMET e SHAW, 2005). E o consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação está relacionado com alterações metabólicas na prole, tais como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de LDL e diminuição de HDL (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

Estudos com camundongos alimentados com dieta rica em gordura e suplementada com ácido palmítico, encontraram inflamação no tecido adiposo, fígado, músculo, rim e hipotálamo em comparação com animais submetidos à dieta controle (HIROSUMI *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2010; DECLÈVES *et al.*, 2011; WANG, X. *et al.*, 2012). O consumo de dieta rica em ácido esteárico também foi capaz desencadear a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de astrócitos (GUPTA *et al.*, 2012). É verificado que tanto o ácido esteárico quanto o ácido palmítico induzem a ativação de NF- κ B e estimulam a secreção de mediadores pró-inflamatórios em células trofoblásticas isoladas de placentas humanas (YANG *et al.*, 2015; SHIRASUNA *et al.*, 2016) e em células microgliais (WANG, Z. *et al.*, 2012). Além disso, dados apontam que indivíduos em dieta rica em ácido palmítico exibem níveis circulantes elevados de IL-6 e IL-1 β comparados com indivíduos que consomem dieta com baixo teor de ácido palmítico/alto teor de ácido oleico (DUMAS *et al.*, 2016). Esses estudos sugerem que o aumento do nível de ácidos graxos saturados (AGS) pode representar um elo chave entre obesidade e inflamação (ZHOU, URSO e JADEJA, 2020).

Foi observado em camundongos, que a obesidade induzida pela dieta materna promove a hipertrofia dos adipócitos, HAS e aumento dos níveis plasmáticos de insulina na prole (SAMUELSSON *et al.*, 2008). A obesidade materna tem uma grande influência na vida fetal intrauterina que se estende aos distúrbios metabólicos na infância, adolescência e vida adulta (CATALANO e EHRENBERG, 2006; ARMITAGE, POSTON e TAYLOR, 2008). Os adipócitos regulam os estoques de energia e secretam muitas adipocinas que têm um grande impacto na homeostase energética e na resistência à insulina (SCHERER, 2006). Estudos mostram que a obesidade materna predispõe a prole à obesidade e à síndrome

metabólica, possivelmente através da programação metabólica fetal tardia (MURABAYASHI *et al.*, 2013).

O nível de expressão de RNAm do TNF- α no tecido adiposo é significativamente elevado na obesidade e fortemente correlacionado com o nível de hiperinsulinemia (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995). É observado hiperinsulinemia e menor tolerância à glicose, alterações nos níveis de mediadores inflamatórios e adipocinas em camundongos prenhes alimentados com dieta hiperlipídica (KĘPCZYŃSKA *et al.*, 2013; MURABAYASHI *et al.*, 2013). O aumento do palmitato sérico livre pode levar à apoptose e disfunção das células β pancreáticas (RUAN *et al.*, 2018).

A diminuição de adiponectina materna encontrada pode estar relacionada a um maior peso fetal devido à diminuição da sensibilidade à insulina e elevação dessa no plasma. Também foi encontrada uma redução de resistina plasmática (KĘPCZYŃSKA *et al.*, 2013) e aumento nos níveis de TNF- α e maior expressão de RNAm de CD-68 (*cluster of differentiation 68* - glicoproteína transmembranar, altamente expressa por monócitos e macrófagos, considerado assim um marcador de macrófagos), MCP-1, CCR2 no tecido adiposo materno. O tecido adiposo subcutâneo fetal (aos 17 dias de gestação) apresentou hipertrofia e infiltração de macrófagos, com aumento na expressão de marcadores inflamatórios como o TNF- α , aumento da expressão de RNAm de CCR2 e diminuição na expressão de *glucose transporter, type 4* (GLUT-4), associando-se ao desenvolvimento de resistência a insulina na prole. Essas mudanças podem estar relacionadas ao aumento do risco de obesidade na adolescência e distúrbios metabólicos (MURABAYASHI *et al.*, 2013).

Estudo com dieta materna rica em AGS de cadeia longa (AGS-CL) (rica em ácido palmítico e esteárico), com uma razão de PUFA: AGS de 0,86, no período da gestação e lactação levou a inflamação hipotalâmica na prole de roedores (PIMENTEL *et al.*, 2012). A ingestão materna de dieta rica em lipídios (35% de calorias de lipídios) também demonstrou induzir inflamação na prole em primatas não humanos (GRAYSON *et al.*, 2010). Dentro de alguns dias, ao ingerir uma dieta rica em calorias e lipídios (60% de lipídios), uma quantidade aumentada de AGS da periferia cruza a BHE (barreira hematoencefálica) e induz uma resposta inflamatória nos neurônios hipotalâmicos, sendo um evento precoce no desenvolvimento da

obesidade (THALER *et al.*, 2012), envolvendo a ativação da microglia, os macrófagos teciduais residentes no SNC (TIMPER e BRUNING, 2017). A administração intracerebroventricular de ácido araquídico também induz a expressão de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no hipotálamo de ratos (MILANSKI *et al.*, 2009).

Ainda foi verificado em roedores que uma dieta materna com alto teor de lipídios, contendo AGS-CL, demonstrou prejudicar a sinalização de leptina a nível do núcleo arqueado, levando a uma atenuação da ação da leptina na supressão do apetite (KIRK *et al.*, 2009). A alimentação materna com elevado teor de gordura durante a lactação em camundongos altera as projeções dos neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) e *agouti-related peptide* (AgRP) para neurônios de segunda ordem, resultando em aumento da obesidade e diminuição da homeostase da glicose na prole (VOGT *et al.*, 2014). A inflamação local no hipotálamo (que engloba o núcleo arqueado, a parte anterior do *paraventricular nucleus* (PVN) e a eminência mediana) promove o estresse no retículo endoplasmático dos neurônios hipotalâmicos, levando à resistência à insulina e leptina (KLEINRIDDERS, KONNER e BRUNING, 2009; PIMENTEL, GANESHAN e CARVALHEIRA, 2014). A ativação constitutiva da via pró-inflamatória *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1) nos neurônios AgRP aumenta o disparo espontâneo nessas células, juntamente com a resistência neuronal e sistêmica da leptina, resultando em hiperfagia, aumento de peso e ganho de adiposidade (TSAOUSIDOU *et al.*, 2014). O estabelecimento do fenótipo pró-inflamatório é caracterizado como a relação entre o desenvolvimento da obesidade, a evolução desta para a resistência à insulina, conseqüentemente ao DM2 e doença cardiovascular associada (PIROLA e FERRAZ, 2017).

2.3 DIETA HIPERLIPÍDICA E SEU IMPACTO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO

As EROS conhecidas também como radicais livres podem afetar vários processos celulares, incluindo imunidade, vias de sinalização celular e regulação da expressão gênica (ZHANG *et al.*, 2016). Elas podem ser produzidas a partir de diferentes vias, incluindo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase reduzida, óxido nítrico sintase e mitocôndrias (BRANDES, WEISSMANN e SCHRÖDER, 2014; MEITZLER *et al.*, 2014). A produção de EROS induzida por AGS pode ser mediada pela ativação da NADPH oxidase (CREMONINI e OTEIZA, 2018). O ácido palmítico também demonstrou aumentar a produção de espécies

reativas de oxigênio (EROS) em uma variedade de células, incluindo monócitos, células endoteliais vasculares, adipócitos, células musculares lisas, cardiomiócitos e células musculares esqueléticas (INOGUCHI *et al.*, 2000; YUZEFOVYCH, WILSON e RACHEK, 2010; HAN *et al.*, 2012; SNODGRASS *et al.*, 2013; JOSEPH *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é decorrente da existência do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, devido a geração excessiva ou em detrimento da velocidade de remoção de radicais livres (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). As EROS contêm elétrons desemparelhados que reagem, podendo levar a reações em cadeias, oxidando biomoléculas e contribuindo para o desenvolvimento de muitas patologias (BIRBEN *et al.*, 2012). As EROs podem estar envolvidas no aumento da expressão de genes inflamatórios de diferentes maneiras. Estudos sugerem que o tratamento com AGS induz a geração de ROS dependente de NADPH oxidase, que, por sua vez, ajuda a recrutar TLR4 para os microdomínios lipídicos e contribui para a dimerização e ativação subsequente de receptores *Toll-like-4* (TLR4), aumentando a expressão de marcadores inflamatórios (WONG *et al.*, 2009; DAS *et al.*, 2015). Diversos estudos têm demonstrado que o excesso de lipídeos está associado com a formação de espécies reativas e o processo de estresse oxidativo, sendo um fator importante na fisiopatologia da obesidade, DHGNA, aterosclerose e doenças cardiovasculares (FURUKAWA *et al.*, 2004; PELUSO *et al.*, 2012; ESTADELLA *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo pode ser mensurado, através dos produtos finais das reações de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação do DNA (BETTERIDGE, 2000). A aferição das EROs e das das lesões oxidativas pode ser realizada através da medição da atividade enzimática (superóxido dismutase - SOD, catalase, glutathiona peroxidase - GSH-Px e glutathiona redutase - GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (glutathiona reduzida- GSH) e aldeídos (malondialdeído - MDA) e o estresse oxidativo, por dosagens de GSSG (forma oxidada da glutathiona) e/ou pelo cálculo da razão GSH/GSSG. A razão entre a glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é um importante parâmetro do estresse oxidativo. A proporção alta de GSH/GSSG protege a célula contra danos oxidativos, o rompimento dessa razão leva a ativação de fatores de transcrição sensíveis redox, como NF- κ B, que atua na resposta inflamatória e está relacionado com o desenvolvimento de alterações metabólicas e cardiorrespiratórias (BIRBEN *et al.*, 2012).

2.4 DIETA HIPERLIPÍDICA E ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS

A ingestão elevada de gordura favorece o desenvolvimento de diversas patologias como dislipidemias e doenças cardiovasculares (FEOLI *et al.*, 2003; COSTA-SILVA, SIMOES-ALVES e FERNANDES, 2016). Estudos em ratos têm demonstrado que o alto consumo de lipídios na dieta materna durante a gestação, lactação e/ou após o desmame leva ao aumento nos níveis basais de pressão arterial na prole (FEOLI *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2005a; XUE *et al.*, 2015), o qual persiste na vida adulta.

Estudos indicam uma relação entre processos inflamatórios e disfunções no sistema nervoso autônomo. A disfunção do sistema nervoso autônomo pode ter um grande papel no surgimento e progressão de doenças cardiovasculares (TOBALDINI *et al.*, 2017). A condição inflamatória em algumas regiões do cérebro responsáveis pelo controle da atividade nervosa simpática, como o núcleo do trato solitário (NTS) (região-chave do controle cardiorrespiratório), a região *rostral ventrolateral medula* (RVLM) e o paraventricular nucleus (PVN) podem contribuir para o estabelecimento de patologias, como a HAS (PATON e WAKI, 2009; ADLAN *et al.*, 2014), demonstrando que prejuízos no sistema imunológico são um dos fatores contribuintes para o desenvolvimento da HAS (TIMPER e BRUNING, 2017).

Foi encontrado em ratos adultos que consumiram dieta hiperlipídica durante um período de 3 ou 6 semanas, um aumento dos níveis pressóricos associado a uma maior ativação de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento da 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).

O nosso laboratório tem estudado o envolvimento do sistema respiratório nos mecanismos de desenvolvimento da HAS em ratos que sofreram insultos nutricionais durante períodos críticos da vida, como a gestação e lactação. Estudos do nosso laboratório verificaram em animais submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação, aumento de frequência respiratória aos 30 dias de vida, a qual permaneceu na vida adulta, associada com a elevação da pressão arterial aos 90 dias de vida. Também foi encontrado maior sensibilidade ao O₂ e CO₂ em condições de hipóxia e hipercapnia nesses animais, com elevação da resposta ventilatória aos 30 e 90 dias (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014), sendo observada a participação do

sistema respiratório nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento da HAS relacionada à desnutrição durante a gestação e lactação. Em relação ao controle autonômico cardíaco, foi sugerido um aumento da atividade simpática nesses animais, pois foi verificada uma elevação da razão entre as *low frequency bands* e *high frequency bands* (LF/HF) aos 90 dias de vida, que contribui para o aumento da pressão arterial relacionada a um desbalanço no controle autonômico cardiovascular (BARROS *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 recente 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 e um desbalanço do sistema nervoso autônomo, com estimulação simpática e redução no controle parassimpático (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017).

Foram encontrados também em ratos que foram submetidos a insulto nutricional durante a gestação e lactação, níveis mais elevados de malondialdeído, acompanhado com a diminuição das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase na medula ventral. Sugerindo que a elevação da pressão arterial encontrada nesses ratos também está associada à disfunção oxidativa medular a nível transcricional e funcional da capacidade antioxidante na medula ventral (BRITO ALVES *et al.*, 2016).

A diminuição na relação CT (colesterol total)/HDL (marcador de risco global, que fornece indicação geral de possíveis efeitos sobre o risco de doença cardíaca coronariana) e da apolipoproteína LDL (relacionado com o risco de doença cardiovascular), foi verificado com a substituição de AGS por PUFA (SACKS e KATAN, 2002; MICHA e MOZAFFARIAN, 2010). Numa análise conjunta de estudos de coorte prospectivos, que não foi considerado apenas a ingestão de AGS, sendo considerados também os nutrientes de substituição, a substituição com PUFA foi relacionado à diminuição do risco de doença cardiovascular (JAKOBSEN *et al.*,

2009; ASTRUP *et al.*, 2011). Sendo isso associado aos efeitos nas mudanças do CT/HDL, devido ao aumento dos níveis de HDL (ASTRUP *et al.*, 2011).

2.5 EFEITOS DO ÔMEGA-3 SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E CARDIORRESPIRATÓRIOS

Estudos têm demonstrado que a ingestão de ácidos graxos α -linolênico tem ação anti-inflamatória (SALTIEL, 2010; INOUE *et al.*, 2017). Os PUFAs ácido α -linolênico (ALA; 18:3) e ácido linoleico (LA; 18:2) são clivados a partir de fosfolípidos de membrana celular pela fosfolipase A_2 . Em seguida, as enzimas ciclooxigenase (HALES *et al.*) e lipoxigenase (LOX) metabolizam os PUFAs. Além de produzir eicosanoides pró-inflamatórios, que incluem prostaglandina E_2 (PGE_2), tromboxano A_2 e leucotrieno B_4 , a partir do ácido araquidônico (PUFA derivado do ácido linoleico). A ação das COX e LOX também produz mediadores anti-inflamatórios, como as resolvinas e protectinas que são originados a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), derivados do ácido α -linolênico (KHATIB *et al.*, 2016).

O último trimestre da gestação e os primeiros seis meses de vida pós-natal apresentam maiores necessidades de ácido docosahexaenóico (DHA), acontecendo nesse período seu depósito na retina e córtex cerebral, que deve ser garantido pelas reservas tissulares da mãe, principalmente no tecido adiposo. Visto que o feto não tem capacidade de sintetizar ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa a partir dos precursores ácido α -linolênico e ácido linoleico. O fígado também ainda não tem atividade biossintética de alongação e dessaturação para a formação de PUFA-LC (SILVA, MIRANDA JÚNIOR e SOARES, 2007). É nesse período que acontece um maior pico na velocidade de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central. O ácido docosahexaenóico e o ácido araquidônico são componentes estruturais do SNC e a deficiência desses ácidos graxos essenciais durante esse período crítico pode acarretar em danos irreparáveis. O DHA também mantém a fluidez da membrana das células nervosas, participa da propagação do impulso nervoso e transmissão sináptica e, sinalização para expressão de genes (DUTTAROY, 2009).

O consumo materno de ácido docosahexaenóico tem uma ação importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, na gestação de alto risco, no aumento

do peso ao nascer, comprimento e circunferência da cabeça, acuidade visual, coordenação mãos-olhos, atenção e processamento de informações, na imunidade e na resposta do sistema nervoso autônomo (DE ALMEIDA *et al.*, 2014).

A transferência de ácidos graxos através da placenta ocorre mais por transporte mediado por proteínas, no entanto pode ocorrer por difusão passiva. O aumento no consumo de ácidos graxos maternos ocasiona uma maior transferência destes para o feto. Diversas proteínas localizadas na membrana placentária têm sido identificadas por sua função no transporte de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, derivados do ácido α -linolênico e ácido linoléico através da placenta, como: a proteína de ligação de ácidos graxos (*placental membrane fatty acid binding protein*, p-FABPpm) que possui alta afinidade por PUFA-LC, principalmente o ácido docosahexaenóico; translocase de ácidos graxos altamente glicosilada (*highly glycosylated fatty acid translocase*, FAT/CD 36), com maior atividade na captação de ácidos graxos livres; proteínas de transporte de ácidos graxos (*fatty acid transport proteins*, FATP), acilCoA sintetase (*fatty acylCoA synthetase*, ACS) e proteínas intracelulares de ligação de ácidos graxos (*intracellular fatty acid binding proteins*, FABPs) (WEN-JU LIN, JAMES e DARRELL, 1984; AKERELE e CHEEMA, 2016).

Ocorre no terceiro trimestre da gravidez um aumento na expressão e atividade da lipase lipoproteica placentária que hidrolisa triacilgliceróis de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) presentes no plasma materno a ácidos graxos livres que são transportados ao feto e utilizados principalmente como fonte de energia. Outra enzima atuante no citosol de células placentárias é a fosfolipase citosólica A2 que participa da liberação de ácidos graxos livres para a síntese de prostaglandinas (DUTTARROY, 2009).

O *Institute of Medicine* recomenda uma AI (*Adequate Intake*) de 13g/dia de ácido linoléico (18:2) para gestantes e lactantes, 1,4g /dia de ácido α -linolênico (18:3) para gestantes e 1,3g /dia de ácido α -linolênico (18:3) para lactantes (MEDICINE, 2005). É sugerida uma recomendação de suplementação em gestantes de 200mg de ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6), a partir de fontes seguras (DE ALMEIDA *et al.*, 2014). Alguns autores recomendavam a ingestão mínima em mulheres lactantes de 200mg de ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6), seja através de fontes alimentares ou suplementação (KOLETZKO *et al.*, 2008). Estudos mais recentes recomendam uma ingestão maior em lactantes, na ordem de 600mg/dia (CARLSON *et al.*, 2013). O *American Institute of Nutrition* preconiza por meio da

AIN-93 a oferta de 4,8g/Kg de dieta do ácido α -linolênico e 35,7 g/Kg de ácido linoléico para fase de crescimento e reprodução de roedores. Na fase de manutenção esses valores são de 2,7 g/kg e 10,4 g/kg, respectivamente (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993). Em relação às recomendações para razão de consumo ômega 6:ômega 3 existe um conflito na literatura, havendo uma tendência para uma razão de 4:1 a 5:1. Alguns autores recomendam as razões 2:1 a 3:1 pela sugestão de maior conversão do ácido α -linolênico (ALA; 18:3) em ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6), alcançando um valor máximo em torno de 2,3: 1. A razão 1:1 não é recomendada por inibir a transformação de ácido α -linolênico (ALA; 18:3) em ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6) ou ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5). Para o *Institute of Medicine* a recomendação de uma boa relação ômega 6 / ômega 3 é em torno de 10:1 a 5:1 (MEDICINE, 2005). Em humanos é verificado um maior nível de conversão entre as mulheres, supostamente devido a influencia do estrogênio sobre a atividade das enzimas dessaturases (MARTIN *et al.*, 2006).

O consumo de dietas enriquecidas com ácido α -linolênico no período da gestação e lactação foi relacionado com a diminuição da adiposidade, do tamanho do adipócito e dos níveis séricos de leptina na prole (KOROTKOVA *et al.*, 2002). Além da redução da adiposidade, a ingestão de ácido α -linolênico está associada com a melhora da sensibilidade à insulina, reduzida com a idade, na prole de ratos machos (SARDINHA *et al.*, 2012). O perfil de ácidos graxos em dietas hiperlipídicas durante a gestação e/ou lactação pode contribuir com o desenvolvimento de alterações metabólicas na vida adulta. Foi observado que o número de ilhotas pancreáticas foi maior na prole de ratos adultos que as mães receberam uma dieta rica em ácido α -linolênico, sem alteração no volume do pâncreas (SIEMELINK *et al.*, 2002). Na presença de hiperglicemia materna, como na DM2, o enriquecimento com óleo de linhaça (fonte de ω -3) na dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação interferiu positivamente no pâncreas, com aumento no número de ilhotas pequenas e expressão de células beta, e menor número de ilhotas grandes semelhantes a um pâncreas normal (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2014).

Os PUFAS-LC através de sua ligação ao PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptor*) podem regular o metabolismo de lipídios, atuando na modulação da expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos. Os PPARs têm ação na regulação da expressão de genes críticos para o metabolismo de lipídios,

na oxidação dos ácidos graxos, no desenvolvimento dos adipócitos e metabolismo das lipoproteínas (KHAIRE, KALE e JOSHI, 2015).

O aumento da proporção materna ômega-3 / ômega-6 é importante, uma vez que o PUFA, ácido α -linolênico, precursor do DHA, são nutrientes essenciais para o desenvolvimento do feto (CRAWFORD, 2000). Em modelos de camundongos transgênicos Fat-1 (capaz de converter endogenamente o PUFA ômega-6 em PUFA ômega-3) que consumiram dieta hiperlipídica, com 45% de calorias provenientes das gorduras, aumentaram a proporção materna de PUFA ômega-3 / ômega-6 e reduziram a inflamação metabólica materna. Verificando através da exposição lipídica fetal e placentária associada à *high-fat diet* (HFD), que mesmo na ausência de mudança na obesidade materna, que as placentas e os fígados fetais das mães Fat1-HFD foram protegidos do excesso de crescimento placentário e deposição lipídica fetal-placentária. A proteção materna do excesso de inflamação levou a melhores resultados metabólicos na prole desses animais (HEERWAGEN *et al.*, 2013).

O EPA e DHA têm ações antioxidantes, antiinflamatórias, antitrombóticas e anti-arritmogênicas que podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (WANG *et al.*, 2016) e melhorar os níveis de triglicerídeos (PIEPOLI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016), metabolismo da glicose e função endotelial (ALFADDAGH *et al.*, 2017). O consumo de ω -3 tem sido associado à redução do risco de doença cardiovascular e mortalidade (HARRIS *et al.*, 2018). No entanto, os mecanismos subjacentes ainda não estão esclarecidos. Não se sabe ao certo se o efeito cardioprotetor é exercido pelo ácido α -linolênico ou pelos produtos metabólicos eicosanoides. Embora, o DHA pareça ser mais eficaz na diminuição da pressão arterial quando comparado ao EPA (MORI *et al.*, 2000). Um estudo com EPA e DHA em células endoteliais da aorta humana com dano de DNA induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), demonstraram que este reduziram significativamente as espécies reativas de oxigênio intracelular em condições basais e a estimulação por H_2O_2 . Os níveis de RNAm de moléculas antioxidantes, como heme oxigenase-1, tioredoxina redutase 1, cadeia leve de ferritina, cadeia pesada de ferritina e o superóxido dismutase de manganês, aumentaram significativamente com o EPA e o DHA (SAKAI *et al.*, 2017).

É verificado que o ômega 3 e seus derivados EPA e DHA, podem atuar na integridade do sistema imunológico, como citoprotetores, através da regulação positiva das enzimas antioxidantes e inibição da expressão gênica pró-inflamatória

(DOSSI *et al.*, 2014). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa podem regular a expressão de enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase e catalase) através da ativação do Fator 2 relacionado a NF-E2, por meio dos seus produtos de oxidação (VALENZUELA *et al.*, 2012).

Foi encontrado que a suplementação por gavagem com EPA e DHA em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica (60% da energia provindas dos lipídios) por 12 semanas após o desmame, melhorou os níveis de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α) e recuperou os níveis de GSH hepático e glutathione (VALENZUELA *et al.*, 2012). Outro estudo verificou que a suplementação de EPA em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica (32% de lipídios) aumentou a atividade de SOD e GSH, que foi encontrada reduzida no grupo que não recebeu a suplementação, com diminuição também dos níveis de glicose, insulina, colesterol total, transaminases, depósito de colesterol e triglicerídeos hepáticos (HIROTANI *et al.*, 2015).

Tem sido demonstrado que a ingestão de ácido α -linolênico 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). Em uma meta-análise, foi encontrada uma redução significativa nos níveis de pressão arterial (entre 2.0 a 3.4 mmHg) em pacientes hipertensos que consumiram 5,6 g de ácidos graxos ω -3 por dia (MORRIS, SACKS e ROSNER, 1993). Da mesma forma, outro estudo descobriu que a pressão arterial de hipertensos não-tratados reduziu entre 3,5-5,5 mmHg com o consumo diário de 3g de ácidos graxos ω -3 (APPEL *et al.*, 1993).

A suplementação em camundongos com óleos dietéticos de peixe, fonte de EPA e DHA podem diminuir a expressão gênica pró-inflamatória e aumentar a expressão anti-inflamatória e de adiponectina (IM, 2016). O ácido α -linolênico pode estimular a polarização M2 (aumento de macrófagos anti-inflamatórios) relacionada à desregulação de mediadores pró-inflamatórios em tecido adiposo inflamado de camundongos obesos (TITOS *et al.*, 2011). Em adição, ácido α -linolênico pode ser metabolizado em moléculas bioativas: resolvinas, protectinas e maresinas (PIROLA e FERRAZ, 2017). Essas moléculas não se assemelham aos eicosanóides

clássicos, são novas estruturas que funcionam exclusivamente através de alvos celulares e moleculares (BANNENBERG e SERHAN, 2010).

A resolvina D1 pode reduzir a produção de interferon- γ (IFN γ), elevando a expressão de arginase-1 (marcador de macrófagos M2), em macrófagos no tecido adiposo (TITOS *et al.*, 2011). A incubação de macrófagos em cultura com o mediador lipídico maresina R1 (MaR1) reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e citocinas pró-inflamatórias [IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ] e promoveu a regulação positiva da expressão do RNAm do receptor de manose tipo 1, marcador M2 (MARCON *et al.*, 2013). A função dos PUFAs como nutrientes benéficos ou agentes terapêuticos estão sendo investigados na prevenção e tratamento de obesidade, DM2 e numerosas doenças relacionadas à inflamação (IM, 2016).

A incorporação dos PUFAS ω 3 nos fosfolípidios de membrana pode alterar suas propriedades e interferir em várias proteínas de membrana, incluindo a supressão da sinalização 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). EPA e DHA 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 e SYLTE, 2008).

As gorduras poli-insaturadas podem reduzir a inflamação hipotalâmica induzida por uma dieta rica em ácidos graxos saturados, a partir da presença e função da resolvina produzida a partir de DHA, como mostra um estudo com camundongos. As enzimas envolvidas na síntese de resolvinas foram detectadas no hipotálamo e foram moduladas em resposta ao consumo de gorduras saturadas, causando uma redução da resolvina hipotalâmica. GPR18, o receptor para resolvina, que foi encontrado em neurônios POMC e NPY (Neuropeptídeo Y), também foi modulado por gorduras dietéticas. A substituição de gorduras saturadas por gorduras poli-insaturadas na dieta levou a um aumento de resolvina hipotalâmica, diminuição de massa corporal e melhora da tolerância à glicose. O tratamento intracerebroventricular com DHA obteve como resultado um aumento da expressão das enzimas sintéticas resolvinas e de citocinas anti-inflamatórias, adiposidade reduzida e um melhor fenótipo metabólico (PASCOAL *et al.*, 2017).

Quando administrados via dieta ou injeção diretamente no hipotálamo, em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica, os PUFAs (ômega-3), ácido α -linolênico foram capazes de aumentar a neurogênese hipotalâmica, grande parte da atividade neurogênica induzida por PUFAs levou um aumento do número de neurônios POMC, mas não de NPY. Sendo acompanhada por aumento da expressão do BDNF (*brain derived neurotrophic fator*) que induz a neurogênese e GPR40 (*G-protein-coupled receptor 40*) (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Demonstrando que os PUFAs (ômega-3) também estão relacionados com a neurogênese, através da ligação aos receptores GPR40 que são associados à neurogênese no hipotálamo e em outras regiões do cérebro (BONEVA NADEZHDA e YAMASHIMA, 2011).

Consumo excessivo de PUFAs ω -6 e uma razão ω -6/ ω -3 muito elevada são encontrados atualmente nas dietas ocidentais. Nas últimas décadas, houve um grande aumento da proporção ω -6/ ω -3 de 1:1 para 20:1 ou até mais atualmente (SIMOPOULOS, 2016). Isso está associado com o surgimento de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças inflamatórias e autoimunes (SCHULZE *et al.*, 2020), ao aumento importante na prevalência de sobrepeso e obesidade (SIMOPOULOS, 2016) Em contrapartida, níveis aumentados de PUFAs ω -3 e uma razão ω -6/ ω -3 mais baixa têm efeitos supressivos (SCHULZE *et al.*, 2020). Diante de todas essas evidências, decidimos então estudar o efeito do enriquecimento de ômega-3 em uma dieta materna com alto teor de ácidos graxos saturados sobre a saúde cardiometabólica da prole de ratos.

3 HIPÓTESE(S)

- As proles de ratos submetidas à dieta com alto teor em ácidos graxos saturados durante gestação e lactação apresentam dislipidemia, diminuição da sensibilidade à insulina e prejuízos em parâmetros cardiorrespiratórios, associados a uma diminuição da resposta antioxidante e uma maior expressão gênica de marcadores inflamatórios no fígado.
- O enriquecimento de ômega-3 à dieta com alto teor em ácidos graxos saturados durante gestação e lactação reduz os efeitos deletérios na prole causados pela dieta com alto teor em ácidos graxos saturados sobre o perfil metabólico e os parâmetros cardiorrespiratórios, bem como sobre a resposta antioxidante e inflamatória.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do enriquecimento de ômega-3 à dieta materna com alto teor em ácidos graxos saturados durante a gestação e lactação sobre o perfil metabólico, resposta antioxidante, expressão gênica de marcadores inflamatórios e os parâmetros cardiorrespiratórios da prole de ratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na prole de ratos provenientes de mães submetidas às dietas controle, hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos e hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados enriquecida com ômega-3 durante gestação e lactação:

- Analisar o consumo alimentar;
- Comparar medidas murinométricas durante o crescimento;
- Examinar o perfil bioquímico sérico em jejum;
- Analisar a tolerância à glicose, ao piruvato e a sensibilidade à insulina;
- Avaliar metabólitos relacionados ao estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes no fígado;
- Investigar a expressão gênica de enzimas antioxidantes e marcadores inflamatórios no fígado;
- Identificar os parâmetros ventilatórios;
- Avaliar os parâmetros cardiovasculares basais;

5 MÉTODOS

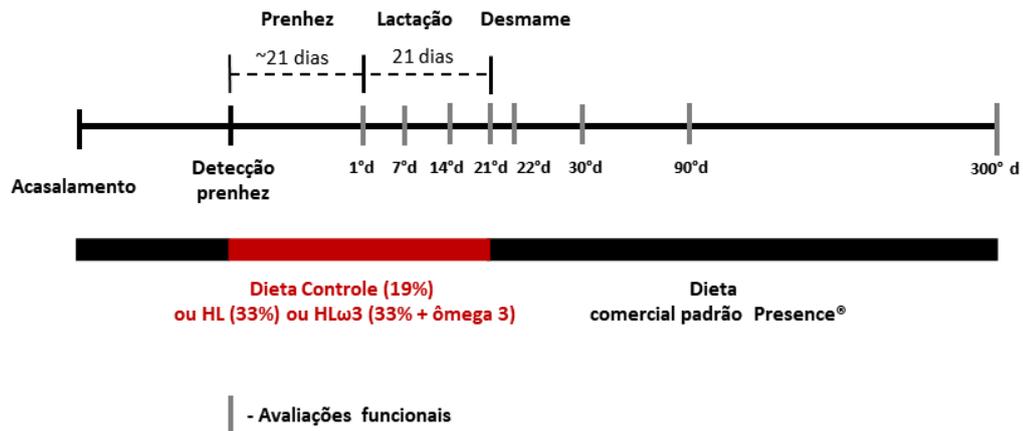
5.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Ratas albinas primíparas (n=30) da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) foram obtidas do biotério do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco. Aos 85 a 90 dias de vida e peso corporal compreendido entre 220 e 260 g, as ratas foram colocadas para acasalamento na proporção de 1:3 (macho:fêmea). A determinação da prenhez foi realizada a partir da observação da presença de espermatozóides 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 compostos os seguintes grupos: grupo dieta controle, C (n=10), grupo dieta hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados, HL (n=10); e grupo dieta hiperlipídica com alto teor em ácidos graxos saturados enriquecida com ômega-3, a partir do óleo de linhaça, HL ω 3 (n=10).

A temperatura e a umidade foram mantidas dentro dos limites de 22 a 24 °C e 55 a 65%, respectivamente, com 12h de claro e escuro (luzes acesas das 06:00 às 18:00h). A prole proveniente de cada fêmea foi reduzida a 8 ratos machos por ninhada. Nos casos da ninhada ter sido composta por menos de 8 ratos machos, ratas 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; HL n=27; HL ω 3 n=27). A figura 1 demonstra o desenho experimental, conforme os períodos das avaliações funcionais realizadas nos animais.

Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) de nº 23076.049500/2016-37 (Anexo A) e seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Figura 1 - Desenho experimental de acordo com o período de avaliação da prole de machos *Wistar* submetidos à dieta Controle (19% de lipídios), HL (33% de lipídios) e HL ω 3 (33% de lipídios enriquecida com ômega-3) durante a gestação e lactação. Um número equivalente a 30 ratas foram colocadas para acasalar e após a detecção da prenhez foram separadas em três grupos de acordo com a dieta consumida (controle, HL e HL ω 3), sendo submetidos a esta dieta até o desmame. Aos 21 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.



5.2 MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL

Para a manipulação nutricional foram definidas as seguintes dietas: grupo controle recebeu uma dieta padrão cuja composição estava de acordo com a AIN-93 (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) com 19% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 61% dos carboidratos; o grupo HL recebeu uma dieta com alto teor em ácidos graxos saturados adaptada a partir da composição da dieta utilizada no estudo de Ferro Cavalcante (FERRO CAVALCANTE, T. C. *et al.*, 2013), com 33% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 47% dos carboidratos; e o grupo HL ω 3 recebeu uma dieta com alto teor em ácidos graxos saturados, enriquecida com ômega-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 quilocalorias por grama e as dietas hiperlipídicas em torno de 4,5 quilocalorias por grama. As dietas hiperlipídicas apresentavam maior teor de ácidos graxos saturados e a dieta enriquecida com ômega-3 continha menor quantidade de ômega 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 (controle), prole das mães alimentadas com dieta hiperlipídica com alto teor

ácidos graxos saturados (HL) e prole das mães alimentadas com dieta hiperlipídica com alto teor de ácidos graxos saturados enriquecida com ômega-3 (HL ω 3).

Tabela 1 - Composição quanto aos ingredientes das dietas experimentais

Ingrediente/quantidade por 100g de dieta	AIN-93 G	Dieta hiperlipídica	Dieta Hiperlipídica enriquecida 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.

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		
	AIN-93G	Hiperlipídica	Hiperlipídica com ômega 3
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 procesos 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 Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular (Santos et al., 2013).

5.3 CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE

O consumo de 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. Foi utilizado para a pesagem da ração, uma balança semianalítica com

capacidade máxima de 5.000g e sensibilidade de 0,1g (GEHAKA®, São Paulo, Brasil). 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: $CEA = \frac{\text{ganho de peso no período avaliado}}{\text{consumo alimentar no mesmo período}}$. A quantidade de calorias consumidas bem como de macronutrientes foi obtida a partir da composição centesimal das dietas utilizadas.

5.4 MEDIDAS MURINOMÉTRICAS

Foram realizadas as medições murinométricas de 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).

5.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As proles aos 22, 30, 90 e 300 dias de vida foram submetidos ao jejum de 12 horas (*overnight*) e, em seguida, anestesiados com Ketamina (80mg/Kgi.p) e xilazina (10mg/Kgi.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.). Os parâmetros analisados foram: proteínas totais (PT), albumina (ALB), glicemia de jejum, triglicerídeos (TG), colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c). Os níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c) foram obtidos por cálculos de Friedwald (SPOSITO *et al.*, 2007).

5.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

Aos 90 e 300 dias de vida foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG) após um jejum de 6 horas, os animais foram separados em gaiolas individuais e o sangue foi coletado a partir de cortes nas extremidades da cauda do animal, sendo mensurado a glicemia basal no tempo 0 ou T0 (em duplicatas), e em seguida, foi administrada glicose a 20% (2mg/g de peso) através de gavagem e foi mensurada a glicose (em duplicata) após 15, 30, 60 e 120 minutos depois da administração da glicose (BARQUISSAU *et al.*, 2017).

5.7 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)

Aos 90 e 300 dias de vida foi realizado o teste de tolerância ao piruvato (TTP) após um jejum de 12 horas (*overnight*), os animais foram separados em gaiolas individuais. Em seguida, foi realizada a mensuração do nível basal de glicose no tempo 0 (T0), em duplicata, e injetado o piruvato de sódio a 50% (2g/kg de peso) por via intraperitoneal, sendo depois mensurada a glicemia (em duplicata) aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração do piruvato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, P2256) (BARQUISSAU *et al.*, 2017).

5.8 TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA (TSI)

Aos 90 e 300 dias de vida foi realizado o teste de sensibilidade à insulina (TSI) após um jejum de 6 horas, os animais foram separados em gaiolas individuais. Em seguida, foi realizada a mensuração do nível basal de glicose no tempo 0 (T0), em duplicata, e injetada a insulina (1 mU/g de peso) por via intraperitoneal, sendo depois mensurada a glicemia (em duplicata) aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração de insulina humana regular (HUMULIN R, 100UI/ml) (BARQUISSAU *et al.*, 2017).

5.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO

O estresse oxidativo foi avaliado no tecido hepático dos ratos, a partir de biomarcadores como malondialdeído (MDA), carbonilas, sulfidrilas e sistemas enzimáticos antioxidantes: catalase, superóxido dismutase e glutathione transferase e através da razão GSH, GSSG e GSH / GSSG. Aos 90 e 300 dias, cinco animais de cada grupo foram sacrificados por guilhotina após jejum de 6 horas no período claro (6h às 12h) para coleta do fígado. Uma alíquota de aproximadamente 1 g do órgão

foi armazenada em Eppendorf a -80°C até o preparo da amostra. As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de bioquímica geral, molecular e do exercício do Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

5.9.1 Preparo do homogeneizado do tecido hepático

O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 50 mM e EDTA 1mM, pH 7,4; com adição de ortovanadato de sódio 1 mM e PMSF 2 mM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1180xg, a 4°C , por 10 minutos e os sobrenadantes submetidos à quantificação protéica.

5.9.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorvância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/ml) foi utilizada como padrão.

5.9.3 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico

Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (BUEGE e AUST, 1978), sendo uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Adicionou-se a uma alíquota (300 μg proteína) do homogeneizado ao ácido tricloroacético (TCA) a 30%, o material foi centrifugado a 1180xg por 10 minutos, o sobrenadante retirado e adicionado ao ácido tiobarbitúrico a 0.73% que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada, utilizada para a leitura da absorvância a 535nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA), utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

5.9.4 Medida dos níveis de oxidação de proteínas (Carbonilas)

A avaliação da oxidação de proteínas dar-se através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por ZANATTA (ZANATTA et al., 2013). As proteínas (300µg) foram precipitadas em TCA a 30% seguido de centrifugação a 1180g por 15 minutos, o pellet foi ressuspensão e adicionado DNPH 10mM dissolvido em HCl 2.5 N e incubado em local livre de luz a temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA 20% foram centrifugadas e passaram por uma série de lavagens com tampão contendo acetato de etila e etanol, até o precipitado ser ressuspensão em cloridrato de guanidina e levado ao espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA) para leitura em um comprimento de onda de 370nm (37°C). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.9.5 Avaliação do conteúdo de sulfidril-SH

O conteúdo de sulfidril foi determinado a partir da reação com o composto DTNB (5,5'- dithiobis (2 nitrobenzoic acid) (ELLMAN, 1959). A alíquota do homogenato (300 µg de proteína) foi incubada no escuro após a adição de DTNB 10mM e o volume final foi de 1 mL completado com tampão de extração pH 7.4 e realizada a leitura com absorvância (30°C) a 412nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em M/mg de proteína.

5.9.6 Avaliação da atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade de SOD foi feita de acordo com Misra e Fridovich (MISRA e FRIDOVICH, 1972). O homogenato de fígado (80 µg de proteína) foi incubado no tampão carbonato de sódio (0,05 %, pH 10.2, 0.1 mM de EDTA) em banho-maria a 37°C, antes da avaliação da atividade enzimática. A reação teve início pela adição de 20 µM de epinefrina (150 mM), em ácido acético (0.05 %). A absorvância foi lida a 480nm por 3 min em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible,USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto-oxidação de 1µmol de epinefrina por minuto.

5.9.7 Avaliação da atividade enzimática da Catalase

A atividade da catalase foi monitorada de acordo com AEBI (1984). O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H_2O_2 , que nas nossas condições de temperatura e pH foi definido como 4.6×10^7 . Assim, 0,3M de H_2O_2 foi adicionado a amostra (80 μ g de proteína), seguido de adição do tampão fosfato 50mM, pH 7.0 a 20°C, a absorção de decaimento foi monitorada por 4 min a 240nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1984). Uma unidade de catalase foi definida como quantidade de proteína requerida para converter 1 μ mol de H_2O_2 em H_2O por minuto.

5.9.8 Avaliação da atividade enzimática da Glutathione S-Transferase

A atividade da glutathione S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil S glutathione), podendo desta forma ser medida por meio do monitoramento da taxa de formação do mesmo. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (80 μ g de proteína) ao tampão fosfato (0.1M) e EDTA (1mM), GSH (1mM) e CDNB (1mM). A absorbância (340nm) foi registrada por um período de aproximadamente 3 min com controle da temperatura (30°C), em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de 1 μ mol do composto DNP-SG por minuto (HABIG, PABST e JAKOBY, 1974).

5.9.9 Quantificação do balanço redox (razão GSH/GSSG)

A razão GSH/GSSG foi avaliada através da quantificação dos níveis de GSH e GSSG segundo o método de HISSIN e HILF (1976). Em tampão 0,1M fosfato contendo 5mM de EDTA (pH 8.0) foi adicionado 100 μ g do homogenato do fígado e o fluorescente orto-ftaldeído (1 μ M), e então incubado a temperatura ambiente, por 15 minutos e lido em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA), utilizando os comprimentos de onda de 350nm de excitação e 420nm de emissão. Para determinar os níveis de GSSG, a amostra foi incubada com 0.04M de N-ethylmaleimide por 30 minutos, seguido da adição de tampão NaOH a 0.1M. Quando os preparos estavam prontos, seguindo os mesmos passos de GSH foi

executado para determinar GSSG. O estado redox foi determinado pela relação GSH/GSSG (HISSIN e HILF, 1976).

5.10 Ensaios moleculares

5.10.1 Coleta dos tecidos

Aos 90 e 300 dias de vida, um grupo de animais que não passaram por procedimentos cirúrgicos foram eutanasiados por decapitação para coleta do fígado para a realização dos ensaios moleculares. Os presentes tecidos foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados em freezer -80°C para posterior realização das análises.

5.10.2 Extração de mRNA

O RNA total de cada amostra (fígado) foi extraído utilizando o reagente TRIzol™ Reagent (Ambion®) e clorofórmio hidratado com água DEPC, seguido de precipitação com isopropanol, lavagem com etanol a 70%, centrifugação e ressuspensão com H₂O DEPC, e posteriormente tratado com TURBODNAase (Ambion), com o objetivo de eliminar contaminantes de DNA genômico. A concentração e qualidade do RNA total foram determinadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000. As amostras de RNA foram quantificadas através de espectrofotometria ($\lambda = 260$ nm) e análise em gel de agarose 1% em comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).

5.10.3 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR foi realizada com o kit Quantitect SYBR™ Green RT-PCR (QIAGEN) e 100ng de RNA. Foi utilizado um controle negativo, com todos os reagentes do kit, porém sem RNA, com o objetivo de verificar uma possível contaminação dos reagentes. Cada amostra foi amplificada em um termociclador Applied Biosystems® 7500, software v.2.0.6, programado para uma etapa de síntese de cDNA, desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, e uma etapa final de 72°C por 10 min. onde foram utilizados os primers.

Todas as reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas em duplicata, no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Para cada reação foram usados: SYBR Green Master mix 1X, 0,2 µM de cada primer (Forward e Reverse), 0,2 U da enzima Transcriptase Reversa, 5 µl de cada amostra normalizada para 100 ng e H₂O para completar 25 µl de reação. A sequência dos primers que foram utilizados para a realização dos experimentos de RT-PCR do presente estudo encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3. Sequência de primers que foi utilizado para a realização do qRT-PCR.

Gene	Forward/ Reverse	Sequence 5' - 3'	T _m (°C)	Amplicon Size
Actb	F	CCTGACCCTGAAGTACCCCATG	60	205pb
	R	CATGGCTGGGGTGTGGAAGGTC		
SOD1	F	TGAAGAGAGGCATGTTGGAG	58	164pb
	R	CCACCTTTGCCCAAGTCATC		
SOD2	F	TCATGCAGCTGCACCACAGC	60	138pb
	R	CCATTGAACTTCAGTGCAGG		
IL-1β	F	CTCTCCACCTCAATGGACAG	60	181pb
	R	TTGGGATCCCACTCTCCAG		
TNF-α	F	CCAGACCCTCACACTCAGATC	58	78pb
	R	CTTGGTGGTTTGCTACGACG		

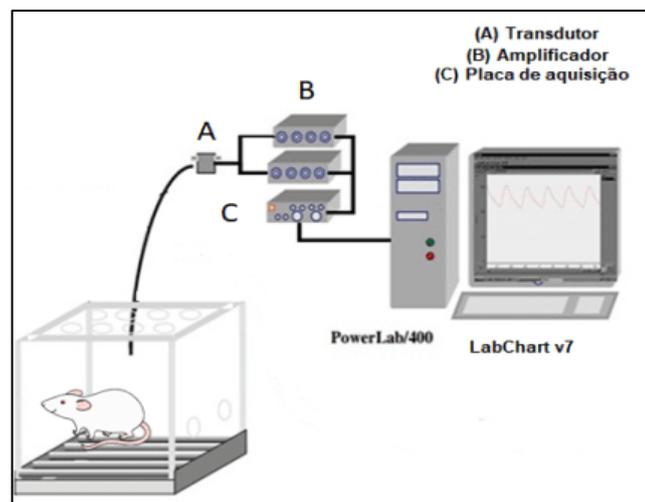
5.11 MEDIDAS DE VENTILAÇÃO PULMONAR

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (BARTLETT e TENNEY, 1970), no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º, 90º e 300º dia de vida da prole. Para aquisição dos sinais de ventilação os animais foram mantidos dentro de uma caixa pletismográfica de corpo inteiro. O volume dessa caixa foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa de acordo com a idade do animal. Para as idades de 1º e 7º dia de vida era utilizado uma caixa pletismográfica de 1 L e para as idades de 14º, 21º e 30º, 90º e 300º dia de vida foi utilizado uma caixa de 5 L.

