

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**RELAÇÃO DA PROPORÇÃO ÔMEGA 6/3 NA DIETA DA GESTANTE COM A
VARIAÇÃO TRANSGERACIONAL DO PERFIL METABÓLICO E INCORPORAÇÃO
DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO HEPÁTICO**

Simone Halfen

Pelotas, 2012

SIMONE HALFEN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: metabolismo de lipídios).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Co-Orientador: Eduardo Schmitt

Pelotas, 2012

Catálogo na Publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB-10/1011

H169r Halfen, Simone

Relação da proporção ômega 6/3 na dieta da gestante com a variação transgeracional do perfil metabólico e incorporação de ácidos graxos no tecido hepático / Simone Halfen ; orientador Marcio Nunes Corrêa ; co-orientador Eduardo Schmitt. – Pelotas, 2012.
60 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas.

1. Alfa-linolênico 2. Tecido hepático 3. Metabolismo lipídico 4. Ratos
I. Corrêa, Marcio Nunes (orient.) II. Schmitt, Eduardo (co-orient.) III. Título.

CDD 574.192
591.19

Banca examinadora

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura

Prof^a. Dr^a. Leonor Almeida de Souza Soares

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Vera Halfen, por sempre me dar apoio nos caminhos que eu pretendia seguir, mesmo que para isso eu precisasse me ausentar por longos períodos.

Ao meu namorado, Thyago Vidovix, que mesmo fisicamente longe foi muito importante para que eu conseguisse superar as dificuldades do dia a dia da pós-graduação.

A todos os meus colegas e amigos do Nupeec, grupo que me recebeu de braços abertos desde o princípio e com quem tive vários momentos inesquecíveis. Especialmente a Patrícia Mattei e Samanta Fenstenseifer, principalmente pelos finais de semana de confinamento e muito estudo. Obrigada gurias!

O meu muito obrigado principalmente para o meu orientador Marcio Nunes Corrêa, que apostou no meu potencial. Espero não ter decepcionado.

Ao Eduardo Schmitt, por ter sido o meu co-orientador e ter me ensinado, na prática, o que é ser uma pesquisadora. Também para a Carolina Jacometo, por ter compartilhado comigo toda esta experiência que foi o mestrado.

Agradeço também ao professor Del Pino, pela disponibilização do laboratório e principalmente pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Milton Amado e a todo o pessoal do Biotério, pela hospitalidade e ajuda na nossa pesquisa. Especialmente também para a Dr^a. Leonor Soares e Dr^a. Elizabete Helbig pela ajuda fundamental no começo da minha trajetória.

Ao Jorge Schafhäuser da EMBRAPA ao Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira, ao Marco Ziemann e ao José Coan Campos Júnior, da Química Orgânica, pela ajuda prestada durante as análises das dietas e do fígado.

Agradeço também a CAPES pela bolsa de mestrado e pelo financiamento da pesquisa.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Sir. Charlie Spencer Chaplin

RESUMO

HALFEN, Simone. **Relação da proporção ômega 6/3 na dieta da gestante com a variação transgeracional do perfil metabólico e incorporação de ácidos graxos no tecido hepático.** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os ácidos graxos essenciais alfa-linolênico (α -LNA 18:3n-3) e linoléico (LA 18:2n-6) são precursores de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa (AGPI-CML) das famílias ômega-3 e ômega-6. Estes ácidos graxos quando consumidos durante a gestação são importantes para o desenvolvimento do cérebro e retina e na adaptação de tecidos fetais, influenciando as vias metabólicas dos ácidos graxos na prole. Baseado nisso, buscou-se verificar a relação da influência da proporção ômega 6/3 na dieta da gestante com o perfil metabólico e de ácidos graxos do tecido hepático nas gerações subsequentes. Para isso foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*) da cepa Wistar/UFPel, sendo 36 fêmeas e 12 machos para a geração fundador (G0), com o grupo controle (CONT) recebendo uma dieta tendo como fonte lipídica o óleo de soja e o grupo ômega (ÔM) que recebeu a dieta com óleo de linhaça. A partir destes grupos, os animais foram selecionados para a formação de mais duas gerações (F1 e F2). Os animais do CONT seguiram recebendo a dieta controle enquanto o grupo ÔM foi dividido em dois novos grupos, um recebendo dieta controle (ÔM/CONT) e o outro mantendo a dieta ômega (ÔM/ÔM). A incorporação de ácidos graxos (AGs) da família ômega-3 foi superior no fígado das ratas do grupo ÔM, enquanto os AGs da família ômega-6 tiveram uma maior incorporação do tecido hepático do grupo CONT. Uma mudança importante pode ser observada na quantidade do AG oléico no tecido hepático, pois a incorporação maior aconteceu no grupo CONT e a menor no ÔM/CONT, demonstrando que a dieta fornecida para a G0 pode ter influenciado de alguma forma a incorporação das gerações F1 e F2. Esta remodelação enzimática foi suficiente também para mudar o resultado do NEFA, que demonstrou menor mobilização lipídica no mesmo grupo.

Palavras-chave: Alfa-linolênico. Tecido hepático. Metabolismo lipídico. Ratos.

ABSTRACT

HALFEN, Simone. **Relative proportion of omega 6/3 in the diet of pregnant with the variation of the transgenerational metabolic profile and incorporation of fatty acids in liver tissue**. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The essential fatty acids alpha-linolenic acid (α -LNA 18:3 n-3) and linoleic acid (LA 18:2 n-6) fatty acids are precursors of polyunsaturated very long chain (PUFA-VLC) families omega-3 and omega-6. These fatty acids when consumed during pregnancy are important for brain development and adaptation of the retina and fetal tissues, influencing the metabolic pathways of fatty acids in the offspring. Based on this, we seek to verify the relationship of the influence of the ratio of omega 6/3 in the diet of pregnant with the metabolic profile of fatty acids and liver tissue in subsequent generations. For this we used 48 rats (*Rattus norvegicus*) Wistar, 36 females and 18 males for the founder generation (G0) with the control group (CONT) received a diet with fat source as soybean oil and omega group (OM) received the diet with linseed oil. From these groups, the animals were selected for the training of two generations (F1 and F2). The animals receiving the CONT followed the control diet while the OM group was divided into two new groups, one receiving control diet (OM/CONT) and the other keeping the feed omega (OM/OM). The incorporation of fatty acids (FA) of omega-3 was higher in liver of rats in the group OM, while the FA of omega-6 had a greater uptake of the liver tissue of the CONT group. A major change can be observed in the amount of oleic AG in liver tissue, since the merger occurred higher in the group CONT and the lowest in OM/CONT, demonstrating that the diet provided to the G0 may have somehow influenced the incorporation of generations F1 and F2. This remodeling enzyme was also sufficient to change the outcome of NEFA, which demonstrated decreased lower lipid mobilization in the same group.

Keywords: Alpha-linolenic. Liver tissue. Lipid metabolism. Rats

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulação das dietas controle e ômega utilizada no ensaio biológico. Os ingredientes foram adquiridos no comércio local. ...44
Tabela 2	Perfil lipídico das dietas controle e ômega, mostradas em porcentagem em relação a quantidade de ácidos graxos totais.45
Tabela 3	Média (\pm erro padrão) do consumo de dieta das ratas durante todo o período de tratamento.46
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos do fígado de ratos de duas gerações submetidos a diferentes tratamentos.47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental para avaliação da variação transgeracional em ratos com dietas contendo ômega 3 e 6.	48
Figura 2	Principais ácidos graxos das dietas ÔM (com óleo de linhaça) e CONT (com óleo de soja).....	49
Figura 3	Incorporação hepática de ácidos graxos da família ômega-3 em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.	50
Figura 4	Ácidos graxos da família ômega-6 em ratas submetidas a diferentes tratamentos com ômega-3 e ômega-6.....	51
Figura 5	Incorporação hepática do ácido graxo oléico em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.	52
Figura 6	Incorporação hepática do ácido graxo mirístico em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.	53
Figura 7	Ácidos graxos não esterificados em soro de ratos submetidos a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

α -LNA – alfa-linolênico

AA – ácido graxo araquidônico

AG – ácido graxo

AGPI – ácido graxo poli-insaturado

AGPI-CL – ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa

AGPI-CML – ácido graxo poli-insaturado de cadeia muito longa

COX – ciclo-oxigenase

DHA – ácido graxo docosahexaenóico

DPA – ácido graxo docosapentaenóico

EPA – ácido graxo eicosapentaenóico

ETA – ácido graxo eicosatetraenóico

LA – ácido graxo linoléico

LHS – lipase hormônio sensível

NEFA – ácidos graxos não esterificados

NURFS – Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre

PPAR – *peroxisome proliferator activated receptor*

SREBP – *sterol regulatory element binding protein*

STD – ácido graxo estearidônico

TAG – triacilglicerol

THA – tetracosahexaenóico

TPA – tetracosapentaenóico

SUMÁRIO

Agradecimentos	1
Resumo	3
Abstract	4
Lista de Tabelas	5
Lista de Figuras	6
Lista de Abreviaturas	7
Sumário	8
1. Introdução Geral.....	9
2. Projeto	13
3. Objetivos	29
4. Artigo	30
5. Conclusões Gerais	55
6. Referências Bibliográficas	56

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os lipídios são definidos como biomoléculas insolúveis em água e que desempenham uma gama variada de funções: desde um provedor eficiente de energia – fornecendo 2,25 vezes mais energia do que os carboidratos, até transportadores de vitaminas lipossolúveis e precursores de hormônios. Contudo, funções estruturais e metabólicas exigem principalmente uma classe especial de lipídios, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). A maioria dos organismos não consegue sintetizar AGPI, pertencentes as famílias ômega-3 e 6, que são então definidos como essenciais e devem ser obtidos através da dieta (Haggarty, 2010).