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), como demonstrado na figura 2. A calibração do volume de ar foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar de 0.1 mL para a caixa de 1 L e 1 mL para a caixa de 5 L dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada. Três variáveis respiratórias foram medidas: a frequência respiratória (f), o volume corrente (GOUBAU *et al.*) e a ventilação pulmonar (VE) (MALAN, 1973).

Figura 2 - Desenho esquemático da pletismografia de corpo inteiro de um animal, adaptado de Penintente *et al.*, 2007. 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 para a placa de aquisição e análise dos dados (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments).



Fonte: Adaptado de Penintente *et al.* (2007).

5.12 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTE DE CATETER EM ARTÉRIA FEMORAL

Na idade de 90 dias de vida, metade dos animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), e em seguida, foi realizada uma cirurgia para inserção de um cateter de polietileno na artéria femoral, para registro da pressão arterial, como descrito por De-Brito-Alves *et al.* (2015). A outra metade dos animais foi submetida a esse mesmo procedimento cirúrgico na idade de 300 dias. O cateter foi exteriorizado subcutaneamente até a altura do pescoço para facilitar a conexão dele ao transdutor de pressão. Após a cirurgia, os animais

receberam uma dose de cetoprofeno (5 mg/kg ip, anti-inflamatório). O registro da PA e da frequência cardíaca (FC) foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico em animais não anestesiados por meio da conexão do cateter 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 vers. 8, 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.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm epm (erro padrão da média). A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de *Kolmogorov-Sminov*. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste *ANOVA one-way* e *ANOVA two-way* (para os testes de tolerância à glicose, teste de tolerância ao piruvato e teste de tolerância à insulina), seguido do pós-teste de *Bonferroni*. Os dados foram analisados no programa Graph Pad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.0, 2007). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CONSUMO ALIMENTAR DA PROLE

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 4). No período de 22 a 30 dias, o grupo HL apresentou menor consumo em gramas, calorias e macronutrientes quando comparados ao grupo C. Não houve diferença entre os grupos no valor do CEA. Na idade de 30 a 60 dias, não foi observada diferença no consumo entre os grupos, porém a prole HLw3 apresentou valores de CEA maiores que o grupo C ($p < 0,05$), sem diferença na prole HL. Durante o período de 60 a 90, não foram encontradas diferenças nos valores de consumo e CEA entre os grupos. No entanto, entre 90 e 300 dias o consumo alimentar e as calorias foram menores no grupo HL quando comparado ao C e o consumo do grupo HLw3 foi maior que o HL ($p < 0,05$).

Tabela 4. 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 (HL) e Hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HLw3) durante a gestação e lactação.

Período/ Nutriente	Grupo		
	C M±EPM	HL M±EPM	HLw3 M±EPM
22 a 30 dias			
Consumo (g)	110,7 ± 1,3	100,8 ± 1,8 [*]	106,8 ± 1,0
Calorias (Kcal)	380,8 ± 4,6	346,8 ± 6,1 [*]	367,5 ± 3,5
Proteínas (g)	28,0 ± 0,3	25,5 ± 0,4 [*]	27,1 ± 0,6
Carboidratos (g)	60,3 ± 0,7	55,0 ± 0,9 [*]	58,2 ± 0,5
Lipídios (g)	3,01 ± 0,03	2,72 ± 0,05 [*]	2,95 ± 0,02
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,4 ± 0,009	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01
30 a 60 dias			
Consumo (g)	727,5 ± 9,5	734,9 ± 16,9	741,2 ± 7,1
Calorias (Kcal)	2503,0 ± 32,9	2528,0 ± 58,0	2550,0 ± 24,5
Proteínas (g)	184,6 ± 2,4	186,5 ± 4,3	191,5 ± 1,8
Carboidratos (g)	396,9 ± 5,2	400,9 ± 9,2	404,4 ± 3,8
Lipídios (g)	20,1 ± 0,3	20,3 ± 0,4	20,5 ± 0,2
Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,2 ± 0,009	0,2 ± 0,006	0,3 ± 0,009 [*]

60 a 90 dias

Consumo (g)	618,6 ± 30,7	597,6 ± 14,1	614,9 ± 7,9
Calorias (Kcal)	2128,2 ± 105,5	2056,0 ± 48,6	2115,4 ± 27,5
Proteínas (g)	157,0 ± 7,8	151,7 ± 3,6	156,1 ± 2,0
Carboidratos (g)	337,5 ± 16,7	326,0 ± 7,7	335,5 ± 4,3
Lipídios (g)	17,1 ± 0,8	16,5 ± 0,4	17,0 ± 0,2
Coefficiente de eficiência alimentar (CEA)	0,1 ± 0,008	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,007

90 a 300 dias

Consumo (g)	10218 ± 5,7	8259 ± 2,7*	10611 ± 5,1#
Calorias (Kcal)	35149 ± 2,4	28410 ± 1,6*	36501 ± 2,3
Proteínas (g)	740,8 ± 0,3	607,0 ± 0,2	779,9 ± 0,3
Carboidratos (g)	1609,3 ± 0,5	1300,7 ± 0,3	1671,2 ± 0,4
Lipídios (g)	86,2 ± 0,1	69,71 ± 0,08	89,6 ± 0,1
Coefficiente 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, (HL, 33% de lipídios) ou hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HLw3, 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). * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HL.

6.2 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS MURINOMÉTRICAS

O grupo HL apresentou maior peso corporal com 1 dia de idade quando comparado ao C e HLw3 (Tabela 5). Os grupos HL e HLw3 apresentaram maior peso corporal no 7º (p<0,0001) e 14º (p<0,0001) dia. O grupo HLw3 apresentou maior peso corporal quando comparado aos demais grupos aos 21 dias (p = 0,002). Não foram encontradas diferenças entre os grupos aos 30, 90 e 300 dias.

Tanto o grupo HL quanto o HLw3 apresentaram circunferência abdominal maior no 1º dia de idade (p = 0,002) quando comparado ao C. Apenas o HL mostrou circunferência aumentada aos 7 dias (p = 0,005) e 14 dias (p = 0,0009) de idade. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos aos 21 dias de idade. Porém, o HL apresentou circunferência abdominal aumentada quando comparada aos outros grupos aos 30 dias (p = 0,004). Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos aos 90 e 300 dias de idade.

O grupo HL apresentou comprimento naso-anal aumentado em relação ao C e HLw3 com 1 dia (p = 0,004) e 7 dias (p<0,0001) de idade. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos aos 14 dias de idade. O comprimento naso-anal dos grupos HL e HLw3 foram maiores em relação a C aos 21 dias de idade (p <0,0001). No entanto, na prole HL, o comprimento naso-anal foi maior aos 30 dias de idade (p <0,0001)

quando comparado com os demais grupos. Os animais apresentaram crescimento corporal semelhante aos 90 e 300 dias de idade.

Quanto ao índice de Lee aos 90 e 300 dias, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos.

Tabela 5. Parâmetros murinométricos da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HL ω 3) durante a gestação e lactação.

Idade/ Variáveis	Grupos		
	C	HL	HL ω 3
	M \pm EPM	M \pm EPM	M \pm EPM
1º dia de vida			
Peso corporal (g)	6,5 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1 [*]	6,7 \pm 0,1 [#]
Circunferência abdominal (cm)	4,4 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1 [*]	4,5 \pm 0,1 [*]
Comprimento naso-anal (cm)	5,1 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1 [*]	5,2 \pm 0,1 [#]
7º dia de vida			
Peso corporal (g)	18,1 \pm 0,2	20,8 \pm 0,1 [*]	20 \pm 0,5 [*]
Circunferência abdominal (cm)	6,2 \pm 0,1	6,6 \pm 0,1 [*]	6,4 \pm 0,1
Comprimento naso-anal (cm)	7,1 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1 [*]	7,3 \pm 0,1 [#]
14º dia de vida			
Peso corporal (g)	32,2 \pm 0,3	34,7 \pm 0,5 [*]	36,1 \pm 0,6 [*]
Circunferência abdominal (cm)	8,1 \pm 0,1	8,4 \pm 0,1 [*]	8,3 \pm 0,1
Comprimento naso-anal (cm)	8,7 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	8,5 \pm 0,1
21º dia de vida			
Peso corporal (g)	53,9 \pm 0,6	54,3 \pm 0,8	57,6 \pm 0,7 [#]
Circunferência abdominal (cm)	10,2 \pm 0,1	10,2 \pm 0,1	10,1 \pm 0,1 [*]
Comprimento naso-anal (cm)	10,6 \pm 0,1	11,7 \pm 0,1 [*]	11,5 \pm 0,2
30º dia de vida			
Peso corporal (g)	93,3 \pm 2,4	97 \pm 2,3	100,2 \pm 2,6
Circunferência abdominal (cm)	12,0 \pm 0,1	12,7 \pm 0,2 [*]	11,8 \pm 0,2 [#]
Comprimento naso-anal (cm)	13,4 \pm 0,18	15,7 \pm 0,3 [*]	13,8 \pm 0,1 [#]
90º dia de vida			
Peso corporal (g)	370,1 \pm 6,6	358,1 \pm 4,3	380 \pm 7,1
Circunferência abdominal (cm)	19,2 \pm 0,3	18,6 \pm 0,3	19,9 \pm 0,3
Comprimento naso-anal (cm)	22,2 \pm 0,5	22,8 \pm 0,4	22,8 \pm 0,4
Índice Lee (g/cm ³)	0,32 \pm 0,007	0,31 \pm 0,005	0,32 \pm 0,005
300º dia de vida			
Peso corporal (g)	472,8 \pm 14,5	498,2 \pm 16,6	511,1 \pm 15,2
Circunferência abdominal (cm)	19,9 \pm 0,5	21,1 \pm 0,4	21,0 \pm 0,4
Comprimento naso-anal (cm)	24,5 \pm 1,1	26,21 \pm 0,3	25,6 \pm 1,0
Índice Lee (g/cm ³)	0,33 \pm 0,01	0,30 \pm 0,005	0,32 \pm 0,017

As proles de ratos foram separadas em três grupos de acordo com suas dietas dadas às mães durante a gestação e lactação: dieta controle, grupo C, (19% de lipídios) ou dieta hiperlipídica, grupo HL, com 33% de lipídios, ou dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3, grupo HL ω 3, com 3,5% de óleo de linhaça. 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). * p<0,05 vs. Controle; # p<0,05 vs. HL.

6.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROLE AOS 22, 30, 90, 300 DIAS DE VIDA

Aos 22 dias de idade (Tabela 6), não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de ALB, PT, HDL-c, LDL-c e AST entre os grupos. Em relação à GLI, apenas o HL apresentou níveis mais elevados ($p = 0,02$) quando comparado ao C. O HL também apresentou níveis séricos mais elevados de CT ($p = 0,003$), ALT ($p = 0,001$) e níveis mais baixos em relação à razão AST /ALT ($p = 0,004$) quando comparado aos demais grupos. O grupo HL ω 3, entretanto, apresentou níveis inferiores de TG ($p = 0,02$) e VLDL-c ($p = 0,01$) quando comparado ao grupo C.

Aos 30 dias de idade (Tabela 6), diferenças foram encontradas apenas nos níveis séricos de LDL-c, com o grupo HL apresentando níveis mais elevados ($p = 0,001$) quando comparado ao grupo C.

Aos 90 dias de idade (Tabela 6), não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de ALB, PT, HDL-c, LDL-c e ALT entre os grupos. Em relação ao GLI, o grupo HL apresentou níveis superiores ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais grupos. O HL também apresentou maiores níveis séricos de CT ($p = 0,01$), TG ($p = 0,02$) e VLDL-c ($p = 0,02$) em relação ao C. O grupo HL ω 3 apresentou níveis mais baixos de AST ($p = 0,0007$) e razão AST/ALT ($p = 0,0002$) quando comparada ao grupo C e HL.

Aos 300 dias de idade (Tabela 6), não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de GLI, PT, HDL-c, LDL-c e ALT entre os grupos. Em relação ao ALB, o HL apresentou níveis mais elevados ($p = 0,01$) quando comparado ao C. Tanto o grupo HL quanto o grupo HL ω 3 apresentaram níveis séricos mais elevados de CT ($p = 0,008$), TG ($p = 0,0002$) e VLDL-c ($p = 0,002$) quando comparado ao grupo C. E o grupo HL e HL ω 3 apresentaram menores níveis de AST ($p = 0,0001$) e razão AST / ALT ($p = 0,0001$) quando comparados ao C.

Tabela 6. Perfil bioquímico em jejum da prole de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 (HL ω 3) durante a gestação e lactação.

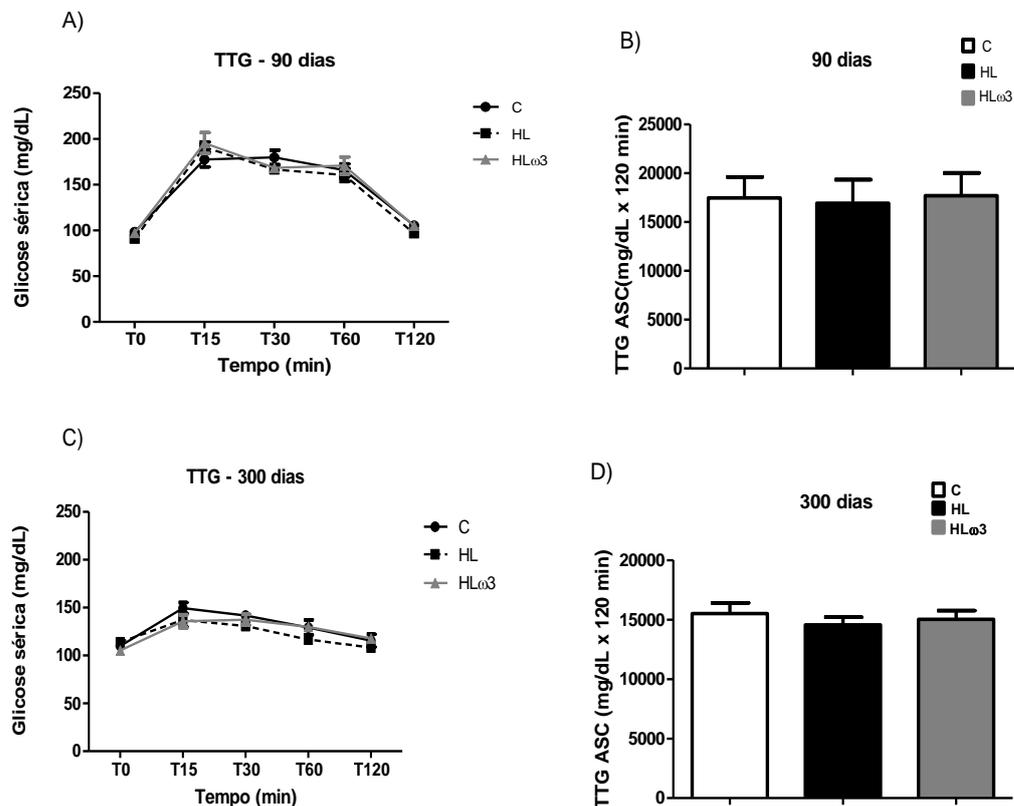
Idade/ Variáveis	Grupos		
	C	HL	HL ω 3
	M \pm EPM	M \pm EPM	M \pm EPM
22 dias de vida			
Albumina (g/dL)	4,0 \pm 0,02	4,1 \pm 0,01	4,1 \pm 0,02
Proteínas totais (g/dL)	5,2 \pm 0,02	5,2 \pm 0,03	5,2 \pm 0,03
Triglicerídeos (mg/dL)	138,5 \pm 6,1	124,2 \pm 6,8	116,3 \pm 4,2 [*]
Colesterol total (mg/dL)	116,4 \pm 1,6	126,8 \pm 3,04 [*]	117,3 \pm 2,1 [#]
HDL-c (mg/dL)	23,6 \pm 3,6	28,45 \pm 3,2	31,6 \pm 4,4
LDL-c (mg/dL)	51,2 \pm 7,5	63 \pm 9	61,3 \pm 6,6
VLDL-c (mg/dL)	28,4 \pm 1,4	24,8 \pm 1,3	23,2 \pm 0,8 [*]
Glicose (mg/dL)	108,6 \pm 3,3	119,3 \pm 3,3 [*]	117 \pm 1,5
ALT (U/L)	17,3 \pm 0,7	22,5 \pm 1,81	16,9 \pm 0,6 [#]
AST (U/L)	152,2 \pm 4,7	137,8 \pm 3,8	142,4 \pm 4,4
AST/ALT	8,5 \pm 0,7	5,5 \pm 0,8	8,6 \pm 0,4 [#]
30 dias de vida			
Albumina (g/dL)	4,2 \pm 0,02	4,1 \pm 0,03	4,2 \pm 0,03
Proteínas totais (g/dL)	5,3 \pm 0,03	5,3 \pm 0,03	5,4 \pm 0,05
Triglicerídeos (mg/dL)	162,5 \pm 11,4	151,6 \pm 10	183,5 \pm 15,1
Colesterol total (mg/dL)	119,9 \pm 2,1	123,4 \pm 2,6	125,5 \pm 2,9
HDL-c (mg/dL)	26,5 \pm 1,4	26,9 \pm 2,9	31,1 \pm 2,5
LDL-c (mg/dL)	64,7 \pm 2,8	78,7 \pm 3,9 [*]	60,3 \pm 2,5
VLDL (mg/dL)	28,7 \pm 2,6	22,3 \pm 2,7	24 \pm 3,8
Glicose (mg/dL)	90,5 \pm 5,1	88,4 \pm 3	100,5 \pm 4,3
ALT (U/L)	30,8 \pm 1,3	34 \pm 2,7	38,1 \pm 2,4
AST (U/L)	149 \pm 4,4	143,3 \pm 6,7	141,7 \pm 0,04
AST/ALT	4,9 \pm 0,3	4,4 \pm 0,6	3,8 \pm 0,4
90 dias de vida			
Albumina (g/dL)	4,4 \pm 0,03	4,5 \pm 0,04	4,4 \pm 0,04
Proteínas totais (g/dL)	5,3 \pm 0,04	5,1 \pm 0,1	5,2 \pm 0,09
Triglicerídeos (mg/dL)	96,9 \pm 1,8	110,3 \pm 1,5 [*]	108,5 \pm 4,4
Colesterol total (mg/dL)	80,8 \pm 1,5	87,2 \pm 1,5 [*]	82,7 \pm 1,6
HDL-c (mg/dL)	13,6 \pm 0,5	12,7 \pm 1	10,3 \pm 0,7
LDL-c (mg/dL)	47 \pm 1	52,2 \pm 2,9	46,3 \pm 3,5
VLDL (mg/dL)	19,3 \pm 0,3	22 \pm 1,1 [*]	21,7 \pm 0,8
Glicose (mg/dL)	120,8 \pm 3,1	142 \pm 3,6 [*]	126,3 \pm 2,9 [#]
ALT (U/L)	43,9 \pm 1,8	44 \pm 1,8	45,2 \pm 1,1
AST (U/L)	143 \pm 4,6	134,2 \pm 6,1	115 \pm 3,8 [#]
AST/ALT	3,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	2,5 \pm 0,08 ^{*#}
300 dias de vida			
Albumina (g/dL)	4,5 \pm 0,06	4,8 \pm 0,04 [*]	4,6 \pm 0,04
Proteínas (g/dL)	6,2 \pm 0,04	6,3 \pm 0,04	6,3 \pm 0,04
Triglicerídeos (mg/dL)	59,8 \pm 3,8	83 \pm 4,1 [*]	86,4 \pm 5,1 [*]
Colesterol total (mg/dL)	77,9 \pm 2,9	87,8 \pm 2,4 [*]	88,8 \pm 2,3
HDL-c (mg/dL)	52,3 \pm 6,2	54,5 \pm 6,5	58,9 \pm 3,9
LDL-c (mg/dL)	25,4 \pm 5,5	21 \pm 3,9 [*]	25,5 \pm 4 [*]
VLDL (mg/dL)	11,9 \pm 0,7	16,6 \pm 0,8 [*]	16,4 \pm 1,2 [*]
Glicose (mg/dL)	125,9 \pm 9,9	135,6 \pm 7,2	135,2 \pm 4,6
ALT (U/L)	55,2 \pm 3,4	52,9 \pm 7	62 \pm 4,7
AST (U/L)	175,4 \pm 7,7	139,4 \pm 9,2 [*]	114,9 \pm 5,1 [*]
AST/ALT	3,2 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2 [*]	1,9 \pm 0,1

As proles de ratos foram separados em três grupos de acordo com as dietas dadas às mães durante a gestação e lactação: dieta controle, grupo C, (19% de lipídios) ou dieta hiperlipídica, grupo HL, com 33% de lipídios, ou dieta hiperlipídica hiperlipídica enriquecida com ômega-3, grupo HL ω 3, com 3,5% de óleo de linhaça. 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). * $p < 0,05$ vs. C; # $p < 0,05$ vs. HL.

6.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

No teste de tolerância à glicose aos 90 e 300 dias de vida, conforme mostrado na figura 3A e 3C, não foram encontradas diferenças nos níveis de glicemia entre os grupos no tempo 0 (antes da administração de glicose), 15, 30, 60 e 120 minutos ($p > 0,05$) após a administração de glicose. Em relação à área sob a curva (ASC) para a glicose também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos aos 90 ($p = 0,9717$) (Fig. 3B) e 300 ($p = 0,6890$) (Fig. 3D) dias.

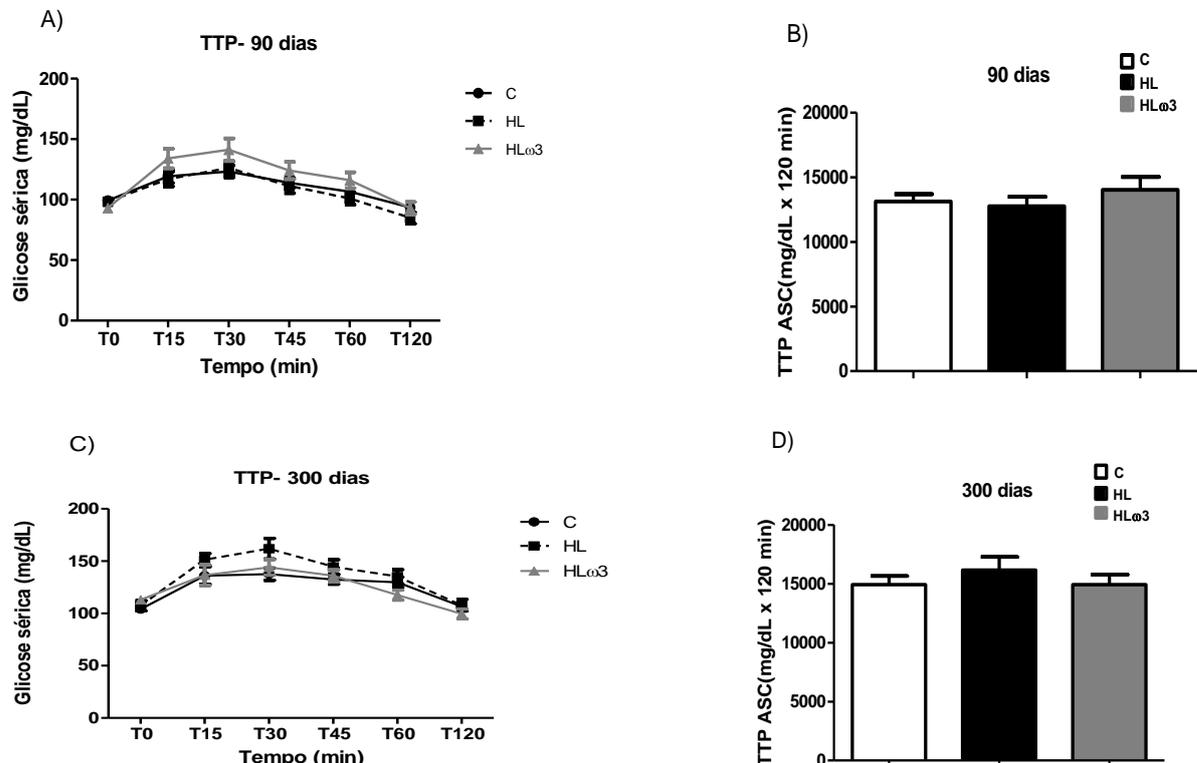
Figura 3. Teste de tolerância à glicose e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação. A glicose foi mensurada no tempo 0 antes da administração de glicose e nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose (gráficos A e C). A ASC para a glicose foi calculada pela regra trapezoidal (gráficos B e D). A linha ou barra preta representa o grupo controle, a linha tracejada ou barra preta representa o grupo HL e a linha ou barra cinza representa o grupo HL ω 3. Os valores foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA two-way (gráficos A e C) ou teste ANOVA one-way (gráficos B e D) seguido do pós-teste de *Bonferroni* ($n = 12-17$).



6.5 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

No teste de tolerância ao piruvato aos 90 e 300 dias de vida, conforme mostrado na figura 4A e 4B, nenhuma diferença na glicemia foi encontrada entre os grupos no tempo 0 (antes da administração do piruvato) e no tempo 15, 30, 45, 60 e 120 ($p > 0,05$) minutos após a administração de piruvato. Em relação à área sob a curva (ASC) para a glicose (Fig. 4B) também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos aos 90 ($p = 0,5157$) (Fig. 4B) e 300 ($p = 0,5562$) (Fig. 4D) dias.

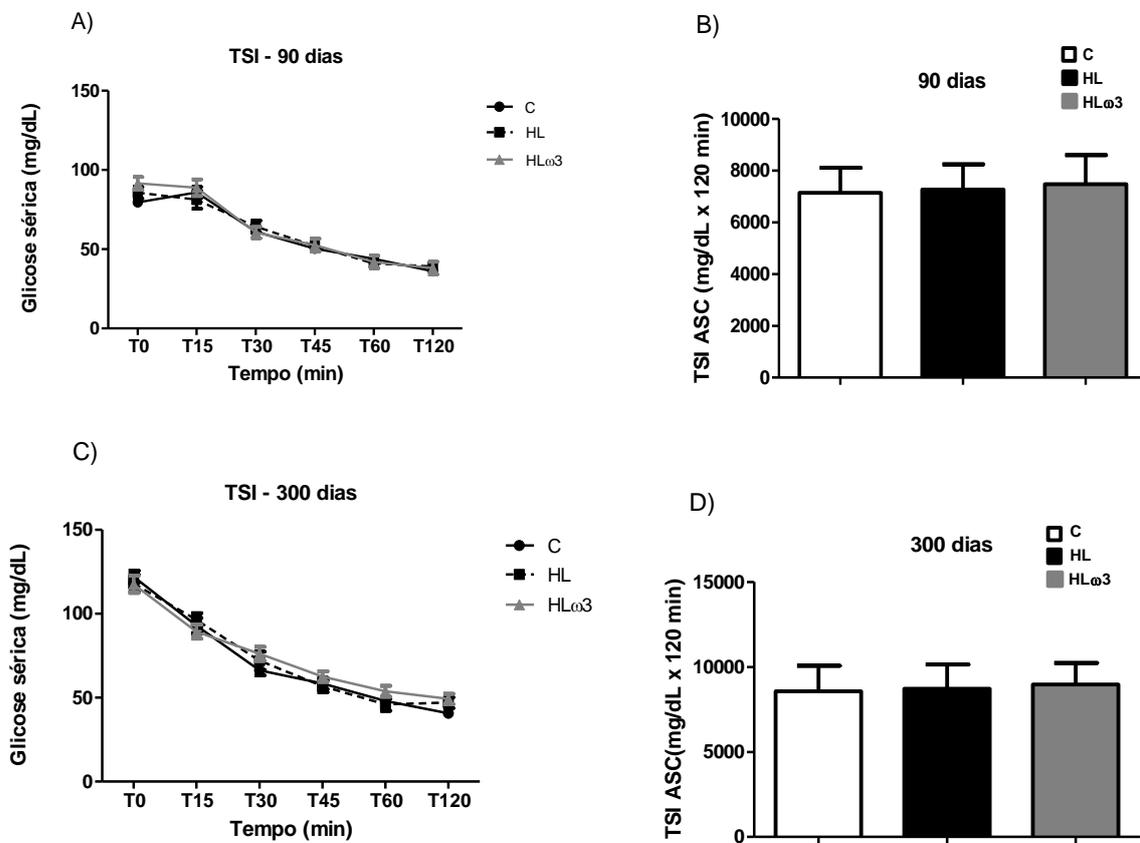
Figura 4. Teste de tolerância ao piruvato e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação. A glicose foi mensurada no tempo 0 antes da administração do piruvato e nos tempos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração do piruvato (gráficos A e C). A ASC para a glicose foi calculada pela regra trapezoidal (gráficos B e D). A linha ou barra preta representa o grupo controle, a linha tracejada ou barra preta representa o grupo HL e a linha ou barra cinza representa o grupo HL ω 3. Os valores foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA two-way (gráficos A e C) ou teste ANOVA one-way (gráficos B e D) seguido do pós-teste de *Bonferroni* ($n = 12-17$).



6.6 TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

Em relação ao teste de sensibilidade à insulina aos 90 e 300 dias de vida, conforme mostrado na figura 5A e 5B, não foram encontradas diferenças na glicemia entre os grupos no tempo 0 (antes da administração de insulina) e no tempo 15, 30, 45, 60 e 120 minutos ($p > 0,05$) após a administração de insulina. Em relação à área sob a curva (ASC) para a glicose também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos aos 90 ($p = 0,9737$) (Fig. 5B) e 300 ($p = 0,9789$) (Fig. 5D) dias.

Figura 5. Teste de sensibilidade à insulina e área sob a curva (ASC) para glicose aos 90 e 300 dias de proles cujas mães foram submetidas à dieta controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação. A glicose foi mensurada no tempo 0 antes da administração de insulina e nos tempos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a administração de insulina (gráficos A e C). A ASC para a glicose foi calculada pela regra trapezoidal (gráficos B e D). A linha ou barra preta representa o grupo controle, a linha tracejada ou barra preta representa o grupo HL e a linha ou barra cinza representa o grupo HL ω 3. Os valores foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA two-way (gráficos A e C) ou teste ANOVA one-way (gráficos B e D) seguido do pós-teste de *Bonferroni* ($n = 12-17$).



6.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE DO FÍGADO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

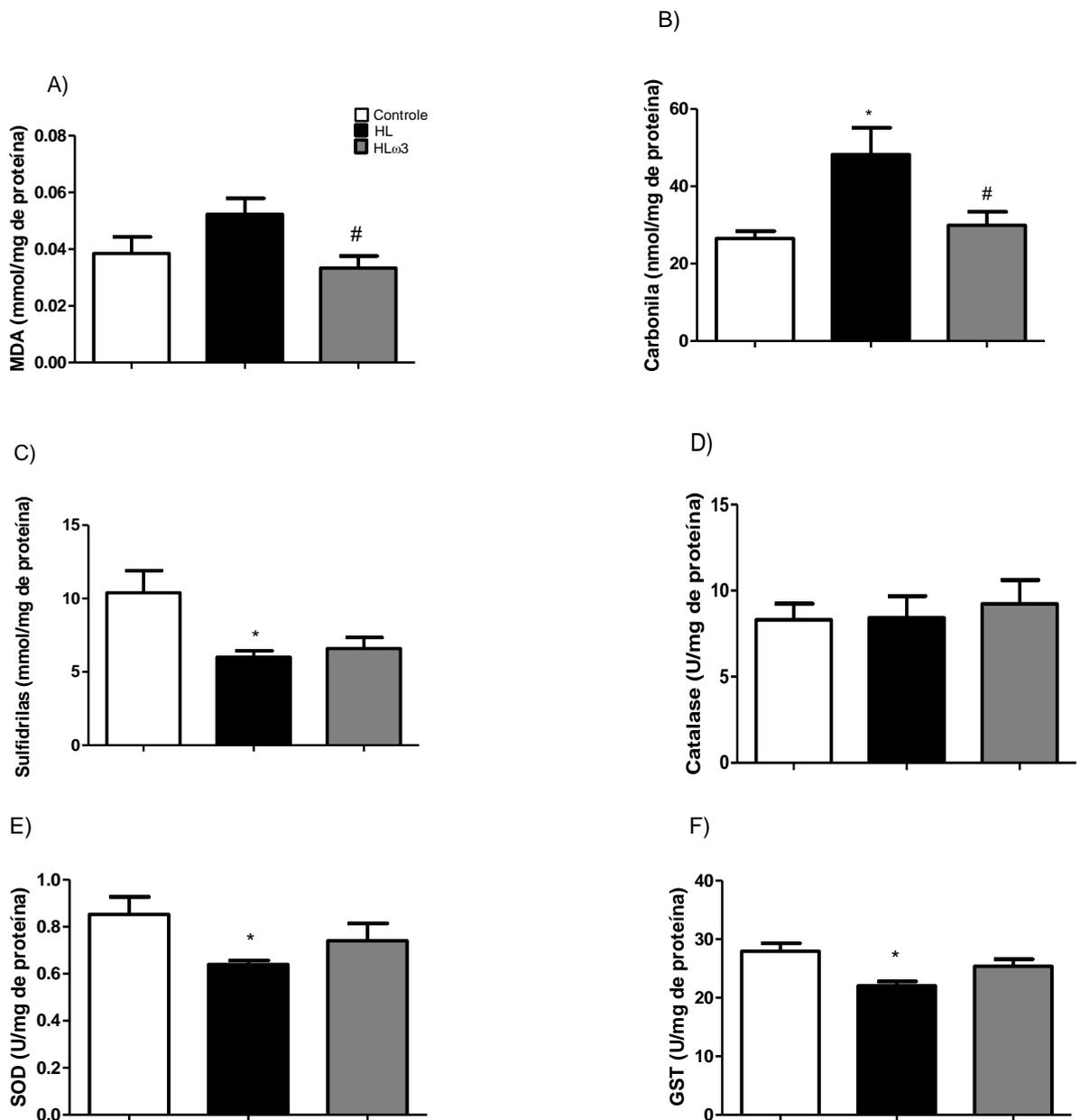
O estresse oxidativo foi avaliado no tecido hepático dos ratos aos 90 e 300 dias de vida, a partir de biomarcadores como malondialdeído (MDA), sulfidril e sistemas enzimáticos antioxidantes: catalase, superóxido dismutase e glutathione transferase e através de GSH, GSSG e relação GSH/GSSG (Fig 6).

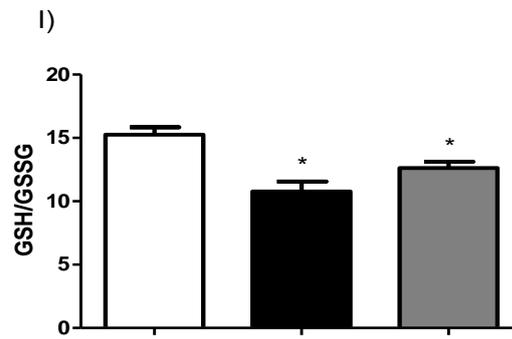
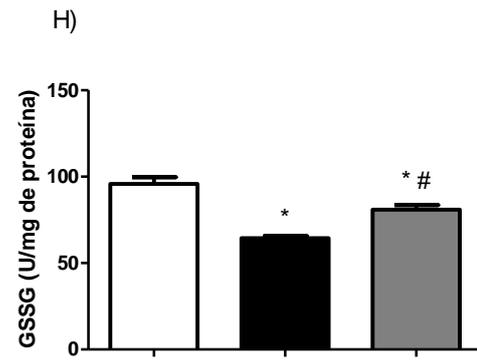
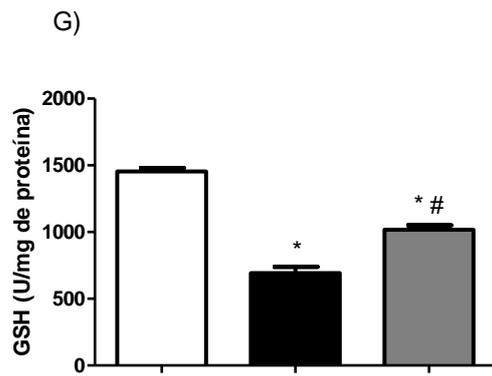
O grupo HL aos 90 dias apresentou níveis mais elevados de MDA quando comparado ao grupo HL ω 3 ($p = 0,0398$) (Fig 6A) e níveis mais altos de carbonila em relação aos demais grupos ($p = 0,0128$) (Fig 6B). Níveis mais baixos de sulfidril também foram encontrados no grupo HL quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0186$) (Fig 6C). Quanto aos sistemas enzimáticos, não foi observada diferença na atividade da catalase entre os grupos ($p = 0,8426$) (Fig 6D). No entanto, o grupo HL apresentou menor atividade de SOD em relação ao grupo controle ($p = 0,0225$) (Fig 6E) e GST ($p = 0,0095$) (Fig 8F). O grupo HL e HL ω 3 apresentaram níveis mais baixos quando comparado ao grupo controle de GSH ($p < 0,0001$) (Fig 6G) e GSSG ($p < 0,0001$) (Fig 6H) e o grupo HL ω 3 apresentou maiores níveis quando comparado ao grupo HL. Em relação à relação GSH/GSSG, os grupos HL e HL ω 3 apresentaram valores menores quando comparados ao grupo controle ($p = 0,0011$) (Fig 6I).

Aos 300 dias, o grupo HL apresentou níveis mais elevados de MDA ($p = 0,0003$) (Fig 6J) e de carbonila ($p = 0,0177$) (Fig 6K) quando comparado aos demais grupos. Níveis mais altos de sulfidril foram encontrados no grupo HL ω 3 quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0219$) (Fig 6L). Quanto aos sistemas enzimáticos, não foi observada diferença na atividade da catalase entre os grupos ($p = 0,6786$) (Fig 6M). No entanto, o grupo HL apresentou menor atividade de SOD em relação ao grupo HL ω 3 ($p = 0,0281$) (Fig 6N) e GST comparado aos demais grupos ($p = 0,0046$) (Fig 6O). Em relação aos níveis de GSH ($p = 0,8869$) (Fig 6P) e GSSG ($p = 0,1833$) (Fig 6Q) e razão GSH/GSSG, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,5041$) (Fig 6R).

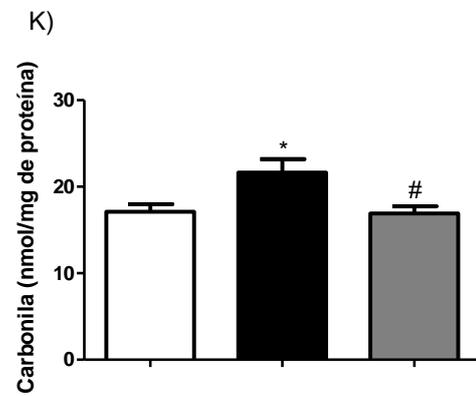
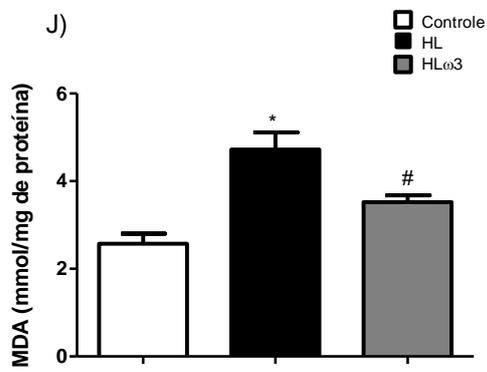
Figure 6. Avaliação do estresse oxidativo e da resposta antioxidante do fígado de ratos submetidos à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 e 300 dias de vida. Níveis de MDA (gráfico A e J), carbonila (gráfico B e K) sulfidrilas (gráfico C e L) e atividade enzimática antioxidante de catalase (gráfico D e M), SOD (gráfico E e N), GST (gráfico F e O), níveis de GSH (gráfico G e P), GSSG (gráfico H e Q) e razão GSH/GSSG (gráfico I e R), do fígado de ratos, com idade de 90 dias. Os ratos foram submetidos durante a gestação e lactação a dieta C, controle (19% lipídios) ou HL, hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios), ou HL ω 3, hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) enriquecida com ômega-3, de acordo com o grupo experimental. As barras brancas representam o grupo controle, as barras pretas o grupo HL e as barras cinza o grupo HL ω 3. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 5 - 6$).

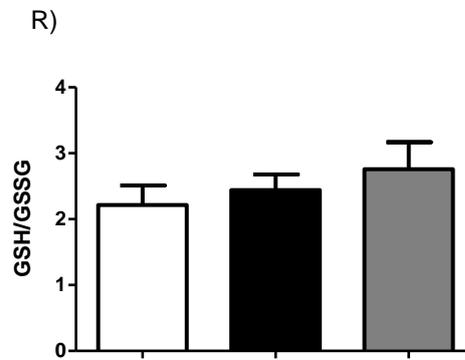
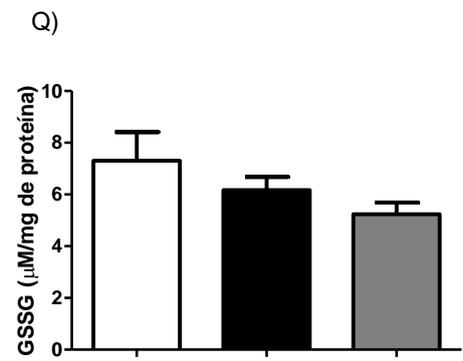
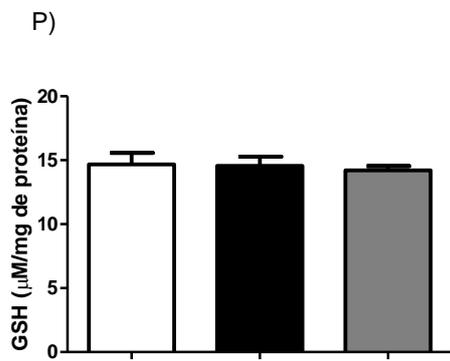
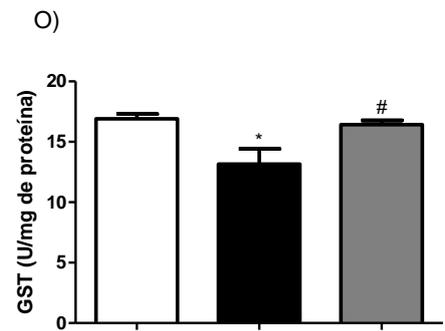
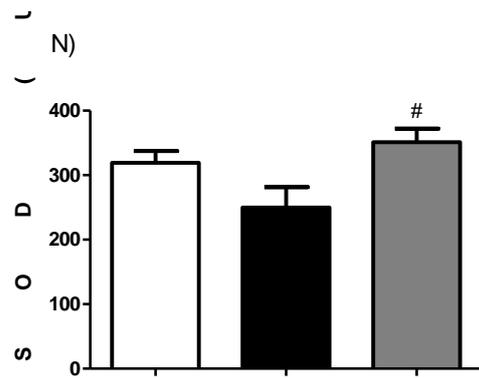
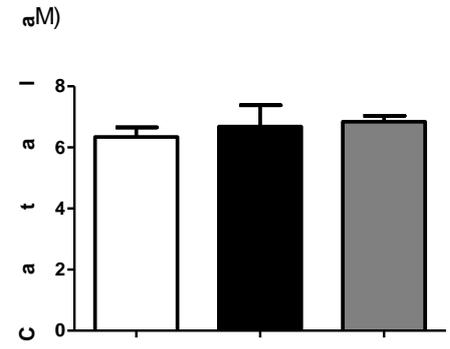
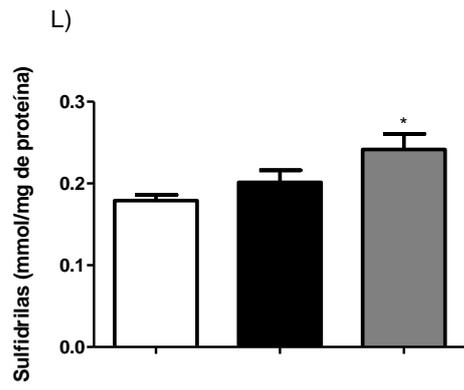
90 dias de vida





300 dias de vida





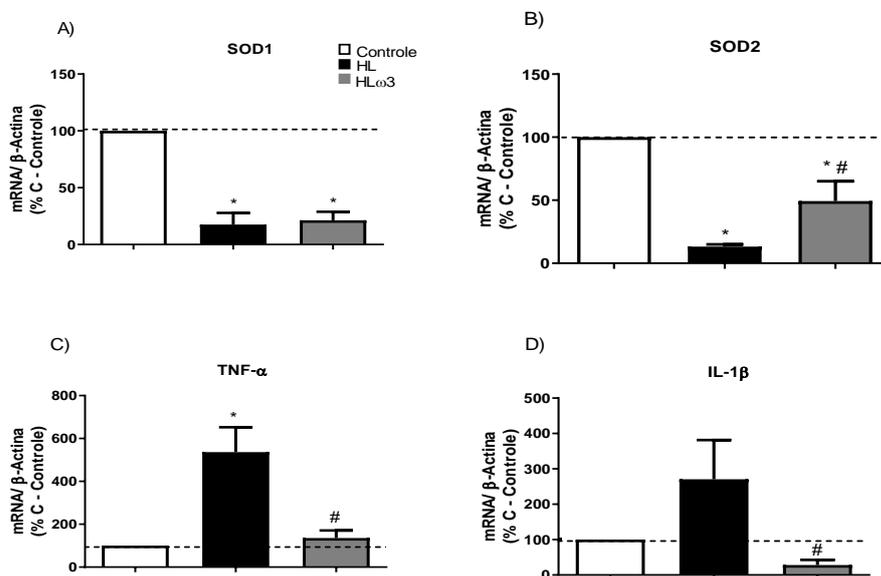
6.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO (qRT-PCR) DO FÍGADO AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

A prole HL e HL ω 3 aos 90 dias apresentaram uma diminuição da expressão de SOD1 ($p < 0,0001$) (Fig 7A) e SOD2 ($p = 0,0414$) (Fig 7B) comparado ao grupo controle, mas o grupo HL ω 3 apresentou maior expressão de SOD2 quando comparado ao HL. Em relação aos marcadores inflamatórios, houve um aumento da expressão de TNF- α (Fig 7C) ($p = 0,0016$) na prole HL quando comparado aos demais grupos e uma diminuição de IL-1 β (Fig 7D) ($p = 0,0212$) na prole HL ω 3 comparado ao HL.

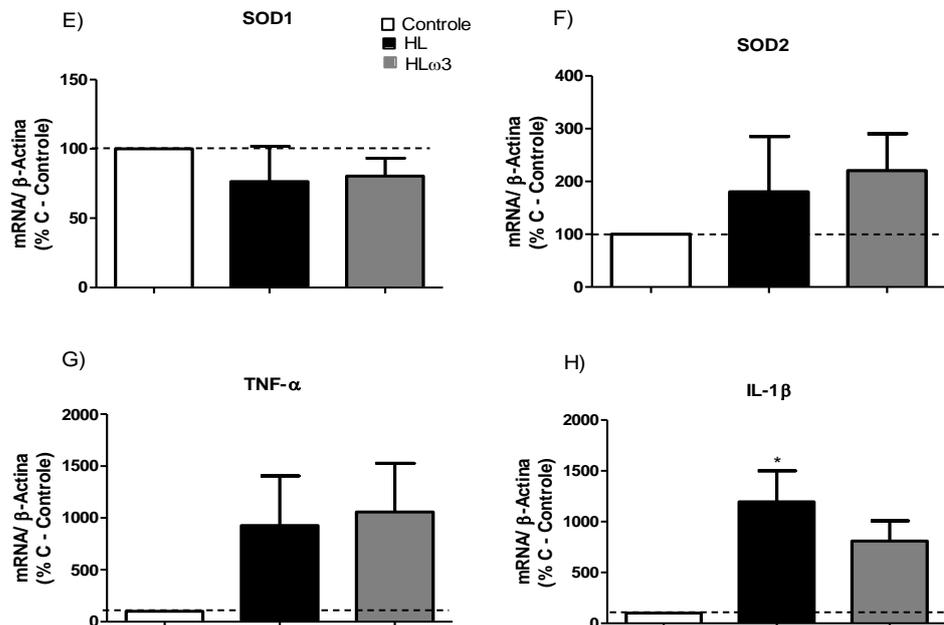
Aos 300 dias não foram encontradas diferenças nas expressões das enzimas antioxidantes SOD1 (Fig 7E) ($p > 0,05$) e SOD2 (Fig 7F) ($p > 0,05$). Na comparação dos marcadores inflamatórios, não houve diferença na expressão de TNF- α (Fig 7G) entre os grupos, mas houve um aumento na expressão de IL-1 β (Fig 7H) ($p = 0,0099$) no grupo HL em relação ao controle.

Figura 7. Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) do fígado de ratos submetidos à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 e 300 dias de vida. Expressão gênica de SOD1 (gráficos A e E), SOD2 (gráficos B e F), TNF- α (gráficos C e G) e IL-1 β (gráficos D e H) do fígado de ratos, com idade de 90 e 300 dias. Os ratos foram submetidos durante a gestação e lactação a dieta C, controle (19% lipídios) ou HL, hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios), ou HL ω 3, hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) enriquecida com ômega-3, de acordo com o grupo experimental. As barras brancas representam o grupo controle, as barras pretas o grupo HL e as barras cinza o grupo HL ω 3. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 5$).

90 dias de vida



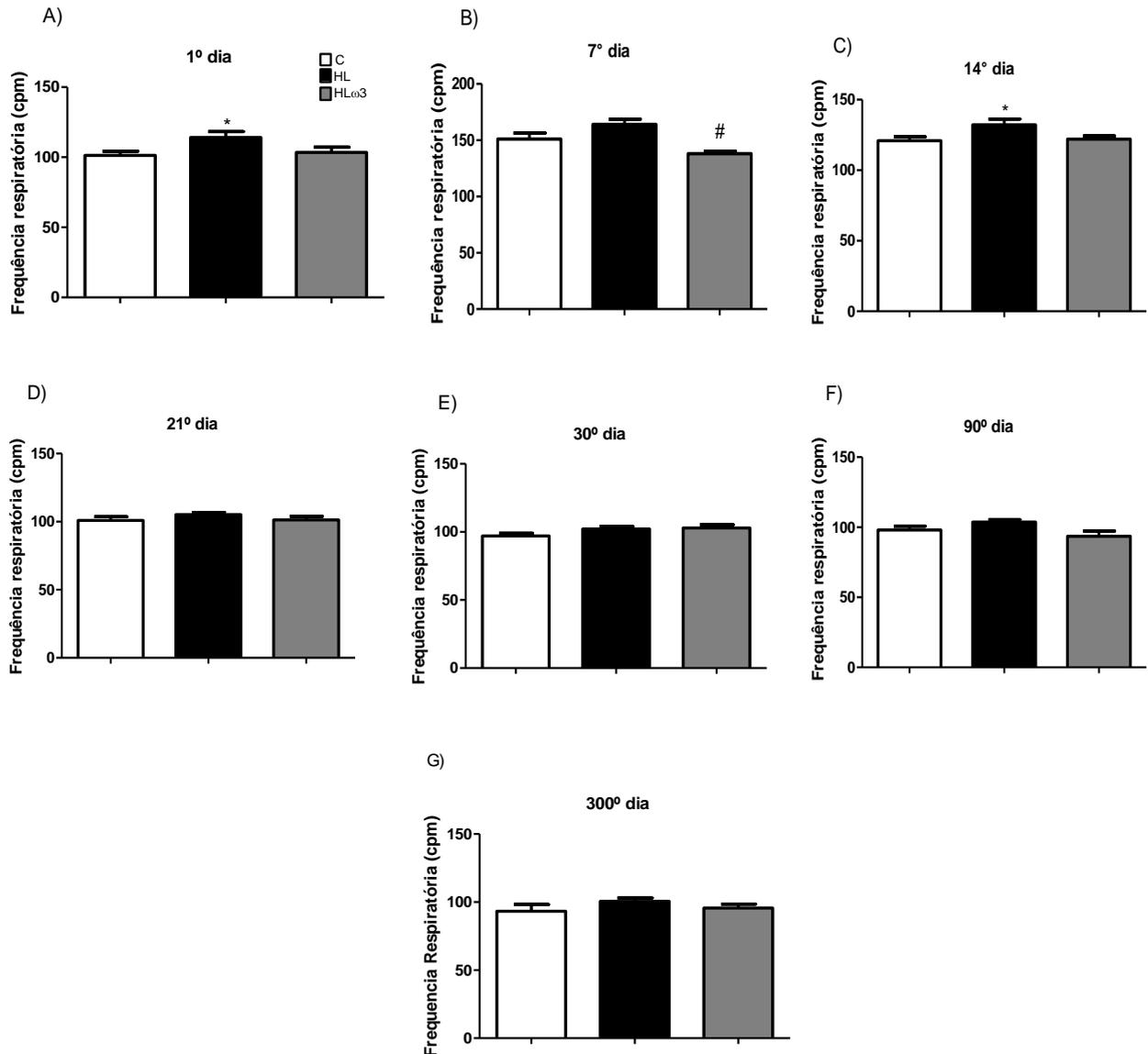
300 dias de vida



6.9 AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS VENTILATÓRIOS BASAIS

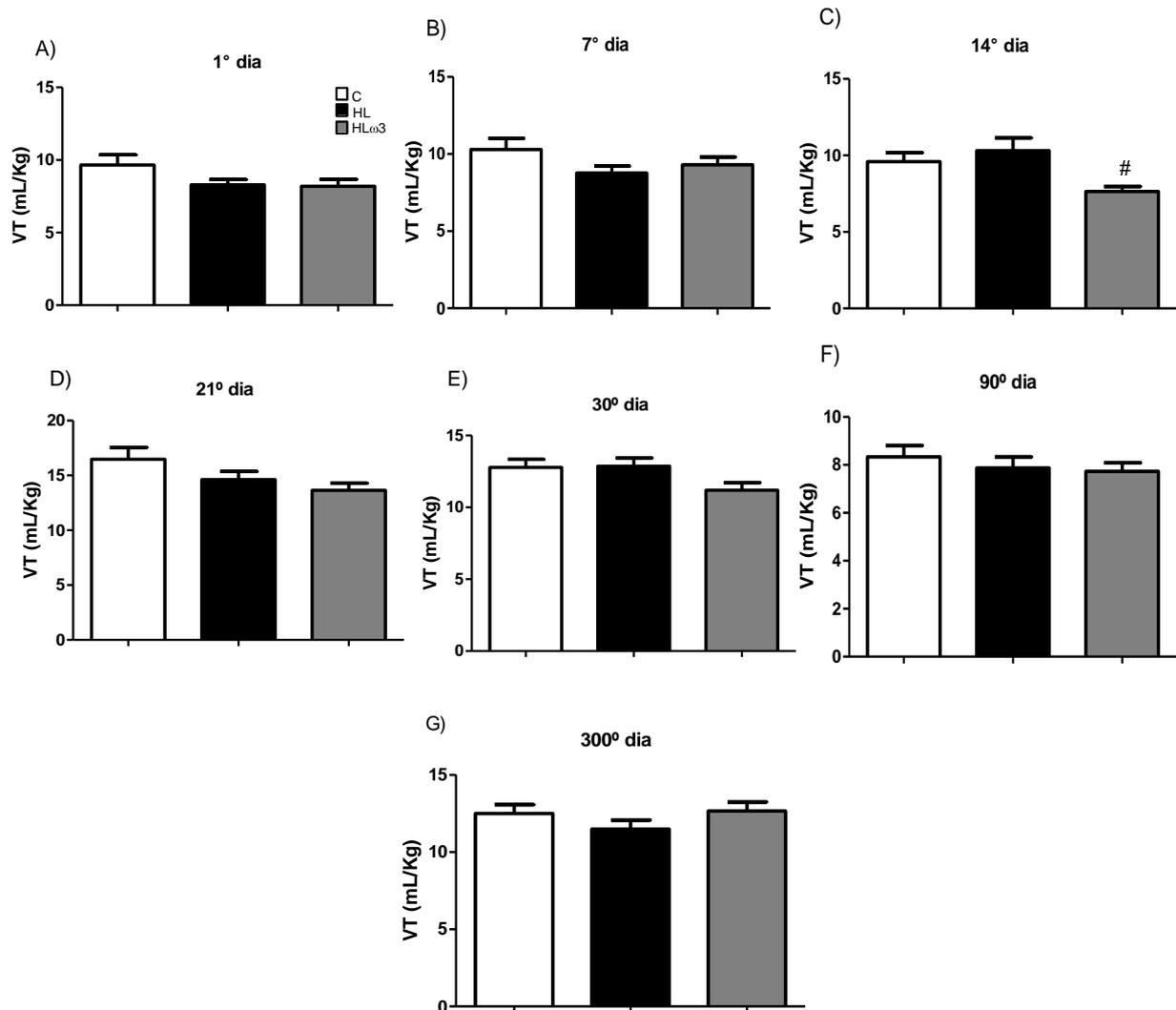
Os parâmetros respiratórios basais da prole foram analisados no 1^o, 7^o, 14^o, 21^o, 30^o, 90^o e 300^o dia de vida em relação à frequência respiratória (FR), obtendo-se também os valores de volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE). No 1^o dia de vida, o grupo HL apresentou maiores valores de FR em relação aos demais grupos ($p = 0,03$) (Fig. 8A). No 7^o dia, o grupo HLω3 teve um FR menor quando comparado ao grupo HL ($p < 0,001$) (Fig. 8B). No 14^o dia, o grupo HL apresentou valores de FR aumentados em comparação com o grupo controle ($p = 0,007$) (Fig. 8C). No entanto, não foram encontradas diferenças no FR entre os grupos no 21^o dia ($p = 0,42$) (Fig. 8D), 30^o ($p = 0,09$) (Fig. 8E), 90^o ($p = 0,07$) (Fig. 8F) e 300^o ($p = 0,38$) (Fig. 8G) dia de vida.

Figura 8. Avaliação da frequência respiratória no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º e 90º e 300º dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação. As ratas foram submetidas durante a gestação e lactação a dieta controle (19% lipídios), C, ou hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios), HL, ou hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) enriquecida com ômega-3, HL ω 3, de acordo com o grupo experimental. As barras brancas representam o grupo controle, as barras pretas o grupo HL e as barras cinza o grupo HL ω 3. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 12-17$).



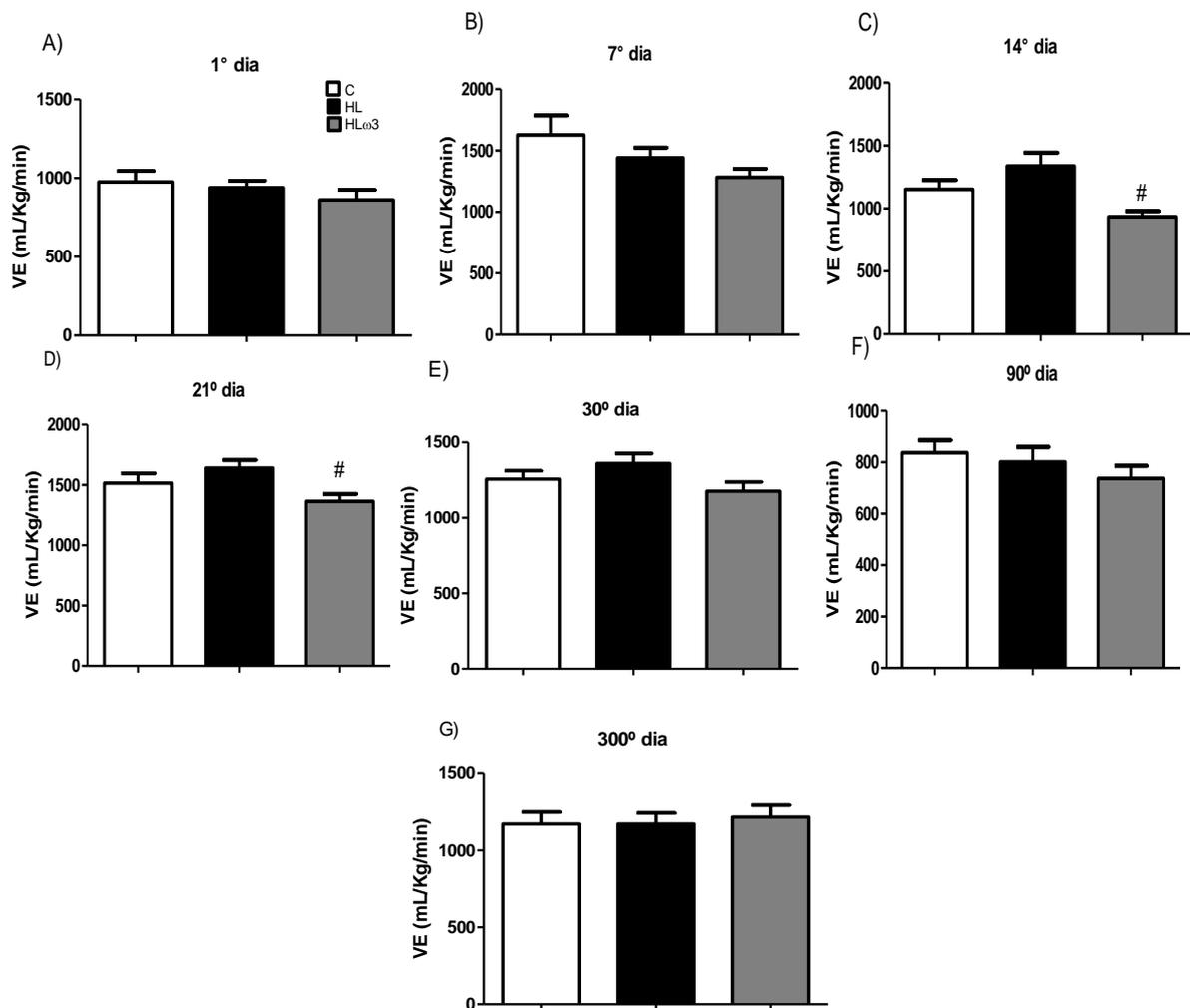
Em relação à análise de VT, não foi encontrada diferença significativa no 1º ($p = 0,09$) (Fig. 9A) e 7º ($p = 0,50$) (Fig. 9B) dia de vida. No 14º dia, o grupo HL ω 3 apresentou um menor VT quando comparado ao HL ($p = 0,007$) (Fig. 9C). Além disso, nenhuma diferença foi encontrada no 21º ($p = 0,13$) (Fig. 9D), 30º ($p = 0,08$) (Fig. 9E), 90º ($p = 0,61$) (Fig. 9F) e 300º ($p = 0,34$) (Fig. 9G) dia de vida.

Figura 9. Avaliação da ventilação corrente no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º e 90º e 300º dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação. As ratas foram submetidas durante a gestação e lactação a dieta controle (19% lipídios), C, ou hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios), HL, ou hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) enriquecida com ômega-3, HL ω 3, de acordo com o grupo experimental. As barras brancas representam o grupo controle, as barras pretas o grupo HL e as barras cinza o grupo HL ω 3. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 12-17$).



Na análise do VE, não foram encontradas diferenças entre os grupos do 1º ($p = 0,21$) (Fig. 10A) e 7º ($p = 0,42$) (Fig. 10B) dia de vida. No 14º dia de vida, menores valores de VE foram observados no grupo HL ω 3 quando comparado ao HL ($p = 0,001$) (Fig. 10C). Da mesma forma, no dia 21º o HL ω 3 também apresentou valores mais baixos quando comparado ao grupo HL ($p = 0,04$) (Fig. 10D). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas outras idades avaliadas, ou seja, 30º ($p = 0,07$) (Fig. 10E), 90º ($p = 0,43$) (Fig. 10F) e 300º ($p = 0,88$) (Fig. 10G) dia de vida.

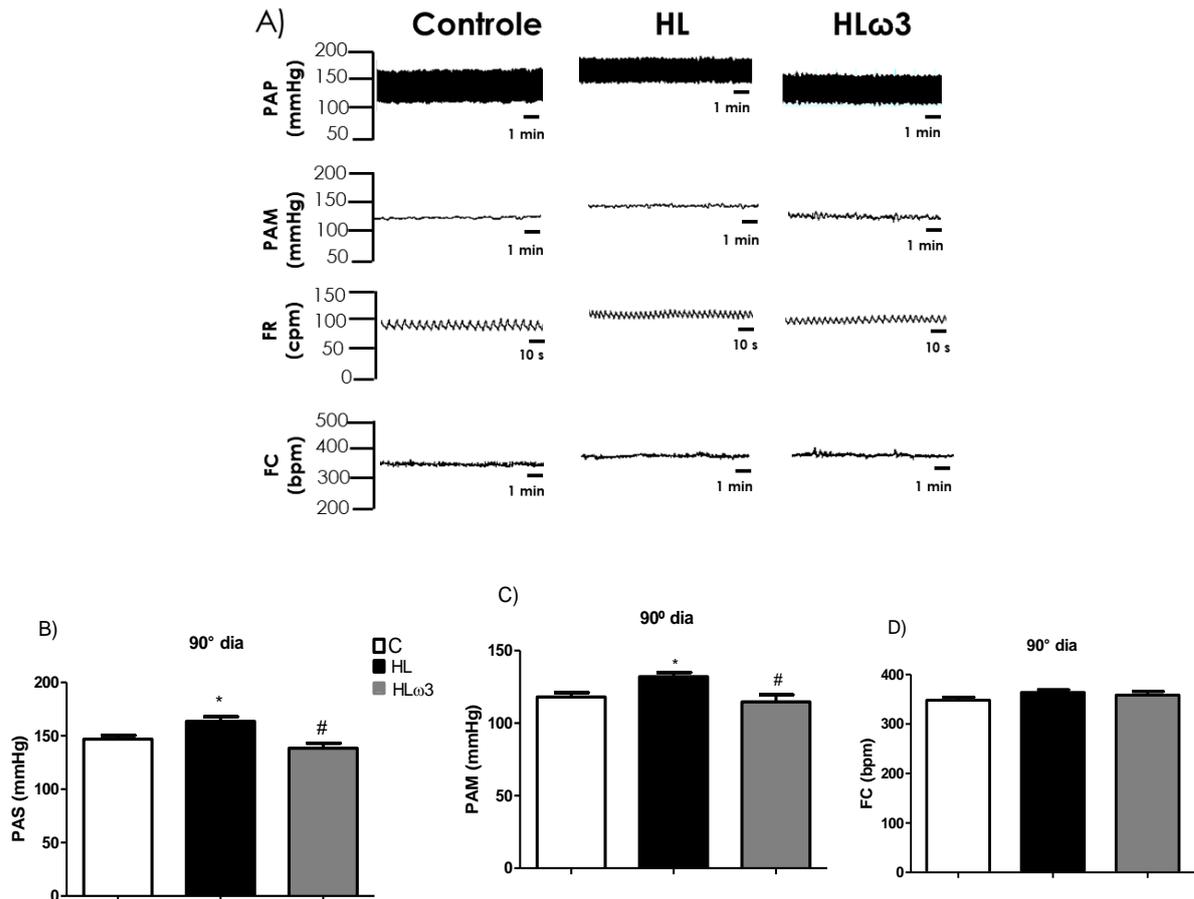
Figura 10. Avaliação da ventilação pulmonar no 1º, 7º, 14º, 21º, 30º e 90º e 300º dia de vida de proles cujas mães foram submetidas às dietas controle, HL e HL ω 3 durante a gestação e lactação. As ratas foram submetidas durante a gestação e lactação a dieta controle, C (19% lipídios) ou hiperlipídica, HL (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) ou hiperlipídica (rica em ácidos graxos saturados - 33% lipídios) enriquecida com ômega-3, HL ω 3, de acordo com o grupo experimental. As barras brancas representam o grupo controle, as barras pretas o grupo HL e as barras cinza o grupo HL ω 3. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 12-17$).



6.10 AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR AOS 90 E 300 DIAS DE VIDA

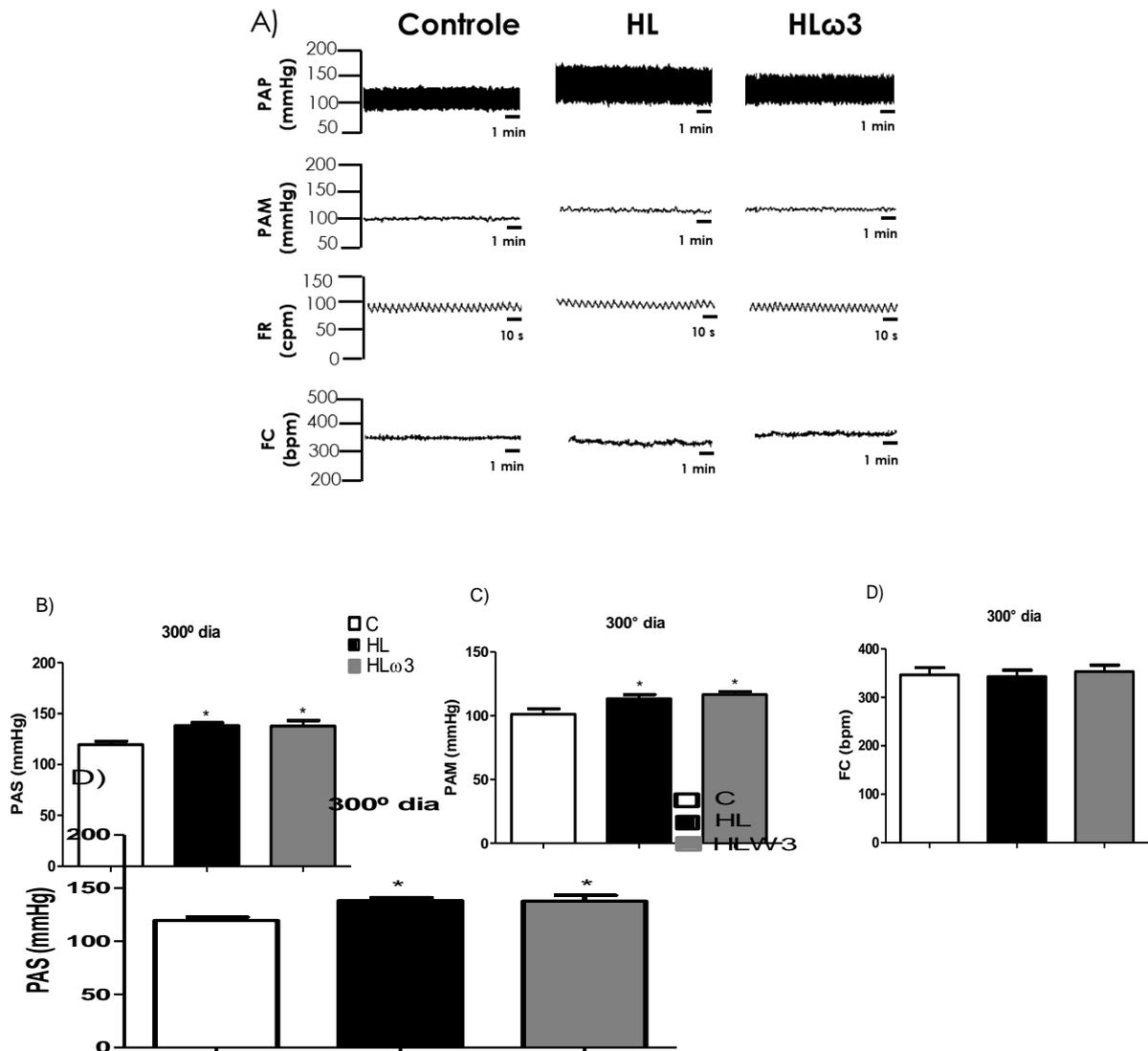
O grupo HL apresentou aos 90 dias de vida um aumento da pressão arterial sistólica (PAS) basal ($p = 0,0007$) (Fig 11B) e PAM ($p = 0,001$) (Fig 11C) quando comparado aos demais grupos, sem alterações na FC ($p = 0,144$) (Fig 11D).

Figura 11. Avaliações cardiovasculares basais da prole de ratas submetidas à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 90 dias de vida. Traçados representativos da pressão arterial pulsátil basal (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC) do grupo controle, HL e HL ω 3 (A). Valores da pressão arterial sistólica (PAS) (gráfico B), pressão arterial média (PAM) (gráfico C) e frequência cardíaca (FC) (gráfico D) no momento de repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HL, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HL ω 3, barras cinzas) aos 90 dias de vida. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 9-19$).



No entanto, aos 300 dias de vida, tanto o grupo HL quanto HL ω 3 apresentaram aumento da PAS ($p = 0,01$) (Fig 12A) e aumento da PAM ($p = 0,005$) (Fig 12B). Não foi encontrada diferença na FC ($p = 0,85$) (Fig 12C) entre os grupos.

Figura 12. Avaliações cardiovasculares basais da prole de ratas submetidas à dieta Controle, HL ou HL ω 3 durante a gestação e lactação aos 300 dias de vida. Traçados representativos da pressão arterial pulsátil basal (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC) do grupo controle, HL e HL ω 3 (A). Valores da pressão arterial sistólica (PAS) (gráfico B), pressão arterial média (PAM) (gráfico C) e frequência cardíaca (FC) (gráfico D) no momento de repouso do grupo Controle (barras brancas), Hiperlipídico (HL, barras pretas) e Hiperlipídico enriquecido com ômega-3 (HL ω 3, barras cinzas) aos 300 dias de vida. Os gráficos foram expressos como média \pm EPM, após o teste ANOVA one-way e pós-teste de *Bonferroni* (* $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. HL; $n = 9-19$).



7 DISCUSSÃO

Neste estudo, os parâmetros metabólicos da prole de ratos foram avaliados no início da vida, após a exposição perinatal às dietas experimentais e na idade adulta. Demonstramos que os ratos expostos a uma dieta materna com alto teor em AGS enriquecida com ω -3 mostraram considerável atenuação das consequências metabólicas adversas até o início da idade adulta, no entanto não houve diferenças observadas posteriormente a longo prazo.

O consumo materno diário em gramas durante a gestação não diferiu entre os grupos na nossa pesquisa. Os animais geralmente apresentam 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 dietas hiperlipídicas têm menor teor de carboidratos e maior teor de lipídios em comparação com a AIN-93. Isso contribuiu para a diminuição do consumo de carboidratos em mães alimentadas com dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3, bem como contribuiu para o maior consumo de lipídios entre os dois grupos em relação ao controle (FERRO CAVALCANTE, T. *et al.*, 2013).

Também neste estudo, as ratas prenhes alimentadas com dieta hiperlipídica também apresentaram maior consumo de lipídios na última semana de gestação em detrimento do consumo de carboidratos. Na avaliação do consumo alimentar das proles, foi observada menor ingestão alimentar na prole HL. Porém, alguns estudos encontraram maior consumo alimentar na prole de ratas submetidas à dieta HL durante a gestação e lactação. Animais submetidos à dieta HL podem apresentar uma alteração na sinalização das vias de saciedade com maior consumo calórico por meio da alimentação, mesmo após a ingestão de leite materno (DESAI *et al.*, 2014; KOJIMA, S., CATAVERO, C. e RINAMAN, L., 2016). No entanto, também é relatado que os animais que receberam dieta HL durante a prenhez apresentam menor ingestão alimentar em comparação com aqueles que receberam uma dieta normolipídica. Foi encontrada uma redução de 30% no consumo de dieta HL com maior teor de gordura saturada quando comparada à dieta padrão (CARVALHO *et al.*, 2013). 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).

Em concordância com um estudo anterior, o grupo HL apresentou aumento do peso corporal quando comparado ao C (KOJIMA, SAYURI, CATAVERO, CHRISTINA e RINAMAN, LINDA, 2016). Da mesma forma, o grupo HL ω 3 apresentou maior peso que o C na maioria das idades avaliadas. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que o aumento do consumo materno de ômega-3 durante a gestação não foi capaz de atenuar o aumento de peso corporal no início da vida das proles alimentadas com dieta rica em ácidos graxos saturados. Isso pode ser devido ao efeito sobrepujante dos ácidos graxos saturados, que foram relatados como associados ao aumento da massa corporal na prole (MENNITTI *et al.*, 2015). No início da vida, o grupo HL mostrou circunferência abdominal maior do que o C. Foi proposto que o consumo materno de dieta rica em ácidos graxos saturados leva ao aumento da gordura visceral na prole (VOLPATO *et al.*, 2012). No entanto, a partir do 7º dia de vida, o grupo HL ω 3 apresentou circunferência abdominal semelhante aos ratos do grupo controle nas idades avaliadas. Também foi demonstrado em animais que a suplementação materna de DHA durante a gestação e lactação reduz o tecido adiposo visceral e subcutâneo, que está associado ao risco de desenvolvimento de obesidade (BAGLEY *et al.*, 2013).

Nossos dados corroboram com outros estudos que utilizaram dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação e encontraram alterações metabólicas, como hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de colesterol total e LDL-c (VIDAL-SANTOS *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que o ômega-3 pode melhorar o perfil lipídico por meio da redução dos níveis de triglicerídeos, colesterol total e fração LDL-C (WADDELL, ZULKAFI e MARK, 2013). A expressão de PPAR através de ômega-3 é acompanhada por supressão de SREBP (*sterol regulatory element-binding proteins*), inibindo a lipogênese com redução na expressão de ácido graxo sintetase (*fatty acid synthase*, FAS) e acetil CoA carboxilase (*acetyl CoA carboxylase*, ACC), e conseqüentemente promovendo a diminuição nos níveis séricos de ácidos graxos, triacilgliceróis e VLDL (KHAIRE, KALE e JOSHI, 2015). Também reduz a expressão de enzimas envolvidas na síntese de colesterol e na síntese de triglicerídeos hepáticos, como fosfatase de ácido fosfatídico e diacilglicerol aciltransferase e aumento da expressão de lipase de lipoproteína para capturar

triglicerídeos circulantes de lipoproteína: VLDL e quilomícrons (BACKES *et al.*, 2016). Esses estudos podem justificar os melhores parâmetros lipídicos observados no grupo HLw3.

O consumo de dieta rica em gorduras saturadas aumenta a expressão gênica de *Scd1* (*stearoyl-CoA desaturase 1*) e *FadS2* (*fatty acid desaturase 2*) 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 (KAI *et al.*, 2017; TAIN *et al.*, 2017). Isso pode explicar os altos níveis de ALT no HL aos 22 dias de idade. Em contraste, a ingestão de ômega-3 reduz os níveis de transaminases, principalmente ALT em indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (HE *et al.*, 2016; YU, YUAN e WANG, 2017).

Porém, em nosso estudo aos 300 dias de vida, não foi encontrado melhora no perfil lipídico e nos níveis de transaminases hepáticas no grupo HLw3, quando comparado ao grupo HL. Uma disfunção do tecido adiposo é verificada com o envelhecimento, os mecanismos ainda não estão claros, mas a inflamação tem um papel importante. A inflamação sistêmica de baixo grau é comumente observada no envelhecimento, com aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa, capaz de levar à supressão da diferenciação dos adipócitos (LIO *et al.*, 2002; BARTLETT *et al.*, 2012). Uma diminuição é encontrada na atividade da CCAAT / *enhancer binding protein α* (C/EBP α) e do PPAR- γ que são responsáveis pelos processos de diferenciação e maturação de pré-adipócitos em adipócitos (WU *et al.*, 1999; ZUO, QIANG e FARMER, 2006) e aumento de supressores adipogênicos C/EBP- β -LIP e CHOP (C/EBP- *Homologous Protein*) (KARAGIANNIDES *et al.*, 2001; KARAGIANNIDES *et al.*, 2006). Como já visto anteriormente, o PPAR- γ também participa do metabolismo de lipídios (KHAIRE, KALE e JOSHI, 2015). Esses estudos podem justificar a sobreposição dos efeitos dos AGS sobre o enriquecimento de ômega-3 no perfil bioquímico lipídico do grupo HLw3 aos 300 dias de idade, sugerindo que o enriquecimento com ômega-3 foi capaz de atenuar os efeitos dos AGS até os 90 dias, não sendo capaz de atenuar em longo prazo, com o envelhecimento, como visto aos 300 dias de idade desses animais.

Neste estudo, o grupo HL apresentou maiores níveis de glicemia de jejum aos 22 e 90 dias. Além de seu papel hipolipemiante, a ingestão de ômega-3 está

associada ao aumento da sensibilidade à insulina, reduzida com a idade, conforme observado na prole de ratos (SARDINHA *et al.*, 2012). Estudos encontraram na prole de ratos adultos de mães que receberam dieta rica em ômega-3 um aumento no número de ilhotas pancreáticas, sem alterar o volume do pâncreas (SIEMELINK *et al.*, 2002).

A progressão da DM 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. Embora não tenhamos encontrado diferença nos testes TTG, TTP e TSI, nosso estudo verificou tendência de desenvolver DM2 no grupo HL. A hiperglicemia de jejum nesses animais pode fornecer evidências de disfunção das células beta (DAVIES *et al.*, 2000). Nesse caso, é possível que em uma idade mais avançada, um comprometimento da tolerância à glicose, piruvato e sensibilidade à insulina possa ser encontrado nesses animais. Porém, aos 300 dias de vida desses animais, não verificamos diferença entre os grupos nestes testes, nem nos parâmetros bioquímicos da glicemia de jejum, sugerindo que a dieta rica em AGS utilizada neste estudo não foi capaz de levar ao desenvolvimento de DM2 até essa idade avaliada.

O aumento dos níveis de MDA e carbonilas, associado com a diminuição de sulfidrilas no grupo HL, pode ser uma evidência de dano oxidativo. A diminuição dos níveis de MDA também está envolvido com a gordura visceral, por ser um preditor de peroxidação lipídica (LEE *et al.*, 2015), é considerado um indicador de dano celular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FRANÇA *et al.*, 2013). A melhor capacidade antioxidante que o grupo HL ω 3 apresentou em relação grupo HL, com normalização da atividade da SOD e GST corrobora também com o estudo de Ramaiyan *et al.* (2016) que encontraram uma melhora na atividade antioxidante no tecido hepático da prole de mães submetidas a dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3.

Esse aumento de biomarcadores do estresse oxidativo, em conjunto com a diminuição da expressão das enzimas antioxidantes (SOD1 e SOD2) e com o aumento da expressão de marcadores inflamatórios no grupo HL aos 90 dias, pode ser um indicativo também do desenvolvimento ou risco de esteato-hepatite não alcoólica (NASH). A DHGNA tem como fatores de risco níveis plasmáticos elevados de TGL, LDL e HDL reduzido, pressão alta e hiperglicemia em jejum (ALBERTI, ZIMMET e SHAW, 2005) (JUMP *et al.*, 2015) e pode progredir a NASH, que é

definida como hepatoesteatose com inflamação e lesão hepática (CHALASANI *et al.*, 2012; GARCIA-JARAMILLO *et al.*, 2019). O estresse oxidativo hepático também aumenta com a NASH (DEPNER, PHILBRICK e JUMP, 2013).

A NASH está associada a um grande enriquecimento do plasma e do fígado com AGS e depleção de PUFAs ω -3 hepáticos (DEPNER, C. M. *et al.*, 2012; DEPNER, PHILBRICK e JUMP, 2013; DEPNER *et al.*, 2013). O desenvolvimento desse fenótipo (NASH) foi atribuído a uma dieta rica em gordura saturada, *trans*, sacarose e colesterol (WOUTERS *et al.*, 2008; DEPNER, C. *et al.*, 2012; NOMURA e YAMANOUCHI, 2012; TERATANI *et al.*, 2012; DEPNER, PHILBRICK e JUMP, 2013; WALENBERGH *et al.*, 2013). No entanto, o aumento da expressão de SOD2 e a diminuição de marcadores inflamatórios no grupo HL ω 3 em relação ao HL, demonstra o efeito antioxidante e antiinflamatório do ômega-3. Diversos estudos demonstram que dietas suplementadas com óleo de peixe, EPA ou DHA previnem NASH induzida por dieta rica em gordura em graus variados (DEPNER, PHILBRICK e JUMP, 2013; DEPNER *et al.*, 2013; JUMP, TRIPATHY e DEPNER, 2013).

A inflamação sistêmica é o principal fator de NASH. A suplementação de dieta ocidentalizada com EPA ou DHA em camundongos não atenuou a endotoxemia induzida por dieta ocidentalizada em longo prazo (DEPNER *et al.*, 2013). No entanto, apesar da ausência do efeito do ômega-3 em marcadores de inflamação sistêmica em longo prazo, como a endotoxina, as análises de expressão gênica sugerem que o EPA e o DHA atenuam a resposta hepática celular aos fatores inflamatórios plasmáticos, regulando negativamente os principais mediadores celulares da inflamação, como *TLRs*, *CD14* (liga-se à endotoxina), NF- κ B-p50 e citocinas (IL-1 β) (DEPNER, PHILBRICK e JUMP, 2013; DEPNER *et al.*, 2013). Esses estudos podem justificar a diminuição da expressão da IL-1 β no fígado do grupo HL ω 3 que se mantém em idade mais tardia.

Quanto à avaliação dos parâmetros respiratórios, nas primeiras idades de vida (1^o e 14^o dias) o grupo HL apresentou aumento da frequência respiratória quando comparado ao controle. Porém, nas demais idades, houve normalização dos valores de FR do grupo HL, sem diferença entre os grupos. Vale ressaltar que nessas primeiras idades de vida, o sistema respiratório ainda está em processo de maturação, apresenta ritmo diferente do adulto, o que demonstra que a maturação desse sistema ocorre no período pós-natal (PATON, RAMIREZ e RICHTER, 1994), sugerindo que o período de lactação tem um papel importante no seu

desenvolvimento. É reconhecido que a desnutrição protéica materna está associada ao aumento da frequência respiratória entre 30 e 90 dias de vida, como mecanismo subjacente ao desenvolvimento da HAS (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da dieta rica em gordura materna neste processo de maturação, bem como o papel do ômega-3.

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 a 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.*, 2005b), o que poderia explicar a ausência de alterações na frequência respiratória na idade adulta.

É bem estabelecido que o alto consumo de dieta hiperlipídica pode causar inflamação sistêmica de baixo grau (DUAN, Y. *et al.*, 2018). Paton e Waki (2009) sugeriram que na inflamação pode ocorrer aumento da aderência leucocitária na microvasculatura do tronco encefálico ou especificamente no NTS, que pode levar a liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos, 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 e 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). Fornecendo um mecanismo de transdução pelo qual a baixa perfusão do tronco encefálico resulta em excitação simpática para tentar assegurar uma perfusão adequada (PATON e WAKI, 2009). Esses estudos podem justificar nossos resultados de aumento da pressão arterial no grupo HL aos 90 dias e tanto no HL quanto no HLw3 aos 300 dias de vida. Semelhante ao nosso estudo, Vidal *et*

al. (2017) também encontraram aumento da pressão arterial na prole de mães que receberam dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação.

Porém, em nosso estudo, aos 90 dias de vida o grupo HLw3 apresentou pressão arterial semelhante ao controle, sugerindo que o ômega-3 parece ter ação cardioprotetora, prevenindo o aparecimento precoce da hipertensão. Isso pode ser devido ao consumo adequado da relação ômega-6/ômega-3 de reduzir a formação de ácido araquidônico a partir do ácido linoléico, aumentando a disponibilidade de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) e, conseqüentemente, a formação de mediadores antiinflamatórios via COX e LOX. A absorção e incorporação de ácido linolênico (ALA; 18:3) em fosfolípidos de membrana tem também ação de inibir a utilização da via da COX e LOX no ácido araquidônico (ARA; 20:4), reduzindo assim a síntese de metabólitos pró-inflamatórios: prostaglandina E₂ (PGE₂), o tromboxano A₂ e leucotrieno B₄ (KHATIB *et al.*, 2016). O ácido α -linolênico (ALA; 18:3) também atua na redução de 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 (PARARASA, BAILEY e GRIFFITHS, 2014). O tecido adiposo torna-se disfuncional, com a diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos maduros ficando prejudicado (KIRKLAND *et al.*, 2002), o que resulta em adipócitos disfuncionais menos capazes de armazenar gordura e ocorre subsequente redistribuição de gordura para locais ectópicos (SLAWIK e VIDAL-PUIG, 2006). Além do aumento da adiposidade ectópica, a função prejudicada do tecido adiposo pode causar aumento dos ácidos graxos livres sistêmicos (AGLs) (PARARASA, BAILEY e GRIFFITHS, 2014), uma característica comum de muitos distúrbios metabólicos (PILZ *et al.*, 2006; SAMUEL, PETERSEN e SHULMAN, 2010). Os ácidos graxos saturados podem ser considerados os mais prejudiciais dos AGLs, sendo capazes de induzir resistência à insulina e o desenvolvimento de aterosclerose por meio de mediadores lipídicos como ceramidas e diacilgliceróis. A elevação dos AGLs, em particular ácidos graxos saturados, pode ser um fator determinante para o aumento da resistência à insulina, risco de doença cardiovascular e inflamação em adultos idosos (PARARASA, BAILEY e GRIFFITHS, 2014). Esses estudos podem justificar o aumento da pressão arterial apresentado também no grupo HLw3 em idade mais tardia.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, o presente estudo demonstra que o enriquecimento de ômega-3 em dieta materna hiperlipídica rica em AGS é capaz de prevenir o aparecimento precoce de doenças cardiometabólicas na prole. O consumo materno de dieta hiperlipídica enriquecida com ômega-3 preveniu a dislipidemia, prejuízos murinométricos a curto prazo e conduziu uma melhor resposta antioxidante enzimática e menor expressão gênica de marcadores inflamatórios no fígado da prole. Além disso, o enriquecimento com ômega-3 mitigou os efeitos deletérios da dieta rica em ácidos graxos saturados sobre os parâmetros ventilatórios durante o período de maturação da rede neural e o desenvolvimento da instalação precoce da HAS na prole adulta.

Em geral, os benefícios cardiometabólicos do ômega-3 foram a curto prazo e insuficientes para contraprogramar as consequências adversas da dieta materna hiperlipídica rica em AGS a longo prazo. Então, nosso estudo sugere que o ômega-3 pode servir como estratégia de prevenção primária para doenças cardiometabólicas, mas não a única. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos relacionados às alterações cardiometabólicas causadas pelo consumo de dieta hiperlipídica materna, bem como o papel do ômega-3 durante o período perinatal. Uma compreensão completa desses mecanismos e do papel do ômega-3 pode contribuir com o desenvolvimento de estratégias terapêuticas não farmacológicas e políticas governamentais para melhorar a saúde pública. Como a implementação de políticas públicas que visem a disponibilização e o fácil acesso do ômega-3, a exemplo da suplementação gestacional. Essas podem configurar como possíveis estratégias na prevenção e controle de doenças cardiometabólicas na população.

REFERÊNCIAS

ADLAN, A. M.; LIP, G. Y.; PATON, J. F.; KITAS, G. D.; FISHER, J. P. Autonomic function and rheumatoid arthritis: a systematic review. **Semin Arthritis Rheum**, v. 44, n. 3, p. 283-304, Dec 2014.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: (Ed.). **Methods Enzymol**: Academic Press, v.105, 1984. p.121-126.

AKERELE, O. A.; CHEEMA, S. K. A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 5, p. 23-33, 2016/09/01/ 2016.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-62, 2005.

ALFADDAGH, A.; ELAJAMI, T. K.; ASHFAQUE, H.; SALEH, M.; BISTRAN, B. R.; WELTY, F. K. Effect of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids Added to Statin Therapy on Coronary Artery Plaque in Patients With Coronary Artery Disease: A Randomized Clinical Trial. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 12, p. 006981, 2017.

ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Front Genet**, v. 2, p. 27, 2011.

ALVES, J.; MARICELLY DEODATO DE OLIVEIRA, J.; FERREIRA, D. J.; ASSIS V DE BARROS, M.; NOGUEIRA, V.; SANTOS ALVES, D.; VIDAL, H.; GOIS LEANDRO, C.; LAGRANHA, C.; PIROLA, L.; COSTA-SILVA, J. **Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata.** 2016.

ANGULO, P.; LINDOR, K. D. Non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 90, p. 1440-1746, 2002.

APPEL, L. J.; MILLER, E. R.; III; SEIDLER, A. J.; WHELTON, P. K. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 12, p. 1429-1438, 1993.

ARIMA, Y.; FUKUOKA, H. Developmental origins of health and disease theory in cardiology. **J Cardiol**, v. 76, n. 1, p. 14-17, 2020.

ARMITAGE, J. A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. **Front Horm Res**, v. 36, p. 73-84, 2008.

ASTRUP, A.; DYERBERG, J.; ELWOOD, P.; HERMANSEN, K.; BHU, F.; JAKOBSEN, M.; KOK, F. J.; KRAUSS, R.; LECERF, J.-M.; LEGRAND, P.; NESTEL, P.; RISÉRUS, U.; SANDERS, T.; SINCLAIR, A.; STENDER, S.; THOLSTRUP, T.; CWILLETT, W. **The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010?** 2011. 684-8

BACKES, J.; ANZALONE, D.; HILLEMANN, D.; CATINI, J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. **Lipids Health Dis**, v. 15, n. 1, p. 118-118, 2016.

BAGLEY, H. N.; WANG, Y.; CAMPBELL, M. S.; YU, X.; LANE, R. H.; JOSS-MOORE, L. A. Maternal docosahexaenoic acid increases adiponectin and normalizes IUGR-induced changes in rat adipose deposition. **J Obes**, v. 2013, p. 312153, 2013.

BANNENBERG, G.; SERHAN, C. N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 12, p. 1260-73, Dec 2010.

BARDGETT, M. E.; SHARPE, A. L.; TONEY, G. 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**, v. 307, n. 10, p. E944-E953, 2014.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v. 1, n. 8489, p. 1077-81, May 10 1986.

BARQUISSAU, V.; CAPEL, F.; DARDEVET, D.; FEILLET-COUDRAY, C.; GALLINIER, A.; CHAUVIN, M.-A.; RIEUSSET, J.; MORIO, B. Reactive oxygen species enhance mitochondrial function, insulin sensitivity and glucose uptake in skeletal muscle of senescence accelerated prone mice SAMP8. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 267-279, 2017/12/01/ 2017.

BARROS, M. A.; DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; WANDERLEY, A. G.; COSTA-SILVA, J. H. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 1, p. 123-30, Jan 2015.

BARTLETT, D.; FIRTH, C.; WHITTAKER WAS PHILLIPS, A.; MOSS, P.; BAYLIS, D.; SYDDALL, H.; AIHIE SAYER, A.; COOPER, C.; LORD, J. The age-related increase

in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. **Aging cell**, v. 11, p. 912-5, 2012.

BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, n. 3, p. 384-395, 1970/10/01/ 1970.

BATISTA FILHO, M.; BATISTA, L. V. Transição alimentar/ nutricional ou mutação antropológica? **Ciência e Cultura**, v. 62, p. 26-30, 2010.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism - Clinical and Experimental**, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BOGDARINA, I.; WELHAM, S.; KING, P. J.; BURNS, S. P.; CLARK, A. J. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. **Circ Res**, v. 100, n. 4, p. 520-6, Mar 2 2007.

BONEVA NADEZHDA, B.; YAMASHIMA, T. New insights into “GPR40-CREB interaction in adult neurogenesis” specific for primates. **Hippocampus**, v. 22, n. 4, p. 896-905, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208-226, 2014/11/01/ 2014.

BRITO ALVES, J. L.; OLIVEIRA, J. M. D.; FERREIRA, D. J. S.; BARROS, M. A. D. V.; NOGUEIRA, V. O.; ALVES, D. S.; VIDAL, H.; LEANDRO, C. G.; LAGRANHA, C. J.; PIROLA, L.; COSTA-SILVA, J. H. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1177-1184, 2016.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: FLEISCHER, S. e PACKER, L. (Ed.). **Methods Enzymol**: Academic Press, v.52, 1978. p.302-310.

BURGGREN, W. W. Phenotypic Switching Resulting From Developmental Plasticity: Fixed or Reversible? **Front Physiol**, v. 10, n. 1634, 2020.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F.; MELENDEZ, P. A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 183-90, 2005.

CARLSON, S. E.; COLOMBO, J.; GAJEWSKI, B. J.; GUSTAFSON, K. M.; MUNDY, D.; YEAST, J.; GEORGIEFF, M. K.; MARKLEY, L. A.; KERLING, E. H.; SHADDY, D. J. DHA supplementation and pregnancy outcomes. **Am J Clin Nutr**, v. 97, n. 4, p. 808-15, Apr 2013.

CARVALHO, M. F.; COSTA, M. K. M. E. D.; MUNIZ, G. D. S.; CASTRO, R. M. D.; NASCIMENTO, E. D. 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**, v. 26, p. 177-196, 2013.

CATALANO, P.; EHRENBERG, H. Review article: The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 10, p. 1126-1133, 2006.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; DIEHL, A. M.; BRUNT, E. M.; CUSI, K.; CHARLTON, M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1592-609, 2012.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 586, 2016.

CORREIA-SANTOS, A. M.; SUZUKI, A.; VICENTE, G. C.; DOS ANJOS, J. S.; PEREIRA, A. D.; LENZI-ALMEIDA, K. C.; BOAVENTURA, G. T. Effect of maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation on glucose metabolism and pancreas histomorphometry of male offspring from diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 106, n. 3, p. 634-42, 2014.

COSTA-SILVA, J. H.; DE BRITO-ALVES, J. L.; BARROS, M. A.; NOGUEIRA, V. O.; PAULINO-SILVA, K. M.; DE OLIVEIRA-LIRA, A.; NOBRE, I. G.; FRAGOSO, J.; LEANDRO, C. G. New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity. **Front Physiol**, v. 6, p. 345, 2015.

COSTA-SILVA, J. H.; SIMOES-ALVES, A. C.; FERNANDES, M. P. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. **Front Physiol**, v. 7, p. 504, 2016.

CRAWFORD, M. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 275S-84S, Jan 2000.

CREMONINI, E.; OTEIZA, P. I. (-)-Epicatechin and its metabolites prevent palmitate-induced NADPH oxidase upregulation, oxidative stress and insulin resistance in HepG2 cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 646, p. 55-63, 2018.

DAS, S.; ALHASSON, F.; DATTAROY, D.; POURHOSEINI, S.; SETH, R. K.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S.; MICHELOTTI, G. A.; DIEHL, A. M.; KALYANARAMAN, B.; CHATTERJEE, S. NADPH Oxidase–Derived Peroxynitrite Drives Inflammation in Mice and Human Nonalcoholic Steatohepatitis via TLR4-Lipid Raft Recruitment. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 7, p. 1944-1957, 2015/07/01/ 2015.

DAVIES, M. J.; RAYMOND, N. T.; DAY, J. L.; HALES, C. N.; BURDEN, A. C. Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics. **Diabetic Medicine**, v. 17, n. 6, p. 433-440, 2000.

DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. Tlr-4 Deficiency Selectively Protects Against Obesity Induced by Diets High in Saturated Fat. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 6, p. 1248-1255, 2008.

DE ALMEIDA, C. A.; RIBAS FILHO, D.; MELLO, E.; BERTOLUCCI, P.; CÍCERO FALCÃO, M. **I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante gestação, lactação e infância.** 2014. 5

DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; DE OLIVEIRA, G. B.; DA SILVA, G. S. F.; WANDERLEY, A. G.; LEANDRO, C. G.; COSTA-SILVA, J. H. 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**, v. 111, n. 4, p. 606-615, 2014.

DECLÈVES, A. E.; MATHEW, A. V.; CUNARD, R.; SHARMA, K. AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 10, p. 1846-55, 2011.

DENG, X.; WANG, P.; YUAN, H. Epidemiology, risk factors across the spectrum of age-related metabolic diseases. **J Trace Elem Med Biol**, v. 61, n. 126497, p. 126497, 2020.

DEPNER, C.; TORRES-GONZALEZ, M.; TRIPATHY, S.; MILNE, G.; JUMP, D. Menhaden Oil Decreases High-Fat Diet-Induced Markers of Hepatic Damage,

Steatosis, Inflammation, and Fibrosis in Obese Ldlr(-/-) Mice. **J Nutr**, v. 142, p. 1495-503, 2012.

DEPNER, C. M.; PHILBRICK, K. A.; JUMP, D. B. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. **J Nutr**, v. 143, n. 3, p. 315-23, 2013.

DEPNER, C. M.; TORRES-GONZALEZ, M.; TRIPATHY, S.; MILNE, G.; JUMP, D. B. Menhaden oil decreases high-fat diet-induced markers of hepatic damage, steatosis, inflammation, and fibrosis in obese Ldlr-/- mice. **J Nutr**, v. 142, n. 8, p. 1495-503, 2012.

DEPNER, C. M.; TRABER, M. G.; BOBE, G.; KENSICKI, E.; BOHREN, K. M.; MILNE, G.; JUMP, D. B. A metabolomic analysis of omega-3 fatty acid-mediated attenuation of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in LDLR-/- mice. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

DESAI, M.; FERRINI, M. G.; HAN, G.; NARWANI, K.; ROSS, M. G. 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**, v. 12, n. 11, 2020.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G.; BEALL, M.; LANE, R. H.; ROSS, M. G. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211, n. 3, p. 237 e1-237 e13, Sep 2014.

DOSSI, C. G.; TAPIA, G. S.; ESPINOSA, A.; VIDELA, L. A.; D'ESPESSAILLES, A. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR- α and SREBP-1c. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 9, p. 977-984, 2014/09/01/ 2014.

DUAN, Y.; ZENG, L.; ZHENG, C.; SONG, B.; LI, F.; KONG, X.; XU, K. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2649, 2018-November-13 2018.

DUAN, Y.; ZENG, L.; ZHENG, C.; SONG, B.; LI, F.; KONG, X.; XU, K. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2649, 2018.

DUMAS, J. A.; BUNN, J. Y.; NICKERSON, J.; CRAIN, K. I.; EBENSTEIN, D. B.; TARLETON, E. K.; MAKAREWICZ, J.; POYNTER, M. E.; KIEN, C. L. Dietary saturated fat and monounsaturated fat have reversible effects on brain function and the secretion of pro-inflammatory cytokines in young women. **Metabolism**, v. 65, n. 10, p. 1582-8, 2016.

DUTTAROY, A. K. Transport of fatty acids across the human placenta: a review. **Prog Lipid Res**, v. 48, n. 1, p. 52-61, Jan 2009.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959/05/01/ 1959.

ESTADELLA, D.; DA PENHA OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; OYAMA, L. M.; RIBEIRO, E. B.; DAMASO, A. R.; DE PIANO, A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 137579, 2013.

FAN, Y. Y.; LY, L. H.; BARHOUMI, R.; MCMURRAY, D. N.; CHAPKIN, R. S. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. **J Immunol**, v. 173, n. 10, p. 6151-60, 2004.

FEOLI, A. M.; ROEHRIG, C.; ROTTA, L. N.; KRUGER, A. H.; SOUZA, K. B.; KESSLER, A. M.; RENZ, S. V.; BRUSQUE, A. M.; SOUZA, D. O.; PERRY, M. L. S. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, v. 19, n. 9, p. 789-793, 2003.

FERRO CAVALCANTE, T.; SILVA, J.; SILVA, A.; MUNIZ, G.; MARQUES, L.; SOUZA, S.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; FERRAZ, K.; NASCIMENTO, E. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, 2013.

FERRO CAVALCANTE, T. C.; LIMA DA SILVA, J. M.; DA MARCELINO DA SILVA, A. A.; MUNIZ, G. S.; DA LUZ NETO, L. M.; LOPES DE SOUZA, S.; MANHAES DE CASTRO, R.; FERRAZ, K. M.; DO NASCIMENTO, E. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157-68, Nov 2013.

FRANÇA, B. K.; MELO ALVES, M. R.; SILVEIRA SOUTO, F. M.; TIZIANE, L.; FREIRE BOAVENTURA, R.; GUIMARÃES, A.; ALVES, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013/09/01/ 2013.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004.

GANI, O. A.; SYLTE, I. Molecular recognition of docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. **J Mol Graph Model**, v. 27, n. 2, p. 217-24, 2008.

GARCIA-JARAMILLO, M.; SPOONER, M. H.; LÖHR, C. V.; WONG, C. P.; ZHANG, W.; JUMP, D. B. Lipidomic and transcriptomic analysis of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in female Ldlr ^{-/-} mice. **PLoS One**, v. 14, n. 4, 2019.

GAWLIŃSKA, K.; GAWLIŃSKI, D.; FILIP, M.; PRZEGALIŃSKI, E. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health. **Nutr Rev**, v. 79, n. 6, p. 709-725, 2021.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BATESON, P.; BEEDLE, A. S.; LAW, C. M.; BHUTTA, Z. A.; ANOKHIN, K. V.; BOUGNERES, P.; CHANDAK, G. R.; DASGUPTA, P.; SMITH, G. D.; ELLISON, P. T.; FORRESTER, T. E.; GILBERT, S. F.; JABLONKA, E.; KAPLAN, H.; PRENTICE, A. M.; SIMPSON, S. J.; UAUY, R.; WEST-EBERHARD, M. J. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. **Lancet**, v. 373, n. 9675, p. 1654-7, May 9 2009.

GOUBAU, C.; JAEKEN, J.; LEVTCHENKO, E. N.; THYS, C.; DI MICHELE, M.; MARTENS, G. A.; GERLO, E.; DE VOS, R.; BUYSE, G. M.; GOEMANS, N.; VAN GEET, C.; FRESON, K. Homozygosity for aquaporin 7 G264V in three unrelated children with hyperglyceroluria and a mild platelet secretion defect. **Genet Med**, v. 15, n. 1, p. 55-63, Jan 2013.

GRAYSON, B. E.; LEVASSEUR, P. R.; WILLIAMS, S. M.; SMITH, M. S.; MARKS, D. L.; GROVE, K. L. Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1622-32, Apr 2010.

GRUBER, L.; HEMMERLING, J.; SCHUPPEL, V.; MULLER, M.; BOEKSCHOTEN, M. V.; HALLER, D. Maternal High-fat Diet Accelerates Development of Crohn's Disease-like Ileitis in TNFDeltaARE/WT Offspring. **Inflamm Bowel Dis**, v. 21, n. 9, p. 2016-25, Sep 2015.

GUBERMAN, C.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G.; ROSS, M. G.; DESAI, M. Maternal high-fat diet programs rat offspring hypertension and activates the adipose renin-angiotensin system. **Am J Obstet Gynecol**, v. 209, n. 3, p. 4, 2013.

GUIMARÃES, K. S. L.; DE ARAÚJO, E. V.; AQUINO, J. S.; GADELHA, D. A.; BALARINI, C. M.; COSTA-SILVA, J. H.; MAGNANI, M.; VIDAL, H.; BRAGA, V. A.; DE BRITO ALVES, J. L. Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 11, p. 930-941, 2017.

GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; GUPTA, S.; KELLER, J. N.; BRUCE-KELLER, A. J. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **J Neurochem**, v. 120, n. 6, p. 1060-71, 2012.

GUTIÉRREZ, S.; SVAHN, S. L.; JOHANSSON, M. E. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 20, p. 5028, 2019.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, November 25, 1974 1974.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P.; CLARK, P. M. S.; COX, L. J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P. D. Fetal And Infant Growth And Impaired Glucose Tolerance At Age 64. **BMJ: British Medical Journal**, v. 303, n. 6809, p. 1019-1022, 1991.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAN, C. Y.; UMEMOTO, T.; OMER, M.; DEN HARTIGH, L. J.; CHIBA, T.; LEBOEUF, R.; BULLER, C. L.; SWEET, I. R.; PENNATHUR, S.; ABEL, E. D.; CHAIT, A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. **J Biol Chem**, v. 287, n. 13, p. 10379-10393, 2012.

HANSON, M.; GODFREY, K. M.; LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C.; GLUCKMAN, P. D. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 106, n. 1, p. 272-80, Jul 2011.

HARRIS, W. S.; TINTLE, N. L.; ETHERTON, M. R.; VASAN, R. S. Erythrocyte long-chain omega-3 fatty acid levels are inversely associated with mortality and with incident cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. **J Clin Lipidol**, v. 12, n. 3, p. 718-727, 2018.

HE, X.-X.; WU, X.-L.; CHEN, R.-P.; CHEN, C.; LIU, X.-G.; WU, B.-J.; HUANG, Z.-M. Effectiveness of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0162368-e0162368, 2016.

HEERWAGEN, M. J. R.; STEWART, M. S.; DE LA HOUSSAYE, B. A.; JANSSEN, R. C.; FRIEDMAN, J. E. Transgenic Increase in N-3/N-6 Fatty Acid Ratio Reduces Maternal Obesity-Associated Inflammation and Limits Adverse Developmental Programming in Mice. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67791, 2013.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-6, 2002.

HIROTANI, Y.; OZAKI, N.; TSUJI, Y.; URASHIMA, Y.; MYOTOKU, M. Effects of eicosapentaenoic acid on hepatic dyslipidemia and oxidative stress in high fat diet-induced steatosis. **Int J Food Sci Nutr**, v. 66, n. 5, p. 569-73, 2015.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-226, 1976/07/01/ 1976.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2409-15, May 1995.

HOWE, P. R. C. Dietary Fats and Hypertension Focus on Fish Oil. **Ann N Y Acad Sci**, v. 827, n. 1, p. 339-352, 1997.

IM, D.-S. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. **Eur J Pharmacol**, v. 785, p. 36-43, 2016/08/15/ 2016.

INOBUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H. Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

INOUE, T.; TANAKA, M.; MASUDA, S.; OHUE-KITANO, R.; YAMAKAGE, H.; MURANAKA, K.; WADA, H.; KUSAKABE, T.; SHIMATSU, A.; HASEGAWA, K.; SATOH-ASAHARA, N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 5, p. 552-560, 2017/05/01/ 2017.

JAKOBSEN, M. U.; O'REILLY, E. J.; HEITMANN, B. L.; PEREIRA, M. A.; BALTER, K.; FRASER, G. E.; GOLDBOURT, U.; HALLMANS, G.; KNEKT, P.; LIU, S.; PIETINEN, P.; SPIEGELMAN, D.; STEVENS, J.; VIRTAMO, J.; WILLETT, W. C.; ASCHERIO, A. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 5, p. 1425-32, May 2009.

JOSEPH, L. C.; BARCA, E.; SUBRAMANYAM, P.; KOMROWSKI, M.; PAJVANI, U.; COLECRAFT, H. M.; HIRANO, M.; MORROW, J. P. Inhibition of NAPDH Oxidase 2 (NOX2) Prevents Oxidative Stress and Mitochondrial Abnormalities Caused by Saturated Fat in Cardiomyocytes. **PLoS One**, v. 11, n. 1, 2016.

JUMP, D. B.; DEPNER, C. M.; TRIPATHY, S.; LYTLE, K. A. Potential for dietary ω -3 fatty acids to prevent nonalcoholic fatty liver disease and reduce the risk of primary liver cancer. **Advances in nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 6, p. 694-702, 2015.

JUMP, D. B.; TRIPATHY, S.; DEPNER, C. M. Fatty Acid–Regulated Transcription Factors in the Liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 249-269, 2013.

KAI, M.; MIYOSHI, M.; FUJIWARA, M.; NISHIYAMA, Y.; INOUE, T.; MAESHIGE, N.; HAMADA, Y.; USAMI, M. A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 212, p. 22-32, 2017.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K.-I.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KARAGIANNIDES, I.; TCHKONIA, T.; DOBSON, D. E.; STEPPAN, C. M.; CUMMINS, P.; CHAN, G.; SALVATORI, K.; HADZOPOULOU-CLADARAS, M.; KIRKLAND, J. L. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 6, p. R1772-R1780, 2001.

KARAGIANNIDES, I.; THOMOU, T.; TCHKONIA, T.; PIRTSKHALAVA, T.; KYPREOS, K.; CARTWRIGHT, A.; DALAGIORGOU, G.; LASH, T.; FARMER, S.; TIMCHENKO, N.; KIRKLAND, J. Increased CUG Triplet Repeat-binding Protein-1 Predisposes to Impaired Adipogenesis with Aging. **J Biol Chem**, v. 281, p. 23025-33, 2006.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C. C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.

KĘPCZYŃSKA, M. A.; WARGENT, E. T.; CAWTHORNE, M. A.; ARCH, J. R. S.; O'DOWD, J. F.; STOCKER, C. J. Circulating levels of the cytokines IL10, IFN γ and resistin in an obese mouse model of developmental programming. **J Dev Orig Health Dis**, v. 4, n. 6, p. 491-498, 2013.

KHAIRE, A. A.; KALE, A. A.; JOSHI, S. R. Maternal omega-3 fatty acids and micronutrients modulate fetal lipid metabolism: A review. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 98, p. 49-55, Jul 2015.

KHAN, I. Y.; DEKOU, V.; DOUGLAS, G.; JENSEN, R.; HANSON, M. A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces

cardiovascular dysfunction in adult offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R127-R133, 2005a.

_____. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 1, p. 12, 2005b.

KHATIB, S. A.; ROSSI, E. L.; BOWERS, L. W.; HURSTING, S. D. Reducing the burden of obesity-associated cancers with anti-inflammatory long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 125, p. 100-7, Sep 2016.

KIM, C. H.; YOUNOSSI, Z. M. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. **Cleve Clin J Med**, v. 75, n. 10, p. 721-8, 2008.

KIRK, S. L.; SAMUELSSON, A. M.; ARGENTON, M.; DHONYE, H.; KALAMATIANOS, T.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D.; COEN, C. W. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5870, Jun 11 2009.

KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T.; PIRTSKHALAVA, T.; HAN, J.; KARAGIANNIDES, I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? **Exp Gerontol**, v. 37, n. 6, p. 757-67, 2002.

KISLAL, S.; SHOOK, L. L.; EDLOW, A. G. Perinatal exposure to maternal obesity: Lasting cardiometabolic impact on offspring. **Prenat Diagn**, v. 40, n. 9, p. 1109-1125, 2020.

KLEINRIDDERS, A.; KONNER, A. C.; BRUNING, J. C. CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 6, p. 794-804, Dec 2009.

KOJIMA, S.; CATAVERO, C.; RINAMAN, L. **Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups.** 2016.

KOJIMA, S.; CATAVERO, C.; RINAMAN, L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. **Physiol Behav**, v. 157, p. 237-45, 2016.

KOLETZKO, B.; LIEN, E.; AGOSTONI, C.; BOHLES, H.; CAMPOY, C.; CETIN, I.; DECSI, T.; DUDENHAUSEN, J. W.; DUPONT, C.; FORSYTH, S.; HOESLI, I.; HOLZGREVE, W.; LAPILLONNE, A.; PUTET, G.; SECHER, N. J.; SYMONDS, M.; SZAJEWSKA, H.; WILLATTS, P.; UAUY, R.; WORLD ASSOCIATION OF

PERINATAL MEDICINE DIETARY GUIDELINES WORKING, G. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. **J Perinat Med**, v. 36, n. 1, p. 5-14, 2008.

KOROTKOVA, M.; GABRIELSSON, B.; LONN, M.; HANSON, L. A.; STRANDVIK, B. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to alpha-linolenic acid in the maternal diet. **J Lipid Res**, v. 43, n. 10, p. 1743-9, Oct 2002.

KREMER, J. M. n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 349S-51S, Jan 2000.

LEE, S. M.; CHO, Y. H.; LEE, S. Y.; JEONG, D. W.; CHO, A. R.; JEON, J. S.; PARK, E. J.; KIM, Y. J.; LEE, J. G.; YI, Y. H.; TAK, Y. J.; HWANG, H. R.; LEE, S. H.; HAN, J. Urinary Malondialdehyde Is Associated with Visceral Abdominal Obesity in Middle-Aged Men. **Mediators Inflamm**, v. 524291, n. 10, p. 11, 2015.

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

LIO, D.; SCOLA, L.; CRIVELLO, A.; COLONNA-ROMANO, G.; CANDORE, G.; BONAFÈ, M.; CAVALLONE, L.; FRANCESCHI, C.; CARUSO, C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. **Genes & Immunity**, v. 3, n. 1, p. 30-33, 2002/02/01 2002.

LLOPIS, M.; SÁNCHEZ, J.; PRIEGO, T.; PALOU, A.; PICÓ, 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**, v. 62, n. 7, p. 1590-601, 2014.

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

MARCON, R.; BENTO, A. F.; DUTRA, R. C.; BICCA, M. A.; LEITE, D. F.; CALIXTO, J. B. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. **J Immunol**, v. 191, n. 8, p. 4288-98, Oct 15 2013.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. D.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. D.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770, 2006.

MEDICINE, I. O. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.** Washington, DC: The National Academies Press, 2005. 1358

MEITZLER, J. L.; ANTONY, S.; WU, Y.; JUHASZ, A.; LIU, H.; JIANG, G.; LU, J.; ROY, K.; DOROSHOW, J. H. NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 17, p. 2873-89, 2014.

MENNITTI, L. V.; OLIVEIRA, J. L.; MORAIS, C. A.; ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DO NASCIMENTO, C. M. O.; PISANI, L. P. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 99-111, 2015.

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Saturated Fat and Cardiometabolic Risk Factors, Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: a Fresh Look at the Evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p. 893-905, 2010/10/01 2010.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 359-70, 2009.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972/05// 1972.

MORAES, D. J.; BONAGAMBA, L. G.; COSTA, K. M.; COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **J Physiol**, v. 592, n. 9, p. 2013-33, May 1 2014.

MORGAN, M. J.; LIU, Z.-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2011.

MORI, T. A.; WATTS, G. F.; BURKE, V.; HILME, E.; PUDDEY, I. B.; BEILIN, L. J. Differential Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Vascular Reactivity of the Forearm Microcirculation in Hyperlipidemic, Overweight Men. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1264-1269, 2000.

MORRIS, M. C.; SACKS, F.; ROSNER, B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. **Circulation**, v. 88, n. 2, p. 523-533, 1993.

MURABAYASHI, N.; SUGIYAMA, T.; ZHANG, L.; KAMIMOTO, Y.; UMEKAWA, T.; MA, N.; SAGAWA, N. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 169, n. 1, p. 39-44, 2013/07/01/ 2013.

NASCIMENTO, L. F.; SOUZA, G. F.; MORARI, J.; BARBOSA, G. O.; SOLON, C.; MOURA, R. F.; VICTORIO, S. C.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; RAZOLLI, D. S.; CARVALHO, H. F.; VELLOSO, L. A. n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. **Diabetes**, v. 65, n. 3, p. 673-86, Mar 2016.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-19, 2003.

NOMURA, K.; YAMANOUCHI, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 3, p. 203-8, 2012.

NOVELLI, E. L.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v. 41, n. 1, p. 111-9, Jan 2007.

OLLIVER, M.; VEYSEY, M.; LUCOCK, M.; NIBLETT, S.; KING, K.; MACDONALD-WICKS, L.; GARG, M. L. Erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with biomarkers of inflammation in older Australians. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 5, p. 61-69, 2016.

PARARASA, C.; BAILEY, C.; GRIFFITHS, H. Ageing, adipose tissue, fatty acids and inflammation. **Biogerontology**, v. 16, 2014.

PARK, E. J.; LEE, J. H.; YU, G. Y.; HE, G.; ALI, S. R.; HOLZER, R. G.; OSTERREICHER, C. H.; TAKAHASHI, H.; KARIN, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197-208, 2010.

PASCOAL, L. B.; BOMBASSARO, B.; RAMALHO, A. F.; COOPE, A.; MOURA, R. F.; CORREA-DA-SILVA, F.; IGNACIO-SOUZA, L.; RAZOLLI, D.; DE OLIVEIRA, D.; CATHARINO, R.; VELLOSO, L. A. Resolvin RvD2 reduces hypothalamic inflammation and rescues mice from diet-induced obesity. **J Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 5, Jan 5 2017.

PATON, J. F.; RAMIREZ, J. M.; RICHTER, D. W. Mechanisms of respiratory rhythm generation change profoundly during early life in mice and rats. **Neurosci Lett**, v. 170, n. 1, p. 167-70, Mar 28 1994.

PATON, J. F. R.; WAKI, H. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 2, p. 89-94, 2009/02/01/ 2009.

PELUSO, I.; MORABITO, G.; URBAN, L.; IOANNONE, F.; SERAFINI, M. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 12, n. 4, p. 351-60, Dec 2012.

PIEPOLI, M. F.; HOES, A. W.; AGEWALL, S.; ALBUS, C.; BROTONS, C.; CATAPANO, A. L.; COONEY, M.-T.; CORRÀ, U.; COSYNS, B.; DEATON, C.; GRAHAM, I.; HALL, M. S.; HOBBS, F. D. R.; LØCHEN, M.-L.; LÖLLGEN, H.; MARQUES-VIDAL, P.; PERK, J.; PRESCOTT, E.; REDON, J.; RICHTER, D. J.; SATTAR, N.; SMULDERS, Y.; TIBERI, M.; VAN DER WERP, H. B.; VAN DIS, I.; VERSCHUREN, W. M. M.; BINNO, S.; GROUP, E. S. D. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **Eur Heart J**, v. 37, n. 29, p. 2315-2381, 2016.

PILZ, S.; SCHARNAGL, H.; TIRAN, B.; SEELHORST, U.; WELLNITZ, B.; BOEHM, B. O.; SCHAEFER, J. R. R.; MÄRZ, W. Free Fatty Acids Are Independently Associated with All-Cause and Cardiovascular Mortality in Subjects with Coronary Artery Disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 7, p. 2542-2547, 2006.

PIMENTEL, G. D.; GANESHAN, K.; CARVALHEIRA, J. B. Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 397, n. 1-2, p. 15-22, Nov 2014.

PIMENTEL, G. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; OLIVEIRA, J. L.; LOSINSKAS-HACHUL, A. C.; SOUZA, G. I.; DAS GRACAS, T. D. C. M.; SANTOS, R. V.; DE MELLO, M. T.; TUFIK, S.; SEELAENDER, M.; OYAMA, L. M.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; WATANABE, R. H.; RIBEIRO, E. B.; PISANI, L. P. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFkappaBp65 signaling in adult offspring. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 3, p. 265-71, Mar 2012.

PIROLA, L.; FERRAZ, J. C. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the pathophysiology of type 2 diabetes and obesity. **World J Biol Chem**, v. 8, n. 2, p. 120-128, May 26 2017.

RAMAIYAN, B.; BETTADAHALLI, S.; TALAHALLI, R. R. Dietary omega-3 but not omega-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced oxidative stress: A three generation study in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 477, n. 4, p. 887-894, 2016.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

RUAN, J. S.; LIN, J. K.; KUO, Y. Y.; CHEN, Y. W.; CHEN, P. C. Chronic palmitic acid-induced lipotoxicity correlates with defective trafficking of ATP sensitive potassium channels in pancreatic β cells. **J Nutr Biochem**, v. 59, p. 37-48, 2018.

SACKS, F. M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 13-24, 2002.

SAKAI, C.; ISHIDA, M.; OHBA, H.; YAMASHITA, H.; UCHIDA, H.; YOSHIZUMI, M.; ISHIDA, T. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0187934, 2017.

SALTIEL, A. R. Fishing out a sensor for anti-inflammatory oils. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 672-4, Sep 3 2010.

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2267-77, 2010.

SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. A.; ARGENTON, M.; CHRISTIE, M. R.; MCCONNELL, J. M.; JANSEN, E. H.; PIERSMA, A. H.; OZANNE, S. E.; TWINN, D. F.; REMACLE, C.; ROWLERSON, A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 383-92, 2008.

SARDINHA, F. L. C.; FERNANDES, F. S.; TAVARES DO CARMO, M. G.; 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. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 4, p. R313-R320, 2013/02/15 2012.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1537-45, Jun 2006.

SCHULZE, M. B.; MINIHANE, A. M.; SALEH, R. N. M.; RISÉRUS, U. Intake and metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: nutritional implications for cardiometabolic diseases. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 8, n. 11, p. 915-930, 2020.

SHIRASUNA, K.; TAKANO, H.; SENO, K.; OHTSU, A.; KARASAWA, T.; TAKAHASHI, M.; OHKUCHI, A.; SUZUKI, H.; MATSUBARA, S.; IWATA, H.; KUWAYAMA, T. Palmitic acid induces interleukin-1 β secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. **J Reprod Immunol**, v. 116, p. 104-12, 2016.

SIEMELINK, M.; VERHOEF, A.; DORMANS, J. A.; SPAN, P. N.; PIERSMA, A. H. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. **Diabetologia**, v. 45, n. 10, p. 1397-403, Oct 2002.

SILVA, D. R. B. D.; MIRANDA JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. D. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, p. 123-133, 2007.

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

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J Am Coll Nutr**, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

_____. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, 2016.

SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M.; ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. **Intensive Care Med**, v. 34, n. 9, p. 1580-92, 2008.

SLAWIK, M.; VIDAL-PUIG, A. J. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 144-164, 2006/05/01/ 2006.

SNODGRASS, R. G.; HUANG, S.; CHOI, I. W.; RUTLEDGE, J. C.; HWANG, D. H. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. **J Immunol**, v. 191, n. 8, p. 4337-47, 2013.

SPERETTA, G.; BASSI, M.; RUCHAYA, P.; SUMNERS, C.; MENANI, J.; COLOMBARI, E.; COLOMBARI, D. Arterial pressure and gene expression in the nucleus of the solitary tract in rats fed with high-fat diet (874.4). **The FASEB Journal**, v. 28, n. 1_supplement, p. 874.4, 2014/04/01 2014.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A. D.; LOTTENBERG, A. M. P.; CHACRA, A. P.; FALUDI, A. A.; LOURES-VALE, A. A.; CARVALHO, A. C.; DUNCAN, B.; GELONESE, B.; POLANCZYK, C.; RODRIGUES SOBRINHO, C. R. M.; SCHERR, C.; KARLA, C.; ARMAGANIJAN, D.; MORIGUCHI, E.; SARAIVA, F.; PICHETTI, G.; XAVIER, H. T.; CHAVES, H.; BORGES, J. L.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, J. I.; NICOLAU, J. C.; SANTOS, J. E. D.; LIMA, J. J. G. D.; VIEIRA, J. L.; NOVAZZI, J. P.; FARIA NETO, J. R.; TORRES, K. P.; PINTO, L. D. A.; BRICARELLO, L.; BODANESE, L. C.; INTROCASO, L.; MALACHIAS, M. V. B.; IZAR, M. C.; MAGALHÃES, M. E. C.; SCHMIDT, M. I.; SCARTEZINI, M.; NOBRE, M.; FOPPA, M.; FORTI, N. A.; BERWANGER, O.; GEBARA, O. C. E.; COELHO, O. R.; MARANHÃO, R. C.; SANTOS F^o, R. D. D.; COSTA, R. P.; BARRETO, S.; KAISER, S.; IHARA, S.; CARVALHO, T. D.; MARTINEZ, T. L. R.; RELVAS, W. G. M.; SALGADO, W. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, p. 2-19, 2007.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 10, p. 2062, 2005.

TAIN, Y.-L.; LIN, Y.-J.; SHEEN, J.-M.; YU, H.-R.; TIAO, M.-M.; CHEN, C.-C.; TSAI, C.-C.; HUANG, L.-T.; HSU, C.-N. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 357, 2017.

TERATANI, T.; TOMITA, K.; SUZUKI, T.; OSHIKAWA, T.; YOKOYAMA, H.; SHIMAMURA, K.; TOMINAGA, S.; HIROI, S.; IRIE, R.; OKADA, Y.; KURIHARA, C.; EBINUMA, H.; SAITO, H.; HOKARI, R.; SUGIYAMA, K.; KANAI, T.; MIURA, S.; HIBI, T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 152-164, 2012.

THALER, J.; YI, C.-X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J.; HWANG, B.; DIETRICH, M.; ZHAO, X.; SARRUF, D. A.; IZGUR, V.; MARAVILLA, K. R.; NGUYEN, H. T.; FISCHER, J. D.; MATSEN, M.; WISSE, B. E.; MORTON, G. J.; HORVATH, T.; BASKIN, D.; TSCHÖP, M.; SCHWARTZ, M. W. **Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans (The Journal of Clinical Investigation (2012) 122, 1, (153-162) DOI: 10.1172/JCI59660).** 2012.

TIMPER, K.; BRUNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Dis Model Mech**, v. 10, n. 6, p. 679-689, Jun 1 2017.

TITOS, E.; RIUS, B.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; LÓPEZ-VICARIO, C.; MORÁN-SALVADOR, E.; MARTÍNEZ-CLEMENTE, M.; ARROYO, V.; CLÀRIA, J. Resolvin D1 and Its Precursor Docosahexaenoic Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Inflammation by Eliciting Macrophage Polarization toward an M2-Like Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5408-5418, 2011.

TOBALDINI, E.; COSTANTINO, G.; SOLBIATI, M.; COGLIATI, C.; KARA, T.; NOBILI, L.; MONTANO, N. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 74, n. Pt B, p. 321-329, 2017.

TSAOUSIDOU, E.; PAEGER, L.; BELGARDT, B. F.; PAL, M.; WUNDERLICH, C. M.; BRÖNNEKE, H.; COLLIENNE, U.; HAMPEL, B.; WUNDERLICH, F. T.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; KLOPPENBURG, P.; BRÜNING, J. C. Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. **Cell Rep**, v. 9, n. 4, p. 1495-506, 2014.

VALENZUELA, R.; ESPINOSA, A.; GONZÁLEZ-MAÑÁN, D.; D'ESPESSAILLES, A.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A.; TAPIA, G. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46400-e46400, 2012.

VICKERS, M. H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2165-78, Jun 2 2014.

VIDAL-SANTOS, R.; MACEDO, F. N.; SANTANA, M. N.; DE MELO, V. U.; DE BRITO ALVES, J. L.; SANTOS, M. R.; BRITO, L. C.; NASCIMENTO, E.; COSTA-SILVA, J. H.; SANTANA-FILHO, V. J. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. **J Dev Orig Health Dis**, v. 8, n. 2, p. 216-225, Apr 2017.

VOGT, M. C.; PAEGER, L.; HESS, S.; STECULORUM, S. M.; AWAZAWA, M.; HAMPEL, B.; NEUPERT, S.; NICHOLLS, H. T.; MAUER, J.; HAUSEN, A. C.; PREDEL, R.; KLOPPENBURG, P.; HORVATH, T. L.; BRUNING, J. C. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. **Cell**, v. 156, n. 3, p. 495-509, Jan 30 2014.

VOLPATO, A. M.; SCHULTZ, A.; MAGALHÃES-DA-COSTA, E.; DE GUSMÃO CORREIA, M. L.; ÁGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 4, p. 272-284, 2012.

WADDELL, B. J.; ZULKAFI, I. S.; MARK, P. J. 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**, v. 154, n. 9, p. 3110-3117, 2013.

WAKI, H.; GOURAUD, S. S.; MAEDA, M.; PATON, J. F. Evidence of specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 95, n. 5, p. 595-600, May 2010.

WALENBERGH, S. M.; KOEK, G. H.; BIEGHS, V.; SHIRI-SVERDLOV, R. Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. **J Hepatol**, v. 58, n. 4, p. 801-10, 2013.

WANG, D. D.; LI, Y.; CHIUVE, S. E.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality. **JAMA Intern Med**, v. 176, n. 8, p. 1134-45, 2016.

WANG, G.; ZHOU, P.; REPUCCI, M. A.; GOLANOV, E. V.; REIS, D. J. Specific actions of cyanide on membrane potential and voltage-gated ion currents in rostral ventrolateral medulla neurons in rat brainstem slices. **Neuroscience Letters**, v. 309, n. 2, p. 125-129, 2001/08/24/ 2001.

WANG, X.; GE, A.; CHENG, M.; GUO, F.; ZHAO, M.; ZHOU, X.; LIU, L.; YANG, N. Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. **Exp Diabetes Res**, v. 847246, n. 10, p. 11, 2012.

WANG, Z.; LIU, D.; WANG, F.; LIU, S.; ZHAO, S.; LING, E. A.; HAO, A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. **Br J Nutr**, v. 107, n. 2, p. 229-41, 2012.

WEN-JU LIN, C.; JAMES, W. A.; DARRELL, J. Propionate May Mediate the Hypocholesterolemic Effects of Certain Soluble Plant Fibers in Cholesterol-Fed Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 175, n. 2, p. 215-218, 1984/02/01 1984.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 5, p. 1388-92, Mar 1986.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 304B, n. 6, p. 610-618, 2005.

WONG, S. W.; KWON, M. J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D. H. 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. **J Biol Chem**, v. 284, n. 40, p. 27384-92, 2009.

WOUTERS, K.; VAN GORP, P. J.; BIEGHS, V.; GIJBELS, M. J.; DUIMEL, H.; LÜTJOHANN, D.; KERKSIEK, A.; VAN KRUCHTEN, R.; MAEDA, N.; STAELS, B.; VAN BILSEN, M.; SHIRI-SVERDLOV, R.; HOFKER, M. H. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 474-86, 2008.

WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; MCKEON, C.; DARLINGTON, G. J.; SPIEGELMAN, B. M. Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. **Molecular Cell**, v. 3, n. 2, p. 151-158, 1999/02/01/ 1999.

XUE, B.; THUNHORST, R.; YU, Y.; GUO, F.; BELTZ, T.; B FELDER, R.; JOHNSON, A. **Central Renin-Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II-Elicited Hypertension.** 2015.

YANG, X.; HAGHIAC, M.; GLAZEBROOK, P.; MINIUM, J.; CATALANO, P. M.; HAUGUEL-DE MOUZON, S. Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts. **Hum Reprod**, v. 30, n. 9, p. 2152-9, 2015.

YOON, A.; TAMMEN, S. A.; PARK, S.; HAN, S. N.; CHOI, S. W. Genome-wide hepatic DNA methylation changes in high-fat diet-induced obese mice. **Nutr Res Pract**, v. 11, n. 2, p. 105-113, Apr 2017.

YU, L.; YUAN, M.; WANG, L. 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**, v. 33, n. 4, p. 1022-1028, Jul-Aug 2017.

YUZEFOVYCH, L.; WILSON, G.; RACHEK, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 299, n. 6, p. 28, 2010.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxid Med Cell Longev**, v. 4350965, n. 10, p. 22, 2016.

ZHAO, Y.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; CHEN, L. H. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 1, p. 71-8, 2004.

ZHOU, H.; URSO, C. J.; JADEJA, V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. **J Inflamm Res**, v. 13, p. 1-14, 2020.

ZINKHAN, E. K.; YU, B.; SCHLEGEL, A. Prenatal Exposure to a Maternal High Fat Diet Increases Hepatic Cholesterol Accumulation in Intrauterine Growth Restricted Rats in Part Through MicroRNA-122 Inhibition of Cyp7a1. **Front Physiol**, v. 9, n. 645, 2018.

ZUO, Y.; QIANG, L.; FARMER, S. R. Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. **J Biol Chem**, v. 281, n. 12, p. 7960-7967, 2006/03// 2006.

APÊNDICE A - TÉCNICAS DESENVOLVIDAS NA REALIZAÇÃO DO DOUTORADO SANDUÍCHE

Projeto: CAPES-COFECUB

Local: Université Claude Bernrd Lyon-1 (FRANÇA *et al.*). Laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition (CarMeN).

Período: Dezembro 2021 – Abril 2022

Supervisora: Prof. Dr. Béatrice Morio

Tratamento com Betaína e Glicina

Hipóteses:

- A restauração da circulação dos níveis de betaína e glicina melhoram a sensibilidade hepática à insulina e esteatose através das MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*).
- Proteínas chaves que regulam a integridade das MAMs são reguladas por modificações epigenéticas.

Objetivo:

- Avaliar *in vitro* o tratamento da glicina e betaína na resposta à insulina através da fosforilação da AKT e nas MAMs por meio dos pontos de contato entre VDAC e IP3R1.

Tratamento com ATR-101

Hipótese:

- O ATR-101 inibe a SOAT1 (*sterol O-acyltransferase 1*), uma enzima localizada na membrana do retículo endoplasmático que catalisa a esterificação do colesterol livre intracelular e que faz parte da estrutura das MAMs. Diminuindo desta maneira, a sensibilidade à insulina, com redução da fosforilação da AKT.

Objetivo:

- Avaliar *in vitro* o tratamento do ATR-101 na resposta à insulina através da fosforilação da AKT e nas MAMs por meio dos pontos de contato entre VDAC e IP3R1.

Técnicas:**1. Cultura celular:**

Os experimentos foram realizados em células de carcinoma hepatocelular HuH7. Esta linha celular foi estabelecida por Nakabayashi em 1982 (Nakabayashi H. et al., 1982). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, PAA Laboratories) contendo 1g/L de glicose (5,5 mM) a 37°C e em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂. O DMEM foi suplementado com 2mM de glutamina, 2mM de antibiótico/antimicótico e 10% de soro fetal de vitela (FBS), constituindo o meio padrão. Células em crescimento exponencial (cerca de 80% confluentes) foram usadas para todos os experimentos. Para isso, aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células foram semeadas em frasco de 75cm², 2×10^5 em placas de 6 poços (9,6cm²/poço), $0,8 \times 10^5$ e 5×10^4 nas placas de cultura de fundo de vidro para geração de imagens (MatTek Corporation®). Em todas as experiências, as células foram primeiro cultivadas durante 24 horas em meio padrão antes de qualquer tratamento ser iniciado.

Tratamento com Betaina e Glicina:

As células foram incubadas por 18h em meio de cultura com BSA (200µM) ou Palmitato (200µM). Em cada condição, as células foram tratadas com betaina (5mM) e glicina (5mM). Foi realizada a depleção em FBS (soro fisiológico humano) de 3h e após a estimulação à insulina (100nM) durante 15 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição.