Os principais e mais importantes representantes das famílias ômega-3 e 6 são respectivamente, o ácido α -linolênico (18:3n-3, α -LNA) e o ácido linoléico (18:2n-6, LA). Estes ácidos graxos são essencialmente provenientes da dieta e são metabolizados principalmente no retículo endoplasmático do fígado (Gabre e Gassull, 1996). Esses dois ácidos graxos essenciais partem de uma via metabólica comum, e são moléculas precursoras de ácidos graxos de cadeia muito longa (AGPI-CML). Essa metabolização é catalisada por um sistema enzimático comum aos dois ácidos graxos, constituído basicamente de elongases e dessaturases (Nakamura e Nara, 2004).

O α -LNA é inicialmente dessaturado pela $\Delta 6$ dessaturase, que introduz uma dupla ligação entre uma insaturação pré-existente e a carboxila do ácido graxo, levando a formação do ácido estearidônico (18:4n-3, STD). Esse ácido sofre a ação de uma elongase, que adiciona dois carbonos à cadeia hidrocarbonada do ácido graxo, e dá origem ao ácido eicosatetraenóico (20:4n-3, ETA). Outra dessaturase, a $\Delta 5$ trabalha neste substrato, introduzindo uma ligação dupla na posição 5 do ácido graxo, dando origem ao ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA). Após mais duas passagens pela elongase, originam-se os ácidos graxos docosapentaenóico (22:5n-3, DPA) e o ácido tetracosapentaenóico (24:5n-3, TPA). Uma última passagem pela $\Delta 6$ dessaturase, origina-se o tetracosahexaenóico (24:6n-3, THA), que é transformado em ácido docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) pela remoção de dois carbonos da cadeia através da β -oxidação. O DHA, metabólito final da cadeia de alongamento e

dessaturação do α -LNA possui ação em tecidos alvo, como o córtex e a retina, participando do desenvolvimento dos tecidos e otimizando a função destes (Blank *et al*, 2002).

O LA é metabolizado utilizando as mesmas enzimas e seguindo o mesmo caminho do α -LNA, sendo que o metabólito final é o DPAn-6. Evidências de vários estudos demonstram que além de utilizarem o mesmo aparato enzimático, conseqüentemente o α -LNA e o LA competem por essas enzimas (Stanley *et al*, 2007).

Nota-se que a $\Delta 6$ dessaturase é uma enzima chave na rota de metabolização, pois é utilizada duas vezes na biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), pelos dois precursores de 18 carbonos e pelo THA. Disso, pode-se supor que dietas com altas taxas de AGPI, especificamente LA podem inibir a conversão de α -LNA a seus derivados de cadeia longa (Gibson *et al*, 2011). Entretanto, o α -LNA parece ter um efeito supressor maior que o LA, sendo necessário dez vezes mais LA do que α -LNA para que se tenha uma concorrência equivalente das enzimas pelos substratos (Holman, 1998).

Sabe-se também que mamíferos não podem converter α -LNA a LA e vice-versa, pela inexistência da enzima $\Delta 3$ dessaturase. Ou seja, α -LNA e LA são dois ácidos graxos fisiológica e metabolicamente diferentes, com funções opostas e justamente por isso uma proporção correta e balanceada entre eles é fundamental para uma vida saudável (Brenna *et al*, 2009).

Com base em estimativas, sabe-se que a dieta humana antes da era industrial possuía uma proporção de n-6/n-3 entre 2:1 a 1:1, com muito menos teor de ácidos graxos trans do que atualmente. Diferentemente, hoje tem-se um padrão de dieta que em alguns países, principalmente os ocidentais, alcança proporções de até 20:1. A ingestão de ácidos graxos da família ômega-3 acaba sendo muito menor por causa da nutrição em geral, que se apresenta rica em ômega-6. As proporções ideais destes dois ácidos graxos essenciais ainda não estão bem estabelecidas, porém estudos demonstram que uma maior incorporação de DHA ocorre quando as proporções são na faixa de 4:1 a 2:1 (Blank *et al*, 2002).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa desempenham funções importantes no organismo e têm sido relacionados com a diminuição de várias doenças, principalmente doenças cardíacas coronarianas, aterosclerose e inflamação (Cheng *et al*, 2001). Estudos têm apontado que a ingestão de pequenas quantidades de linhaça ao dia promove alterações hormonais contribuindo com a redução do risco de câncer e diabetes, dos níveis de colesterol total e LDL séricos, assim como favorece a diminuição da agregação antiplaquetária (Pellizzon *et al*, 2007). Existem dois principais tipos de linhaça, a dourada e a marrom. A linhaça dourada é produzida em locais extremamente frios, como o Canadá e no norte dos Estados Unidos. Já a marrom é produzida em grande quantidade principalmente no sul do Brasil.

Os AGPI também são necessários no período de gestação para o desenvolvimento fetal, pois além de manterem a fluidez, permeabilidade e conformação das membranas, servem como fonte energética e precursores de compostos bioativos importantes, como prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Haggarty, 2010). Neste contexto, o ácido araquidônico (20:4n-6, AA), oriundo da cadeia de dessaturação e alongamento do LA, é o precursor da síntese de prostaglandinas da série 2, que são conhecidas pelos seus efeitos pró-inflamatórios, enquanto que o EPA, oriundo da família do ômega-3, é o precursor da síntese das prostaglandinas da série 3, que possui efeitos anti-inflamatórios (Abayasekara e Wathes, 1999). Sabe-se, portanto, que a suplementação com α -LNA inibe a síntese de prostaglandinas da série 2 pela diminuição da atividade da enzima ciclooxigenase (Mattos *et al*, 2000).

Considerando os efeitos benéficos dos AGPI na saúde, alguns estudos demonstram a influência da nutrição no período gestacional, sendo que nesta etapa o “status” nutricional materno é um dos fatores extrínsecos na programação da divisão e redirecionamento de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento do feto (Godfrey e Barker, 2000).

O estado nutricional de gestantes pode promover diferenças na remodelação e morfologia dos tecidos fetais, determinando mudanças em tipos de células especializadas, associadas a funções fisiológicas (Newnham *et al*, 2002). Estudos com roedores indicam que a desnutrição fetal determina

obesidade em adultos. Ratos sujeitos a restrição protéica intrauterina apresentam maior preferência por alimentos ricos em gordura. O consumo de alimentos de energia densa para os ratos que foram desnutridos no período intrauterino promove um maior grau de obesidade do que é observado em animais sujeitos a nutrição adequada na vida fetal (Langley-Evans et al, 2005). Há evidências que sugerem que a programação de apetite pode decorrer de remodelação das estruturas do hipotálamo, em que a alimentação de controle e programação da expressão de genes envolvidos em respostas aos hormônios orexígenos (Langley-Evans et al, 2005).

Estudos mostram que a obesidade materna durante a gravidez é capaz de promover a obesidade na infância (Shankar *et al*, 2008). Uma dieta materna com alta energia durante a gravidez e lactação muda o metabolismo lipídico na criança, aumentando o risco de obesidade e podendo acarretar a hipertensão e resistência a insulina (Howie *et al*, 2009). Uma dieta de alta energia (20% acima da dieta normal) durante três gerações de camundongos é capaz de promover acúmulo de lipídeos no tecido adiposo de fêmeas, aumentar o nível de triacilglicerol sérico (TAG), alterando o metabolismo de lipídeos além de alterar os níveis de glicose e insulina (Takasaki *et al*, 2011).