Tratamento com ATR-101:

As células foram tratadas por 24h com DMSO ou ATR-101 (8 µM). Foi feita a depleção em FBS (soro fisiológico humano) de 3h e após a estimulação à insulina (100nM) durante 15 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição.

2. Expressão de proteínas**Extração e dosagem de proteínas:**

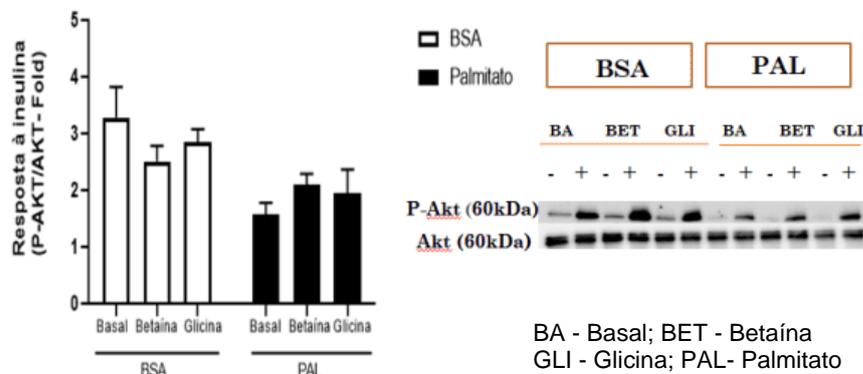
As proteínas das células HuH7 foram extraídas em mistura Ripa+ (1% de desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1% NP-40, em PBS suplementado imediatamente

antes da extração com 1mM DTT, 5mM EDTA, 20mM NaF, 1mM Na₃VO₄ e Inibidor de Protease 1X (1/1000)). Após incubação por 30 min em gelo, as amostras foram centrifugadas (15 min, 13.000 rpm, 4°C) e os sobrenadantes foram recuperados. A concentração de proteína foi avaliada usando o método de Bradford (Amersham 11 Biosciences). A densidade óptica foi medida com um espectrofotômetro a 595nm (MultiskanGO, ThermoScientific©).

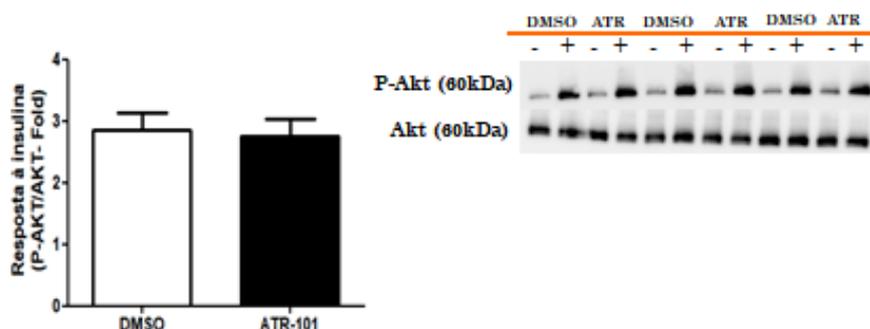
Mensuração da expressão de proteína por Western Blot:

Pouco antes do estágio de migração, a solução de tampão Laemmli 6x (Tris HCL 1M pH 7,4, Glycreol, SDS10%, β Mercapto, BBP) foi adicionada a 10µg de proteína que foi então termicamente desnaturada (10 min a 75°C). As amostras de proteína foram depositadas nos respectivos poços de géis de acrilamida/bisacrilamida a 10%. Os géis foram transferidos em membranas por transferência semi-seca usando o equipamento TransBlot Turbo Blotting (BioRad). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em BSA 4% por 2 horas à temperatura ambiente e incubadas durante a noite com o anticorpo primário específico. No dia seguinte, as membranas foram lavadas (tampão de lavagem: 10% TBS 1x, 0,3% Tween20) e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário. O sinal da membrana foi detectado utilizando a solução Luminata Classico (LuminataTM) e o equipamento ChemiDoc Cam (Biorad). Finalmente o sinal foi quantificado usando o software ImageLab (Biorad).

Tratamento com Betaína e Glicina:



Tratamento com ATR-101:



Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay:

Resumidamente, usamos o Duolink *in situ* PLA para detectar, visualizar e quantificar a interação proteica entre VDAC1 e IP3R1. Os anticorpos primários reconhecem proteínas e os anticorpos secundários exibem um pequeno pedaço terminal de DNA complementar (PLUS e MINUS). Quando duas proteínas estão em contato próximo (<40nm), a ligação e amplificação do DNA dos anticorpos ocorre criando um sinal de ponto fluorescente vermelho detectável por microscopia. O PLA *in situ* Duolink foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Duolink® Fluorescence Protocol II, Olink Bioscience). As células HuH7 foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído a 10% (10 min à temperatura ambiente, sob agitação). A reação foi interrompida com glicina 1M e as células foram lavadas com glicina 100mM. Em seguida, as células foram permeabilizadas com triton 0,1% (15 min à temperatura ambiente, sob agitação) e saturadas com uma solução comercial de PBS-BSA (1%) (1 h a 37°C).

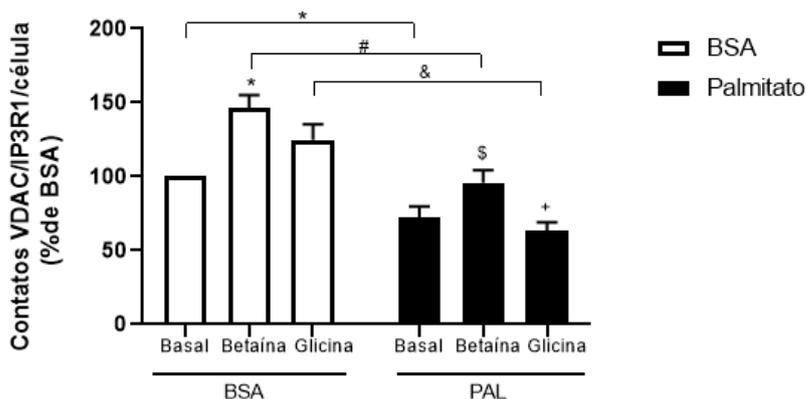
Em seguida, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com uma mistura binária de anticorpos primários anti-IP3R1 (diluição 1/500, Coelho, sc-28614) e VDAC1 (diluição 1/500, Rato, ab14734). A partir daí, todas as reações foram realizadas usando produtos químicos fornecidos pelo kit PLA. Após várias lavagens com TBS-Tween 0,3%, as células foram incubadas (1h a 37°C) com o anticorpo secundário complementar (Rabbit PLUS e Mouse MINUS) acoplado a um fluorocromo (Alexa Fluor), diluído em um diluente de anticorpo (1:5). Em seguida, foram aplicadas sucessivamente “solução de ligação (1:5)” com ligase (1:40) e

“solução de amplificação estoque” (1:5) com polimerase (1:80). Outra série de lavagem foi realizada usando SSC 1x (cloreto de sódio 0,15M, citrato de sódio 0,015M) e SSC 0,01x. As células foram então montadas com meio de montagem Duolink contendo DAPI. Os sinais de pontos de fluorescência foram quantificados usando o software BlobFinder (centro de análise de imagens, Universidade de Uppsala). Os resultados foram expressos em número de pontos por núcleo.

Imagem de fluorescência:

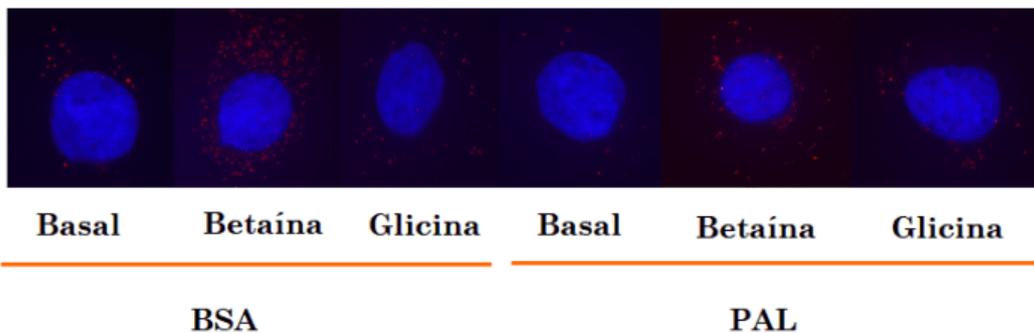
Todas as imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência inversa (Zeiss®, com equipamento ApoTome e programa Axio Vision). Um mínimo de 10 imagens foram tomadas para cada condição.

Tratamento com Betáina e Glicina



* vs BSA Basal, # BSA Betáina, & BSA Glicina
\$ vs PLA Basal, + vs PAL Basal

Imagem de fluorescência PLA (VDAC1- IP3R1)



Tratamento com ATR-101

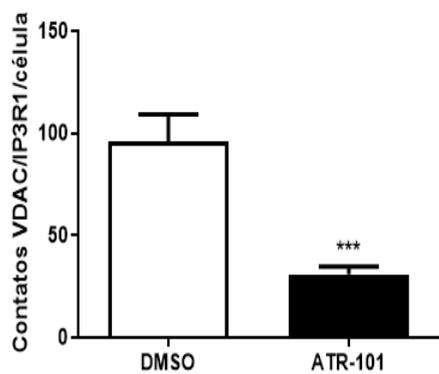
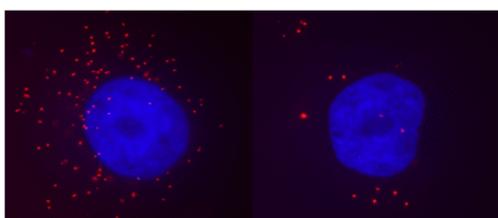


Imagem de fluorescência PLA (VDAC1- IP3R1)



DMSO

ATR-101

APÊNDICE B – PAPER 1

INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION
<https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1940885>



RESEARCH ARTICLE



Cardiometabolic impacts of saturated fatty acids: are they all comparable?

Aline Maria Nunes de Lira Gomes Bloise^a, Aiany Cibelle Simões-Alves^{a,b}, Alves Debora Santos^a ,
 Beatrice Morio^b and João Henrique Costa-Silva^{a,b} 

^aDepartment of Physical Education and Sport Sciences, Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brazil; ^bLaboratoire de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN), INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

ABSTRACT

In last decades, a phenomenon named nutrition transition has been observed in many countries around the world. It has been characterised by increased consumption of fat-rich diets, predisposing to cardiometabolic diseases and high prevalence of the obesity. In the dietary recommendations cited to prevent metabolic diseases, there is a consensus to decrease intake of saturated fatty acids (SFA) to less than 10% of total energy intake, as recommended by the Food Safety Authorities. However, fatty acids of different chain lengths may exhibit different cardiometabolic effects. Thus, our major aim was to review the cardiometabolic effects of different classes of SFA according to carbon chain length, i.e. short-, medium- and long-chains. The review emphasises that not all SFA may have harmful cardiometabolic effects since short- and medium-chain SFA can provide beneficial health effects and participate to the prevention of metabolic disorders.

ARTICLE HISTORY

Received 23 February 2021
 Revised 3 June 2021
 Accepted 4 June 2021

KEYWORDS

Saturated fatty acids;
 obesity; nutrition transition;
 cardiometabolic;
 dyslipidemia

Introduction

With the nutritional transition, the prevalence of non-transmissible chronic diseases associated with hypercaloric diets, trans fats, saturated fatty acids, and exacerbated consumption of sugar and salt, lack of physical activity and other unhealthy practices related to western lifestyle are observed worldwide (Batista Filho and Batista 2010). Characteristics of western diets include high levels of saturated fats, sodium, simple sugars and low levels of fibre (Popkin and Gordon-Larsen 2004; Popkin et al. 2012; Batal et al. 2018).

In the dietary recommendations cited to prevent metabolic diseases, there is a consensus to decrease intake of saturated fatty acids (SFA) to less than 10% of total energy intake (EFSA Panel on Dietetic Products and N. and Allergies 2010). However, a meta-analysis found essentially null associations between total saturated fatty acids and coronary risk in studies using food intake and those using circulating biomarkers. The pattern of findings of this analysis did not produce clearly supporting evidence for the current cardiovascular guidelines that encourage low consumption of saturated fats. The study suggests that nutritional guidelines on fatty acids and

cardiovascular guidelines may require a reassessment to reflect current evidence (Chowdhury et al. 2014). It is found that fatty acids of different chain lengths may exhibit different cardiometabolic effects (Iggman and Risérus 2011). As for chain size, fatty acids can be classified into short chain fatty acids (containing from 2 to 5 carbon atoms, SC), medium chain (with 6–12 carbon atoms, MC), long chain (with 12–18 carbon atoms, LC) and very long chain (with 19 or more carbon atoms, VLC) (Silva and Mura 2007). According to the origin, saturated fatty acids (SFA) can be divided into animal or vegetable origin. Good examples are vegetable oils, such as palm and coconut oils, which are sources of SFA. However, there is a considerable variety in this category. Coconut oil is rich in lauric acid (12:0) and also in caprylic (8:0), decanoic (10:0) and myristic (14:0) acids. Palm oil consists mainly of palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1n-9), the last one being a monounsaturated fatty acid. In general, the most common dietary SFA are palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) found in animal fats and also in plants. Palmitic acid (16:0) is one of the major fatty acids in plasma and human tissues, reflecting the consumption of moderately high fat diets (Iggman and Risérus 2011). Milk fat, from humans (Garwolińska et al. 2018) as well as from farm animals

CONTACT João Henrique Costa-Silva  joao.hcsilva@ufpe.br  Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Universidade Federal de Pernambuco – CAV – UFPE, Rua Alta do Reservatório, S/N, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, CEP: 55608-680, Brazil

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

(cow, goat) (Vieitez et al. 2016), has a very characteristic composition, since it contains SC, MC and LC SFA, as well as monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Still, in most dairy products, the main fatty acid is palmitic acid (16:0) (Iggman and Risérus 2011).

The aim of this manuscript was to review the main cardiometabolic effects of different classes of SFA according to carbon chain length, i.e. short-, medium- and long-chains. Highlighting harmful and beneficial health effects of SFA according to carbon chain length.

Physiological and cardiometabolic effects of short-chain SFA

The consumption of SC SFA is uncommon in the human diet, with the exception of dairy products (Iggman and Risérus 2011). Fat from goat milk has approximately a percentage of 20% SC SFA and that from cow milk on average 11% (Vieitez et al. 2016). Dietary carbohydrates, specifically resistant starches and dietary fibres, are substrates for fermentation by the intestinal microbiota that produce SC SFA, such as acetic acid (2:0), propionic acid (3:0) and butyric acid (4:0). It is assumed that most SC SFA are products of colonic fermentation in humans (Cummings 1981; Iggman and Risérus 2011). SC SFA are used by enterocytes as an energy source or are transported through the intestinal epithelium into the bloodstream where they can interact with peripheral cells and tissues as signalling molecules. The concentrations of SC SFA in the peripheral circulation are very low, consequently due to hepatic metabolism (Peters et al. 1992; Li et al. 2018). The daily concentration of SC SFA in humans is approximately 100–200 mM (Cook and Sellin 1998; Topping and Clifton 2001). The concentrations of SC SFA estimated in the proximal colon varies from 70 to 140 mM (Cook and Sellin 1998; Topping and Clifton 2001) and reduce to 20–70 mM in the distal colon (Topping and Clifton 2001). The concentrations of SC SFA are influenced by diet, portion of the intestine and type of microbiota present (Hooper et al. 2002). The predominant SC SFA found in plasma is acetic acid in acetate form (2:0) in concentrations ranging from 58 to 230 μ M. Serum concentrations of 3–15 μ M and 1–28 μ M have been reported for propionic acid (3:0, propionate) and butyric acid (4:0, butyrate), respectively (Wolever et al. 1997, 2002; Vogt et al. 2004). It has been proposed that serum levels of SC SFAs may be positively

associated with the quantity of fibre habitually consumed (Hashemi et al. 2017).

In general, SC SFAs can activate G protein-coupled receptors (GPCR41 and GPCR43) in colon epithelial and enteroendocrine cells, leading to the release of the peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide 1 (GLP1) which are intestinal anorectic hormones (Everard and Cani 2014; Byrne et al. 2015). The hormones GLP-1 and PYY can reduce motility and gastric emptying, and decrease pancreatic secretions (Brereton et al. 2015; Steinert et al. 2017). These hormones also inhibit orexigenic neurons as the neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related peptide (AgRP), while stimulating anorexigenic neurons such as the POMC (proopiomelanocortin) of the CNS (central nervous system), reducing appetite (Halatchev and Cone 2005; De Silva et al. 2011; Alhabeeb et al. 2021). In Figure 1 are illustrated the mechanisms of the SC SFAs related to reducing food intake and protecting individuals against obesity and related metabolic disorders, based on evidence reported by studies in humans and animals.

Acetic acid (2:0) is easily absorbed and transported to the liver, so it is less metabolised in the colon and penetrates the peripheral circulation. The presence of acetyl-CoA synthetase in the adipose cells and mammary glands allows the use of acetic acid (2:0) for lipogenesis, and in the muscle cells to generate energy from its oxidation. Acetic acid also increase cholesterol synthesis (Wong et al. 2006). Lactulose (18–25 g/d for 2 weeks), a disaccharide that is rapidly fermented in the colon, caused higher serum cholesterol levels when compared to the control diet in humans. It is suggested that this was caused by the hepatic uptake of acetate through colonic fermentation of lactulose and that these increased acetate concentrations caused an increase in liver lipogenesis (Jenkins et al. 1991). However, polyfructans fibres (inulin and oligofructose) in combination with viscous fibres (oat bran) can lower serum cholesterol (Wong et al. 2006) although acetic acid production is enhanced. This is due to the fact that the parallel increase in propionic acid (3:0) production from polyfructans is able to counteract the impact of acetic acid, thus reducing the risk of cardiovascular diseases (Wong et al. 2006). The propionic acid (3:0) has been shown to decrease cholesterol synthesis in the liver and consequently blood cholesterol (Anderson et al. 2009). Studies in rats suggest that the hypolipidemic action caused by propionic acid may be related to an induction of hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase, the limiting enzyme of cholesterol synthesis (Levrat et al. 1994).

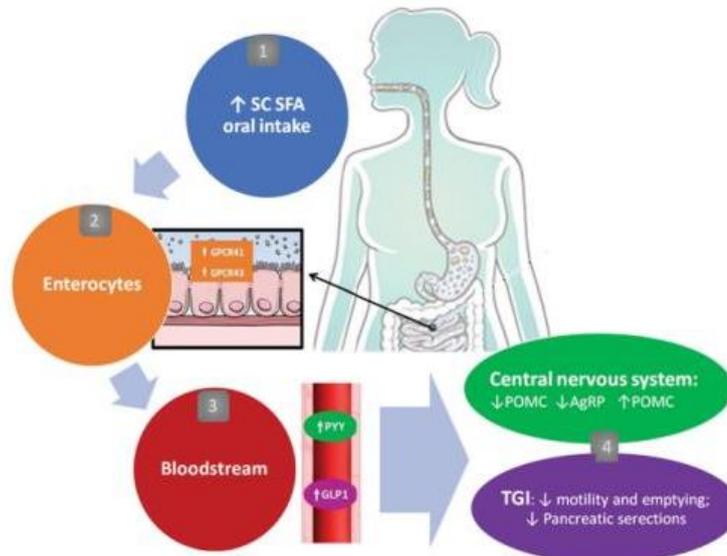


Figure 1. The dietary consumption of short-chain saturated fat acids can activate G protein-coupled receptors (GPCR41 and GPCR43) in colon epithelial and enteroendocrine cells, leading to the release in the bloodstream of the peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide 1 (GLP1), which are intestinal anorectic hormones. The hormones GLP-1 and PYY can reduce motility and gastric emptying, and decrease pancreatic secretions. These hormones also increase the activity of Pro-opiomelanocortin (POMC) and decrease the activity of Neuropeptide Y (NPY) and Agouti related-protein (AgRP). This could contribute to reducing food intake and protecting individuals against obesity and related metabolic disorders.

Indeed, propionic acid (3:0) has been suggested to have anti-inflammatory actions and beneficial effects for prevention of obesity, type 2 diabetes (T2DM) and cardiovascular diseases (Al-Lahham et al. 2010; Iggman and Risérus 2011). In humans, supplementation of 10 g/day of inulin propionate ester for 24 weeks decreased weight gain, intra-abdominal fat, intra-hepatocellular lipids and prevented the deterioration in insulin sensitivity (Chambers et al. 2015). First, propionic acid (3:0) has moderate inhibitory activity on cyclooxygenase (COX), an important enzyme in the production of pro-inflammatory eicosanoids (Bos et al. 2004). Although inflammation acts in the defense of the host, chronic inflammatory condition is a pathological characteristic observed in the metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease, T2DM and cardiovascular diseases (Libby et al. 2002; Hotamisligil 2006). Second, propionic acid is extensively absorbed by the liver and has been shown to inhibit cholesterol synthesis (Galisteo et al. 2008). Studies in rodents also suggest that propionic acid (3:0) has effects on the reduction of fatty acid concentration in the liver (Nishina and Freedland 1990; Demigné et al. 1995) and plasma (Chen et al. 1984; DiCostanzo et al. 1999). Finally, propionic acid (3:0) is probably able to favour adipogenesis in white adipose tissue (Hong et al. 2005; Ge et al. 2008). Indeed,

in vitro model, propionic acid (3:0) was found to inhibit in a dose-dependent manner the isoproterenol-induced lipolysis in differentiated adipocytes 3T3-L1 of mice. (Hong et al. 2005; Ge et al. 2008). Furthermore, propionic acid was shown to dose-dependently induce the expression of the glucose transporter type 4 (GLUT-4) in human adipose tissue (Al-Lahham et al. 2010) thus enhancing glucose capture for favouring triglycerides synthesis. The mechanism appointed for the induction of adipogenesis includes the binding of propionic acid (3:0) to the G protein-coupled receptor (GPCR43), which is an important receptor in cellular function (Hong et al. 2005). GPCR43 belongs to a subfamily of GPCRs, including GPR40 and GPR41, which have been identified as receptors for fatty acids (Covington et al. 2006). GPCR43 is induced during the differentiation process of adipocytes and its expression is increased in white adipose tissue of rodents fed a high-fat diet (Hong et al. 2005), suggesting that GPCR43 participates to the regulation of adipocyte functions.

Butyric acid (4:0), which is found in milk (Iggman and Risérus 2011), is the primordial source of energy of the colonocytes (Wong et al. 2006). It plays major role in colonic mucosa nutrition and in the prevention of colon cancer (Young et al. 2005; Sengupta et al. 2006). The mechanisms include inhibition of the

nuclear factor kappa B (NF- κ B) and of the histone deacetylase enzyme (Chen et al. 2006), which has been shown to induce apoptosis in Ehrlich ascites tumour cells (Belakavadi et al. 2007). Butyric acid (4:0) has also been shown to play a role in preventing intestinal inflammation, through binding to the GPR43 receptor (also present in cells of the colon, neutrophils and eosinophils) which blunts the inflammatory responses. Butyric acid (4:0) may help preventing atherosclerosis and heart failure through inhibition of the NF- κ B pathway (Aguilar et al. 2014). Hence, diet with 1% butyrate-supplemented for 10 weeks suppressed atherosclerotic lesions in apolipoprotein E (apoE) knockout mice (Aguilar et al. 2014). Butyric acid (4:0) reduces monocyte chemotactic protein-1 (CCL2/MCP-1), the vascular cell adhesion molecule 1 and the matrix metalloproteinase 2 production at the lesion site, leading to decreased macrophage migration and increased collagen deposition and atherosclerotic plaque stability (Aguilar et al. 2014; Ohira et al. 2017). In a co-culture system with adipocytes and macrophages, 0.1–1.0 mM of butyric acid (4:0) significantly reduced production of TNF- α , IL-6, MCP-1, and release of glycerol and free fatty acids. This suggested that butyric acid (4:0) is able to blunt inflammation and to inhibit triglyceride lipolysis through its binding to GPCR43 and GPCR41 present in adipocytes (Ohira et al. 2013, 2017).

Physiological and cardiometabolic effects of medium chain SFA

The MC SFA are found in dairy products and coconut and palm kernel oil (Iggman and Risérus 2011). MC SFA are also found in human milk and colostrum (Isaacs 2005). Medium-chain triglycerides (MCTs) are a family of triglycerides, composed of caproic (6:0), caprylic (8:0), capric (10:0), and lauric (12:0) fatty acids (Bach and Babayan 1982). MCTs are partially hydrolysed by gastric lipase in the stomach and thereafter by pancreatic lipase within the intestinal lumen, allowing the direct absorption of MC SFA through the portal vein to the liver, instead of being absorbed through the lymphatic system, which is the conventional pathway for the absorption of LC SFA (Bach and Babayan 1982; Traul et al. 2000). In comparison with the consumption of different proportions of MC SFA: LC SFA for 16 weeks, it was found in mice that the MC SFA group (MC SFA: LC SFA ratio of 1.1) had a different lipid signature than the LCSFA group (MC SFA: LC SFA ratio 0.04), prevented the elevation of pro-inflammatory ceramides, but showed high

concentrations of some lipids associated with an increased risk of cardiovascular disease (Žáček et al. 2019). Few studies showed that they raise the basal metabolic rate and thermogenesis (Seaton et al. 1986; Iggman and Risérus 2011). Because MC SFA are more easily absorbed and transported through the portal circulation, which become adequate in states of intestinal malabsorption, pancreatic insufficiency, impaired chylomicron lymphatic transport, total parenteral nutrition. MC SFA are also used in premature infant formula (Marten et al. 2006).

In chicken embryo hepatocytes in culture, caproic acid (6:0) and caprylic acid (8:0) have been shown to significantly decrease the expression and activity of fatty acid synthase (FAS) induced by insulin and T3 (triiodothyronine) (Akpa et al. 2010). FAS is a key enzyme of *de novo* lipogenesis. It is positively regulated in the postprandial state and is suspected to contribute to obesity and non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) (Berlanga et al. 2014; Sanders and Griffin 2016). In cultured hepatocytes, caprylic acid (8:0) and capric acid (10:0) inhibited the induction of cell steatosis induced by oleic acid (18:1) and palmitic acid (16:0), both LC SFA (Wang et al. 2016).

It has been shown that MC SFA can prevent endotoxic lipopolysaccharide (LPS)-mediated endotoxemia. For survival analysis, the rats were fed either MC SFA or corn oil (source of LC fatty acids), with 5 g/kg per day by gavage during 1 week before they received an acute intravenous dose of LPS. Injection of LPS caused mortality in animals fed with oil, but no mortality occurred in MC SFA fed rats. In LPS treated groups, liver lesions and markers of inflammation (CD14, endotoxin receptor involved in inflammation; TNF- α , tumour necrosis factor alpha) were lower in MC SFA fed rats than in those which received corn oil. For the analysis of intestinal permeability, another group of MC SFA/LPS animals was used, which received a dosage of 5 mg/kg of MC SFA per gavage for 1 week compared to those treated with oil/LPS. An improvement in intestinal permeability was observed in the MC SFA/LPS group. This study thus demonstrated that MC SFA supplementation was able to limit endotoxemia-induced inflammation and lesions, which are associated with obesity and the metabolic syndrome (Kono et al. 2003). In mice fed a diet rich in cholesterol and supplemented with either medium chain triglycerides [caprylic acids (C8:0) and capric acids (C10:0)] (CR-MCT) or long chain triglycerides (CR-LCT) for 16 weeks, MCT supplementation decreased body weight and serum levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol

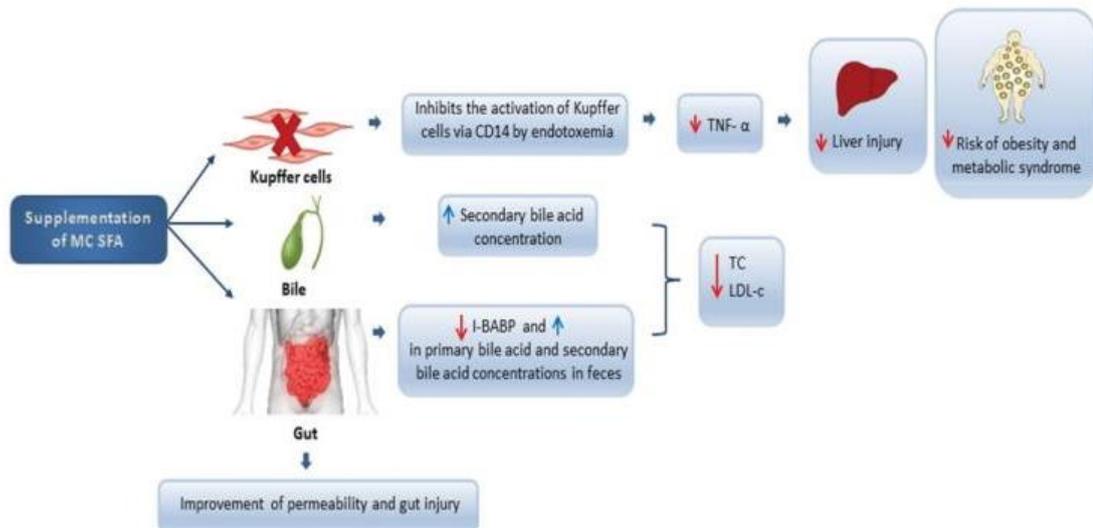


Figure 2. The medium chain saturated fatty acids (MC SFA) prevent liver injury and risk of obesity and metabolic syndrome by inhibiting $\text{TNF-}\alpha$ production due to endotoxin-mediated activation of Kupffer cells via CD14. It is observed that MC SFA decrease levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) by increase in primary bile acid and secondary bile acid concentrations in faeces and secondary bile acids in bile and reduction of ileal bile acid binding protein (I-BABP) gene expression in the small intestine. The MC SFA also acts in the improve permeability and gut injury.

(LDL-C) and increased serum high-density lipoprotein (HDL)/LDL ratio. An increase in primary bile acid and secondary bile acid concentrations in faeces and secondary bile acids in bile was found with reduction of ileal bile acid binding protein (I-BABP) gene expression in the small intestine in the CR-MCT group. This suggests that caprylic acid (C8:0) and capric acid (C10:0)-induced reduction in serum cholesterol levels may be mediated through increased bile acid excretion, probably thanks to the reduction of bile acid reabsorption in the small intestine (Li et al. 2018). In Figure 2 are illustrated the mechanisms of MC SFAs in the preventing of inflammation induced by endotoxemia and consequently in the development of liver injury, furthermore is demonstrated its action in the reducing CT, LDL and intestinal protection.

By contrast with other MC SFA, lauric acid (12:0) is classified in the literature as MC SFA, and sometimes as LC SFA (Iggman and Risérus 2011). It can be absorbed through both the portal and lymphatic system. MC SFA monoglycerides, and specifically lauric acid monolaurin (12:0) (Li et al. 2009). Lauric acid (12:0) is found in coconut oil, palm kernel oil, dairy products and some margarines. It was shown to increase the risk of cardiovascular diseases, by increasing TC and LDL-C, suggesting the oils sources of lauric acid would be very damaging to cardiovascular health. Findings from meta-analyses provide evidence that ingestion of lauric acid (12:0) elevates HDL levels

to a higher degree than LDL, thus improving the TC:HDL-C ratio when compared to carbohydrates (Mensink et al. 2003; Micha and Mozaffarian 2010). However in rabbits, an isocaloric diet rich in coconut oil (at either 15 or 26% of total energy) in comparison with standard feeding (4.2% fat derived from soybean) induced the development of atherosclerosis and marked metabolic disorders, even without body weight gain (Waqar et al. 2010). In humans, the consumption of a meal rich in coconut oil (composition of fatty acids: 89.6% saturated fats, 5.8% monounsaturated and 1.9% polyunsaturated) compared to a meal rich in safflower oil (composition of fatty acids: 75% polyunsaturated fats, 13.6% monounsaturated and 8.8% saturated) decreased the anti-inflammatory action of HDL and promoted atherogenic factors. Furthermore, expression of the intracellular adhesion molecules (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecules (VCAM)-1 was increased in human umbilical vein endothelial cells incubated with HDL from individuals who had consumed a meal rich in coconut oil, whereas it was decreased following incubation with HDL from individuals who had consumed a meal rich in safflower oil (Nicholls et al. 2006). These data suggest that lauric acid (12:0) despite of its impact on increased plasma HDL, is not favourable to cardiovascular protection. This conclusion is supported by a review study which evidenced that the consumption of coconut oil, compared to the consumption of

unsaturated oils and other saturated fats, does not help improving plasma lipid and lipoprotein profiles, and does not help reducing the risk of cardiovascular diseases (Eyres, Eyres et al. 2016). Two longitudinal cohort studies have confirmed previous results that longer chain saturated fatty acids (12:0–18:0) increase the risk of cardiovascular disease (Zong et al. 2016).

Physiological and cardiometabolic effects of long chain SFA

The human plasma of healthy subjects after an overnight fast contains on average 214 mM of free fatty acids, with approximately 63.8 mM of palmitic acid (16:0) and 22.1 mM of stearic acid (Quehenberger et al. 2010). In humans, palmitic acid (16:0) consumption increases serum TC, LDL-C, and HDL-C concentrations in comparison to diets rich in carbohydrate and it is accepted that this SFA increases the risks of cardiovascular diseases (Iggman and Risérus 2011). By contrast, involvement of stearic acid (18:0) in the increased risk of cardiovascular diseases are less consensual (Hunter et al. 2010). In a systematic review and meta-analysis involving 51 dietary intervention trials, it was found that substitution of palmitic acid (16:0) for stearic acid (18:0) induced higher concentrations of various biomarkers of coronary heart disease and cardiovascular disease, both unfavourable (TC, LDL-C, apolipoprotein B and LDL-C/HDL-C) and favourable (HDL-C), whereas most of the biomarkers were significantly lower when compared with diets rich in myristic (14:0)/lauric (12:0) acids (Fattore et al. 2014). Meta-analyses of studies demonstrated that postprandial lipaemia was highly increased after consumption of stearic acid (18:0) in comparison to SC SFA and MC SFA (Sanders 2009), but plasma LDL levels were lower in comparison to other LC SFA such as palmitic acid (16:0) (Kris-Etherton and Yu 1997). Furthermore, stearic acid (18:0) consumption had similar impacts on plasma lipoproteins (LDL and HDL) compared to a diet rich in carbohydrates (Kris-Etherton and Yu 1997). However when compared to a high-fat milk diet (for 5 weeks), characterised by high content of palmitic acid (16:0), a diet rich in stearic acid (18:0) (33% of energy from fat [9.3% of energy as stearic acid]), has been shown to increase levels of lipoprotein A (+ 10%), a risk factor for cardiovascular disease (Aro et al. 1997). In addition in men, stearic acid (18:0) intake for 5 weeks increased levels of plasma fibrinogen compared to high-carbohydrate diets and other SFA [palmitic acid (16:0) and lauric acid (12:0)], trans fatty acids and oleic acid (18:1n-9)

(Baer et al. 2004). However, other studies failed to evidence the prothrombotic effect of stearic acid compared to palmitic acid (16:0) (Thijssen et al. 2005) or even showed beneficial effects in relation to thrombotic risk profiles (Kelly et al. 2001). Stearic acid (18:0) has been shown to influence further death and inflammation of endothelial cells in humans. It induces apoptosis of human coronary artery endothelial cells by activating the inhibitor of κ B kinase (IKK) and NF- κ B. The role of stearic acid in the activation of NF- κ B was also demonstrated in comparison to other LC SFAs in an *in vitro* study (Harvey et al. 2010).

A maternal diet rich in LC SFA (with 15.7% palmitic acid and 13.8% stearic acid from total fatty acids), also containing 12% trans fatty acids, with a PUFA: SFA ratio of 0.86, in the period of gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation in rodent offspring (Pimentel et al. 2012). Within a few days, by eating a diet rich in calories and fat, an increased amount of SFA from the periphery crosses the blood-brain barrier and induces an inflammatory response in hypothalamic neurons, being an early event in the development of obesity (Thaler et al. 2012), involving the activation of microglia, tissue macrophages resident in the CNS (Timper and Bruning 2017).

Studies have shown that specific SFAs such as palmitic acid, a fatty acid produced by adipose tissue and acquired through diet, may play a role in the apoptosis in various nonadipose cells, including pancreatic beta cells (Chu et al. 2010), cardiac myocytes (Miller et al. 2005), and granulosa cells (Mu et al. 2001), as well as the CNS cells neurons (Almaguel et al. 2009) and astrocytes (Blazquez et al. 2000).

Palmitic acid (16:0) is able to induce abnormal ectopic lipid accumulation (called as lipotoxicity) and enhance the risk of development of insulin resistance (Consitt et al. 2009; Samuel 2011). It has been established that lipotoxicity plays an important role in the development of heart failure in obesity and diabetes (Wende and Abel 2010; Goldberg et al. 2012). A large increase in free serum palmitate can lead to apoptosis and dysfunction of pancreatic β -cells (Ruan et al. 2018). A study of 8 week old mice injected intraperitoneally with 100 mg/kg palmitic acid (16:0) five times a day for 2 weeks and after 2 weeks were injected with 200 mg/kg palmitic acid (16:0) twice daily for another 2 weeks, found in these mice T2DM characteristics. Pancreatic sections of these mice showed a decrease in the expression of K_{ATP} channels and pancreatic β -cell apoptosis (Ruan et al. 2018). It has been shown that

FFAs increase endoplasmic reticulum (ER) stress in β -cells, inducing to dysregulation of protein folding, processing, trafficking, and calcium buffering. After exposure to SFAs, such as palmitic acid (16:0), a sustained depletion of ER Ca^{2+} , followed by mitochondria dysfunction and the production of nitric oxide (NO) free radicals through the increased activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), causing to β -cell apoptosis (Yang and Li 2012). Lipotoxicity leads to insulin resistance in the liver and skeletal muscle, reducing normal responses to insulin, decreasing glucose uptake by skeletal muscle, increasing gluconeogenesis and providing glucose from the liver to the circulation (Cusi 2009). The mechanisms pointing to reduction of insulin signalling include reduction of insulin receptor expression and activity, reduction of phosphorylation of insulin receptor substrates on tyrosine (IRS) and activation of kinases such as c-Jun N-terminal kinase (JNK), which phosphorylate the IRS in serine residues, inhibiting its activity (Cusi 2009; Martins et al. 2012). Lipotoxicity is also related to insulin resistance through mechanisms of mitochondrial dysfunction (Martins et al. 2012).

Study *in vitro* with H9c2 cells (embryonic cardiac myoblasts) treated with palmitic acid (16:0) (100 mM) induced a lipotoxicity, a gradual increase in intracellular lipid accumulation, as well as apoptotic cell death. An increase in stress in the endoplasmic reticulum (ER) was observed in these mice in response to palmitic acid (16:0), which also induced resistance to adiponectin, assessed via AMPK phosphorylation, by decreasing the expression of APPL1 (Drosatos et al. 2011). Cardiomyocyte apoptosis is a component of cardiac remodelling leading to heart failure (Drosatos et al. 2011). Adiponectin is considered an important cardioprotective adipokine, with effects anti-apoptotic, anti-inflammatory, anti-fibrotic and beneficial metabolic effects (Park and Sweeney 2013). A targeted mechanism that may lead to adiponectin resistance includes decreased expression of the components of the adiponectin signalling pathway such as adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 (APPL1). APPL1 is vital for many actions of adiponectin, involving metabolic and antiapoptotic effects (Fang et al. 2010; Park et al. 2011).

There is an increasing concepts that LC SFAs act on macrophages to alter the cellular ratio M1(pro-inflammatory)/M2(anti-inflammatory). These fatty acids stimulate the development of M1 cells, while unsaturated types help to elevate M2 cells. During the development of obesity and adipocyte hypertrophy,

infiltration of proinflammatory macrophages M1 and subsets of T cells occurs in the adipose tissue (Pirola and Ferraz 2017). Indeed, hypertrophied adipocytes release monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Kanda et al. 2006), this activates the blood monocytes through the chemokine receptor 2 (CCR2) and induces the migration of monocytes into adipose tissue and differentiation into macrophages. The Macrophages in adipose tissue are activated in response to SFA, such as palmitic acid (16:0), released from hypertrophied adipocytes, thus producing larger amounts of inflammatory mediators, such as TNF- α , interleukin-6, MCP-1 (Suganami et al. 2005). *In vitro* studies have also demonstrated that exposure of adipocytes to high concentrations of palmitic acid (16:0) increased TNF- α and IL-6 mRNA and protein expressions (Kennedy et al. 2009). The chronic low-grade inflammation is related to the development of several pathologies associated with obesity, such as insulin resistance, diabetes, cardiovascular disease and NAFLD (Zhou et al. 2020). In Figure 3 is illustrated the mechanism of action of the LC SFAs in increasing inflammatory mediators and, consequently in the development of cardiometabolic diseases.

The heptadecanoic acid (17:0), also called margaric, is a saturated fatty acid present in bovine milk fat and was the original component of margarine (hence, margarine's name) in the late 1800s (Mansson 2008) and have been described as biomarkers of dairy consumption (Jenkins et al. 2015). Within large observational human studies, this fatty acid correlate moderately with their individual intake (Riserus and Marklund 2017). However, within strictly controlled animal models, there are significant differences, there is convincing evidence showing that heptadecanoic acid (17:0), does not directly relate to dietary intake. Instead, heptadecanoic acid (17:0) endogenous biosynthesis has a significant influence on its circulating levels (Jenkins et al. 2018). Furthermore, the literature suggests that heptadecanoic acid (17:0) may have a significant pathophysiological relevance and could be subject to *in vivo* homeostasis. Their circulating levels show a significant association with a reduced risk of cardiometabolic diseases (Khaw et al. 2012; Forouhi et al. 2014). Higher erythrocyte membrane or plasma phospholipid heptadecanoic acid (17:0) levels, among other identified fatty acids, have been identified as biomarkers of or potential protective factors against development of metabolic syndrome, type 2 diabetes, and associated inflammation in humans (Krachler et al. 2008; Forouhi et al. 2014; Magnusdottir et al. 2014), supporting theses metabolic benefits.

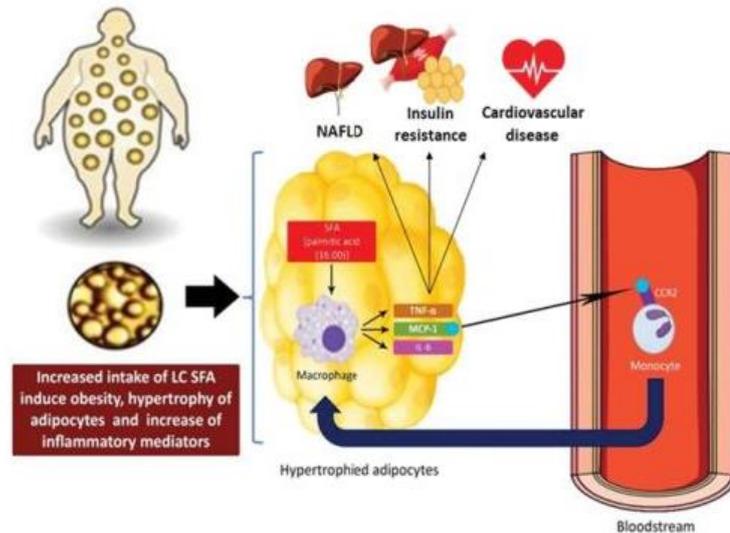


Figure 3. Long chain saturated fatty acids (LC SFAs) act on macrophages to alter the cellular ratio M1 (pro-inflammatory)/M2 (anti-inflammatory). These fatty acids stimulate the development of M1 cells, while unsaturated types help to elevate M2 cells. During the development of obesity and adipocyte hypertrophy, infiltration of proinflammatory macrophages M1 and subsets of T cells occurs in the adipose tissue. Indeed, hypertrophied adipocytes release monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), this activates the blood monocytes through the chemokine receptor 2 (CCR2) and induces the migration of monocytes into adipose tissue and differentiation into macrophages. Macrophages in adipose tissue are activated in response to SFA, such as palmitic acid (16:0), released from hypertrophied adipocytes, thus producing larger amounts of inflammatory mediators, such as TNF- α , interleukin-6, and MCP-1. The chronic low-grade inflammation is related to the development of several pathologies associated with obesity, such as insulin resistance, diabetes, cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD).

Recently, several prospective investigations have consistently documented potentially-beneficial associations of a unique group of very-long chain saturated fatty acids (VLCSFAs), saturated fats with a chain length of 20 or more carbon atoms, in circulation with atrial fibrillation, diabetes, and insulin sensitivity (Fretts et al. 2014). While diet is unlikely the major source of these fatty acids in the human body, the VLCSFAs can be synthesised and serve as essential constituents of sphingolipids that are found in cell membranes throughout the body (Quehenberger et al. 2010). Evidence suggests that the VLCSFAs are actively involved in human metabolism and cardiovascular disease aetiology through modulating peroxisome-related functionality and interplay with PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptor) (Yamazaki et al. 2014). The study show with circulating arachidic acid (20:0), behenic acid (22:0), and lignoceric acid (24:0) are associated with a lower risk of diabetes, and these associations may be mediated by lower triglycerides and palmitic acid (Lemaitre et al. 2015).

In the Cardiovascular Health Study (CHS) consisting of 2,899 elderly participants, VLCSFAs in serum were significantly associated with lower risk of developing atrial fibrillation (Fretts et al. 2014). In a small

nested case-control study of diabetes conducted in Australia, lignoceric acid (24:0) in whole blood was significantly associated with lower diabetes incidence (Alhazmi et al. 2014). In the much larger EPIC-InterAct case-cohort study, VLCSFAs in plasma phospholipids were all inversely associated with lower type 2 diabetes risk (Forouhi et al. 2014). In contrast to prospective results, evidence generated from cross-sectional studies has been somewhat mixed. In healthy adolescent girls, plasma lignoceric acid (24:0) was the only individual fatty acid that was positively correlated with adiponectin levels (Gallo et al. 2010). In Japanese men 40 years and older, serum levels of behenic acid (22:0) and lignoceric acid (24:0) were both correlated with higher HDL-C levels and lower TG levels (Yamazaki et al. 2014). However, in two other cross-sectional studies, VLCSFAs levels in serum or whole blood were positively associated with coronary artery disease prevalence or insulin resistance (Fernandez-Real et al. 2003; Miyazaki et al. 2014). Evidence regarding erythrocyte VLCSFAs is sparse and exclusively from cross-sectional studies. Interestingly, in these studies erythrocyte lignoceric acid (24:0) or hexacosanoic acid (26:0) were consistently correlated with atherogenic lipoprotein profiles or diabetes status (Matsumori et al. 2013). The source of heterogeneity

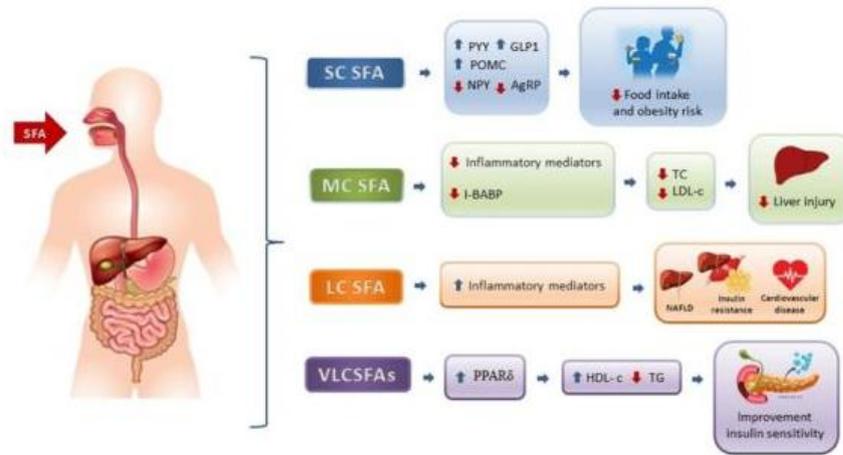


Figure 4. Saturated fatty acids have different cardiometabolic effects according to the size of your carbon chain. Short-chain saturated fatty acids (SC SFA) act to increase anorexigenic intestinal hormones, such as the peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide 1 (GLP1). It also increases the activity of anorexigenic neurons like Pro-opiomelanocortin (POMC) and decreases the activity of orexigenic neurons like Neuropeptide Y (NPY) and Agouti related-protein (AgRP). Consequently leading to decreased food consumption and of the risk of obesity. Medium chain saturated fatty acids (MC SFA) are related with the reduction of inflammatory mediators and with the reduction of the gene expression of ileal bile acid binding protein (I-BABP), thus leading to a decrease in total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and liver injury. Long-chain saturated fatty acids (LC SFA) are related to the increase in inflammatory mediators and the development of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD), insulin resistance and cardiovascular diseases. Very long chain saturated fatty acids (VLCSFAs) are related to activation of the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR δ) and, consequently, to the increase in high-density lipoprotein (HDL-C) levels, reducing triglyceride (TG) levels and improving insulin sensitivity.

among these cross-sectional studies is unknown, although they all shared similar limitations.

The mechanisms underlying these observations are not well established, although evidence from animal experiments suggests that these fatty acids may actively modulate lipid metabolism and insulin sensitivity through multiple pathways. Unlike most other fatty acids that are oxidised in mitochondria, the β -oxidation of very long-chain fatty acids occurs primarily in peroxisomes (Kawamura et al. 1981; Malik et al. 2015). Activated fatty acid-CoA can be utilised in anabolic processes in peroxisomes, including the synthesis of plasmalogen. Plasmalogens may serve as anti-oxidants by being preferentially oxidised to spare the oxidation of other lipids (Braverman and Moser 2012). Another unique feature that distinguishes VLCSFAs from other fatty acids is that PPAR α does not play a pivotal role in regulating the β -oxidation of VLCSFAs (Moser et al. 1999). Instead, PPAR δ may modulate the metabolism of very long-chain fatty acids by upregulating very long-chain acyl-CoA synthetase, which is localised in peroxisome membranes and plays an essential role in activating VLCSFAs to facilitate downstream processes (Watkins 1997). A study in humans (with 794 men and Women) incident coronary heart disease show strong favourable

correlations between VLCSFAs and blood lipids, as well as insulin resistance, are in line with the effects of PPAR δ activation on raising HDL-C levels, reducing TG levels, and improving insulin sensitivity (Reilly and Lee 2008; Malik et al. 2015). In Figure 4, we summarise the main cardiometabolic findings that we found and presented of the different types of SFA, according to the length of their carbon chain, based on evidence reported by studies in humans and animals.

Conclusion

We observed that the different types of saturated fatty acids, classified according to carbon chain length, exhibit different cardio-metabolic effects, from very beneficial to harmful. SC SFA act in the increase of anorexigenic intestinal hormones, in the increase of the activity of anorexigenic neurons and in the decrease of the activity of orexigenic neurons. Consequently, leading to reduction in food consumption and in the risk of obesity. The MC SFA are related to the reduction of inflammatory mediators, with the decrease of serum levels of CT, LDL-C and liver damage. LC SFA are already related to the increase in inflammatory mediators and the

development of NAFLD, insulin resistance and cardiovascular diseases. But VLCSFAs are associated with increasing HDL-C levels, reducing triglyceride levels and improving insulin sensitivity. Therefore, dietary recommendations suggesting a general decrease of SFA consumption need to be revised by government agencies and new conceptions may be discussed. Because it is consensus that some SFA, according to the length of their carbon chain, have beneficial effects on cardiometabolic parameters, acting in the prevention of metabolic, cardiovascular diseases and anti-inflammatory action.

Acknowledgments

The authors who are graduate students (AMNLG Bloise, AC Simões-Alves, and DS Alves) thank fellowship grants from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Scholarship – CAPES) and Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco-PE-Brazil (Scholarship – FACEPE). In addition, we thank CAPES/COFECUB Program for the postdoctoral project conducted by Professor JH Costa-Silva at l'Université Claude Bernard-Lyon 1.

Disclosure statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco-PE-Brazil [PRONEM 0797-4.05/14], the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil [CNPq 311386/2019-9] and CAPES/COFECUB Program (number: 797-14 and 923-20).

ORCID

Alves Debora Santos  <http://orcid.org/0000-0002-8263-2217>

João Henrique Costa-Silva  <http://orcid.org/0000-0002-9794-1418>

References

Aguilar EC, Leonel AJ, Teixeira LG, Silva AR, Silva JF, Pelaez JMN, Capettini LSA, Lemos VS, Santos RAS, Alvarez-Leite JI, et al. 2014. Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 24(6):606–613.

Akpa MM, Point F, Sawadogo S, Radenne A, Mounier C. 2010. Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthesis by hexanoate. *Lipids.* 45(11):997–1009.

Alhabeeb H, AlFaiz A, Kutbi E, AlShahrani D, Alsuhaib A, AlRajhi S, Alotaibi N, Alotaibi K, AlAmri S, Alghamdi S, et al. 2021. Gut hormones in health and obesity: the upcoming role of short chain fatty acids. *Nutrients.* 13(2):481.

Alhazmi A, Stojanovski E, Garg ML, McEvoy M. 2014. Fasting whole blood fatty acid profile and risk of type 2 diabetes in adults: a nested case control study. *PLOS One.* 9(5):e97001.

Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1801(11):1175–1183.

Almaguel FG, Liu J-W, Pacheco FJ, Casiano CA, De Leon M. 2009. Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. *J Neurosci Res.* 87(5):1207–1218.

Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev.* 67(4):188–205.

Aro A, Jauhainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. 1997. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 65(5):1419–1426.

Bach AC, Babayan VK. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr.* 36(5):950–962.

Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. 2004. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr.* 79(6):969–973.

Batal M, Steinhouse L, Delisle H. 2018. The nutrition transition and the double burden of malnutrition. *Med Sante Trop.* 28(4):345–350.

Batista Filho M, Batista LV. 2010. Transição alimentar/nutricional ou mutação antropológica? *Ciência e Cultura.* 62:26–30.

Belakavadi M, Prabhakar BT, Salimath BP. 2007. Purification and characterization of butyrate-induced protein phosphatase involved in apoptosis of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1770(1):39–47.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. 2014. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* 7:221–239.

Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzmán M. 2000. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *Faseb J.* 14(14):2315–2322.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(7):1187–1205.

Braverman NE, Moser AB. 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 9(52):22.

Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. 2015. Alpha-, delta- and PP-cells: are they the architectural cornerstones of islet structure and co-ordination? *J Histochem Cytochem.* 63(8):575–591.

- Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. 2015. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 39(9):1331–1338.
- Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, et al. 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*. 64(11):1744–1754.
- Chen J, Ghazawi FM, Bakkar W, Li Q. 2006. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Mol Cancer*. 5(1):71.
- Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. 1984. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 175(2):215–218.
- Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, Johnson L, Franco OH, Butterworth AS, Forouhi NG, Thompson SG, et al. 2014. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 160(6):398–406.
- Chu KY, Lin Y, Hendel A, Kulpa JE, Brownsey RW, Johnson JD. 2010. ATP-citrate lyase reduction mediates palmitate-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 285(42):32606–32615.
- Consitt LA, Bell JA, Houmard JA. 2009. Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity. *IUBMB Life*. 61(1):47–55.
- Cook SI, Sellin JH. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 12(6):499–507.
- Covington DK, Briscoe CA, Brown AJ, Jayawickreme CK. 2006. The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans*. 34(Pt 5):770–773.
- Cummings JH. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 22(9):763–779.
- Cusi K. 2009. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 13(4):545–563.
- De Silva A, Salem V, Long CJ, Makwana A, Newbould RD, Rabiner EA, Ghatei MA, Bloom SR, Matthews PM, Beaver JD, et al. 2011. The gut hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. *Cell Metab*. 14(5):700–706.
- Demigné C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Rémésy C. 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br J Nutr*. 74(2):209–219.
- DiCostanzo A, Williams JE, Keisler DH. 1999. Effects of short- or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. *J Anim Sci*. 77(11):3050–3056.
- Drosatos K, Bharadwaj KG, Lymperopoulos A, Ikeda S, Khan R, Hu Y, Agarwal R, Yu S, Jiang H, Steinberg SF, et al. 2011. Cardiomyocyte lipids impair β -adrenergic receptor function via PKC activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 300(3):E489–E499.
- EFSA Panel on Dietetic Products, N. and Allergies. 2010. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J*. 8(3):1461.
- Everard A, Cani PD. 2014. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord*. 15(3):189–196.
- Eyres L, Eyres MF, Chisholm A, Brown RC. 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr Rev*. 74(4):267–280.
- Fang X, Palanivel R, Cresser J, Schram K, Ganguly R, Thong FSL, Tuinei J, Xu A, Abel ED, Sweeney G, et al. 2010. An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299(5):E721–E729.
- Fattore E, Bosetti C, Brighenti F, Agostoni C, Fattore G. 2014. Palm oil and blood lipid-related markers of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. *Am J Clin Nutr*. 99(6):1331–1350.
- Fernandez-Real J-M, Broch M, Vendrell J, Ricart W. 2003. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care*. 26(5):1362–1368.
- Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB, Crowe FL, Huerta JM, Guevara M, Beulens JWJ, et al. 2014. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2(10):810–818.
- Fretts AM, Mozaffarian D, Siscovick DS, Djousse L, Heckbert SR, King IB, McKnight B, Sitlani C, Sacks FM, Song X, et al. 2014. Plasma phospholipid saturated fatty acids and incident atrial fibrillation: the Cardiovascular Health Study. *J Am Heart Assoc*. 3(3):e000889.
- Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. 2008. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 19(2):71–84.
- Gallo S, Egeland G, Meltzer S, Legault L, Kubow S. 2010. Plasma fatty acids and desaturase activity are associated with circulating adiponectin in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 95(5):2410–2417.
- Garwolińska D, Namieśnik J, Kot-Wasik A, Hewelt-Belka W. 2018. Chemistry of human breast milk – a comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. *J Agric Food Chem*. 66(45):11881–11896.
- Ge H, Li X, Weiszmann J, Wang P, Baribault H, Chen J-L, Tian H, Li Y. 2008. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 149(9):4519–4526.
- Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. 2012. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab*. 15(6):805–812.
- Halatchev IG, Cone RD. 2005. Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice. *Cell Metab*. 1(3):159–168.
- Harvey KA, Walker CL, Pavlina TM, Xu Z, Zaloga GP, Siddiqui RA. 2010. Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. *Clin Nutr*. 29(4):492–500.

- Hashemi Z, Foughse J, Im H, Chan C, Willing B. 2017. Dietary pea fiber supplementation improves glycemia and induces changes in the composition of gut microbiota, serum short chain fatty acid profile and expression of mucins in glucose intolerant rats. *Nutrients*. 9(11):1236.
- Hong Y-H, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi K-C, Feng DD, Chen C, Lee H-G, et al. 2005. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*. 146(12):5092-5099.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. 22(1):283-307.
- Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444(7121):860-867.
- Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. 2010. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 91(1):46-63.
- Iggman D, Risérus U. 2011. Role of different dietary saturated fatty acids for cardiometabolic risk. *Clin Lipidol*. 6(2):209-223.
- Isaacs CE. 2005. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. *J Nutr*. 135(5):1286-1288.
- Jenkins B, Aoun M, Feillet-Coudray C, Coudray C, Ronis M, Koulman A. 2018. The dietary total-fat content affects the *in vivo* circulating C15:0 and C17:0 fatty acid levels independently. *Nutrients*. 10(11):1646.
- Jenkins B, West JA, Koulman A. 2015. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (c15:0) and heptadecanoic acid (c17:0) in health and disease. *Molecules*. 20(2):2425-2444.
- Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins A, Brighenti F, Vuksan V, Rao AV, Cunnane SC, Ocana A, Corey P, Vezina C, et al. 1991. Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr*. 54(1):141-147.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-i, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, et al. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 116(6):1494-1505.
- Kawamura N, Moser HW, Kishimoto Y. 1981. Very long chain fatty acid oxidation in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 99(4):1216-1225.
- Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D. 2001. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr*. 55(2):88-96.
- Kennedy A, Martinez K, Chuang C-C, LaPoint K, McIntosh M. 2009. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*. 139(1):1-4.
- Khaw K-T, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. 2012. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLOS Med*. 9(7):e1001255.
- Kono H, Fujii H, Asakawa M, Masayuki Y, Matsuda M, Maki A, Matsumoto Y. 2003. Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Ann Surg*. 237(2):246-255.
- Krachler B, Norberg M, Eriksson JW, Hallmans G, Johansson I, Vessby B, Weinehall L, Lindahl B. 2008. Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 18(7):503-510.
- Kris-Etherton PM, Yu S. 1997. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 65(5 Suppl):1628S-1644S.
- Lemaitre RN, Fretts AM, Sitlani CM, Biggs ML, Mukamal K, King IB, Song X, Djoussé L, Siscovick DS, McKnight B, et al. 2015. Plasma phospholipid very-long-chain saturated fatty acids and incident diabetes in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr*. 101(5):1047-1054.
- Levrat MA, Favier ML, Moundras C, Rémésy C, Demigné C, Morand C. 1994. Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *J Nutr*. 124(4):531-538.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105(9):1135-1143.
- Li Q, Estes JD, Schlievert PM, Duan L, Brosnahan AJ, Southern PJ, Reilly CS, Peterson ML, Schultz-Darken N, Brunner KG, et al. 2009. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature*. 458(7241):1034-1038.
- Li H, Liu Y, Zhang X, Xu Q, Zhang Y, Xue C, Guo C. 2018. Medium-chain fatty acids decrease serum cholesterol via reduction of intestinal bile acid reabsorption in C57BL/6J mice. *Nutr Metab*. 15(1):37.
- Li M, van Esch BCAM, Henricks PAJ, Garssen J, Folkerts G. 2018. Time and concentration dependent effects of short chain fatty acids on lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor α -induced endothelial activation. *Front Pharmacol*. 9:233.
- Magnusdottir OK, Landberg R, Gunnarsdottir I, Cloetens L, Akesson B, Landin-Olsson M, Rosqvist F, Iggman D, Schwab U, Herzig K-H, et al. 2014. Plasma alkylresorcinols C17:0/C21:0 ratio, a biomarker of relative whole-grain rye intake, is associated to insulin sensitivity: a randomized study. *Eur J Clin Nutr*. 68(4):453-458.
- Malik VS, Chiuve SE, Campos H, Rimm EB, Mozaffarian D, Hu FB, Sun Q. 2015. Circulating very-long-chain saturated fatty acids and incident coronary heart disease in US men and women. *Circulation*. 132(4):260-268.
- Mansson HL. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*. 52:1821.
- Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeier J. 2006. Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J*. 16(11):1374-1382.
- Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM, et al. 2012. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 11:30-30.
- Matsumori R, Miyazaki T, Shimada K, Kume A, Kitamura Y, Oshida K, Yanagisawa N, Kiyonagi T, Hiki M, Fukao K, et al. 2013. High levels of very long-chain saturated fatty acid in erythrocytes correlates with atherogenic lipoprotein profiles in subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 99(1):12-18.

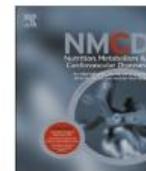
- Mensink RP, Zock PL, Kester ADM, Katan MB. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 77(5):1146–1155.
- Micha R, Mozaffarian D. 2010. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. *Lipids.* 45(10): 893–905.
- Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM, Trucillo MP, Pimentel DR, Ido Y, Ruderman NB, Sawyer DB. 2005. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 336(1): 309–315.
- Miyazaki T, Shimada K, Hiki M, Kume A, Kitamura Y, Oshida K, Yanagisawa N, Kiyonagi T, Matsumori R, Daida H, et al. 2014. High hexacosanoic acid levels are associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 233(2):429–433.
- Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S-E, Raymond GV, Naidu S, Moser HW. 1999. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol.* 45(1):100–110.
- Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Tanaka A, Saito M, Jin CH, Mukasa C, Okabe T, Nomura M, Goto K, et al. 2001. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology.* 142(8):3590–3597.
- Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA, Cutri B, Griffiths KA, Rye K-A, Barter PJ, Celermajer DS. 2006. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 48(4):715–720.
- Nishina PM, Freedland RA. 1990. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr.* 120(7):668–673.
- Ohira H, Fujioka Y, Katagiri C, Mamoto R, Aoyama-Ishikawa M, Amako K, Izumi Y, Nishiumi S, Yoshida M, Usami M, et al. 2013. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 20(5):425–442.
- Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. 2017. Are short chain fatty acids in gut microbiota defensive players for inflammation and atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb.* 24(7): 660–672.
- Park M, Sweeney G. 2013. Direct effects of adipokines on the heart: focus on adiponectin. *Heart Fail Rev.* 18(5): 631–644.
- Park M, Youn BS, Zheng X-L, Wu D, Xu A, Sweeney G. 2011. Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *PLOS One.* 6(4):e19143.
- Peters SG, Pomare EW, Fisher CA. 1992. Portal and peripheral blood short chain fatty acid concentrations after caecal lactulose instillation at surgery. *Gut.* 33(9):1249–1252.
- Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Oliveira JL, Losinskas-Hachul AC, Souza GIH, das Graças T. do Carmo M, Santos RVT, de Mello MT, Tufik S, et al. 2012. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFkappaBp65 signaling in adult offspring. *J Nutr Biochem.* 23(3):265–271.
- Pirola L, Ferraz JC. 2017. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *World J Biol Chem.* 8(2):120–128.
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW. 2012. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 70(1):3–21.
- Popkin BM, Gordon-Larsen P. 2004. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes.* 28(S3):S2–S9.
- Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, Bandyopadhyay S, Jones KN, Kelly S, Shaner RL, et al. 2010. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res.* 51(11):3299–3305.
- Reilly SM, Lee CH. 2008. PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett.* 582(1):26–31.
- Riserus U, Marklund M. 2017. Milk fat biomarkers and cardiometabolic disease. *Curr Opin Lipidol.* 28(1):46–51.
- Ruan J-S, Lin J-K, Kuo Y-Y, Chen Y-W, Chen P-C. 2018. Chronic palmitic acid-induced lipotoxicity correlates with defective trafficking of ATP sensitive potassium channels in pancreatic β cells. *J Nutr Biochem.* 59:37–48.
- Samuel VT. 2011. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 22(2):60–65.
- Sanders TA. 2009. Fat and fatty acid intake and metabolic effects in the human body. *Ann Nutr Metab.* 55(1–3): 162–172.
- Sanders FWB, Griffin JL. 2016. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 91(2): 452–468.
- Seaton TB, Welle SL, Warenko MK, Campbell RG. 1986. Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *Am J Clin Nutr.* 44(5):630–634.
- Sengupta S, Muir JG, Gibson PR. 2006. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol.* 21(1 Pt 2):209–218.
- Silva SMCSd, Mura JDAP. 2007. *Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia [Treated to feeding, nutrition and diet therapy]*. 1st ed. São Paulo, Brazil: Roca.
- Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N. 2017. Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol Rev.* 97(1):411–463.
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(10): 2062–2068.
- Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruff DA, Izgur V, Maravilla KR, et al. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 122(1):153–162.
- Thijssen MAMA, Hornstra G, Mensink RP. 2005. Stearic, oleic, and linoleic acids have comparable effects on markers of thrombotic tendency in healthy human subjects. *J Nutr.* 135(12):2805–2811.
- Timper K, Bruning JC. 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech.* 10(6):679–689.

APÊNDICE C – PAPER 2

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases (2022) 32, 279–289

Available online at www.sciencedirect.com

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nmcdMaternal consumption of ω 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,*}

^aLaboratory 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

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

^cDepartment 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 (ω 3) in the diet.

Methods and results: Wistar rat dams were fed a control (C: 19% of lipids and ω 6: ω 3 = 12), HF (HF: 33% lipids and ω 6: ω 3 = 21), or HF enriched with ω 3 (HF ω 3: 33% lipids and ω 6: ω 3 = 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 ω 3 in the maternal HFD led to lower birth weight and improved lipid, glycemic, and transaminase biochemical profile of the HF ω 3 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 ω 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 [1–3]. 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).

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.09.010>

0939-4753/© 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.

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 (5–19 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 murinometric measurements, food consumption, and biochemical profile in the rat offspring.

Methods

Animals and experimental groups

Virgin female albino rats ($n = 30$) 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 85–90 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; $n = 10$), HF (high in saturated fatty acids content; $n = 10$), and HF $\omega 3$ (high in saturated fatty acids content enriched with $\omega 3$; $n = 10$) 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 into three groups according to their dams' diets: C ($n = 35$), HF ($n = 27$), and HF $\omega 3$ ($n = 27$) groups. Temperature and humidity were maintained within the range of 22–24 °C and 55–65%, 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 $\omega 6$: $\omega 3$ ratio = 12.66; the HF received a HFD, which 33% energy from fat, 20% energy from protein and 47% energy from carbohydrate, with 6: $\omega 3$ ratio = 21.22; and the HF $\omega 3$ 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 $\omega 6$: $\omega 3$ ratio = 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 (Presence®, 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: $FEC = \text{weight gain in the period evaluated} / \text{food consumption in the same period}$. 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	—	—
Wheat flour	—	12	12
Corn flour biscuit	—	7	7
Soy flour	—	6	6
Lard	—	2	2
Butter	—	8	8
Casein (>85%)	20	20	20
Guar gum	—	0.50	0.50
Sucrose	10	18	18
Linseed oil	—	—	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
D,L-methionine	0.30	0.25	0.25
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
BTH	0.0014	0.014	0.014
Monosodium glutamate	—	0.20	0.20
Sodium chloride	—	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 (subsequent 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 se (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 (22–300-d-old)

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

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 (HF ω 3) during gestation and lactation.

Variables	Group		
	C	HF	HF ω 3
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, HF ω 3 (3.5% flaxseed oil), according to the experimental group. Values were expressed as mean ± 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 present normal distribution. *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 HF ω 3 had higher consumption of lipids (p = 0.005), and HF ω 3 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 HF ω 3 compared to the C (p = 0.0004). HF ω 3 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 HF ω 3 had higher consumption of lipids (p = 0.04), and HF ω 3 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 a lower 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 HF ω 3 presented FEC values higher than the C (p < 0.05), with no difference in HF. At age 60 to 90 and 90–300 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 (HF ω 3) after lactation.

Period/nutrient	Group		
	C	HF	HF ω 3
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, HF ω 3, according to the experimental group. Values were expressed as mean ± se. There was no statistical difference after the application of one-way ANOVA and Bonferroni post-test (N = 12–17) 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 HF ω 3 (Table 4). At the 7-d-old ($p < 0.0001$) and 14-d-old ($p < 0.0001$), the HF and HF ω 3 presented higher body weight. At 21-d-old ($p = 0.002$), the HF ω 3 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 HF ω 3 presented increased abdominal circumference at the 1-d-old ($p = 0.002$) when compared to the C. At 7-d-old ($p = 0.005$) and 14-d-old

($p = 0.0009$), only the HF showed increased circumference. At 21-d-old, no difference was found among the groups. However, at 30-d-old ($p = 0.004$), 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 HF ω 3 at 1-d-old ($p = 0.004$) 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 HF ω 3 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.

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 (HF ω 3) diets during gestation and lactation.

Days old/Variables	Group		
	C	HF	HF ω 3
1-d-old			
Body Weight (g)	5.9 \pm 0.1	7.1 \pm 0.1*	7.2 \pm 0.1#
Abdominal circumference (cm)	4.3 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1*	4.3 \pm 0.1*
Naso-anal-length (cm)	4.9 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1*	5.4 \pm 0.1#
7-d-old			
Body Weight (g)	18.7 \pm 0.2	20.3 \pm 0.1*	19.3 \pm 0.5*
Abdominal circumference (cm)	6.3 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1*	6.5 \pm 0.1
Naso-anal-length (cm)	7.2 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1*	7.2 \pm 0.1#
14-d-old			
Body Weight (g)	32.4 \pm 0.3	34.6 \pm 0.5*	36.6 \pm 0.6*
Abdominal circumference (cm)	8.1 \pm 0.1	8.3 \pm 0.1*	8.3 \pm 0.1
Naso-anal-length (cm)	8.6 \pm 0.1	8.9 \pm 0.1	8.5 \pm 0.1
21-d-old			
Body Weight (g)	54.9 \pm 0.6	54.6 \pm 0.8	57.7 \pm 0.7**
Abdominal circumference (cm)	10.1 \pm 0.1	9.6 \pm 0.1	9.5 \pm 0.1
Naso-anal-length (cm)	10.3 \pm 0.1	11.6 \pm 0.1*	12.1 \pm 0.2*
30-d-old			
Body Weight (g)	93 \pm 2	97 \pm 2	100 \pm 2
Abdominal circumference (cm)	12.5 \pm 0.1	12.4 \pm 0.2*	11.8 \pm 0.2#
Naso-anal-length (cm)	13.4 \pm 0.1	15.8 \pm 0.3*	14.1 \pm 0.1#
90-d-old			
Body Weight (g)	370 \pm 6	358 \pm 4.3	380 \pm 7
Abdominal circumference (cm)	19.9 \pm 0.3	18.1 \pm 0.3	20.1 \pm 0.3
Naso-anal-length (cm)	22.6 \pm 0.5	22.3 \pm 0.4	22.6 \pm 0.4
Lee index (g/cm ³)	0.300 \pm 0.007	0.300 \pm 0.005	0.300 \pm 0.005
300-d-old			
Body Weight (g)	472 \pm 14	498 \pm 16	511 \pm 15
Abdominal circumference (cm)	20.9 \pm 0.5	21.1 \pm 0.4	21.0 \pm 0.4
Naso-anal-length (cm)	24.5 \pm 1	26.2 \pm 0.3	25.6 \pm 1.0
Lee index (g/cm ³)	0.30 \pm 0.01	0.30 \pm 0.01	0.30 \pm 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 with high-fat diet omega-3-rich, HF ω 3 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 ($N = 7-35$). * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. HF.

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 HF ω 3 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 ($p = 0.02$) when compared to the C. The HF also had higher serum levels of TC ($p = 0.003$), ALT ($p = 0.001$), and lower levels relative to the ratio AST/ALT ($p = 0.004$) when compared to the other groups. Already the HF ω 3 presented lower levels of TRI ($p = 0.02$) and VLDL-c ($p = 0.01$) 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 ($p = 0.001$) 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 ($p = 0.01$), TRI ($p = 0.02$), and VLDL-c ($p = 0.02$) when compared to the C. Already the HF ω 3 presented lower levels of AST ($p = 0.0007$) and AST/ALT ratio ($p = 0.0002$) 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 ($p = 0.01$) when compared to the C. Both HF and HF ω 3 presented higher serum levels of TC ($p = 0.008$), TRI ($p = 0.0002$), and VLDL-c ($p = 0.002$) when compared to the C. Already both HF and HF ω 3 presented lower levels of AST ($p = 0.0001$) and AST/ALT ratio ($p = 0.0001$) when compared to the C.

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 (HF ω 3) diets during gestation and lactation and their offspring at 22, 30, 90, and 300-d-old.

Age/variables	Group		
	C	HF	HF ω 3
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	HF ω 3
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, HF ω 3 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 = 19–35). *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

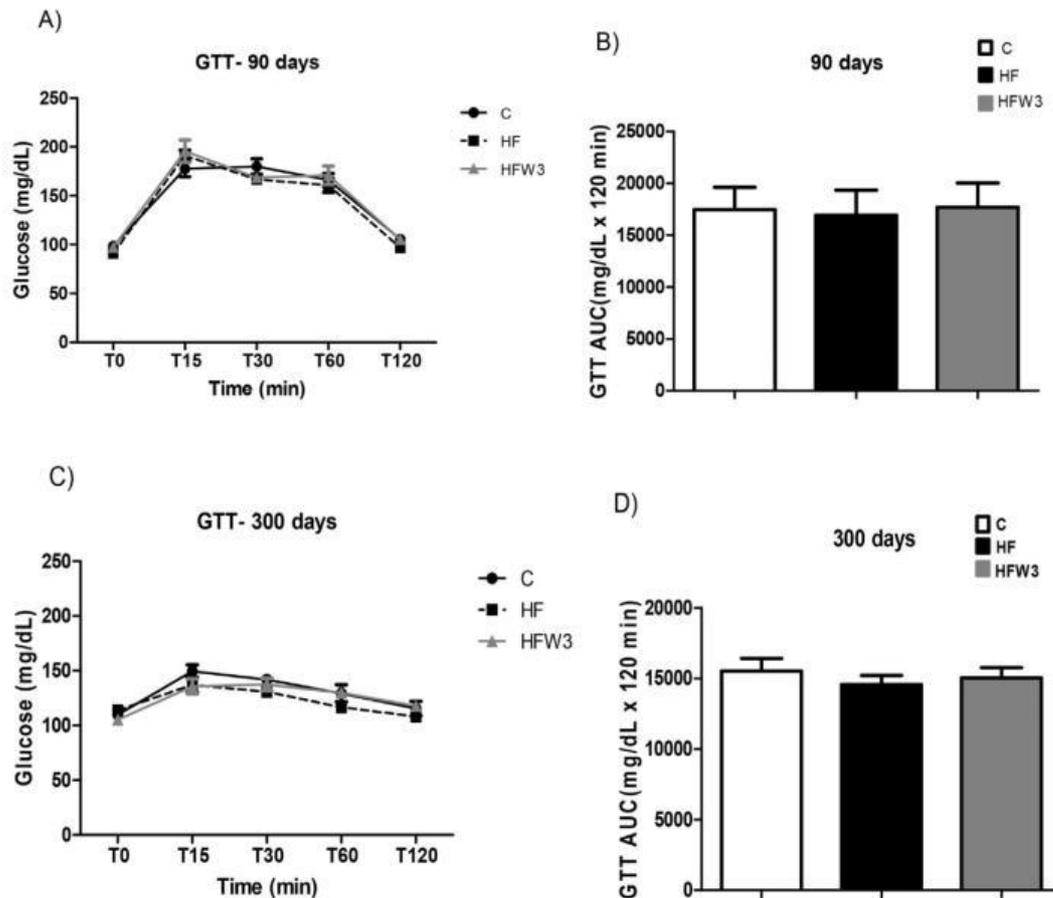


Figure 1 Glucose tolerance test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 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 \pm 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; $n = 10-18$).

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 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 in early life of the offspring of dams feed 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 subcutaneous 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

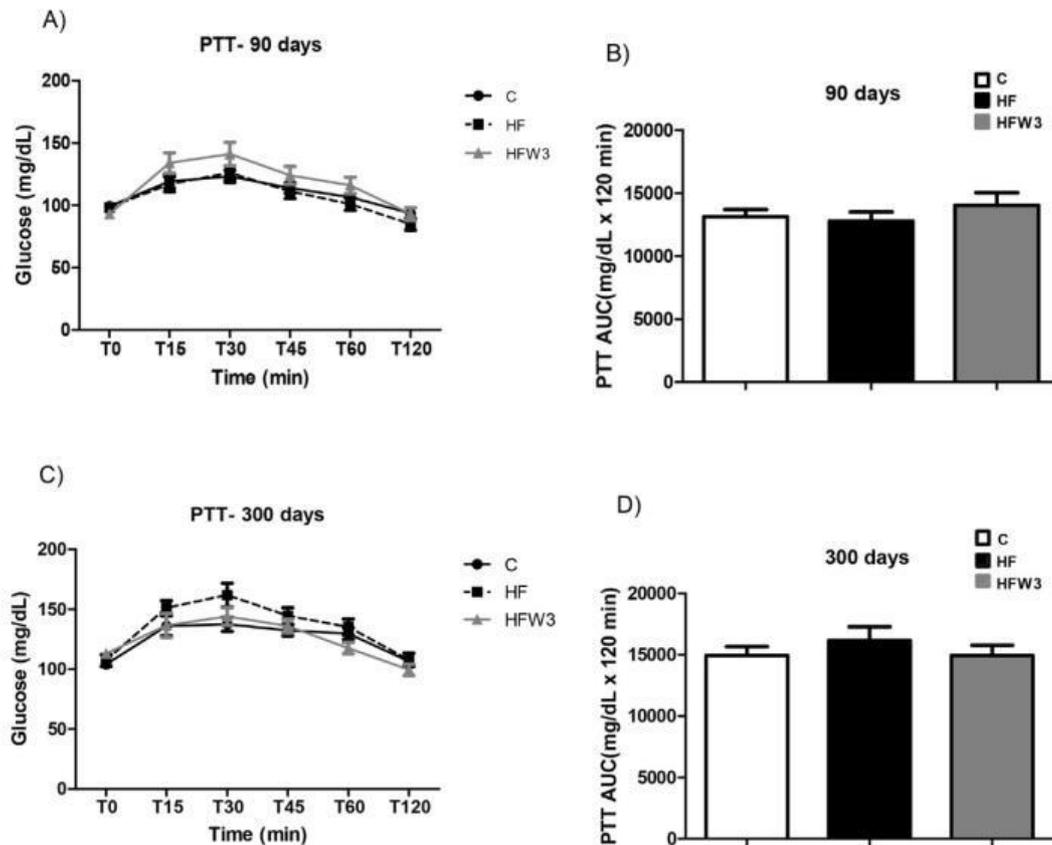


Figure 2 Pyruvate tolerance test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 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 \pm 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; $n = 10-18$).

risk factors for endothelial dysfunction [26] and atherosclerosis [27]. Our study found that HF ω 3 offspring showed reduction in the TRI levels. It has been demonstrated that ω 3 can improve lipid profile by lowering TRI levels, TC, and LDL-c fraction [22]. Several epidemiological, experimental, and clinical studies indicate that ω 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 ω 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, ω 3 PUFA decrease arterial plaque buildup [28], increase anti-inflammatory properties [29], improve endothelial-dependent vasodilation [30], decrease blood pressure [31], promote vasodilatation 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 ω 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 ω 6 arachidonic acid (AA) to fatty acid ω 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], ω 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

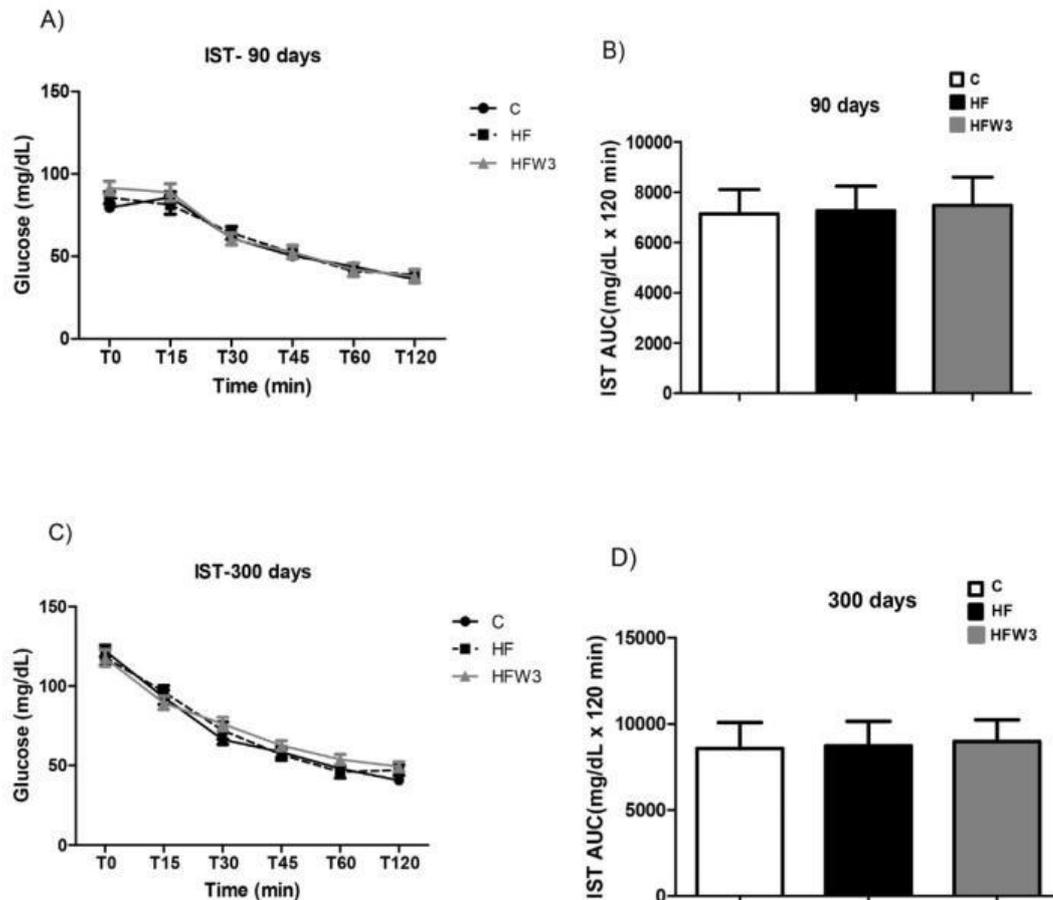


Figure 3 Insulin sensitivity test and area under the curve for glucose at 90 and 300 days of offspring of males whose dams were submitted to control, HF and HFW3 diets during gestation and lactation. The rats were submitted during gestation and lactation to control diet (C, 19% lipids) or high SFA (HF, 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 \pm 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; $n = 10-18$).

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 intermediary 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 beta-cell dysfunction [48], it is possible that in

a more advanced age impaired of 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 ω 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 – PE, Brazil (grant nº PRONEM 0797–4.05/14; IBPG-1478-4.05/16; IBPG-0313-4.05/19) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (grant nº 311386/2019-9).

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

We thank Danilo Augusto Ferreira Fontes for the technical support.

References

- 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.
- Batista Filho M, Batista LV. Transição alimentar/nutricional ou mudança antropológica? *Ciencia e Cult* 2010;62:26–30.
- Adair LS, Ng SW, Popkin BM. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* 2012;70(1):3–21.
- World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016. p. 121. viii +.
- Castro AVB, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014;58(6):600–9.
- Belkina AC, Denis GV. Obesity genes and insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17(5):472–7.
- 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):2272–88.
- 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):99–111.
- Korotkova M, Gabrielson 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):1743–9.
- Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2015;1851(4):469–84.
- Punia S, Sandhu KS, Siroha AK, Dhull SB. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits—A review 2019;10:100162.
- 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):1939–51. Epub 1993/11/01.
- 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):49–55.
- 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):111–9. Epub 2007/01/20.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC, Afíune 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;88:2–19.
- Pinel A, Pitois E, Rigaudiere 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):1382–97.
- Capel F, Chabrier G, Pitois E, Rigaudière JP, Plénier 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):4996–5008.
- Farias H. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. I Simpósio de Bioterismo da Fiocruz. 2010.
- 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):177–96.
- 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):1590–601.
- Kojima S, Catavero C, Rinaman L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. 2016.
- 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):3110–7.
- 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):272–84.
- 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.
- 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):216–25. Epub 2016/12/10.
- 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):111–6.
- 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):1–12.
- 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):1515–24.
- Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83(6):1505S–19S.
- 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):300–10.
- 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.
- 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):191–200.
- 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):119–25.
- [34] Verveniotis A, Siasos G, Oikonomou E, Tsigkou V, Papageorgiou N, Zaromitidou 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):1865–72.
- [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;64:169–81.
- [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):493–502.
- [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):702–707. 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, Pasmnik-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(4–6):185–94.
- [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;212:22–32.
- [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 acids on non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *PaK J Med Sci* 2017;33(4):1022–8.
- [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):R313–20.
- [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):1397–403. 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):433–40.

APÊNDICE D – PAPER 3



Article

Glycine Supplementation in Obesity Worsens Glucose Intolerance through Enhanced Liver Gluconeogenesis

Anaïs Alves ¹, Frédéric Lamarche ², Rémy Lefebvre ¹, Eva Drevet Mulard ³, Arthur Bassot ⁴,
Stéphanie Chanon ¹, Emmanuelle Loizon ¹, Claudie Pinteur ¹, Aline Maria Nunes de Lira Gomes Bloise ⁵,
Murielle Godet ¹, Gilles J. P. Rautureau ^{3,6}, Baptiste Panthu ¹ and Béatrice Morio ^{1,*}

- ¹ CarMeN laboratory, UMR INSERM U1060/INRAE U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69310 Pierre-Bénite, France
² Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, INSERM U1055, Université Grenoble Alpes, 38400 Saint Martin d'Hères, France
³ ICBMS CNRS U5246, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne, France
⁴ Erika Cosset Team, Cancer Research Centre of Lyon, UMR INSERM U1052/CNRS 5286, 69008 Lyon, France
⁵ Department of Physical Education and Sport Sciences, Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 55604-000 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil
⁶ Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs, UMR CNRS U5082/ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69100 Villeurbanne, France
* Correspondence: beatrice.morio@inrae.fr



Citation: Alves, A.; Lamarche, F.; Lefebvre, R.; Drevet Mulard, E.; Bassot, A.; Chanon, S.; Loizon, E.; Pinteur, C.; Bloise, A.M.N.d.L.G.; Godet, M.; et al. Glycine Supplementation in Obesity Worsens Glucose Intolerance through Enhanced Liver Gluconeogenesis. *Nutrients* **2023**, *15*, 96. <https://doi.org/10.3390/nu15010096>

Academic Editor: Antonio Brunetti

Received: 29 November 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 20 December 2022

Published: 24 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Interactions between mitochondria and the endoplasmic reticulum, known as MAMs, are altered in the liver in obesity, which contributes to disruption of the insulin signaling pathway. In addition, the plasma level of glycine is decreased in obesity, and the decrease is strongly correlated with the severity of insulin resistance. Certain nutrients have been shown to regulate MAMs; therefore, we tested whether glycine supplementation could reduce insulin resistance in the liver by promoting MAM integrity. Glycine (5 mM) supported MAM integrity and insulin response in primary rat hepatocytes cultured under control and lipotoxic (palmitate 500 μ M) conditions for 18 h. In contrast, in C57 BL/6 JOLA^{Hsd} mice (male, 6 weeks old) fed a high-fat, high-sucrose diet (HFHS) for 16 weeks, glycine supplementation (300 mg/kg) in drinking water during the last 6 weeks (HFHS-Gly) did not reverse the deleterious impact of HFHS-feeding on liver MAM integrity. In addition, glycine supplementation worsened fasting glycemia and glycemic response to intraperitoneal pyruvate injection compared to HFHS. The adverse impact of glycine supplementation on hepatic gluconeogenesis was further supported by the higher oxaloacetate/acetyl-CoA ratio in the liver in HFHS-Gly compared to HFHS. Although glycine improves MAM integrity and insulin signaling in the hepatocyte in vitro, no beneficial effect was found on the overall metabolic profile of HFHS-Gly-fed mice.

Keywords: dietary supplement; amino acid metabolism; obesity-related metabolic disorders; insulin resistance; mitochondria

1. Introduction

Hepatic insulin resistance is a major metabolic disorder that causes a heavy burden on the healthcare system as it affects 60–80% of obese and type 2 diabetic patients [1]. Interestingly, obese and type 2 diabetic patients show abnormal circulating amino acid profiles [2] that are particularly characterized by decreased plasma glycine concentration [3,4]. The decrease in circulating glycine concentration is associated with the severity of insulin resistance [5,6]. Several prospective studies showed that a decrease in plasma glycine concentration is a strong predictive factor for incident glucose intolerance and type 2 diabetes [7–9]. Glycine is a non-essential amino acid with many metabolic roles. However,

the involvement of glycine in metabolic diseases associated with obesity is still poorly understood, and part of the mechanisms responsible for its metabolic effects have not yet been elucidated [10].

Hepatic insulin resistance is associated with metabolic inflexibility, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum (ER) stress, which suggests a potential relationship between hepatic metabolic disorders and impaired functions of both organelles. Mitochondria and ER communicate through contact points called mitochondria associated-ER membranes (MAMs) which dynamically regulate cellular functions [11]. MAM integrity has been associated with metabolic homeostasis in the liver [12]. Specifically, MAMs have been identified as crucial platforms involved in the regulation of the hepatic insulin response [13–16]. Furthermore, MAM integrity is disrupted and MAM flexibility is lost in the liver of obese and type 2 diabetic mice [13]. Therefore, MAMs are now recognized as crucial hubs of cell signaling, and targeting MAMs in the liver could be a novel strategy to prevent hepatic insulin resistance.