Levando em consideração a importância desses ácidos graxos e com base na proporção do ômega 6/3 na dieta, o objetivo deste estudo foi elucidar a influência desta proporção no metabolismo lipídico dos ácidos graxos de uma forma direta assim como ao longo de três gerações.

2. PROJETO

Ômega-3 na dieta da gestante: Efeitos epigenéticos no metabolismo energético de duas gerações

Equipe:

Marcio Nunes Corrêa – Coordenador

Juan J. Loor – Pesquisador Colaborador

Ivan Bianchi - Pesquisador Colaborador

Francisco Augusto Burkert Del Pino – Pesquisador Colaborador

Odir Delagostin – Pesquisador Colaborador

Eduardo Schmitt – Candidato a Pós-Doutorado

Elizabeth Schwegler – Doutoranda em Veterinária

Augusto Schneider – Doutorando em Biotecnologia Agrícola

Viviane Rabassa - Doutoranda em Medicina Veterinária

Rubens Alves Pereira – Doutorando em Medicina Veterinária

Carolina Bespalhok Jacometo – Mestranda em Zootecnia

Simone Halfen – Mestranda em Medicina Veterinária

Pelotas, Julho de 2009

1. Caracterização do Problema

O estado nutricional de gestantes pode promover diferenças na remodelação e morfologia dos tecidos fetais, determinando mudanças em tipos de células especializadas, associadas a funções fisiológicas (Newnham et al., 2002). Recentemente, isto tem sido reconhecido como um importante mediador sobre a susceptibilidade de algumas doenças na prole (Langley-Evans, 2006), associadas a diferenças entre programação pré-natal e a realidade pós-natal (Newnham, et al. 2002). A subnutrição, ou excesso de nutrientes durante a vida fetal, pode induzir a diferenças no metabolismo de carboidratos e lipídios em animais e humanos (Guillemainm, et al., 2007). Um exemplo são pessoas que possuem redução na tolerância à glicose na idade adulta, por terem sido expostos à fome na metade ou final da vida fetal, ou o aumento do perfil lipídico aterogênico, quando esta exposição ocorreu no início da gestação (Newnham, et al., 2002). Estes achados evidenciam um aumento do risco de doenças metabólicas em indivíduos adultos, de acordo com o ambiente que ele foi exposto durante sua vida fetal (Schwitzgebel & KLEEN, 2009). Com uma proposta semelhante Husted et al. (2008) demonstraram que progênies de ovelhas expostas a baixos níveis energéticos ao final da gestação, tiveram alterações no desenvolvimento da célula pancreática e reduzida plasticidade na “down-regulation” e secreção de insulina em resposta a um desafio metabólico na fase adulta. Tais conseqüências em vacas leiteiras, poderiam explicar uma maior, ou menor capacidade adaptativa durante o final de gestação e início de lactação, onde é maior risco de doenças em conseqüência ao grande desafio metabólico. Fatores como níveis de produção da mãe, poderiam influenciar o suprimento protéico e energético durante a vida fetal e isto poderia determinar modificações na programação celular de tecidos responsáveis pelo equilíbrio homeorético e homeostático durante a fase adulta. Uma melhor compreensão sobre estes mecanismos têm avançado com o uso do microarranjo de DNA (Yates, et al., 2009), sugerindo novas formas de avaliação das relações entre programação epigenética e vias metabólicas ao longo da vida. Em ratos, por exemplo, a restrição protéica intra-uterina modificou a expressão de 102 genes no hipotálamo e 36 genes no rim das proles (Langley-Evans, et al., 2005) evidenciando que a manipulação da dieta das gestantes, poderia ser utilizada como terapia preventiva para diminuir síndromes metabólicas nas gerações futuras. Nutrientes consumidos durante a gestação como o ácido graxo essencial ômega-3, têm demonstrado ser uma alternativa potencial para melhorar a saúde das progênies em animais e humanos (Yavin, et al., 2009). Em uma revisão Santos et al. (2008), destacam que esses ácidos graxos têm demonstrado benefícios para a saúde e melhoria do desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. No entanto, estes efeitos na vida fetal não são bem compreendidos, devido a dificuldades no entendimento de interações entre gene - ambiente e gene - dieta (Berquin, 2008). Uma alternativa tem sido a utilização de ratos e camundongos, como modelos in vivo, os quais permitem melhor acompanhamento e controle de diferentes fases da vida pré e pós-natal, facilitando testar hipóteses de causalidade em epidemiologia humana ou mesmo em ruminantes (Meyer, et al., 2009; Schwitzgebe, et al. , 2009). No entanto, deve-se ater a diferenças quanto ao metabolismo energético de monogástricos e ruminantes, o que por vezes determina testar a repetibilidade na espécie de interesse. Com base nessas evidências, nossa hipótese é que uma dieta rica em ácido graxo ômega-3 fornecida em sucessivas gerações durante a gestação pode alterar níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e de carboidratos em

progênies de roedores e ruminantes, determinado uma melhor resposta a desafios metabólicos.

Objetivos

Objetivo Geral

Elucidar o efeito epigenético do ácido graxo Ômega-3 nas vias metabólicas do metabolismo energético em sucessivas gerações.

Objetivos específicos

- 1. Investigar a existência de efeitos aditivos do ácido graxo ômega-3 no metabolismo energético de ruminantes em sucessivas gerações durante a vida fetal.*
- 2. Investigar a existência de efeitos aditivos do ácido graxo ômega-3 no metabolismo energético de roedores em sucessivas gerações, como modelo para humanos.*
- 3. Comparar respostas das vias metabólicas em ruminantes e roedores submetidos à dieta com ômega-3 durante a vida fetal e em sucessivas gerações.*

3. Metodologia e Estratégia de ação

Animais:

Primeira geração:

Serão utilizados 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos com 60 dias de vida, sendo 12 machos e 36 fêmeas, sem doença prévia. No momento da admissão os animais serão distribuídos em dois grupos de peso uniforme e passarão a receber suas correspondentes dietas,

iniciando o controle de consumo diário. Será feito um período de adaptação de 30 dias com subgrupos de quatro animais do mesmo sexo por gaiola, recebendo a correspondente ração e água *ad libitum*. Ao final do período de adaptação as fêmeas serão agrupadas com machos na proporção 3:1, por um período de cinco dias. No sexto dia as fêmeas serão separadas e acompanhadas quanto ao peso semanal permanecendo em gaiolas individuais. Após o nascimento todas as gestantes e ninhadas serão pesadas. Ao final do período de amamentação serão escolhidas aleatoriamente 18 progênes fêmeas da primeira geração que serão mantidas com a mesma dieta administrada as suas mães, repetindo esta metodologia por mais duas gerações (Tabela 1).

É importante destacar que hoje a Universidade Federal de Pelotas conta com um moderno Biotério (<http://www.ufpel.tche.br/bioterio/>), recentemente reestruturado com recursos da FINEP, oferecendo todas as condições necessárias para execução do trabalho.

Dieta:

Será fornecida uma ração pelletizada, sendo esta isoproteica e isoenergética entre os grupos, diferindo-se apenas quanto à adição de ômega-3 para o grupo tratamento. A quantidade fornecida será em torno de 15 g/dia por animal e a composição será baseada em: farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix, vitamínico-mineral e de aminoácidos: umidade (max) 12,50%; proteína bruta (min) 22,00%; extrato etéreo (min) 4,00%; material mineral (max) 10,00%; matéria fibrosa (max) 8,00%; cálcio (max) 1,40%; fósforo (min) 0,80%; vitaminas: vitamina A 12.000 UI; vitamina D3 1.880 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mg; niacina 60 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg; biotina 0,05mg; colina 600,00 mg; microelementos minerais: ferro 50,00mg; zinco 60mg; cobre 10,00mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg; aminoácidos: DL-metionina 300,00mg; lisina 100,00mg; aditivos: antioxidante: 100,00mg. O grupo tratamento será suplementado com ômega-3 na proporção 0,1% do peso vivo e grupo controle será suplementado com mesma proporção de outro ácido graxo.

Procedimento de coletas de sangue e eutanásia

Amostras de fígado e tecido adiposo:

No 5º dia de lactação cinco fêmeas gestantes de cada grupo serão sacrificadas. As fêmeas serão sacrificadas sob efeito do éter etílico sendo decapitadas para coleta de sangue. Neste momento além do sangue serão coletados fígado e tecido adiposo, sendo estes mantidos a -196°C congelados em nitrogênio líquido.

Perfil Metabólico

Após decapitação todo sangue será dividido e colocado em dois tubos, um contendo anticoagulante (EDTA 10%) na proporção de 12 µl/ml de sangue e outro com EDTA 10% e antiglicolítico (KF 12%). Imediatamente após a coleta de sangue, estes serão submetidos à centrifugação para obtenção de amostras de plasma, plasma com antiglicolítico e soro, as quais serão divididas em dois *eppendorff*® previamente identificados, sendo um mantido a 4°C (perfil metabólico) e outro a -70 °C (perfil endócrino).

Serão avaliados os níveis de magnésio, fósforo, cloro, triglicerídeos, colesterol total, HDL NEFA, Glicose, β-hidroxibutirato, AST e GGT, de forma que para todas estas

análises será utilizado o método colorimétrico com Kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) conforme a metodologia indicada pelo fabricante. Para leitura destes testes será utilizado espectrofotômetro de luz visível (FEMTO 435®).

A mensuração do perfil endócrino Insulina, Glucagon, IGF-I, e GH será feita através de Radioimunoensaio (WILSON et al., 1983; PURUP et al., 1993).

Tabela 1. Número de animais utilizados para cada dieta por geração e número de fêmeas sacrificadas para coleta de tecido.

Dieta	Machos	Fêmeas	Prenhez 85%	Fêmeas Sacrificadas	Nascidos	Fêmeas
Dieta 1	6	18	15	5	82	41
Dieta 2	6	18	15	5	82	41
Primeira Geração						
Dieta 1	6	18	15	5	82	41
Dieta 2	6	18	15	5	82	41
Segunda Geração						
Dieta 1	6	18	15	5	82	41
Dieta 2	6	18	15	5	82	41

Resultados e Impactos esperados

Indicadores de Progresso ao final de cada ano de projeto:

Ano 1

Experimento 1 em execução, apresentação de resultados preliminares em congressos nacionais e/ou internacionais com o perfil metabólico da primeira geração

Ano 2

Final da etapa de campo com perfil metabólico das três gerações com resultados analisados e publicados em congressos e artigo de perfil metabólico submetido à revista nacional.

Ano 3

Execução do Microarranjo do experimento 1 e submissão do artigo 2 com dados do perfil metabólico e microarranjo para revista internacional.

Indicadores de resultados ao final do projeto:

Uma dissertação de Mestrado

Quatro artigos Publicados: dois em revista nacional e dois em internacional

Envolvimento de quatro bolsistas de iniciação científica

Repercussão e/ou impactos dos resultados:

Na Instituição

Buscar sinergia de experimentos e departamentos de pós-graduação, conjugando diferentes áreas dentro da instituição, otimizando custos com material experimental e estrutura. Este estudo poderá ser utilizado para elucidação de respostas as dietas no sistema imune e em patologias como câncer. Desta forma poderíamos congregamos alunos e professores das áreas de Nutrição, Clínica, Imunologia, Reprodução e Epidemiologia em humanos e animais, desta e de outras instituições.

No meio científico

Contribuir para o entendimento da influência da dieta da gestante como fator epigenético ligado ao balanço energético na vida adulta e as interações destes com transtornos metabólicos em diferentes espécies.

No desenvolvimento sócio-econômico

Este projeto vai de encontro com dois setores de interesse:

No sistemas de Saúde Pública

O primeiro experimento poderá destacar sugestões na prevenção de doenças de grande impacto em saúde pública através de intervenções na dieta da gestante. Estes achados poderão sugerir medidas estratégicas de baixo custo que garantam gerações mais saudáveis a longo prazo.

No Sistema produtivo

Utilizando ovino como modelo experimental, achados desta pesquisa poderão alavancar novas estratégias de manejo alimentar para ruminantes, garantindo um incremento da eficiência econômica ao melhorar a saúde do rebanho de gerações futuras. A manipulação da dieta da gestante, poderá garantir melhor equilíbrio homeostático e homeorrético no metabolismo energético em períodos de grande desafio metabólico, como o final da gestação e início de lactação de vacas leiteiras.

5. Cronograma, Riscos e Dificuldades (máximo de 2 páginas)

Cronograma

Descrição	2010		2011		2012		2013		2014	
	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4	Semestre 5	Semestre 6	Semestre 7	Semestre 8	Semestre 9	Semestre 10
Aquisição de material, ratos e treinamento	X									
Início da administração da dieta		X								
Perfil metabólico		X	X	X						
Coletas Amostras de tecido extração de RNA		X	X	X						
Confecção do cDNA			X	X	X					
Microarranjo (EUA)					X					
Fim do experimento e análise dos resultados										
Artigo 1				X						
Artigo 2						X				

Riscos

- Aspectos ligados a metodologia de execução da técnica de microarranjo, como integridade de amostras de RNA.

Dificuldades

- Controle da ingestão de matéria seca em ovinos.

6. Referências Bibliográficas

ABAYASEKARA D.R .E. & WATHES D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. v.61, p.275-287, 1999.

BERQUIN, I. M., et al. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. Cancer Letters v.269. p. 363–377, 2008.

BRAGA M.M., et al. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. Revta Centro Ciênc. Rurais, Santa Maria, v.15, p.79-88, 1985.

GREEN, M. P., et al., Nutritional skewing of conceptus sex in sheep: effects of a maternal diet enriched in rumen-protected polyunsaturated fatty acids (PUFA). Reproductive Biology and Endocrinology, v.6 (21), 2008. doi:10.1186/1477-7827-6-21.

HUSTED, S. M., et al., [Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life](#) Domestic Animal Endocrinology. v. 34, (4), p.419-431, 2008.

LANGLEY-EVANS S. C., et al. Animal models of programming: Early life influences on appetite and feeding behaviour. *Maternal and Child Nutrition*. v. 1 (3), p. 142 – 148, 2005.

LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc.*; v.65 n.1, p.97–105, February, 2006.

LOOR, J. J., et al. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics* v.32, p.105–116, 2007. doi:10.1152/physiolgenomics.00188.2007

LOOR J.J., et al. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol Genomics* v. 23, p. 217–226, 2005.

LOOR J.J., et al. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics* v. 27, p.29–41, 2006.

MEYER, U., et al., In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.001

MURPHY, M., et al. Rumen and total diet digestibilities in lactating cows fed diets containing full fat rapeseed. *J Dairy Sci.*, 70:1572-1582, 1987.

NEWNHAM, J. P., et al. Nutrition and the early origins of adult disease. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 11(Suppl): S537–S542 S537, 2002.

PURUP, S., et al. Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. *J. Endocrinol.*, v. 139, p.19-26, 1993.

SANTOS, J.E.P., et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reprod Dom Anim.* v.43 (2), p. 23–30, 2008. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01139.x

SCHWITZGEBEL, V.M., et al. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (2009) 78–83. doi:10.1016/j.mce.2009.02.019

YATES ZOE; TARLING ELIZABETH J; LANGLEY-EVANS SIMON C; SALTER ANDREW M
Maternal undernutrition programmes atherosclerosis in the ApoE*3-Leiden mouse. *The British journal of nutrition* 2009;101(8):1185-94.

YAVIN E, et al., Delayed cell migration in the developing rat brain following maternal Omega 3 alpha linolenic acid dietary deficiency, *Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.012

7 . Recursos Solicitados

RAÇÃO

Animais Adultos	Dias	Animais x dias
48	120	5760
48	120	5760
48	120	5760
		17280
Crescimento	Dias	Animais x dias
40	90	3600
40	90	3600
		7200
TOTAL		24480
Consumo diário(Kg)		0,015
TOTAL ração (Kg)		367
Sacos (60Kg)		18
Custo Saco		68
TOTAL R\$		R\$ 1.248,48

PERFIL METABÓLICO

MATERIAL DE CONSUMO

Descrição	Qt.	Amostras	Vol total	Subtotal
Ponteira amarela	1000	340	R\$ 39	R\$ 399,33
Ponteira Azul	1000		R\$ 16	R\$ 164,73
Ependorff	1000		R\$ 20	R\$ 27,40
Agulhas Vacutainer	100		R\$ 1	R\$ 5,10
Adaptador Vacutainer	1		R\$ 1	R\$ 2,38
Tubos de 10 ml p/ Vacutainer	100		R\$ 47	R\$ 318,92
Tubos de 10 ml Vacutainer (com KF e EDTA)	100		R\$ 43	R\$ 290,36
Luvas de procedimento	100		R\$ 18	R\$ 124,44
Álcool 96°C	1		R\$ 3	R\$ 35,36
Seringa descartável de 10ml	1		R\$ 0	R\$ 95,20
Algodão (pacote)	1		R\$ 6	R\$ 130,56
Papel Toalha (pacote)	1		R\$ 8	R\$ 157,08
TOTAL				
Total/amostra				R\$ 5,15