Based on the alteration of MAMs and the variation of glycine concentration in the serum of obese and diabetic patients, we hypothesized that glycine may be involved in the regulation of hepatic MAM integrity, and we anticipated that restoring glycine availability in obese mice may restore hepatic insulin resistance by supporting MAM integrity in the liver. Indeed, glycine interacts with one-carbon metabolism through the enzyme glycine N-methyltransferase (GNMT), thereby potentially regulating methylation processes which can regulate gene and protein expression [10,17]. GNMT catalyzes the methylation of glycine using S-adenosylmethionine to form sarcosine with the concomitant production of S-adenosylhomocysteine. Therefore, it plays an important role in the balance of methyl groups in the liver [10,17].

In this study, we explored *in vitro*, on primary rat hepatocytes, and *in vivo*, in diet-induced obese mice, whether glycine supplementation could positively impact on the hepatic insulin response by promoting MAM integrity, thus contributing to improved glucose homeostasis.

2. Material and Methods

2.1. Primary Rat Hepatocytes

Primary hepatocytes were isolated using a modified collagenase perfusion method according to Berry et al. [18] and Groen et al. [19]. Primary rat hepatocytes were plated on collagen type I-coated culture plates and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, France) with 3 g/L glucose at 37 °C and in a humid atmosphere with 5% CO₂. DMEM was supplemented with 2 mM glutamine, 2 mM antibiotic/antimycotic, 1% penicillin streptomycin solution, 7.5 mM DL-sodium lactate, and 10% fetal calf serum (FCS), which is the standard medium. The percentage of viability was determined using the trypan blue exclusion method (on an average 85–90% of the viable cells). After 4 h of adhesion, hepatocytes were cultured for 18 h in control (standard medium + bovine serum albumin, BSA) or lipotoxic (standard medium + palmitate 500 μM) supplemented or not with glycine (5 mM).

2.2. Animal Study

This animal study was performed in accordance with the French guidelines for the care and use of animals [20] and approved by the regional ethic committee (CECCAP LS_2022_001). Thirty 5-week-old male C57 BL/6 JOLA^{Hsd} mice (Envigo, France) were housed in groups of five on sawdust bedding in plastic cages in an enriched environment up to the age 5 months. Artificial lighting was provided on a fixed 12 h light–dark cycle with *ad libitum* access to standard chow and water. Mice were fed a standard chow diet (SD, n = 10, 35.6% carbohydrates, 10.2% fat by mass, Genobios, France) for 16 weeks or a high-fat, high-sucrose diet (HFHS, n = 20, 36% fat and 17% sucrose by mass, Envigo, France) for 10 weeks [21]. Then, the HFHS-fed mice were divided into 2 groups of 10 animals and remained on the HFHS diet for an additional 6 weeks. The first group continued to receive

water, while the second group received glycine in water (300 mg/kg/d). An oral glucose tolerance test (OGTT, 1.5 g/kg body weight) was performed on 4 h-fasted mice one week before the end of the protocol. Five days apart, a pyruvate tolerance test (1.5 g/kg body weight, injected intraperitoneally, ipPTT) was performed on overnight-fasted mice. In both tests, blood glucose was monitored with a glucometer for 2 h before and at 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after gavage or injection. Glucose and pyruvate tolerance were evaluated based on the blood glucose area under the curve (AUC) [21]. Finally, overnight-fasted mice were euthanized with elongation, and the liver and leg muscles were quickly removed, weighted, and divided for further analyses.

2.3. Exploration of the Insulin Signaling Pathway

In vitro, primary hepatocytes were depleted in serum for 3 h and then incubated in DMEM without FBS in the absence or presence of insulin (10⁻⁷ M) for 15 min. In vivo, overnight-fasted mice were injected with either NaCl or insulin (0.75 U/kg body weight) 15 min before the sacrifice. The liver and *gastrocnemius* muscles were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Insulin-stimulated Ser473 phosphorylation (#4060, Cell Signaling) of protein kinase B (Akt, #4691, Cell Signaling) was assessed using western blotting in primary rat hepatocytes, mouse liver, and *gastrocnemius* muscle.

Additional information was obtained from a preliminary study performed following the same protocol (regional ethic committee approval, CECCAP LS_2017_004) in which peripheral insulin response was evaluated in 4 h-fasted animals. Four hour-fasted mice (n = 10 per group) were injected intraperitoneally with insulin (0.75 U/kg body weight). Blood glucose was monitored with a glucometer before and at 15, 30, and 45 min after injection. Insulin tolerance was evaluated based on the blood glucose area over the curve (AOC) [21].

2.4. In Situ Proximity Ligation Assay (PLA)

ER-mitochondrial interactions were assessed using in situ PLA which targeted the complex between the ER inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3 R)-1 (ab5804, Abcam, Paris, France) and the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC)-1 (ab14734, Abcam, UK) as previously described [13]. In vitro, the assays were conducted on 4% paraformaldehyde-fixed and 0.1% triton-permeabilized primary rat hepatocytes using a green, fluorescent in situ PLA DUOLINK kit (Merck, Darmstadt, Germany). In situ, the assays were carried on in 4 µm paraffin sections of 4% paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded mouse liver samples using a bright-field in situ PLA DUOLINK kit (Merck, USA). Images were analyzed using a custom written Fiji macro on 10 images/sample in 3 to 5 independent series, and the number of VDAC1-IP3 R1 dots was expressed per nucleus.

2.5. Triglyceride and Glycogen Assay

Mouse liver samples were embedded in an optimal cutting temperature (OCT) compound and frozen in liquid nitrogen. Oil Red O (ORO-k-250, Biognost) staining was performed in 10 µm cryosections to quantify the liver triglycerides, and 4 µm paraffin sections were stained with PAS diastase (PAD-2-IFU, Clinisciences) to measure glycogen content. Images were analyzed using a custom-written Fiji macro, and data expressed the percentage of the area. Furthermore, liver triglyceride, oxaloacetate, and acetyl-CoA concentrations were assayed using the commercial assay kits, including Triglycerides GPO Method (Biolabo, Maizy, France), Oxaloacetate Colorimetric/Fluorometric, and PicoProbe™ Acetyl-CoA Fluorometric (CliniSciences, Nanterre, France), respectively. Results were expressed relative to the protein concentration, and the oxaloacetate to acetyl-CoA ratio was calculated.

2.6. Western Blot

Proteins of primary hepatocytes or mouse livers were lysed in a RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0). Protein concentration of the samples was quantified using the Bradford protein

assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Protein content was quantified after SDS-PAGE electrophoresis (10 or 15% acrylamide gels) migration using the following antibodies: anti-Akt (4691 L, Cell signaling, USA), anti-S473-Phospho AKT (4060 L, Cell Signaling, Saint-Cyr-L'École, France), and anti-tubulin (T5168, Merck, USA). The signal was quantified with ImageLab software (Biorad, USA). Data were expressed relative to tubulin before calculating the phospho-Akt/Akt ratio and the insulin-induced fold-change in Akt phosphorylation.

2.7. Gene Expression

Total RNA was extracted using a Trizol Reagent kit following the method of Chomczynski and Sacchi [22] as previously described [23]. RNA concentration was measured using the Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription (RT) of RNA to complementary DNA (cDNA) was performed using 1 µg of total RNA in 10 µL of total reaction volume of PrimeScript reagents RT kit. Total RNA samples were treated with DNase to prevent the potential contamination with genomic DNA. Gene expression of *gamt* was explored by qPCR (quantitative real time Polymerase Chain Reaction) using SYBR[®] Green mix and Rotor-Gene 6200 (Corbett Research, Genta, Paris, France) and normalized using TBP (TATA-binding protein) mRNA. Primers sequences for *gamt* were 5' GAAGGAGCCAGCCTTTGACA 3' and 3' AGGTGAGCAAACCTGTTCC 5' for rats and 5' GGAAGAGCCATCCTTTGAC 3' and 3' GCAAGTGAGCAAACCTGTTCC 5' for mice. Primers sequence for TBP were 5'TGGTGTGCACAGGAGCCAAG 3' and 3' TTCACATCACAGCTCCCCAC 5' for rats and 5' TGGTGTGCACAGGAGCCAAG 3' and 3' TTCACATCACAGCTCCCCAC 5' for mice.

2.8. Mice Liver and Muscle Endometabolome Analyses through ¹H-NMR Spectroscopy

Metabolites were extracted using 100% methanol and a Precellys Homogenizer as previously described [24]. NMR spectra were obtained as previously described [24] on a Bruker Avance III spectrometer operating at a ¹H frequency of 800.14 MHz and equipped with a 5 mm TXI probe. Identification of the metabolites was carried out based on the ¹H 1 D NMR data with ChenomX NMR Suite 8.0 software (ChenomX Inc., Edmonton, Canada) and confirmed based on analyses of 2 D ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC, and J-Resolved NMR spectra. Metabolite concentrations were determined based on the ¹H 1 D NOESY experiments using ChenomX. A pure lactate solution (1 g/L, Fisher) was used as a concentration reference and exploited using the ERETIC2 utility from TopSpin to add a digitally synthesized peak to a spectrum [25].

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism[®] software v8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). The normality of the data was assessed using Shapiro–Wilk or Agostino and Pearson omnibus normality tests, and homogeneity was assessed using Bartlett's test. Two-way ANOVA followed by a Student post-hoc test were used to explore the effect of glycine in control and lipotoxic conditions for the in vitro experiments. The three groups were compared using one-way ANOVA followed by a Sidak's post-hoc test or Kruskal–Wallis test for the in vivo experiments. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Glycine Enhances MAM Contact Sites and Insulin Response in Primary Rat Hepatocytes

In primary rat hepatocytes, palmitate (500 µM) for 18 h induced a 38.5% higher *gamt* mRNA content compared to BSA ($p < 0.01$), whereas glycine (5 mM) had no significant impact in both the control and lipotoxic conditions (Figure 1A). Palmitate caused a 26.5% lower number of VDAC1-IP3 R1 contact points per cell compared to BSA. In contrast, glycine induced a 32.5 and 50.8% higher number of VDAC1-IP3 R1 contact points per cell compared to untreated cells in both the control and lipotoxic conditions, respectively (p

< 0.001, Figure 1B,C). As expected [13,16], these positive impacts were associated with an improved insulin response, especially under control conditions ($p < 0.05$, Figure 1D,E). We thus tested whether glycine supplementation could improve liver MAM integrity and insulin response in diet-induced obese mice and contribute to improved glucose homeostasis.

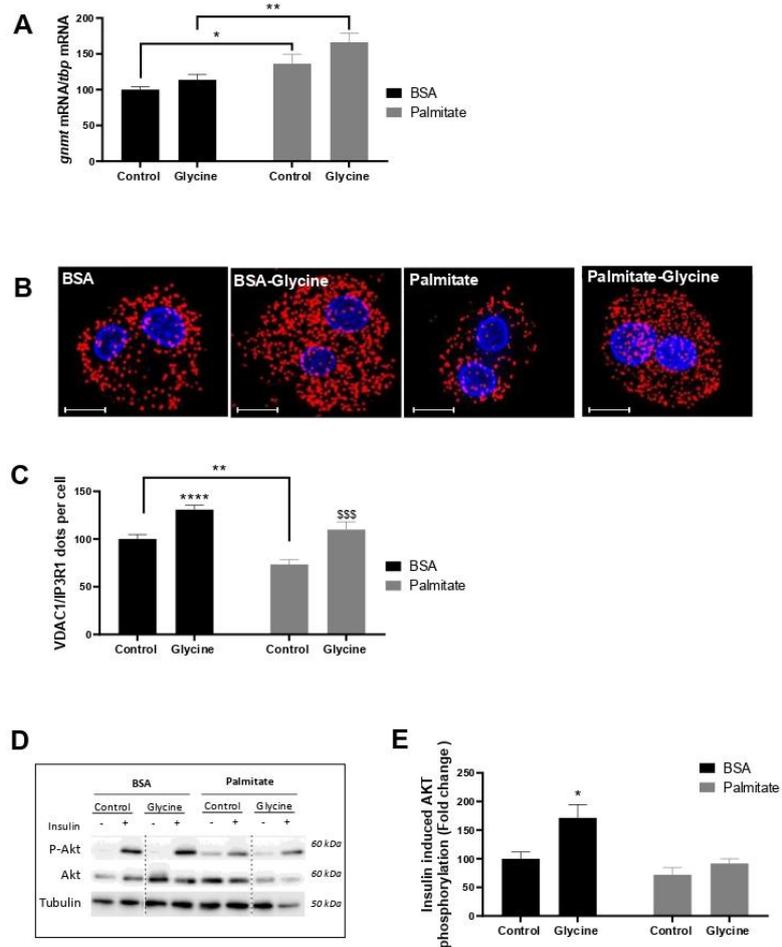


Figure 1. The impact of glycine on MAM integrity and insulin response in primary rat hepatocytes. Primary rat hepatocytes were treated with glycine (5 mM) for 18 h under basal (BSA) or lipotoxic (Palmitate, 500 μM) conditions. (A) Glycine N-methyltransferase (Gnmt) mRNA expression relative to TATA box binding protein (Tbp) mRNA, (B) representative images (scale = 10 μm) and (C) quantitative analysis of VDAC1/IP3R1 interactions per cells using in situ Proximity Ligation Assay (n = 3 series per group, n = 10 images/condition; VDAC1: Voltage Dependent Anion Channel 1; IP3R1: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type1). (D) representative images and (E) quantitative analysis of insulin (10-7M)-induced Akt phosphorylation (n = 6 series per group). Comparison of all groups vs. BSA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; Comparison of palmitate + glycine vs. Palmitate: \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2. Characteristics of Diet-Induced Obese Mice

The HFHS diet induced 43.8% and 57.1% heavier body and liver weights compared to SD at the end of the study, respectively ($p < 0.01$). These differences were not altered after glycine supplementation, so HFHS-Gly animals evidenced similar body and liver weights

as HFHS (Table 1). The liver triglyceride content was 81.4% higher and glycogen content 32.4% lower in HFHS compared to SD ($p < 0.05$, Figure 2A–E). Glycine supplementation did not significantly alter these parameters (Figure 2A–E).

Table 1. Animal characteristics at sacrifice.

	SD (n = 10)	HFHS (n = 10)	HFHS-Gly (n = 10)
Body weight (g)	28.8 ± 0.5	41.5 ± 1.3 ***	43.8 ± 1.0 ***
Liver weight (g)	1.19 ± 0.03	1.85 ± 0.19 **	1.91 ± 0.16 **
Gastrocnemius muscles (mg)	399 ± 12	399 ± 12	413 ± 9

C57Bl6J OlaHsd male mice were fed a standard diet (SD) or a high-fat high-sucrose diet (HFHS) for 16 weeks. Glycine supplementation (300 mg/kg/day) was given in drinking water during the last 6 weeks to half of the HFHS-fed mice (HFHS-Gly). Comparison of all groups vs. SD used ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

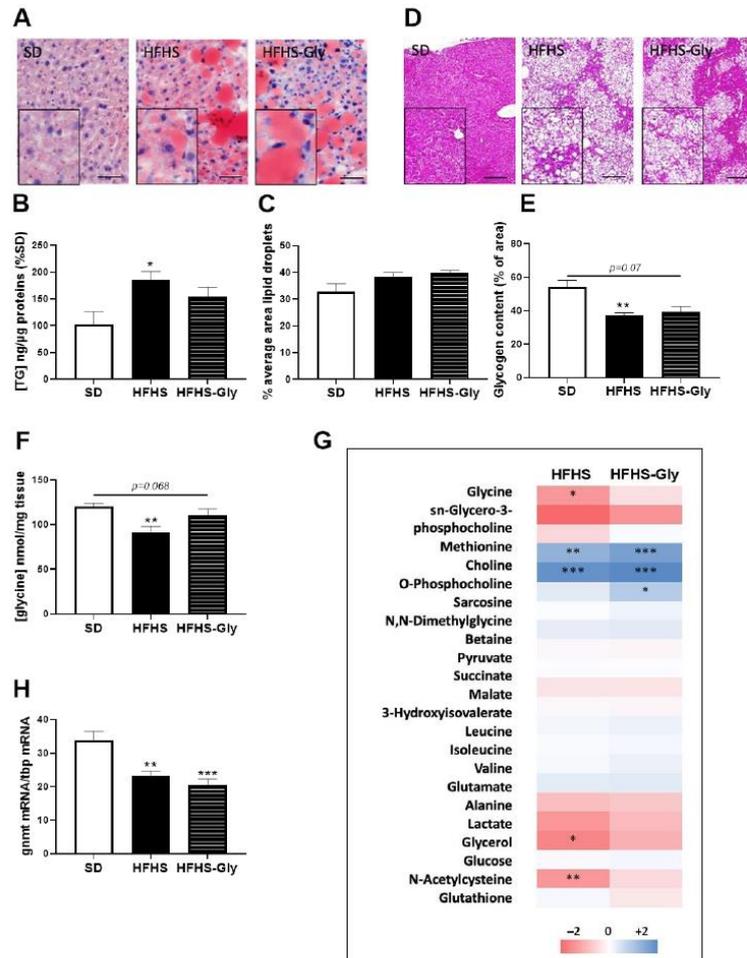


Figure 2. The impact of obesogenic diet and glycine on hepatic metabolism. C57Bl6J OlaHsd mice were fed a standard diet (SD) or a high-fat high-sucrose diet (HFHS) for 16 weeks. Glycine supplementation

(300 mg/kg/day) was given in drinking water during the last 6 weeks to half of the HFHS-fed mice (HFHS-Gly). (A) representative images and quantitative analysis of liver (scale = 200µm) (B) content in triglycerides (TG) and (C) mean lipid droplet area (n = 5 mice per group, n = 10 images/mouse). (D) representative images (scale = 200µm) and (E) quantitative analysis of liver glycogen content (n = 5 mice per group, n = 10 images/mouse). Quantitative NMR analysis of liver (F) glycine content and (G) major metabolites (n = 5 mice per group). HFHS and HFHS-Gly data were normalised to the SD group. (H) Glycine N-methyltransferase (Gnmt) mRNA expression relative to TATA box binding protein (Tbp) mRNA (n = 10 mice per group). Comparison of HFHS and HFHS-Gly vs. SD: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The liver metabolic fingerprint was explored using ¹H-NMR metabolomics. The HFHS diet was associated with a 21.7% lower glycine concentration compared to SD ($p < 0.01$), and HFHS-Gly tended to restore the value to the SD level ($p = 0.068$ vs. HFHS, Figure 2F,G). HFHS-Gly was associated with an 86.0% higher sarcosine concentration compared to SD ($p < 0.05$, Figure 2G and Table S1). Related to the use of glycine for sarcosine synthesis, the liver mRNA content in *gnmt* mRNA was 31.2% lower in HFHS compared to SD ($p < 0.01$) and was not significantly altered by glycine supplementation (Figure 2H). Additionally, choline and o-phosphocholine were 2 to 3-fold higher in both HFHS and HFHS-Gly compared to SD ($p < 0.01$, Figure 2G). Finally, the HFHS diet was also associated with a 22.1% to 26.1% lower concentration in N-acetylcysteine and glycerol compared to SD, respectively ($p < 0.05$, Figure 2G). These alterations were no longer significant following glycine supplementation compared to SD values (Figure 2G).

3.3. Glycine Supplementation Does Not Influence Liver MAM Integrity and Insulin Response in Diet-Induced Obese Mice

As already described [13], liver MAM integrity assessed using in situ PLA was disrupted in HFHS compared to SD. Indeed, the number of VDAC1-IP3 R1 contact points per nucleus was 33.3% lower in HFHS compared to SD ($p < 0.05$, Figure 3A,B). The difference did not reach the level of significance for the VDAC1-IP3 R2 interaction (Figure 3C,D). Glycine supplementation did not modify the HFHS-induced alterations (Figure 3B–D). Exploration of insulin-induced Akt phosphorylation showed that HFHS was associated with a 40.6% lower fold-change in Akt phosphorylation compared to SD ($p < 0.05$), while HFHS-Gly tended to restore values to the SD level (Figure 3E,F).

3.4. Glycine Supplementation Worsens Glucose Homeostasis of Diet-Induced Obese Mice

We further investigated in vivo glucose homeostasis. Four-hour fasting glycemia was 23.2% and 25.3% higher in HFHS and HFHS-Gly compared to SD, respectively ($p < 0.0001$, Figure 4C). In contrast, while the differences between HFHS and SD values did not reach the level of significance regarding overnight-fasting glycemia, overnight-fasting glycemia of HFHS-Gly was 41.4% higher than in SD ($p < 0.001$, Figure 4E). In vivo tests evidenced a deterioration in glucose and pyruvate tolerance in HFHS-fed animals compared to SD (Figure 4A–F). AUC_{OGTT} and AUC_{ipPPTT} were 110.2% ($p < 0.001$, Figure 4A,C) and 53.6% ($p < 0.05$, Figure 4D,F) higher in HFHS compared to SD. In HFHS-Gly-fed animals, the glycemia response to OGTT was similar to HFHS (Figure 4A); therefore, glycine supplementation did not significantly alter AUC_{OGTT} compared to HFHS (Figure 4C). In contrast, glycemia response to ipPPTT was 24.4% higher than that of HFHS 15 min after pyruvate injection ($p < 0.01$) and remained higher than that of HFHS for the rest of the test ($p = NS$, Figure 4D). However, overall, the impact of glycine supplementation on AUC_{ipPPTT} did not reach the level of significance compared to HFHS (Figure 4F). AUC_{ipPPTT} of HFHS-Gly-fed animals was 87.5% higher compared to SD ($p < 0.05$, Figure 4F). We assessed the concentration of oxaloacetate that drives gluconeogenesis to better understand the discrepancy between ipPPTT and insulin responses in the livers of HFHS-Gly-fed animals. The oxaloacetate to acetyl-CoA ratio was 96.7% higher in HFHS compared to SD ($p < 0.0001$, Figure 4G) and a further 43.0% higher in HFHS-Gly compared to HFHS ($p < 0.001$, Figure 4G). This

finding shows that the glycine supplementation enhanced gluconeogenesis activity in the liver of HFHS-Gly-fed animals compared to HFHS.

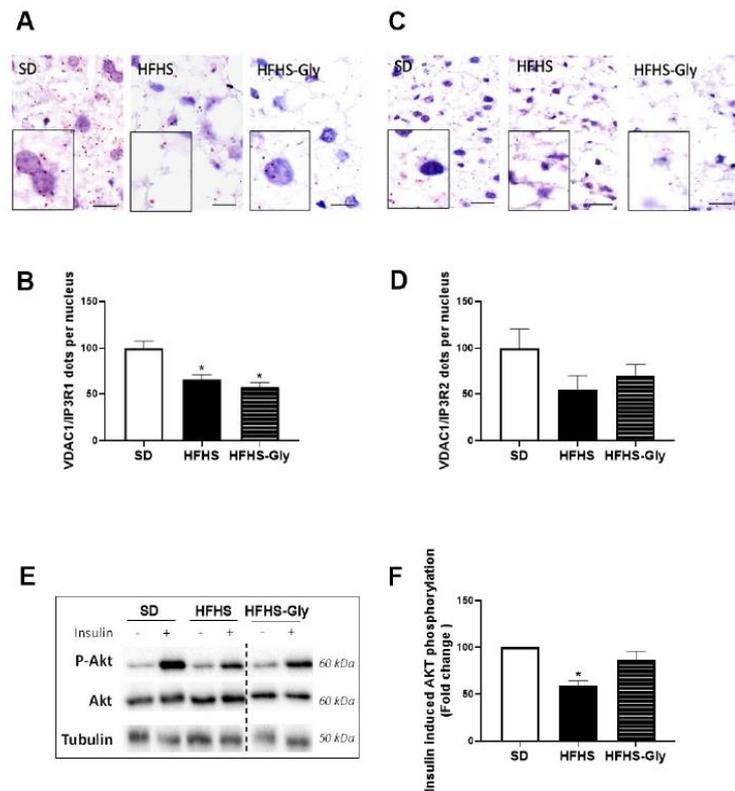


Figure 3. The impact of obesogenic diet and glycine on hepatic MAM integrity and insulin response. C57Bl6/J mice were fed a standard diet (SD) or a high-fat high-sucrose diet (HFHS) for 16 weeks. Glycine supplementation (300 mg/kg/day) was given in drinking water during the last 6 weeks to half of the HFHS-fed mice (HFHS-Gly). (A) representative images (scale = 10 μ m) and (B) quantitative analysis of VDAC1/IP3R1 contacts per nucleus (n = 5 mice per group, n = 10 images/mouse). (C) representative images (scale = 10 μ m) and (D) quantitative analysis of VDAC1/IP3R2 contacts per nucleus (n = 5 mice per group, n = 10 images/mouse). (E) Representative images and (F) quantitative analysis of insulin (0.75 U/kg)-induced Akt phosphorylation (n = 5 unstimulated and 5 insulin-stimulated mice per group). Comparison of HFHS and HFHS-Gly vs. SD: * $p < 0.05$.

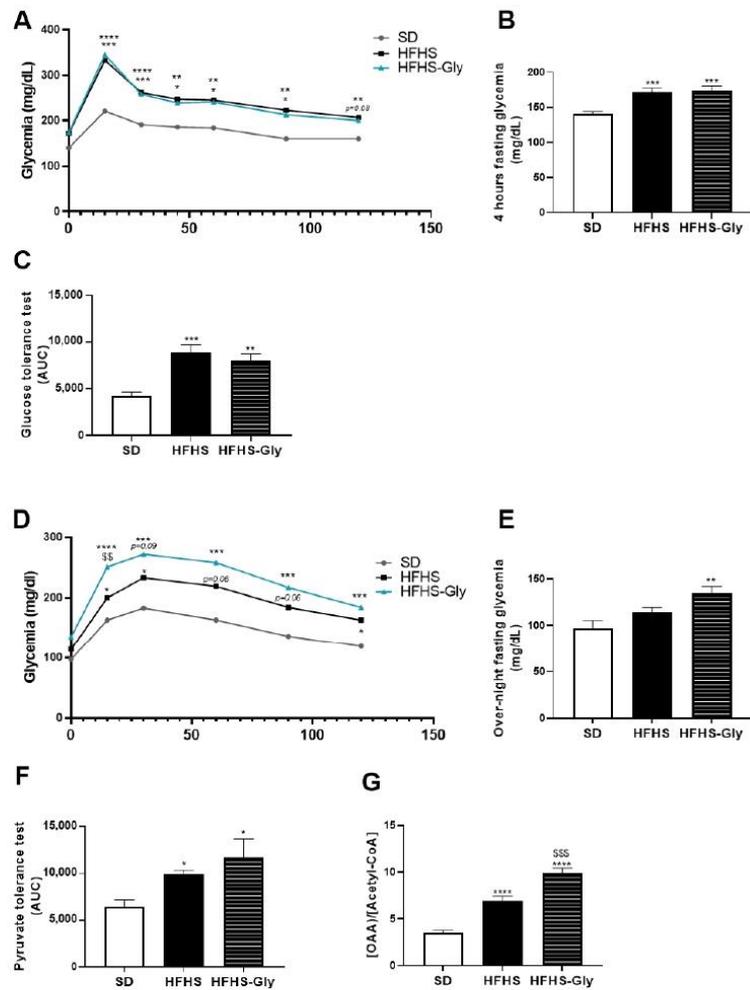


Figure 4. The impact of obesogenic diet and glycine on glucose and pyruvate tolerance tests. C57 Bl6 J01aHsd mice were fed a standard diet (SD) or a high-fat, high-sugar diet (HFHS) for 16 weeks. Glycine supplementation (300 mg/kg/day) was given in drinking water during the last 6 weeks to half of the HFHS-fed mice (HFHS-Gly). (A) shows the glycemic response, while (B) highlights 4 h-fasting glycemia, and (C) displays the area under the curve (AUC) of the glycemic response to glucose (1.5 g/kg) gavage (OGTT, n = 10 mice per group). (D) shows the glycemic response, while (E) displays overnight-fasting glycemia, and (F) highlights the area under the curve (AUC) of the glycemic response to pyruvate (1.5 g/kg) intraperitoneal injection (ipPTT, n = 10 mice per group). Finally, (G) displays the oxaloacetate (OAA) ratio to acetyl-coA in the liver (n = 10 mice per group). Comparison of HFHS and HFHS-Gly vs. SD used * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Comparison of HFHS-Gly vs. HFHS used \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$.

3.5. The Impact of Glycine Supplementation on the Skeletal Muscle of Diet-Induced Obese Mice

We further phenotyped the *gastrocnemius* muscle status since skeletal muscles are key tissues involved in glycine [26] and glucose [27] homeostasis. Glycine concentration in the muscle was similar between HFHS and SD and 34.6% higher in HFHS-Gly compared to

the other two groups ($p < 0.001$, Figure 5A). Interestingly, concentrations in sarcosine and glutamate were 25.0% and 25.7% lower and alanine was 19.2% higher in HFHS compared to SD, respectively ($p < 0.01$, Figure 5B and Table S2). In HFHS-Gly, leucine and glycerol concentrations were 20.3% and 38.6% higher compared to SD, respectively ($p < 0.05$, Figure 5B and Table S2). Finally, alanine and lactate concentrations were 23.3% and 30.2% lower in HFHS-Gly compared to HFHS, respectively ($p < 0.001$, Figure 5B and Table S2).

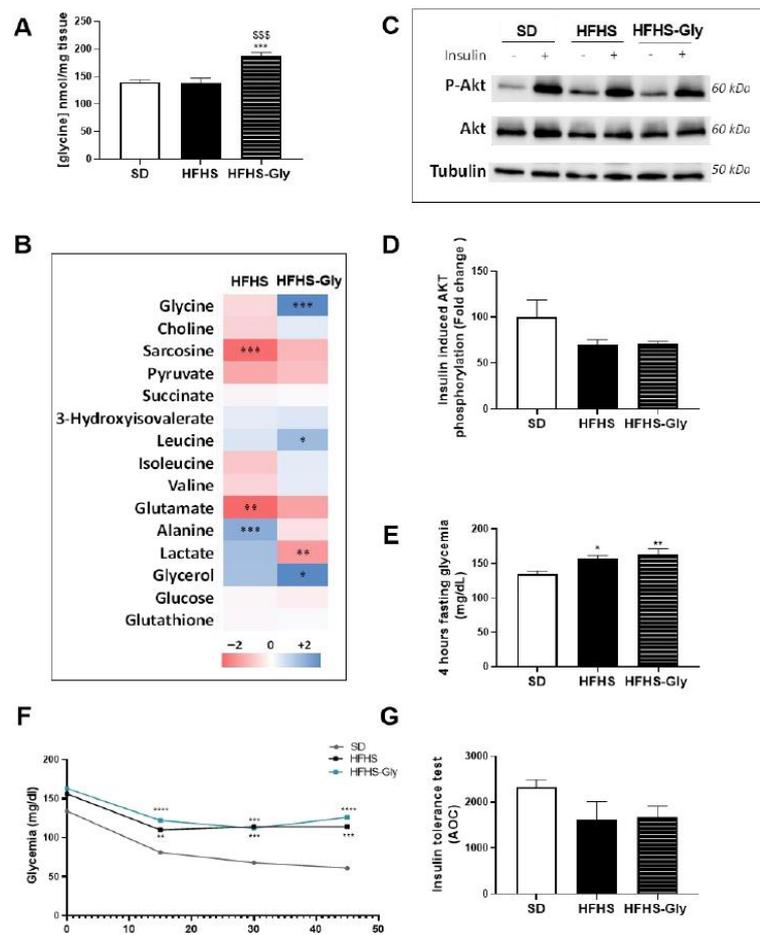


Figure 5. The impact of obesogenic diet and glycine on muscle metabolism and insulin response. C57 Bl6 J01aHsd mice were fed a standard diet (SD) or a high-fat, high-sugar diet (HFHS) for 16 weeks. Glycine supplementation (300 mg/kg/day) was given in drinking water during the last 6 weeks to half of the HFHS-fed mice (HFHS-Gly). (A,B) show quantitative NMR analyses of *gastrocnemius* muscle content in glycine and major metabolites (n = 5 mice per group), respectively. HFHS and HFHS-GLY data were normalized to the SD group. (C) includes representative images, and (D) highlights a quantitative analysis of insulin (0.75 U/kg)-induced Akt phosphorylation (n = 5 unstimulated and 5 insulin-stimulated mice per group). (E) displays four-hour fasting glycemia, while (F) shows the glycemic response, and (G) includes the area over the curve (AOC) of the glycemic response to insulin (0.75 U/kg) intraperitoneal injection (ipITT, n = 10 mice per group). Comparison of HFHS and HFHS-Gly vs. SD used * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Comparison of HFHS-Gly vs. HFHS used \$\$\$ $p < 0.001$.

Exploration of insulin-induced Akt phosphorylation evidenced that HFHS and HFHS-Gly both tended to decrease the insulin-induced Akt phosphorylation compared to SD, but the difference did not reach the level of significance (Figure 5C,D). These results were corroborated by the insulin tolerance test performed in a separate but similar protocol (Figure 5E–G). Four-hour fasting glycemia was 17.5% and 25.0% higher in HFHS and HFHS-Gly compared to SD, respectively ($p < 0.05$, Figure 5E). However, while both HFHS and HFHS-Gly tended to decrease AOC_{iPTT} compared to SD, neither reached the level of significance (Figure 5F,G). These results showed that skeletal muscle responded to glycine supplementation, but these adaptations did not alter the insulin resistance.

4. Discussion

Our previous study on diet-induced obese mice showed that the lowest plasma glycine concentration in obesity is also observed in the liver [24]. In that organ, this study showed that the lower availability of glycine was partially compensated by glycine supplementation. Although glycine positively impacted MAM integrity and insulin response in vitro, glycine supplementation had little or no beneficial impact on these parameters in the liver of diet-induced obese mice. It also had no apparent beneficial impact on skeletal muscle insulin resistance associated with diet-induced obesity. Unexpectedly, glycine supplementation promoted hepatic gluconeogenesis, thereby contributing to the worsening of overnight-fasting glycemia.

Our work is the first to evaluate the impact of glycine on liver MAM integrity. In situ PLA has proven its reliability for exploring VDAC1-IP3 R contact points in vitro and in vivo [12,13,15,16]. The discrepancy between the in vitro and in vivo results suggests that glycine implication may be context dependent and involve one or more of the multiple metabolic [10]. In particular, as glycine metabolism has been shown to be important for skeletal muscle in obesity [26], the discrepancy between the in vitro and in vivo results suggests that crosstalk between skeletal muscle and the liver may play a key role in determining the availability and metabolic fate of glycine in the hepatocytes. The divergence might also involve the expression of GNMT which is involved in the regulation of S-adenosyl-methionine levels and methylation processes. *Gnmt* gene expression was indeed enhanced by palmitate in vitro and reduced in obesity in vivo. In addition, the mechanisms may be more complex than the regulation of S-adenosyl-methionine levels as several compensatory mechanisms can be activated according to the *gnmt* gene expression level and the availability of metabolites interacting with the one-carbon cycle [28]. Given the correlation between low plasma glycine concentration and the severity of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [10], we hypothesized that glycine might have bioactive functions. Few studies have evidenced that liver MAM integrity can be regulated by nutrients. The deciphered signaling pathways involve either glucose and the protein phosphatase 2 A (PP2 A) [12] or arginine, the synthesis of nitric oxide (NO), and the protein kinase G (PKG) [16]. Palmitate has also been identified to alter MAM integrity in vitro in hepatocytes [13,14] and myotubes [29], but the exact mechanisms are still unknown. Further studies are needed to follow up on these findings. However, the data collected in our study do not encourage further work on glycine.

The present work is also the first that evaluated the impact of glycine on liver insulin response, and it found no beneficial impact on nutritional dosage. It is the second work that observed that glycine supplementation at a dose below 0.3 g/kg/d for 6 to 10 weeks does not improve muscle insulin resistance and glucose tolerance in an animal model of obesity [26]. No recent clinical interventions have been published using dietary glycine in patients with obesity and/or cardiometabolic disorders. A former clinical work in elderly patients with HIV evidenced that 0.1 g of glycine/kg/day for 14 days in association with N-acetylcysteine improved insulin sensitivity [30], potentially due to improved glutathione synthesis and antioxidant protection. Our data showed that glutathione content was not altered following glycine supplementation in the liver and *gastrocnemius* muscle, which contrasts with this clinical trial, potentially because our dosage was about four times

lower (i.e., a human equivalent dose of 24.3 mg/kg/day, [31]) and not associated with N-acetylcysteine. In addition, our study did not show a beneficial effect of glycine supplementation on liver biochemistry, especially on triglyceride content, which contrasts with Zhou et al. [32]. The authors used a 23-fold higher dose of glycine (i.e., 3.5 g/kg/d, the human equivalent dose being 565 mg/kg/day, [31]) for 24 weeks in diet-induced obese rats [32]. In this study, glycine supplementation decreased triglyceride levels and protected against HFHS-induced non-alcoholic steatohepatitis, but the authors did not explore its impact on glucose homeostasis. Therefore, it would be interesting to study the dose-response to glycine supplementation in obesity starting from nutritional doses to therapeutic doses. To complete the exploration, it would also be relevant to explore the impact of the form of administration of glycine, i.e., administered in water or food as opposed to gavage. Based on current knowledge, our work showed that in the liver, like glycerol, lactate, and other amino acids, such as alanine, the carbon skeleton of glycine supplied at a nutritional dosage can be metabolized to pyruvate to support gluconeogenesis through the synthesis of phosphoenolpyruvate [33]. The present study provides evidence that gluconeogenesis is strongly upregulated in obesity, which may imply that supplementary dietary glycine is integrated in gluconeogenesis and routed toward glucose synthesis. Interestingly, overnight fasting glycemia and the early glycaemic peak in response to the pyruvate tolerance test were the most impacted following glycine supplementation compared to other measurements (i.e., glucose and insulin tolerance tests and insulin response in tissues). This suggests that providing glycine in drinking water chronically correlates with hepatic gluconeogenesis induction but, as observed through Akt-phosphorylation assay, it does not worsen tissue insulin resistance.

NMR exploration interestingly evidenced differences between liver and muscle metabolic fingerprints in response to dietary manipulations. In the liver, HFHS was associated with a lower glycine concentration which was restored close to SD values due to glycine supplementation in parallel to enhanced sarcosine content. This may indicate that glycine supplementation enhances its conversion to sarcosine through GNMT. In contrast, in *gastrocnemius* muscle, HFHS did not alter glycine concentration, but it was associated with lower content in sarcosine and glutamate and higher content in leucine and alanine compared to SD. These observations corroborate a recent demonstration that muscle glycine metabolism in obesity is shifted to provide carbon for the pyruvate-alanine cycle in a manner regulated by branched chain amino acids [26]. Furthermore, HFHS may divert glycine metabolism from GNMT activity. Interestingly, glycine supplementation induced a strong increase in glycine content in *gastrocnemius* muscle, which contrasts with a partial restoration of sarcosine and glutamate concentration, and it induced a significant decrease in alanine and lactate content. This raises two issues that need to be further assessed. Firstly, a question arises whether glycine supplementation is sufficient to restore GNMT activity in skeletal muscle. Secondly, it would be important to explore whether glycine supplementation in obesity alters the Cori and Cahill cycles between skeletal muscle and the liver, thereby contributing to increased hepatic gluconeogenesis.

In conclusion, the present study did not find a coherent impact of glycine on hepatocyte and liver MAM integrity, which supports the idea that glycine does not consistently interact with pathways involved in the regulation of MAM integrity in the liver. Alternative or compensatory mechanisms may contribute to loosening the link between glycine and the signaling pathways involved in regulating MAM integrity. This could explain why glycine can have positive impact on that parameter *in vitro* and not *in vivo*. In addition, our observations do not support the beneficial impact of glycine supplementation in obesity to prevent insulin resistance and improve glucose intolerance. This raises the question whether glycine supplementation in obesity could alter alanine and lactate fluxes between skeletal muscles and the liver, which would promote gluconeogenesis and hyperglycemia. Therefore, the long-term effect of glycine supplementation on the risk of developing type 2 diabetes needs to be debated.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu15010096/s1>, Table S1: Metabolite concentrations measured by NMR in the liver of SD, HFHS and HFHS-GLY-fed mice. Table S2: Metabolite concentrations measured by NMR in the gastrocnemius muscle of SD, HFHS and HFHS-GLY-fed mice.

Author Contributions: Conceptualization, B.M., A.A. and B.P.; methodology, A.A., F.L., R.L., S.C., E.L., C.P., G.J.P.R., B.P. and B.M.; Software, G.J.P.R. and B.P.; validation, A.A., A.B., S.C., E.L., G.J.P.R., B.P. and B.M.; formal analysis, A.A., R.L., E.D.M., S.C., E.L. and A.M.N.d.L.G.B.; investigation, A.A., F.L., C.P., M.G. and B.M.; data curation, B.M.; writing—original draft preparation, B.M. and A.A.; writing—review and editing, B.M., A.A., A.B., G.J.P.R. and P.B.; visualization, A.A. and A.B.; supervision, B.M.; project administration, B.M.; funding acquisition, B.M., G.J.P.R. and B.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD 2020). Financial support from the Access to Research Infrastructures activity in the 7th Framework Programme of the EC (Project number: 261863, Bio-NMR) to conduct this research is gratefully acknowledged.

Data Availability Statement: Contact the corresponding author.