PERFIL METABÓLICO

Descrição	Qt Kits	R\$/Kit	Custo da Análise	Custo por Amostra
CÁLCIO	4	R\$ 89,49	R\$ 357,96	R\$ 0,53
URÉIA	7	R\$ 52,60	R\$ 368,20	R\$ 0,54
MAGNÉSIO	3	R\$ 52,40	R\$ 157,20	R\$ 0,23
FÓSFORO	1	R\$ 38,90	R\$ 38,90	R\$ 0,06
GGT	6	R\$ 91,20	R\$ 547,20	R\$ 0,80
AST	1	R\$ 47,40	R\$ 47,40	R\$ 0,07
COLESTEROL	2	R\$ 55,70	R\$ 111,40	R\$ 0,16
GLICOSE	1	R\$ 61,20	R\$ 61,20	R\$ 0,09
TAG	3	R\$ 530,00	R\$ 1.590,00	R\$ 2,34
B-H-BUTIRATO	4	R\$ 530,00	R\$ 2.120,00	R\$ 3,12
NEFA	10	R\$ 1.440,00	R\$ 14.400,00	R\$ 21,18
INSULINA	4	R\$ 1.776,64	R\$ 7.106,56	R\$ 20,90
GLUCAGON	7	R\$ 1.200,00	R\$ 8.400,00	R\$ 24,71
GH	7	R\$ 1.800,00	R\$ 12.600,00	R\$ 37,06
Total				R\$ 111,78

CUSTO TOTAL

Custos Totais do Projeto R\$				
Descrição	Preço Und	n	Subtotal todo período	Gasto Anual
Experimento Ratos				
Animais	15	48	720	144
Ração	68	18	1248	249,696
Perfil Metabolico (amostras em duplicata)	116,93	60	7015,968353	1403,193671
Microarranjo	1500	60	90000	18000
Despesas com Bolsista				
Passagens aéreas to University of Illinois	2000	4	8000	1600
Bolsa	3300	60	198000	39600
TOTAL			R\$ 424.347,93	R\$ 84.869,59
Subtração taxa de bancada	1000	60	R\$ 364.347,93	R\$ 72.869,59

**Os valores referentes as análises de microarranjo foram orçados na University of Illinois at Urbana-Champaign junto ao W. M. Keck Center for Comparative and Functional Genomics, por intermédio do Diretor do Functional Genomics Unit, Professor Mark Band. Estes valores incluem todo processamento e quantificação das análises de biologia molecular citadas neste projeto.*

3. OBJETIVOS

Tendo em vista as modificações que a nutrição materna pode proporcionar na vida adulta da prole, principalmente na reprogramação de vias importantes no metabolismo, nosso estudo tem como objetivo:

1. Verificar a influência da proporção ômega 6/3 na dieta da gestante e suas possíveis modulações do metabolismo lipídico de ácidos graxos na prole;
2. Visualizar se as possíveis modificações metabólicas podem se estender através de três gerações de ratos.

4. ARTIGO: Relação da proporção ômega 6/3 na dieta da gestante com a variação transgeracional do perfil metabólico e incorporação de ácidos graxos no tecido hepático

Será submetido para a Revista Molecular and Cell Biology of Lipids

(Formatado segundo as normas da revista)

(será traduzido para o inglês)

Simone Halfen¹; Patrícia Mattei²; Samanta Regine Fensterseifer³; Carolina Bespalhok Jacometo⁴; Luiz Francisco Machado Pfeifer⁵; Francisco Augusto Burkert Del Pino⁶ Eduardo Schmitt⁷; Marcio Nunes Corrêa⁸

ABSTRACT

HALFEN, Simone. **Relative proportion of omega 6/3 in the diet of pregnant with the variation of the transgenerational metabolic profile page and incorporation of fatty acids in liver tissue.** 2012. 42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The essential fatty acids alpha-linolenic acid (α -LNA 18:3 n-3) and linoleic acid (LA 18:2 n-6) when consumed during pregnancy influence in the modulation of fetal tissues and in fatty acid metabolic pathways. Based on that this study sought to evaluate the metabolism of these fatty acids, as well as possible metabolic reprogramming over three generations. We utilize 48 rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain, 36 females and 18 males for the founder generation (G0) with the control group (CONT) received a diet with fat source as soybean oil and omega group (OM) who received the diet with linseed oil. From these groups, the animals were selected for the training of two generations (F1 and F2). The animals receiving the CONT followed the control diet while the OM group was divided into two new groups, one receiving control diet (OM/CONT) and the other keeping the feed omega (OM/OM). The results indicated a probable remodeling enzymes in lipid metabolism, since the group OM/CONT showed some intriguing results. Oleic acid, for example, had a lower incorporation in the liver tissue of the group OM/CONT, and NEFA levels were lower in this group, contrary to what the literature says. This change probably has to do with the diet with high levels of α -LNA provided in this group G0 generation. More research is needed in this area so that we can explain the ways in which these changes occurred.

1 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: monehalfen@gmail.com

2 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: patymtp@hotmail.com

3 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: samanta.rfens@gmail.com

4 Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: cbjacometo@gmail.com

5 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Rondônia-RO, Brasil. e-mail: lfmpfeifer@terra.com.br

6 Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: fabdelpino@gmail.com

7 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: schmitt.edu@gmail.com

8 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, Brasil. e-mail: marcio.nunescorrea@gmail.com

Keywords: alpha-linolenic, liver tissue, lipid metabolism, rats

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos essenciais alfa-linolênico (α -LNA 18:3n-3) e linoléico (LA 18:2n-6) são os precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa (AGPI-CML) eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), da família ômega-3 (n-3) e araquidônico (AA) e docosapentaenóico (DPA) da família ômega-6 (n-6). Essa metabolização é catalisada por um sistema enzimático comum aos dois ácidos graxos, constituído basicamente de elongases e dessaturases [1]. O ácido graxo (AG) AA, da família ômega-6 é importante por ser precursor de hormônios pró inflamatórios, como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, pela via da ciclooxigenase 2 (COX-2) [2]. O EPA, assim como outros AGs da família ômega-3 são considerados anti-inflamatórios por estarem inseridos nas membranas celulares no lugar do ácido araquidônico e produzirem eicosanóides anti-inflamatórios [2] pois se sabe que a suplementação com α -LNA inibe a síntese de prostaglandinas da série 2 pela diminuição da atividade da COX-2 [3]. Para que os efeitos benéficos destes AGPI sejam eficientes, é necessário que exista um equilíbrio no consumo nos AGs LA e α -LNA. As proporções ideais desses dois ácidos graxos essenciais ainda não são bem estabelecidas, porém estudos demonstram que uma maior incorporação de DHA ocorre quando as proporções são na faixa de 4:1 a 2:1 [4].

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa desempenham funções importantes no organismo e têm sido relacionados com a diminuição de várias doenças, principalmente doenças cardíacas coronarianas, aterosclerose e inflamação [5]. Considerando os efeitos benéficos dos AGPI na saúde, alguns estudos demonstram a influência da nutrição no período gestacional, sendo que nesta etapa o "status" nutricional materno é um dos fatores extrínsecos na programação da divisão e redirecionamento de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento do feto [6].

Com base nestas informações, o objetivo do estudo é verificar a incorporação hepática destes ácidos graxos através de dietas com proporções de ômega 6/3 de 13,6/1 e 0,4/1 e verificar se estes AGPI são capazes de influenciar o perfil metabólico de ácidos graxos no fígado de ratas através de três gerações.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

O ensaio foi realizado no setor de experimentação animal do Biotério Central da UFPel, em Pelotas-RS – Campus Capão do Leão, durante o período de 13/10/2010 a 15/07/2011. O procedimento proposto para este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel sob número 4382.

Para a primeira geração foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da cepa Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas – UFPel-RS, sendo 36 fêmeas e 12 machos adultos com 60 dias de idade, sem doença prévia. Na admissão do experimento, as fêmeas pesavam 233g ($\pm 2,94$ g) e os machos 343g ($\pm 7,26$ g). Após a pesagem, os animais foram distribuídos em gaiolas individuais e mantidos em estantes fechadas com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. As ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos com 18 animais cada (Figura 1), com homogeneidade de peso, com um grupo recebendo a dieta controle e o segundo grupo recebendo a dieta ômega, conforme descrito no tópico Composição das Dietas. Os machos receberam sempre a dieta controle, com fornecimento de água e ração *ad libitum* para os grupos durante todo o período experimental, com controle diário de consumo.