Acknowledgments: The authors warmly thank Aurélie Vieille Marchiset, Sandra Pesenti, and Emmanuelle Meugnier for their skillful technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

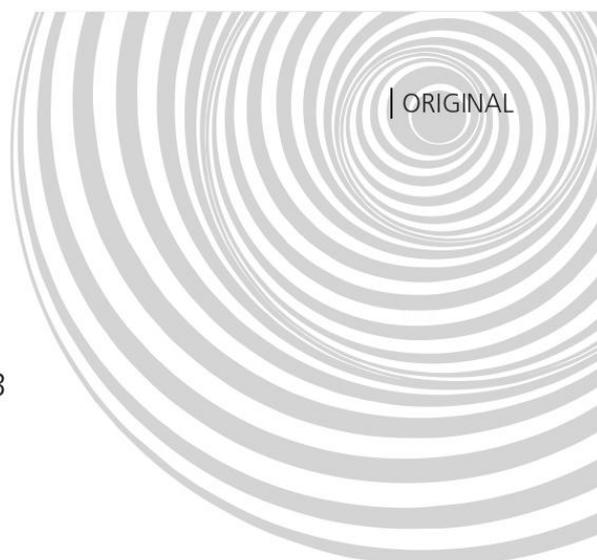
- Wong, R.J.; Liu, B.; Bhuket, T. Significant Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Advanced Fibrosis in the US: A Cross-Sectional Analysis of 2011–2014 National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 974–980. [CrossRef] [PubMed]
- Okeunle, A.P.; Li, Y.; Liu, L.; Du, S.; Wu, X.; Chen, Y.; Li, Y.; Qi, J.; Sun, C.; Feng, R. Abnormal Circulating Amino Acid Profiles in Multiple Metabolic Disorders. *Diabetes Res. Clin. Pr.* **2017**, *132*, 45–58. [CrossRef] [PubMed]
- Giesbertz, P.; Padberg, I.; Rein, D.; Ecker, J.; Höfle, A.S.; Spanier, B.; Daniel, H. Metabolite Profiling in Plasma and Tissues of Ob/Ob and Db/Db Mice Identifies Novel Markers of Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetologia* **2015**, *58*, 2133–2143. [CrossRef] [PubMed]
- Guasch-Ferré, M.; Hruby, A.; Toledo, E.; Clish, C.B.; Martínez-González, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Hu, F.B. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 833–846. [CrossRef] [PubMed]
- Gall, W.E.; Beebe, K.; Lawton, K.A.; Adam, K.-P.; Mitchell, M.W.; Nakhle, P.J.; Ryals, J.A.; Milburn, M.V.; Nannipieri, M.; Camastra, S.; et al. α -Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10883. [CrossRef] [PubMed]
- Takashina, C.; Tsujino, I.; Watanabe, T.; Sakaue, S.; Ikeda, D.; Yamada, A.; Sato, T.; Ohira, H.; Otsuka, Y.; Oyama-Manabe, N.; et al. Associations among the Plasma Amino Acid Profile, Obesity, and Glucose Metabolism in Japanese Adults with Normal Glucose Tolerance. *Nutr. Metab.* **2016**, *13*, 5. [CrossRef]
- Wang-Sattler, R.; Yu, Z.; Herder, C.; Messias, A.C.; Floegel, A.; He, Y.; Heim, K.; Campillos, M.; Holzapfel, C.; Thorand, B.; et al. Novel Biomarkers for Pre-diabetes Identified by Metabolomics. *Mol. Syst. Biol.* **2012**, *8*, 615. [CrossRef]
- Floegel, A.; Stefan, N.; Yu, Z.; Mühlenbruch, K.; Drohan, D.; Joost, H.-G.; Fritsche, A.; Häring, H.-U.; Hrabě de Angelis, M.; Peters, A.; et al. Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach. *Diabetes* **2013**, *62*, 639–648. [CrossRef]
- Palmer, N.D.; Stevens, R.D.; Antinozzi, P.A.; Anderson, A.; Bergman, R.N.; Wagenknecht, L.E.; Newgard, C.B.; Bowden, D.W. Metabolomic Profile Associated With Insulin Resistance and Conversion to Diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, E463–E468. [CrossRef]
- Alves, A.; Bassot, A.; Bulteau, A.-L.; Pirola, L.; Morio, B. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases. *Nutrients* **2019**, *11*, 1356. [CrossRef]
- Rieusset, J. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Calcium Signaling in Hepatic Metabolic Diseases. *Biochim. Et Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 865–876. [CrossRef] [PubMed]
- Theurey, P.; Tubbs, E.; Vial, G.; Jacquemetton, J.; Bendridi, N.; Chauvin, M.-A.; Alam, M.R.; Le Romancer, M.; Vidal, H.; Rieusset, J. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Allow Adaptation of Mitochondrial Metabolism to Glucose Availability in the Liver. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8*, 129–143. [CrossRef] [PubMed]
- Tubbs, E.; Theurey, P.; Vial, G.; Bendridi, N.; Bravard, A.; Chauvin, M.-A.; Ji-Cao, J.; Zoulim, F.; Bartosch, B.; Ovize, M.; et al. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes* **2014**, *63*, 3279–3294. [CrossRef] [PubMed]

14. Tubbs, E.; Axelsson, A.S.; Vial, G.; Wollheim, C.B.; Rieusset, J.; Rosengren, A.H. Sulforaphane Improves Disrupted ER-Mitochondria Interactions and Suppresses Exaggerated Hepatic Glucose Production. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *461*, 205–214. [[CrossRef](#)]
15. Rieusset, J.; Fauconnier, J.; Paillard, M.; Belaidi, E.; Tubbs, E.; Chauvin, M.-A.; Durand, A.; Bravard, A.; Teixeira, G.; Bartosch, B.; et al. Disruption of Calcium Transfer from ER to Mitochondria Links Alterations of Mitochondria-Associated ER Membrane Integrity to Hepatic Insulin Resistance. *Diabetologia* **2016**, *59*, 614–623. [[CrossRef](#)]
16. Bassot, A.; Chauvin, M.-A.; Bendridi, N.; Ji-Cao, J.; Vial, G.; Monnier, L.; Bartosch, B.; Alves, A.; Cottet-Rousselle, C.; Gouriou, Y.; et al. Regulation of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) by NO/SGC/PKG Participates in the Control of Hepatic Insulin Response. *Cells* **2019**, *8*, 1319. [[CrossRef](#)]
17. Ducker, G.S.; Rabinowitz, J.D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 27–42. [[CrossRef](#)]
18. Berry, M.N.; Friend, D.S. High-Yield Preparation of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. *J. Cell Biol.* **1969**, *43*, 506–520. [[CrossRef](#)]
19. Groen, A.K.; Sips, H.J.; Vervoorn, R.C.; Tager, J.M. Intracellular Compartment Ation and Control of Alanine Metabolism in Rat Liver Parenchymal Cells. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *122*, 87–93. [[CrossRef](#)]
20. International Association for the Study of Pain. IASP Guidelines for the Use of Animals in Research. Available online: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1217> (accessed on 15 January 2020).
21. Beaulant, A.; Dia, M.; Pillot, B.; Chauvin, M.-A.; Ji-Cao, J.; Durand, C.; Bendridi, N.; Chanon, S.; Vieille-Marchiset, A.; Da Silva, C.C.; et al. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Miscommunication Is an Early and Causal Trigger of Hepatic Insulin Resistance and Steatosis. *J. Hepatol.* **2022**, *77*, 710–722. [[CrossRef](#)]
22. Chomczynski, P.; Sacchi, N. The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 581–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bassot, A.; Prip-Buus, C.; Alves, A.; Berdeaux, O.; Perrier, J.; Lenoir, V.; Ji-Cao, J.; Berger, M.-A.; Loizon, E.; Cabaret, S.; et al. Loss and Gain of Function of Grp75 or Mitofusin 2 Distinctly Alter Cholesterol Metabolism, but All Promote Triglyceride Accumulation in Hepatocytes. *Biochim. Et Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2021**, *1866*, 159030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rautureau, G.J.P.; Morio, B.; Guibert, S.; Lefevre, C.; Perrier, J.; Alves, A.; Chauvin, M.A.; Pinteur, C.; Monet, M.A.; Godet, M.; et al. Dietary Obesity in Mice Is Associated with Lipid Deposition and Metabolic Shifts in the Lungs Sharing Features with the Liver. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Jung, Y.-S.; Hyeon, J.-S.; Hwang, G.-S. Software-Assisted Serum Metabolite Quantification Using NMR. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *934*, 194–202. [[CrossRef](#)]
26. White, P.J.; Lapworth, A.L.; McGarrah, R.W.; Kwee, L.C.; Crown, S.B.; Ilkayeva, O.; An, J.; Carson, M.W.; Christopher, B.A.; Ball, J.R.; et al. Muscle-Liver Trafficking of BCAA-Derived Nitrogen Underlies Obesity-Related Glycine Depletion. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108375. [[CrossRef](#)]
27. DeFronzo, R.A.; Tripathy, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes. Care* **2009**, *32* (Suppl. 2), S157–S163. [[CrossRef](#)]
28. Wang, Y.-C.; Wu, M.-T.; Lin, Y.-J.; Tang, F.-Y.; Ko, H.-A.; Chiang, E.-P. Regulation of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism by Glycine N-Methyltransferase (GNMT) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2015**, *61*, S148–S150. [[CrossRef](#)]
29. Shinjo, S.; Jiang, S.; Nameta, M.; Suzuki, T.; Kanai, M.; Nomura, Y.; Goda, N. Disruption of the Mitochondria-Associated ER Membrane (MAM) Plays a Central Role in Palmitic Acid-Induced Insulin Resistance. *Exp. Cell Res.* **2017**, *359*, 86–93. [[CrossRef](#)]
30. Nguyen, D.; Hsu Jean, W.; Jahoor, F.; Sekhar Rajagopal, V. Effect of Increasing Glutathione With Cysteine and Glycine Supplementation on Mitochondrial Fuel Oxidation, Insulin Sensitivity, and Body Composition in Older HIV-Infected Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 169–177. [[CrossRef](#)]
31. Nair, A.B.; Jacob, S. A Simple Practice Guide for Dose Conversion between Animals and Human. *J. Basic Clin. Pharm.* **2016**, *7*, 27–31. [[CrossRef](#)]
32. Zhou, X.; Han, D.; Xu, R.; Wu, H.; Qu, C.; Wang, F.; Wang, X.; Zhao, Y. Glycine Protects against High Sucrose and High Fat-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis in Rats. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80223–80237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Verne, J.; Hebert, S.; Bescol Liversac, J.; Graf, B. Analysis of neoglucogenesis in hepatocyte culture by the use of C-14-glycine. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales* **1966**, *160*, 1148–1150. [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

APÊNDICE E – PAPER 4

<http://dx.doi.org/10.1590/1678-9865201932e180292>



Composition of a maternal high fat diet rich in saturated fats and omega 3 in gestation and lactation for studies with rodents

Composição de uma dieta hiperlipídica materna rica em gorduras saturadas e ômega 3 na gestação e lactação para estudos com roedores

Laura Mata de Lima SILVA¹  0000-0002-6893-9781

Aline Maria Nunes de Lira Gomes BLOISE¹  0000-0001-7816-6500

Daniilo Augusto Ferreira FONTES¹  0000-0002-1795-7963

Katarynna Santos de ARAÚJO²  0000-0002-7924-8054

Mariana Oliveira BARBOSA²  0000-0003-3795-9488

João Henrique COSTA-SILVA¹  0000-0002-9794-1418

ABSTRACT

Objective

To prepare a high fat diet rich in saturated fatty acids and supplemented with omega 3 for experimental studies in rodents.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica. R. Alto do Reservatório, s/n., Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. Correspondence to: JH COSTA-SILVA. E-mail: <joao.hesilva@ufpe.br>.

² Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Grupo de Biotecnologia Branca, Central Analítica. Recife, PE, Brasil.

Article based on the dissertation by LML SILVA, entitled "Efeitos da ingestão de uma dieta hiperlipídica ocidentalizada suplementada com ômega 3 durante a gestação e lactação sobre os parâmetros cardiopulmonares e metabólicos na prole de ratos machos". Universidade Federal de Pernambuco; 2018.

How to cite this article

Silva LML, Bloise AMNLG, Fontes DAF, Araújo KS, Barbosa MO, Costa-Silva JH. Composition of a maternal high fat diet rich in saturated fats and omega 3 in gestation and lactation for studies with rodents. Rev Nutr. 2019;32:e180292. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9865201932e180292>



Methods

Purified industrial ingredients and flaxseed oil as a source of omega 3 at a concentration of 3.5% (v/w) were used in the elaboration of the diets. Centesimal and nutritional compositions, fatty acids profile and dietary intake were evaluated. Serum levels of total protein, albumin, cholesterol and glucose in pregnant rats were verified. The offspring were assessed with regard to body mass and waist circumference. Statistical analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov, Anova One-Way test and Bonferroni post-test.

Results

High fat and high fat with omega 3 diets presented, respectively, 37% and 36% saturated fat, and the lipid amount was 80% higher than the American Institute of Nutrition 93G control diet. The omega 3 content was 50% higher in the high fat with omega 3 diet. There was no difference in consumption of diet types in weight (grams). The dams that received the High fat diet developed hypercholesterolemia and their High fat offspring exhibited higher body mass on the 1st day of life and increased abdominal circumference on the 30th day of life compared to the control and the high fat with omega 3 offspring.

Conclusion

The formulated diets with a higher amount of saturated fatty acids meet the nutritional requirements of the gestation and lactation period. The high fat diet with omega 3 was able to attenuate the changes observed in dams and their offspring.

Keywords: Alpha-linolenic acid. Fatty acids. Nutritional requirements. Rats.

RESUMO

Objetivo

Elaborar uma dieta hiperlipídica rica em gorduras saturadas e suplementada com ômega 3 para estudos experimentais em roedores.

Métodos

Foram utilizados ingredientes industriais e purificados na elaboração das dietas, e o óleo de linhaça como fonte de ômega 3 na concentração de 3,5% (v/m). As composições centesimal e nutricional, o perfil de ácidos graxos e o consumo das dietas foram avaliados. Verificaram-se os níveis séricos de proteínas totais, albumina, colesterol e glicose das ratas prenhas. A prole foi submetida à avaliação de massa corporal e circunferência abdominal. Na análise estatística, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, Anova One-Way e o pós-teste de Bonferroni.

Resultados

As dietas hiperlipídica e hiperlipídica com ômega 3 apresentaram, respectivamente, 37% e 36% de gorduras saturadas, sendo a quantidade de lipídios 80% superior em relação à dieta controle 93G do American Institute of Nutrition. O teor de ômega 3 foi 50% maior na dieta hiperlipídica com ômega 3. Não houve diferença no consumo em gramas dos tipos de dieta. As mães que receberam dieta hiperlipídica tiveram hipercolesterolemia e a prole hiperlipídica apresentou maior massa corporal no 1º dia de vida e aumento de circunferência abdominal nos 30 dias de vida em relação ao grupo controle e hiperlipídica com ômega 3.

Conclusão

As dietas formuladas atendem aos requerimentos nutricionais do período de gestação e de lactação com uma quantidade superior de ácidos graxos saturados. A dieta hiperlipídica com ômega 3 foi capaz de atenuar as alterações observadas nas mães e na prole.

Palavras-chaves: Ácido alfa-linoleico. Ácidos graxos. Necessidades nutricionais. Ratos.

INTRODUCTION

Consumption of high fat diets in pregnancy and lactation is associated with cardiometabolic diseases in adulthood [1,2]. Fat content in high fat diets varies among experimental studies, reaching 65% of Total Energy Value (TEV) fat in some diets [1,3,4]. High fat rodent diets can be classified into:

high lipid diets with 30% to 50% TEV and very high lipid diets with over 50% TEV [5]; such values are well above those recommended by the American Institute of Nutrition (AIN), which advocates the supply of 7% lipids in the concentration of the soybean-based experimental diet, which corresponds to 17% TEV, as safe for meeting the needs of essential fatty acids. during growth, reproduction and lactation in rodents [6,7].

Pregnancy is a physiological state that requires adequate intake of essential fatty acids, particularly Docosahexaenoic Acid (DHA), for the development of the fetal central nervous system [8,9]. Supplementation of 200mg DHA from safe sources such as fish rich in this nutrient (herring, tuna and salmon) or from seaweed-based nutritional supplements is recommended for pregnant women to prevent heavy metal contamination such as mercury contamination [9]. Maternal consumption of DHA may also reduce the risk of premature birth in high-risk pregnancies [10]. On the other hand, the use of omega-3 enriched diets during pregnancy and lactation may decrease the expression of genes related to increased adiposity in offspring [11]. A decrease in omega 3 intake with an increased omega 6:3 ratio in the diet may also influence body composition at birth, increasing adiposity. [12].

Fatty acid profile in high fat diets during pregnancy and/or lactation may be a factor related to the development of metabolic disorders in adulthood [13]. Consumption of a diet rich in saturated fatty acids was associated with the development of hepatic steatosis with a higher degree of hepatic impairment, unlike a diet rich in polyunsaturated fatty acids [14]. The excess of saturated fatty acids resulted in altered endocrine pancreas morphometry with lower density of insulin-containing islets, which was not observed in offspring of rats that received the flaxseed high fat diet [3].

Nutritional manipulation with high fat diets during the critical period may imply morphological and functional changes in organs important for endocrine regulation with risk for the development of metabolic diseases in adulthood [3,4,14]. The increased nutritional demands of rodents regarding macronutrients (carbohydrates, proteins and lipids) and micronutrients (vitamins and minerals) during pregnancy, lactation and growth [6,7] sometimes is not considered in the elaboration of experimental diets or in the supply of food to animals by their breeders, especially when using commercial feed and this fact can lead to potential deficiencies.

In the search for a high fat diet pattern with or without omega 3 supplementation, different diets are available, either formulated or commercial diets. The high fat diet model used depends on the type of experimental design, study objectives, research line (e.g., fetal programming or phenotypic plasticity), among others. Nevertheless the diet must meet the demand of different nutrients, considering the life stage of the animal. Conservation and presentation of diets should also be considered. Reduction of dietary intake due to palatability may jeopardize animal growth and development, resulting in lower birth weight and lower pregnancy rates among females [15].

Westernized high fat diet formulation should consider the nutritional requirements of rodents, increasing lipid supply without hampering other nutrients. Diet development also involves steps, such as: selection of ingredients, preparation and pelletization, which may impair quality and acceptance of the feed by the animal, especially regarding the proper texture, jeopardizing the development of research. Westernized experimental diets used in a study with rodents, the Cavalcante *et al.* [16] diet, based on data from the Family Budget Survey of the *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* (Brazilian Institute of Geography and Statistics/Brazil 2002-2003) and the recommendations of AIN 93G [6,7], demonstrates the consumption pattern of the Brazilian population, whose highest caloric intake comes from refined cereals, simple sugars, vegetable oils and animal fats. The diet composition is 49.3% carbohydrate, 31.5% lipid and 19.9% protein, rich in saturated fat. The authors observed

that the consumption of this diet during pregnancy and lactation promoted an early maturation in puppies' physical characteristics and neural reflexes.

Considering the repercussions of high fat diet in pregnancy and lactation on offspring and the scarcity of studies that address the need for standardization of diets, the present work proposed to elaborate a high fat diet rich in saturated fats, which could reflect the consumption of the Brazilian population and a diet of saturated fats with omega 3, meeting the nutritional requirements of rodents and acknowledging the importance of developing strategies that can reduce the effects of a high fat diet, supporting further studies with animal models.

METHODS

The high saturated fatty acid diet with omega 3 (HFw3) was prepared using the basic ingredients of the high fat diet (HF) described above. Flaxseed oil was used as a source of omega 3 (LinoOil®, Cibra, Rio Grande do Sul, Brazil), which was previously analyzed for determination of the lipid profile in the *Laboratório de Fitoquímicos e Processos da Central Analítica* (LAFIP/CEAN, Phytochemistry and Processes Laboratory/Analytical Center) of the *Centro de Tecnologias e Estratégias do Nordeste* (CETENE, Northeast Center for Strategic Technologies) (Recife, Pernambuco, Brazil). The HFw3 diet also included in its composition soybean oil, besides flaxseed oil, with a total content of 7% vegetable oil, similar to AIN 93G. Initially a formulation with 2.5% flaxseed oil had been proposed, but after analysis of the dietary fatty acid profile, it was observed that a concentration of 3.5% flaxseed oil and 3.5% soybean oil supplied the required amounts of omega 6 indicated in AIN 93G. The preparation of the diet followed the same procedure described above for the HF diet.

The dried ingredients were mixed and sieved three times. Then the fat-sourcing ingredients were added, mixing and sieving again three times. Hot water was added to the end-product to obtain a homogeneous solid mass. After this step, the dough was cut into pellets and dried at 70°C for 48 hours in a heating and ventilation oven. The diet was prepared at room temperature at 24°C at the Dietetic Technique Laboratory of the *Centro Acadêmico de Vitória* (CAV) at the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE).

The high saturated fatty acid diet with omega 3 (HFw3) was prepared using the basic ingredients of the High Fat Diet (HF) described above. Flaxseed oil was used as a source of omega 3 (LinoOil®, Cibra, Rio Grande do Sul, Brazil), which was previously analyzed for determination of the lipid profile in the *Laboratório de Fitoquímicos e Processos da Central Analítica* (LAFIP/CEAN) of the *Centro de Tecnologias e Estratégias do Nordeste* (CETENE) (Recife, Pernambuco, Brazil). The HFw3 diet also included in its composition soybean oil, besides flaxseed oil, with a total content of 7% vegetable oil, similar to AIN 93G. Initially a formulation with 2.5% flaxseed oil had been proposed, but after analysis of the dietary fatty acid profile, it was observed that a concentration of 3.5% flaxseed oil and 3.5% soybean oil supplied the required amounts of omega 6 indicated in AIN 93G. The preparation of the diet followed the same procedure described above for the HF diet.

The determination of the centesimal composition was performed in triplicate using the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) moisture, protein, lipid and ash determination methods [17]. Results were expressed as g/100g diet according to the average of three sample repetitions. The carbohydrate fraction was determined by the difference of the values found for moisture, ether extract, proteins and ashes in 100g of the product, without dissociation between total carbohydrates and fiber content [17]. The analysis was performed at CAV/UFPE Bromatology Laboratory.

The analysis was performed at the CETENE, LAFIP/CEAN Laboratory. The preparation of methyl esters followed the AOAC methodology [17]. After obtaining the methyl esters, the fatty acid profile was determined by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID), containing a capillary column: DB-5ms (dimensions 30m longx250µm diameterx0.25µm, FAME Supelco™ mix C4-C24, Bellefonte, PA, USA). Chromatograph operating conditions were: 1.00mL/min column flow; detector temperature 300°C; 300°C injector temperature, 150°C oven temperature for 4 minutes, 150-280°C (4°C/min); The carrier gas used was helium, and a 1µL aliquot of the samples was injected into the apparatus. Fatty acid identification was performed by comparing sample peak retention times with standard peak retention times. The results obtained were in % of area.

Primiparous albino rats (*Rattus norvegicus*) (n=20) Wistar strain, weighting 220 to 250 grams and at 90 days of life were placed for mating at a ratio of 1:3 (male:female). Pregnancy was determined by observing the presence of sperm in a vaginal swab, defining the first day of pregnancy. On the first day of gestation until the 21st day of lactation, female rats were separated and placed in individual cages, randomly allocated to their relevant diets, with water and ration *ad libitum*, composing the following groups: Control Diet (n=5), High Fat Diet (HF) (n=9) and Omega 3 High Fat Diet (HFw3) (n=6).

Temperature and moisture were kept within the range of 22 to 24°C and 55 to 65%, respectively, with 12h light and dark (lights on from 6 am to 6 pm). The offspring were reduced to eight pups per litter for each dam. This reduction should occur after the first dark cycle from birth so that the dam does not reject the remaining offspring and until the 3rd day of life so as not to interfere with milk production.

Feed intake was assessed between the second and third gestational week on alternate days at the beginning of the light period (at eight o'clock in the morning), calculating the difference between the amount offered on the previous day and the cage leftover. Data from some animals were excluded due to difficulties during the food intake assessment test and therefore, only data from nine dam rats were taken into account in this evaluation, three from each group. On the 21st day of life, offspring were weaned and they began to receive a standard Presence® commercial ration (*Grupo Neovia, São Paulo, Brazil*), which contained 25.4% protein, 2.8% lipids, 54.5 % carbohydrates, 8.5% ash and 8.8% moisture per 100g diet. The caloric supply of this diet was 3.44 Kcal per gram of diet; 29.4% of the calories originated from protein, 7.6% from fat and 63% from carbohydrates.

At 19 days pregnancy, the rats were submitted to 12hour fasting (overnight). After this period, the dams were anesthetized with ketamine (80mg/Kgi.p) and xylazine (10mg/Kgi.p) to collect blood samples (1.0mL) through retro orbital plexus rupture. After coagulation, the blood was centrifuged at 3500 RPM for 10 minutes to obtain the serum, which was stored at -20°C in an Eppendorf tube until biochemical analyses could be performed using the Automated Biochemical Analyzer (version.4, Pioway Medical Lab Equipment Co. Nanjing, China). Blood glucose, total cholesterol, total protein and albumin were analyzed. Male offspring from each group of dams were submitted to murinometric measurements of body mass on the 1st, 21st and 30th day of life and abdominal circumference on the 21st and 30th day of life.

Data were analyzed using the GraphPadPrism Software (GraphPad Software Corporation, version 5.0, San Diego, CA United States, 2007). The normal distribution of the variables was verified by the Kolmogorov-Smirnov Test. After analysis of the normal distribution, the comparison between the groups was performed using the Anova One-way test, followed by the Bonferroni post test. Results were expressed as mean ±SEM (Standard Error of The Mean). The significance level considered was $p < 0.05$.

RESULTS

The amount of casein was equivalent between diets. The main sources of fat in the high fat diets were: butter, vegetable oil and lard. Monosodium glutamate was included as an ingredient, as shown in Table 1. The concentration of Butylated Hydroxytoluene antioxidant was increased in high fat diets due to changing fat sources. The HFw3 diet composition contains the ingredients in equal amounts to the HF diet, except for flaxseed and soybean oils, which together make up 7% vegetable oil according to the dietary composition of AIN 93G.

The analysis of centesimal composition, described in Table 2, showed a 20% increase in protein content in the HF diet and 13% in HFw3 in relation to the AIN 93G control diet. There was a 178% and 165% increase in lipid content in the HF and HFw3 diets, respectively. The amount of carbohydrates was reduced by approximately 20% in high fat diets. The percentage energy from fat was 80% higher in the HF diet and 74% in the HFw3 diet according to the nutritional composition analysis, also shown in Table 2.

The Chromatography Qualitative Analysis (Table 3) indicated that fatty acids C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3 were present in the three diets reviewed. Only the AIN 93G diet contained no medium chain fatty acids (C8:0, C10:0 and C12:0). The quantitative analysis showed that the three samples presented a lipid profile predominantly composed of unsaturated fatty acids, but with different proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids between the samples. The AIN 93G diet exhibited higher content of polyunsaturated fatty acids, followed by

Table 1. Composition of ingredients used in the formulation of experimental diets. Vitória de Santo Antão (PE), Brazil, 2018.

Ingredient in g per 100g of diet	AIN 93G	High fat diet	Omega 3 high fat diet with flaxseed oil 3.5%
Corn starch	39.7000	15	15
Dextrinized starch	13.2000	-	-
Wheat flour	-	12	12
Cornmeal cookie	-	7	7
Soy flour	-	6	6
Lard	-	2	2
Butter	-	8	8
Casein (>85%)	20	20	20
Guar gum	-	0.500	0.500
Sucrose	10	18	18
Flaxseed oil	-	-	3.500
Soybean oil	7	7	3.500
Fiber (cellulose)	5	0.300	0.300
Vitamins	1	0.700	0.700
Minerals mix	3.5000	2.500	2.500
DL-Methionine	0.3000	0.250	0.250
Choline Bitartrate	0.2500	0.250	0.250
Butylated hydroxytoluene	0.0014	0.014	0.014
Monosodium glutamate (12.3%)	-	0.200	0.200
Sodium Chloride	-	0.300	0.300
Total (g)	100	100	100

Note: The AIN-93G diet was adapted as recommended by Reeves *et al.* [6,7]. The high-fat diet was adapted from the Cavalcante *et al.* study [16].

Table 2. Centesimal and nutritional composition of formulated experimental diets. *Vitória de Santo Antão* (PE), Brazil, 2018.

Nutrient	AIN 93G	High fat diet	Omega 3 high fat diet with flaxseed oil 3.5%
Moisture (g/100g)	3.50	4.00	3.8
Proteins (g/100g)	18.60	22.30	21
Lipids (g/100g)	6.10	17	16.20
Carbohydrates (g/100g)	68.60	53.20	55.90
Ash (g/100g)	3.30	3.50	3.10
Kcal/g	3.69	4.52	4.51
Total fat (%TEV)	18,60	33.60	32.30
Proteins (%TEV)	20.20	19.60	18.20
Carbohydrates (%TEV)	61	46.80	49.40

Note: The omega 3 high fat diet was made with 3.5% flaxseed oil in the composition of ingredients. The analysis of centesimal composition was performed at the Bromatology Laboratory of the Academic Center of *Vitória de Santo Antão* of the Federal University of *Pernambuco*, following the Association of Official Analytical Chemists determination methodology of moisture, proteins, lipids and ashes [17]. The amount of carbohydrate present in the sample was obtained by difference. TEV: Total Energy Value; The nutritional composition regarding the amount of calories and caloric percentage of fats, proteins and carbohydrates was determined from the centesimal analysis of diets performed at the Bromatology laboratory of the Academic Center of *Vitória de Santo Antão* of the Federal University of *Pernambuco*.

monounsaturated and saturated fatty acids; the HF diet had a higher amount of saturated fatty acids, followed by polyunsaturated and monounsaturated; HFw3 presented higher monounsaturated fatty acids content, followed by saturated and polyunsaturated fatty acids.

There was a 100% increase in saturated fatty acids in high fat diets compared to the AIN 93G control diet (Table 3). Palmitic acid was 90.0% and 81.5% higher in the HF and HFw3 diets, respectively. The percentage of monounsaturated fatty acids was similar between the AIN 93G and HF diets, and the HFw3 diet had a 33.0% increase in monounsaturated fats. The HF and HFw3 diets had a lower content of polyunsaturated fatty acids, namely 37.0% and 53.0%, respectively. Although the AIN 93G diet had a higher percentage of omega 3, the HFw3 diet presented a 50.0% higher content in 100g of the sample when compared to the other diets, which contained similar amounts of this nutrient. The HFw3 diet also had lower omega 6:3 ratio. The omega 6 content was higher in the HF diet, which also presented higher omega 6:3 ratio, being 1.7 times higher than the AIN 93G diet.

In the evaluation of consumption by pregnant rats, shown in Table 4, there was no significant difference between the amount of diet consumed by the rats receiving the AIN 93G diet and the ones receiving the high fat diets (AIN 93G=14.3±2.3g; HF=13.1±1.9g; HFw3=10.2±1.8g, $p=0.0697$). Table 4 also shows that there were no significant differences in total protein, albumin and serum glucose values. However, the cholesterol of pregnant rats that received the HFw3 diet was significantly lower when compared to those receiving the HF diet alone, but these had values significantly higher than the control.

In the murinometric evaluation of offspring, higher body mass was observed on the first day of life in offspring receiving the HF diet, without significant difference between the offspring whose mothers received the control diet and HFw3. However, at 21 days of life, HFw3 offspring presented higher body mass in relation to control and HF offspring. At 30 days of life, there was no difference between the groups, as shown in Table 5. The measurement of abdominal circumference showed that at the end of the lactation period (21st day) there was no difference between the groups, but after this period (on the 30th day of life), the offspring which maternal diet during pregnancy and lactation was HF presented increased abdominal circumference when compared to the offspring of maternal control diet and HFw3.

Table 3. Fatty acid composition in diets regarding the presence of double bond in the carbon chain. *Vitória de Santo Antão* (PE), Brasil, 2018.

Fatty acid	Fatty acid percentage composition Diets		
	AIN 93G	High fat diet	Omega 3 high fat diet with flaxseed oil 3.5%
<i>Saturated</i>			
Octanoic acid (C8:0)	0	0	0
Decanoic acid (C:10)	0	0.85	0.74
Lauric acid (C12:0)	0	1.16	1.15
Myristic acid (C14: 0)	0	4.22	4.37
Pentadecanoate Acid (C15:0)	0	0.47	0
Palmitic acid (C16:0)	11.97	22.78	21.73
Heptadecanoate Acid (C17:0)	0	0	0
Stearic acid (C18:0)	4.62	7.53	8.07
Arachidic acid (C20:0)	0.36	0	0
Behenic acid (C22:0)	0.37	0	0
Total	17.32	37.01	36.06
<i>Monounsaturated</i>			
Myristoleic acid (C14:1)	0	0.46	0
Palmitoleic acid (C16:1)	0	0.95	0.87
Heptadecanoic acid (C17:1)	0	0	0
Oleic acid (C18:1)	29.93	28.32	38.47
Total	29.93	29.73	39.34
<i>Polyunsaturated</i>			
Linolenic acid (C18:3)	3.89	1.64	2.32
Linoleic acid (C18:2)	48.87	31.63	22.28
Total	52.76	33.27	24.60
Omega 3 (g/100g diet)	0.27	0.27	0.40
Omega 6 (g/100g diet)	3.42	5.73	3.78
Omega 6:3 ratio	12.60	21.20	9.40

Note: Fatty acids were identified according to external standard (FAME Supelco™ mix C4-C24, Bellefonte, PA, United States and the percentage (%) calculated according to peak area normalization by the gas chromatography method at the Phytochemical Laboratory and processes of the Northeast Center for Technologies and Strategies. From the percentage determination of linolenic (omega 3) and linoleic (omega 6) acids, the amounts (g/100g of diet) of these fatty acids were calculated and the omega ratio was obtained. 6/3.

DISCUSSION

In the formulation of the high fat diet, the amount of ingredients was modified to obtain a diet rich in saturated fatty acids, with butter as the main source. The fatty acid profile of butter is 73.5% saturated fatty acids, 19.8% monounsaturated and 3.9% polyunsaturated, differing from margarine that contains 21.2% saturated fat, 23.8% monounsaturated and 49.0% polyunsaturated fatty acids [14]. Lard was kept in the formulation of the high-fat diet, since it is an ingredient that is frequently found in the composition of high-fat diets in other studies [3,4,18]. Monosodium glutamate has been added as it is a substance used in the development of experimental models of neuroendocrine obesity [19].

Table 4. Average food intake and serum levels of biochemical parameters at 19 days of gestation of Wistar rats fed with AIN 93G, high fat diet and high fat diet supplemented with omega 3. *Vitória de Santo Antão* (PE), Brazil (2018).

Variables	Group									p
	AIN 93G			HF			HFw3			
	M	±	SEM	M	±	SEM	M	±	SEM	
<i>Food consumption</i>										
g/day	14.2	±	1.4	13.1	±	1.1	10.1	±	0.9	0.0697
kcal/day	52.7	±	5.0	59.3	±	4.9	45.9	±	4.0	0.1784
Carbohydrates/day	8.4	±	0.8 ^a	6.9	±	0.6 ^a	5.6	±	0.4 ^b	0.0424*
Protein/day	2.5	±	0.24	2.9	±	0.24	2.1	±	0.2	0.0944
Lipids/day	0.9	±	0.1 ^a	2.2	±	0.2 ^b	1.6	±	0.1 ^b	0.0022**
g/kg	48.6	±	6.3	45.4	±	2.2	34.5	±	2.2	0.0648
kcal/kg	180.0	±	23.1	205.3	±	10.2	156.0	±	10.1	0.1210
<i>Biochemical Parameters</i>										
Total protein (g/dL)	6.6	±	0.3	6.3	±	0.1	6.0	±	0.1	0.1138
Albumin (g/dL)	4.8	±	0.1	4.8	±	0.1	4.6	±	0.2	0.5708
Glucose (mg/dL)	120.8	±	4.1	129.4	±	6.80	109.0	±	10.6	0.1943
Total cholesterol (mg/dL)	73.3	±	1.7 ^a	90.0	±	3.3 ^b	64.3	±	4.7 ^a	0.0005**

Note: ^{a,b}Values with equal letters in the same line do not differ after statistical analysis; Pregnant rats received 18% lipid control diet (AIN-93G), 33% lipid high fat diet (HF) or omega 3 supplemented high fat diet (HFw3) with 33% lipids with 3,5% flaxseed oil, according to the experimental group, during pregnancy. Values were expressed as mean ± SEM. Values with equal letters in the same line do not differ after statistical analysis (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, One-Way ANOVA and Bonferroni post test: control [N=3], HF [N=3], HFw3 [N=3] in the food intake assessment and control [N=5], HF [N=9], HFw3 [N=5-6] for biochemical assessment).

Table 5. Body mass and abdominal circumference of offspring of Wistar rats fed AIN 93G diets, high fat diet and high fat diet supplemented with omega 3 during pregnancy and lactation. *Vitória de Santo Antão* (PE), Brazil (2018).

Age/Variables	Group									p
	AIN 93G			HF			HFw3			
	M	±	SEM	M	±	SEM	M	±	SEM	
<i>1st day</i>										
Body mass (g)	6.5	±	0.2 ^a	7.4	±	0.2 ^b	6.8	±	0.1 ^a	0.0029**
<i>21st day</i>										
Body mass (g)	53.9	±	0.7 ^a	54.4	±	0.8 ^a	57.6	±	0.7 ^b	0.0023**
Abdominal circumference (cm)	10.2	±	0.1	10.2	±	0.1	10.1	±	0.1	0.9707
<i>30th day</i>										
Body mass (g)	93.3	±	2.3	97.0	±	2.3	100.2	±	2.6	0.1316
Abdominal circumference (cm)	12.0	±	0.1 ^a	12.7	±	0.2 ^b	11.8	±	0.2 ^a	0.0046**

Note: ^{a,b}Values with equal letters in the same line do not differ after statistical analysis; Pregnant rat received a 18% lipid control diet, a 33% lipid high-fat (HF) diet, or an omega 3 supplemented high-fat diet (HFw3) with 33% lipids added with 3.5% flaxseed oil, according to the experimental group during pregnancy. Values were expressed as mean ± SEM. Values with equal letters in the same line do not differ after statistical analysis (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, One-Way ANOVA and Bonferroni post test: control [N=31-35], HF [N=25-27], HFw3 [N=23-27]).

The HFw3 diet was developed by partially replacing the fat source so as not to compromise the omega 6 supply or cause its deficiency. Deficiency of essential fatty acids and particularly of omega 6 is associated with low weight and decreased adipose tissue and a change of both plasma lipid and

plasma membrane of the adipocytes, with an increase in omega 9:6 ratio and alteration of lipolytic and lipogenic response in the adipose tissue [20]. The composition of the HFW3 diet provides the amount of omega 6 as recommended by AIN 93G [6] with the aim of offering a higher omega 3 diet but ensuring adequate amounts of other essential fatty acids.

Alpha-Linolenic Acid (ALA) from the omega 3 series is found mainly in flaxseed (*Linum usitatissimum L.*), both in the seed and in the oil obtained by processing the seeds. Flaxseed oil (*Linum usitatissimum L.*) contains 55 to 57% of ALA and 15 to 18% of alpha-linolenic (omega 6) acid [21], with no difference between golden and brown flaxseed oil [22] and is a low-cost product and easily found. The use of golden flaxseed oil is justified by the fact that such flaxseed is grown without pesticides; therefore, it is organic. Studies show the beneficial effects of using flaxseed oil in high fat experimental diets in the critical period of development [3,4]. In young animals exposed to the high-fat diet, omega 3 supplementation from flaxseed decreased hepatic inflammation and prevented steatosis [23]. Data published by our research group show that the omega-3 high-fat diet was associated with lower triglycerides values at 21 days of life in the offspring, and the high-fat diet was associated with elevated Alanine Aminotransferase levels during the same period [24].

Studies using high fat diets to evaluate the effect of metabolic programming must meet the nutritional requirements for rodents, ruling out possible biases due to misinterpretation of results. According to some authors, studies to better evaluate the efficacy of a particular compound are well developed when using a high fat diet over a very high fat diet [5,25]. High fat diets, about 60% TEV, exceed nutritional recommendations, both for rodents and humans, making it difficult to extrapolate data beyond experimental research [25]. Given the macronutrient recommendations for the reproduction and growth phase [6,7], very high fat diets should not be used in studies of fetal programming and phenotypic plasticity, as this type of diet jeopardizes the necessary nutritional intake, especially protein, and may cause perinatal malnutrition and potential results misinterpretation. Control and high fat diets should ensure availability of the essential nutrients for development so that the difference between them is only in terms of lipid content [25].

In the assessment of food intake, there was no significant difference between the groups, although lower food intake was observed in pregnant rats of the HF and HFW3 groups. It is reported that animals receiving high fat diet during pregnancy exhibit lower food intake compared to those receiving normolipidic diet. Carvalho *et al.* [26] found a 30% reduction in the consumption of high fat diet 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* regime animals consume a constant amount of energy [14]. The composition of high fat diets includes lower carbohydrate content and higher lipid content in relation to AIN 93G, which contributed to the reduction in carbohydrate consumption in dams fed with the HFW3 diet and higher lipid consumption between the two groups in relation to the control group. Cavalcante *et al.* [16] also showed a higher lipid consumption in detriment of lower carbohydrate consumption in pregnant animals that were on Western diet in the last week of gestation.

In the present study, no difference was observed in serum total proteins and albumin was observed. This fact is considered a biomarker of nutritional status and low levels are associated with energy-protein malnutrition [27]. Animals submitted to perinatal malnutrition with a low protein diet show lower levels of albumin [28]. Normal albumin values may infer adequate dietary intake without nutritional impairment.

Dams on HF diet had high cholesterol levels, which was not observed in those on the HFw3 diet. Omega 3 fatty acids can improve lipid profile by lowering triglycerides, total cholesterol, and LDL cholesterol fraction levels, even in animals consuming the high-fat diet [29]. Some mechanisms are proposed by which omega 3 decreases lipid levels such as: reduction of hepatic lipogenesis by inhibiting Sterol Regulatory Element-Binding Proteins and expression of enzymes responsible for the synthesis of cholesterol, fatty acids and triglycerides; inhibition of key enzymes for hepatic triglyceride synthesis such as the phosphatidic acid phosphatase and diacylglycerol acyltransferase, and increased lipoprotein lipase expression for uptake of triglycerides by circulating lipoproteins, such as very low density lipoprotein and chylomicrons [30].

The HF offspring presented higher body mass on the 1st day of life and larger abdominal circumference at 30 days of life. Consumption during pregnancy of a saturated fatty acid-rich high fat diet has effects on offspring's body composition, such as weight gain, increased visceral fat, and long-term adipocyte hypertrophy [13].

A meta-analysis concluded that consumption of a high-fat diet during pregnancy is associated with increased body fat, hyperleptinemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia, dyslipidemia, and arterial hypertension in the offspring, with risk of developing metabolic syndrome [31]. In addition, HFw3 offspring also exhibited increased body mass at weaning, which demonstrates the overwhelming effect of a high fat diet early in life, even with omega 3 supplementation. Up to 42 days of life, considered as early adolescence in animals, there may be changes in body composition deriving from the nutritional environment, with repercussions on health in adulthood [32].

CONCLUSION

The formulated high fat diet may be indicated for experimental studies which objective is to evaluate the effect of diets rich in saturated fatty acids when manipulated during pregnancy and lactation, but that meet the recommended nutritional recommendations for rodents. Protein intake remained ideal for the growth and reproduction phase, as well as carbohydrates, which represent the main energy source, similar to the control diet, although in a lower percentage. Monounsaturated fats were in the same proportions of the control diet. In contrast, the percentage of saturated fatty acids was high, without impairing the supply of omega 3 and omega 6. The high fat diet with omega 3 ensures the essential nutrients for growth and development of rodents from commercial flaxseed oil as a source of alpha-linolenic acid, considering the feasibility, but with lower omega 6 content. The adequate supply of nutrients with modification only in the lipidic component allows the reduction of biases by other types of nutritional imbalances. It was observed that there was no statistical difference in the consumption analysis between diets, suggesting that the high-fat diet and the high fat diet with omega 3 may be well accepted, so that the nutritional requirements are met. The high-fat diet changed the dams' cholesterol levels, which was not observed with omega 3 supplementation. In addition, the offspring which dams received this diet exhibited higher body mass on the first day of life and increased abdominal circumference after weaning, which demonstrates that the high-fat diet has short- and long-term effects on the mother and offspring, and omega 3 supplementation can mitigate these changes.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the team of the *Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos* (LEAAL, Food Experimentation and Analysis Laboratory) of the Federal University of Pernambuco, represented by the chemist Sebastião Camilo de Melo Filho.

CONTRIBUTORS

LML SILVA and JH COSTA-SILVA contributed to study conception and design, data analysis and interpretation, manuscript preparation and writing, and approval of the final version. AMNLG BLOISE, DAF FONTES, KS ARAUJO, and MO BARBOSA contributed to data analysis and interpretation, article review and approval of the final version.

REFERENCES

1. Kereliuk SM, Brawerman GM, Dolinsky VW. Maternal macronutrient consumption and the developmental origins of metabolic disease in the offspring. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1-27. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071451>
2. Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(3):237.e1-237.e13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.03.025>
3. Correia-Santos AM, Suzuki A, Vicente GC, Anjos JS, Pereira AD, Lenzi-Almeida KC, *et al.* Effect of maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation on glucose metabolism and pancreas histomorphometry of male offspring from diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;106(3):634-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.09.022>
4. Correia-Santos AM, Vicente GC, Suzuki A, Pereira AD, Anjos JC, Lenzi-Almeida KC, *et al.* Maternal use of flaxseed oil during pregnancy and lactation prevents morphological alterations in pancreas of female offspring from rat dams with experimental diabetes. *Int J Exp Pathol.* 2015;96(2):94-102. <http://dx.doi.org/10.1111/iep.12126>
5. Gajda AM, Pellizzon MA, Ricci MR, Ulman EA. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. *Animal Lab News.* 2007;74:775-93.
6. Reeves PG, Nielsen FH, Fabey 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):1939-51.
7. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127(5):838-41. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/127.5.838>
8. Wierzejska R, Jarosz M, Wodja B, Siuba-Strzelinska M. Dietary intake of DHA during pregnancy: A significant gap between the actual intake and current nutritional recommendations. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2018;69(4):381-6. <http://dx.doi.org/10.32394/rpzh.2018.0044>
9. Almeida CAN, Ribas Filho D, Mello ED, Bertolucci PHF, Falcão MC. I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante a gestação, lactação e infância. *Int J Nutri.* 2014;7(3):4-13.
10. Akerele OA, Cheema SK. A balance of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. *J Nutr Intermed Metab.* 2016;30:1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnim.2016.04.008>
11. 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. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2015;8(4-6):185-94. <http://dx.doi.org/10.1159/000442945>
12. Pereira-da-Silva L, Cabo C, Moreira AC, Papoila AL, Virella D, Neves R, *et al.* The effect of long-chain polyunsaturated fatty acids intake during pregnancy on adiposity of healthy full-term offspring at birth during pregnancy on adiposity of healthy full-term offspring at birth. *J Perinatol.* 2015;35(3):177-80. <http://dx.doi.org/10.1038/jp.2014.188>
13. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, 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):99-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.001>
14. Llopis M, Sánchez J, Priego T, Palou A, Picó 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):1590-601. <http://dx.doi.org/10.1021/jf405161e>
15. Farias HG. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. I Simpósio de Bioterismo da Fiocruz; 2010; Out. 29; Recife. Recife: Fiocruz; 2011.

16. Cavalcante TCF, Silva JML, Silva AAM, Muniz GS, Luz Neto LM, Souza SL, *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids*. 2013;48(11):1157-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-013-3833-z>
17. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington: The Association; 1995.
18. 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;15(212):22-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2016.11.048>
19. Bautista RJH, Mahmoud AM, Königsberg M, Guerrero NELD. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and antiobesity medicinal plants. *Biomed Pharmacother*. 2019;111:503-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.108>
20. Harant-Farrugia I, Garcia J, Iglesias-Osma MC, Garcia-Barrado MJ, Carpéné C. Is there an optimal dose for dietary linoleic acid? Lessons from essential fatty acid deficiency supplementation and adipocyte functions in rats. *J Physiol Biochem*. 2014;70(2):615-27. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-014-0315-6>
21. Parikh M, Netticadan T, Pierce GN. Flaxseed: Its bioactive components and their cardiovascular benefits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(2):146-59. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00400.2017>
22. Barroso AKM, Torres AG, Castelo-Branco VN, Ferreira A, Finotelli PV, Freitas SP, *et al.* Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. *Ciênc Rural*. 2014;44(1):181-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000100029>
23. Gonçalves NB, Bannitz RF, Silva BR, Becari DD, Poloni C, Gomes PM, *et al.* a-Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Clinics*. 2018;73:e150.1-9. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e150>
24. Bloise AMNLG, Alves DS, Silva LML, Rocha Júnior RL, Silva JHC. Avaliação dos parâmetros bioquímicos da prole de mães submetidas à dieta hiperlipídica suplementada com ômega 3 durante gestação e lactação. *Anais do III Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde*; 2018 Jun; Campina Grande. Campina Grande: Editora Realize; 2018(1):1-9.
25. Kakimoto PA, Kowaltowski AJ. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol*. 2016;8:216-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.009>
26. Carvalho MF, Costa MKME, Muniz GS, Castro RM, Nascimento E. 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):177-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732013000200006>
27. Dias TMS, Carvalho JAS, Freitas TEC, Aguiar JRS, Silva MCM, Sales ALCC, *et al.* Ângulo de fase e sua relação com albumina e risco nutricional em pacientes hospitalizados. *Braspen J*. 2018 [citado 6 Out 2019];33(2):188-93. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-910158>
28. Alves JLB, Nogueira VO, Oliveira GB, Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, *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. *Br J Nutr*. 2014;111(4):606-15. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114513002833>
29. Zulkafli IS, Waddell BJ, 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):3110-7. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1153>
30. Backes J, Anzalone D, Hilleman D, Catini J. The clinical relevance of omega 3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):118:1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-016-0286-4>
31. Tellechea ML, Mensague MF, Pirola CJ. The association between high fat diet around gestation and metabolic syndrome-related phenotypes in rats: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5086:1-8. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05344-7>
32. Oosting A, Kegler D, Van der Heijning BJ, Verkade HJ, Van der Beek EM. Reduced linoleic acid intake in early postnatal life improves metabolic outcomes in adult rodents following a Western-style diet challenge. *Nutr Res*. 2015;35(9):800-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.010>

Received: March 14, 2019
 Final Version: September 12, 2019
 Approved: October 11, 2019

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, 09 de agosto de 2017.

Ofício nº 67/17

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 **23076.049500/2016-37**

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeitos da suplementação de ômega-3 sobre os parâmetros ventilatórios, de pressão arterial, composição corporal e metabolismo na prole de machos de ratas submetidos à dieta hiperlipídica durante o período perinatal”**, registrada com o nº **23076.049500/2016-37** 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 07/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 08/2019
Espécie/ linhagem/raça	Ratos isogênicos/Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	200-250g / 90 dias
Sexo	9 machos e 18 fêmeas
Origem	Bioterio do departamento de Fisiologia e Farmacologia – CB/UFPE.

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691