Antes do acasalamento os animais foram submetidos a 30 dias de adaptação, onde receberam a dieta correspondente ao grupo ao qual foram designados. Após o período de adaptação, as fêmeas foram acasaladas com machos na proporção de 3:1 por 5 dias. Após o acasalamento, as fêmeas retornavam para gaiolas individuais e os machos eram encaminhados ao NURFS/UFPel (Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre). Durante todo o período experimental os animais foram acompanhados quanto ao peso semanal.

Para a formação das gerações seguintes, após o desmame da ninhada (21 dias pós parto), foram escolhidas 16 fêmeas para cada grupo e 16 machos para o acasalamento, sempre tomando o cuidado de não haver cruzamento entre parentes. Na F1 os grupos foram divididos em Ômega-Ômega (OM/OM), Ômega-Controle (OM/CONT) e Controle-Controle (CONT/CONT), sendo o grupo ômega

dividido em dois. Na F2 foram formados três grupos com a mesma dieta das suas mães, sendo Ômega-Ômega-Ômega (OM/OM/OM), Ômega-Controle-Controle (OM/CONT/CONT) e Controle-Controle-Controle (CONT/CONT/CONT), conforme demonstrado na Fig. 1.

Composição das dietas

A dieta foi formulada de acordo o *American Institute of Nutrition* [7], com modificação na fonte lipídica para a formação dos grupos controle e ômega. O grupo controle possuía como fonte lipídica o óleo de soja e o grupo ômega óleo de linhaça, em proporção calculada de acordo com o valor total de calorias da dieta, sendo ambas isoenergéticas e isoprotéicas (Tabela 1).

As dietas foram preparadas manualmente, na quantidade necessária para utilização em até 5 dias e armazenadas sob refrigeração a 5°C. Os ingredientes foram misturados em recipiente plástico, começando sempre pelos elementos secos e posteriormente adicionando-se o óleo correspondente e o gel, feito com água destilada e amido de milho a 8%, até a total homogeneização da mesma. Em seguida, a dieta era peletizada e permanecia em estufa a 55°C por 24 horas para a secagem.

Eutanásia, coleta de sangue e de tecido

Foram eutanasiadas 6 ratas adultas de cada grupo aos 21 dias de lactação. Os animais eram atordoados em câmara fechada contendo algodão embebido com éter etílico e anestesiados com 1mL de xilazina + cetamina (60 a 80 mg de cetamina + 8 a 15mg de xilazina, ambas /kg) e em seguida submetidos a coleta de sangue por punção intracardíaca. O sangue coletado de cada animal foi colocado em tubos de ensaios e centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos para a obtenção de soro. Após a punção intracardíaca, a eutanásia era feita através de aprofundamento do plano anestésico e em seguida feita a coleta do fígado. O órgão coletado era colocado em tubos criogênicos e congelado em nitrogênio líquido (-80°C) até a realização das análises.

Análise Bioquímica

A análise do soro sanguíneo para a determinação dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) foi feita através de técnica adaptada [8].

Perfil Lipídico do tecido hepático

A extração de lipídios do fígado foi feita pelo método Bligh Dyer [9] e esterificado segundo a metodologia de Hartman e Lago [10]. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo Shimadzu GC-2010, com auto injetor AOC-20i (Shimadzu) e coluna SPTM 2560 capylary column (Supelco) com dimensões 100m X 0,25mm I.D. X 0,2µm. O padrão utilizado foi o Frame Mix100m C4-C24 da Supelco, com injeção de 1µL e split 100:1, para a detecção de até 36 ácidos graxos (São Paulo-SP).

Perfil Lipídico dos óleos e dietas

Os óleos utilizados para a formulação das dietas foram analisados separadamente quanto a quantidade dos ácidos graxos. O óleo de soja, utilizado na dieta do grupo CONT possuía 50,18% do ácido graxo linoléico e 5,76% de α -linolênico, enquanto o óleo de linhaça utilizado na formulação da dieta do grupo OM possuía 13,48% de LA e 50,77% de α -LNA. A quantidade total de ácidos graxos saturados foi de 17,86% e 14,87% e de poli-insaturados foi de 49,52% e 31,11% nos óleos de soja e linhaça, respectivamente.

As análises do perfil de ácidos graxos das dietas foram feitas durante todo o período experimental, sendo cada amostra formada por um *pool* de três partidas diferentes (Fig. 2).

Análise estatística

As análises foram realizadas através do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando a média \pm erro padrão utilizando análise de variância (ANOVA) Mixed Models, considerando o nível de significância de 5%. As variáveis resposta analisadas foram: NEFA, ácidos graxos linoléico, araquidônico, α -linolênico, eicosapentaenóico, docosahexaenóico, oléico e mirístico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto o consumo de ração (Tab. 3) quanto o peso dos animais (dados não mostrados) não mostrou diferença significativa entre grupos e/ou entre gerações durante todo o período experimental.

Neste estudo, observou-se o perfil dos ácidos graxos no tecido hepático de ratas com duas diferentes dietas através de três gerações. As análises do perfil de ácidos graxos hepático foi feito nas ratas das gerações F1 e F2, durante o período pós-parto.

A quantidade do ácido graxo alfa-linolênico (α -LNA) acumulado no fígado das ratas do grupo OM (com média das duas gerações) foi 10 a 15 vezes superior em comparação aos outros dois grupos, sendo 2,6%, 0,24% e 0,17% da quantidade total de lipídios nos grupos OM, OM/CONT e CONT, respectivamente. O resultado era esperado, uma vez que a dieta do grupo OM possuía uma quantidade doze vezes maior deste AG em relação a dieta do grupo CONT (43,26% e 3,39% respectivamente).

Um resultado semelhante foi obtido com os níveis de ácido graxo linoléico (LA), sendo incorporado em quantidades superiores no fígado de ratas do grupo CONT (9,21%) em comparação ao grupo OM (8,28%). Assim como o α -LNA da dieta OM, o LA estava presente em maiores quantidades na dieta do grupo CONT, constituindo 45,99% dos lipídeos totais da dieta CONT e 17,75% da dieta OM.

Os ácidos graxos derivados de LA e α -LNA apresentaram diferença de incorporação no tecido hepático dos dois grupos ($P < 0,05$) através da média geral das duas gerações, sendo este resultado não significante entre gerações ($P = 0,387$). O ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), derivado do α -LNA, apresentou concentrações mais elevadas no grupo OM (6,92%) em relação aos outros dois grupos (ÔM/CONT 0,27 e CONT 0,30%), assim como o ácido graxo docosahexaenóico (DHA), que apresentou incorporação de 5,99%, 4,88 e 3,99% nos grupos ÔM, ÔM/CONT e CONT, respectivamente (Figura 3). Nota-se que a quantidade de EPA é muito maior no grupo ÔM do que nos grupos ÔM/CONT e CONT, provavelmente porque a quantidade de α -LNA seja muito maior na dieta

ÔM, proporcionando uma diferença na abundância de substratos nas duas dietas, uma vez que ambos utilizam a mesma maquinaria enzimática, as enzimas *elongase*, Δ -5 e Δ -6-dessaturase para fazer esta conversão. Apesar de ter muito menos α -LNA nos grupos CONT, a quantidade de DHA, embora menor, se manteve num nível elevado quando comparado com a quantidade de substrato, mostrando que o fígado possui um controle na regulação deste AG. Com as concentrações do EPA e DHA aumentadas no grupo que recebeu uma maior quantidade de α -LNA, sugere-se que esses ácidos graxos foram sintetizados por seus precursores no fígado destes animais de forma eficiente, chegando até o final da via de alongamento e dessaturação da família ômega-3.

Um experimento em ratos, com uma alimentação de 15 semanas com 0,2 e 4,6% de α -LNA na dieta, resultou em uma conversão do DHA semelhante em ambos os grupos [11], mostrando mais uma vez que, existindo uma quantidade mínima de α -LNA, o fígado é capaz de direcionar este AG para a produção de DHA. Em uma dieta livre de DHA, porém com α -LNA em baixas quantidades (0,2% do total de AGs), o fígado consegue aumentar o coeficiente de síntese devido a um *upregulation* das enzimas de conversão do fígado [12]. Com uma dieta em quantidades suficientes de α -LNA, o fígado é capaz de manter a homeostase dos AGPIs, garantido as quantidades mínimas de DHA para o organismo [13].

O ácido graxo linoléico, mostrou uma maior incorporação ($P=0,0141$) no tecido hepático do grupo ÔM/CONT (8,28% no ÔM, 10,85% no ÔM/CONT e 9,21% no grupo CONT), porém apresentou as mesmas concentrações do ácido graxo araquidônico (AA) nos grupos ÔM/CONT (14,88%) e CONT (13,79%) em comparação ao grupo OM (4,76%), sendo essa incorporação até três vezes menor conforme demonstrado na figura 4. Os grupos que receberam a dieta CONT tiveram uma produção endógena de ácido araquidônico maior do que a quantidade de LA incorporado no tecido hepático. O grupo ÔM, ao contrário, teve uma produção de AA inferior a quantidade do LA incorporado (pois sabe-se que o α -LNA age no organismo como anti-inflamatório), pois os ácidos graxos de cadeia longa (AGPI-CL) da família ômega-3 agem substituindo o AA, precursor dos eicosenóides, nas membranas dos tecidos corporais [2]. Esta menor produção de

AA também pode estar relacionada com a quantidade de α -LNA presente na dieta ÔM, pois sabe-se que os dois substratos (LA e α -LNA) utilizam as mesmas enzimas para a produção dos seus produtos. O α -LNA parece ter um efeito supressor muito maior do que o LA, sendo necessário 10 vezes mais LA do que α -LNA para que tenham um efeito metabólico igual [14].

A incorporação do LA foi de alguma forma aumentada no grupo ÔM/CONT, possivelmente por ter algum tipo de remodelação da via enzimática, uma vez que a G0 recebeu dieta ÔM e a F1 foi exposta diretamente a esta alimentação, no período intrauterino e durante toda a lactação. Apesar desta diferença, a incorporação não foi diferentemente significativa entre as gerações F1 e F2 do grupo ÔM/CONT. É sabido que a alimentação durante a vida e principalmente durante a gestação pode promover reprogramação nos tecidos fetais de ratos nas gerações seguintes, sugerindo que a prole seja capaz de adaptar-se à vida extrauterina de acordo com o fornecimento de nutrientes durante seu desenvolvimento [15]. Esta reprogramação é feita durante a vida intrauterina e quando a realidade pós-natal é diferente da que o feto foi programado, este remodelamento pode resultar em alterações nas vias metabólicas que podem, inclusive, resultar em doenças na vida adulta.

Além da via de alongamento e dessaturação desses ácidos graxos depender da disputa por enzimas, sabe-se que esta regulação não está restrita apenas a simples diferença de concentração de substratos. Esta competição é mais complexa, uma vez que está relacionada toda a parte de regulação/expressão gênica do animal. Existem dois mecanismos de controle que estes ácidos graxos exercem sobre os genes: ou o ácido graxo se liga diretamente ao fator de transcrição e controla a atividade do fator de transcrição [16] ou os ácidos graxos controlam a abundância desses fatores de transcrição chave [17]. Estudos indicam que ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico e o DHA são conhecidos substratos da oxidação peroxissomal de ácidos graxos [18] e funcionam como ligantes naturais para *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPAR) [19]. Estes ácidos graxos são capazes de regular a transcrição de enzimas responsáveis por esta conversão. A elongase-5, por exemplo, é regulada pelo gene PPAR, enquanto a elongase-2 é regulada pelo

gene SREBP [20]. PPARs desempenham um papel central em um sistema de sinalização que controla a homeostase lipídica [19].

O PPAR α é ativado por AGPIs assim como pelo DHA, que também age reprimindo a abundância nuclear de SREBP1. Fazendo isso, o 22:6n-3 promove a oxidação de ácidos graxos e inibe a síntese *de novo*. Porém, diferente de outros AGPIs, o DHA é um ativador fraco de PPAR α . Este processo provavelmente requer uma retroconversão do DHA em EPA, que por sua vez é um forte ativador de PPAR α .

Visto a importância dos AGPI na regulação gênica e dada a necessidade do consumo de gorduras em quantidades moderadas, porém mantendo-se um equilíbrio dos ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6 em uma proporção adequada, verificou-se neste estudo a incorporação e conversão destes ácidos graxos no fígado com fornecimento nas proporções n-6/n-3 de 13,6:1 e 0,4:1 (Tab. 2). Outros ácidos graxos detectados no fígado das ratas são mostrados na tabela 4.

O ácido graxo oléico mostrou diferença na incorporação ($P = 0,0235$), sendo maior no grupo CONT (20,58%) em relação ao grupo ÔM/CONT (16,02%), conforme pode ser visualizado na figura 5. Como o grupo ÔM/CONT recebeu, na geração G0, uma dieta com altas quantidades de α -LNA, sugere-se que esta dieta possa ter influenciado de alguma maneira o metabolismo lipídico hepático, uma vez que mesmo recebendo a dieta CONT por mais duas gerações, a incorporação deste AG foi diferente do grupo que somente recebeu uma dieta com alto valor de LA. Existe pouca literatura sobre o assunto, ficando difícil de se elucidar a via pela qual a incorporação deste ácido graxo possa ter passado.

O ácido graxo mirístico (14:0) teve uma incorporação contrária à fornecida na dieta. O grupo ÔM (0,42%), que recebeu uma maior quantidade deste AG na dieta (figura 6), teve uma menor incorporação, assim como o grupo ÔM/CONT (0,43), quando comparado com o grupo CONT (0,62%), com $P=0,0037$. De alguma forma ainda não compreendida os grupos ÔM e ÔM/CONT parecem ter direcionado este ácido graxo saturado com preferência para a produção de energia através da oxidação, uma vez que os AG saturados tem uma

via de oxidação mais rápida. O grupo CONT acumulou mais AG provavelmente porque a dieta CONT possui uma quantidade de AG saturados totais maior do que a dieta ÔM (tabela 2).

Assim como os ácidos graxos interferem no metabolismo lipídico do animal inclusive na incorporação no fígado, esta influência também ocorre nos indicadores bioquímicos, como no NEFA (ácidos graxos não esterificados). Os valores de NEFA das ratas está mostrado na figura 7. Os AGPI, principalmente o EPA, diminui a atividade lipolítica, sendo utilizado inclusive para evitar a degradação muscular e do tecido adiposo nos casos de caquexia em câncer. [21]. Neste estudo, os animais dos grupos ÔM (0,33 mEq/dL) e CONT (0,34 mEq/dL) tiveram uma concentração de NEFA maior quando comparados com o grupo ÔM/CONT (0,24 mEq/dL), com $P=0,0067$. Estes dados são conflitantes com a literatura, pois considerando que o grupo ÔM teve uma quantidade até 25 vezes maior de EPA no tecido hepático, a lipogênese deveria estar diminuída.

CONCLUSÕES

O fornecimento de uma grande quantidade do ácido graxo α -LNA fez com que os animais do grupo ÔM incorporassem uma maior quantidade tanto deste AG quanto dos seus metabólitos de cadeia longa. Esta incorporação alta, além de fazer com que o ácido linoléico fosse utilizado em menor quantidade no tecido hepático do grupo ÔM, também reduziu a produção endógena de ácido araquidônico (comprovando a sua ação anti-inflamatória).

Pode-se perceber que a proporção de AGs ômega 6/3 fornecidos na dieta da gestante foi provavelmente capaz de alterar a incorporação de AGs ou ainda capaz de promover uma possível modulação no metabolismo lipídico, já que o ácido oléico teve uma menor incorporação no tecido hepático do grupo OM/CONT, e os níveis de NEFA foram menores neste grupo, ao contrário do que diz a literatura. Esta mudança provavelmente ocorreu pela dieta com altos níveis de α -LNA fornecida na geração G0. Porém, são necessárias mais estudos nesta linha para que se possa explicar as maneiras pelas quais essas mudanças ocorreram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haggarty, P., *Fatty acid supply to the human fetus*. *Annu Rev Nutr*, 2010. **30**: p. 237-55.
2. Cabre, E. and M.A. Gassull, *Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance*. *Nutrition*, 1996. **12**(7-8): p. 542-8.
3. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases*. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 345-76.
4. Blank, C., et al., *Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(9): p. 1537-43.
5. Stanley, J.C., et al., *UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health*. *Br J Nutr*, 2007. **98**(6): p. 1305-10.
6. Gibson, R.A., B. Muhlhausler, and M. Makrides, *Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life*. *Matern Child Nutr*, 2011. **7 Suppl 2**: p. 17-26.
7. Holman, R.T., *The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health*. *J Nutr*, 1998. **128**(2 Suppl): p. 427S-433S.
8. Brenna, J.T., et al., *alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009. **80**(2-3): p. 85-91.
9. Cheng, Z., et al., *Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow*. *J Endocrinol*, 2001. **171**(3): p. 463-73.
10. Pellizzon, M.A., et al., *Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic mouse models*. *J Am Coll Nutr*, 2007. **26**(1): p. 66-75.
11. Abayasekara, D.R. and D.C. Wathes, *Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999. **61**(5): p. 275-87.
12. Mattos, R., C.R. Staples, and W.W. Thatcher, *Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants*. *Rev Reprod*, 2000. **5**(1): p. 38-45.
13. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Fetal nutrition and adult disease*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1344S-52S.
14. Newnham, J.P., et al., *Nutrition and the early origins of adult disease*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2002. **11 Suppl 3**: p. S537-42.
15. Langley-Evans, S.C., L. Bellinger, and S. McMullen, *Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour*. *Matern Child Nutr*, 2005. **1**(3): p. 142-8.

16. Shankar, K., et al., *Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(2): p. R528-38.
17. Howie, G.J., et al., *Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 4): p. 905-15.
18. Takasaki, M., et al., *Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice*. J Nutr Biochem, 2011.
19. James, M.J., R.A. Gibson, and L.G. Cleland, *Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 343S-8S.
20. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, 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, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
21. Johnson, M.M. and J.P. Peters, *Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma*. J Anim Sci, 1993. **71**(3): p. 753-6.
22. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
23. Hartman, L. and R.C. Lago, *Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids*. Lab Pract, 1973. **22**(6): p. 475-6 passim.
24. Igarashi, M., et al., *Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation*. J Lipid Res, 2007. **48**(5): p. 1150-8.
25. Igarashi, M., et al., *Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating alpha-linolenic acid because it lacks elongase-2*. J Lipid Res, 2008. **49**(8): p. 1735-45.
26. Rapoport, S.I., M. Igarashi, and F. Gao, *Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 273-6.
27. Jump, D.B., et al., *Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription*. Chem Phys Lipids, 2008. **153**(1): p. 3-13.
28. Dentin, R., et al., *Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2843-54.
29. Wanders, R.J., *Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders*. Mol Genet Metab, 2004. **83**(1-2): p. 16-27.
30. Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans, *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4312-7.
31. Wang, Y., et al., *Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases*. J Lipid Res, 2005. **46**(4): p. 706-15.

32. Tisdale, M.J., *Inhibition of lipolysis and muscle protein degradation by EPA in cancer cachexia*. *Nutrition*, 1996. **12**(1 Suppl): p. S31-3.

Tabela 1: Formulação das dietas controle e ômega utilizada no ensaio biológico. Os ingredientes foram adquiridos no comércio local.

Ingredientes (g/kg)	Dieta Controle	Dieta Ômega
Amido de milho	397,48	407,15
Caseína	200	200
Maltodextrina	132	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	70	---
Óleo de linhaça marrom	---	60,33
Fibra de hemicelulose	50	50
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
L-Cistina	3	3
Colina	2,5	2,5
BHT	0,014	0,014

Fonte: AIN 93

Tabela 2: Perfil lipídico das dietas controle e ômega, mostradas em porcentagem em relação a quantidade de ácidos graxos totais.

Ácidos Graxos	Dietas	
	Controle (soja)	Ômega (linhaça)
AGs Saturados	17,83 ±0,298^a	14,87 ±0,299^b
Caprótico (6:0)	0,03 ±0,009	0,08 ±0,054
Caprílico (8:0)	0,02 ±0,003	0,04 ±0,015
Cáprico (10:0)	0,05 ±0,002 ^b	0,06 ±0,002 ^a
Láurico (12:0)	0,05 ±0,002 ^b	0,06 ±0,002 ^a
Mirístico (14:0)	0,33 ±0,010 ^b	0,37 ±0,006 ^a
Pentadecanóico (15:0)	0,06 ±0,001 ^b	0,08 ±0,001 ^a
Palmítico (16:0)	11,00 ±0,060 ^a	7,69 ±0,185 ^b
Heptadecanóico (17:0)	0,11 ±0,001 ^a	0,10 ±0,001 ^b
Estearico (18:0)	4,57 ±0,162 ^b	5,58 ±0,123 ^a
Araquídico (20:0)	0,80 ±0,256 ^a	0,4 ±0,105 ^b
Behênico (22:0)	0,56 ±0,012 ^a	0,24 ±0,017 ^b
Tricosanóico (23:0)	0,06 ±0,007 ^a	0,05 ±0,002 ^b
Lignocérico (24:0)	0,16 ±0,024	0,12 ±0,015
Heneicosanóico (21:0)	0,03 ±0,003 ^a	0,01 ±0,002 ^b
AGs Monoinsaturados	27,74 ±0,582^a	20,68 ±0,486^b
Palmitoléico (16:1)	0,16 ±0,004 ^b	0,18 ±0,003 ^a
Cis-10-Heptadecanóico (17:1)	0,04 ±0,006	0,03 ±0,006
Oléico (18:1)	27,14 ±0,571 ^a	20,33 ±0,477 ^b
Eicosenóico (20:1)	0,41 ±0,061 ^a	0,14 ±0,022 ^b
AGs Poli-insaturados	49,52 ±0,791^b	61,11 ±0,742^a
Linoléico (18:2)	45,99 ±0,540 ^a	17,75 ±1,180 ^b
α-linolênico (18:3)	3,39 ±0,384 ^b	43,26 ±1,849 ^a
Eicosadienóico (20:2)	0,07 ±0,013 ^a	0,04 ±0,005 ^b
Eicosatrienóico (20:3)	0,04 ±0,010	0,04 ±0,003
Eicosapentaenóico (20:5)	0,03 ±0,021	0,02 ±0,011
Taxa n-6/n-3	13,6/1	0,4/1

As letras mostram diferenças nas concentrações do ácido graxo entre as dietas. P<0,05.

Tabela 3: Média (\pm erro padrão) do consumo de dieta das ratas durante todo o período de tratamento.

Geração	Grupo	Consumo (g)
F1	ÔM/ÔM	16,14 \pm 0,81
	ÔM/CONT	15,38 \pm 0,83
	CONT/CONT	16,90 \pm 0,74
F2	ÔM/ÔM/ÔM	18,02 \pm 0,99
	ÔM/CONT/CONT	19,67 \pm 0,68
	CONT/CONT/CONT	17,60 \pm 0,94

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos do fígado de ratos de duas gerações submetidos a diferentes tratamentos.

Ácidos Graxos	Geração F1			Geração F2		
	OM/OM	OM/CONT	CONT/CONT	OM/OM/OM	OM/CONT/CONT	CONT/CONT/CONT
AGs Saturados	41,94 ±0,24	42,16 ±0,23	43,30 ±0,55	41,91 ±0,34	37,15 ±1,88	38,94 ±1,31
Mirístico (14:0)	0,35 ±0,06	0,39 ±0,07	0,58 ±0,06	0,45 ±0,05	0,44 ±0,07	0,63 ±0,06
Pentadecanóico (15:0)	0,08 ±0,01	0,08 ±0,01	0,04 ±0,02	0,09 ±0,01	0,08 ±0,01	0,07 ±0,01
Palmitico (16:0)	19,69 ±0,34	20,24 ±2,51	22,21 ±0,98	20,04 ±0,87	17,38 ±1,17	21,09 ±1,34
Heptadecanóico (17:0)	0,22 ±0,01 ^a	0,21 ±0,02 ^a	0,23 ±0,01 ^a	0,22 ±0,01 ^a	0,21 ±0,01 ^a	0,17 ±0,01 ^b
Estearico (18:0)	21,01 ±0,40	20,70 ±2,35	19,64 ±0,65	20,44 ±0,80	18,31 ±1,28	16,44 ±1,23
Araquídico (20:0)	0,04 ±0,01	0,05 ±0,01	ND	0,04 ±0,01	0,04 ±0,01	0,02 ±0,01
Behênico (22:0)	0,09 ±0,01 ^b	0,09 ±0,01 ^b	0,11 ±0,01 ^{ab}	0,10 ±0,01 ^b	0,12 ±0,01 ^a	0,09 ±0,01 ^b
Tricosanóico (23:0)	0,12 ±0,01	0,07 ±0,04	0,08 ±0,04	0,11 ±0,01	0,15 ±0,02	0,08 ±0,02
Lignocérico (24:0)	0,35 ±0,04	0,32 ±0,01	0,42 ±0,02	0,43 ±0,02	0,41 ±0,04	0,35 ±0,02
AGs Monoinsaturados	19,26 ±1,48	17,50 ±3,22	20,49 ±1,36	22,21 ±1,48	19,30 ±1,57	25,63 ±1,89
Miristoléico (14:1)	ND	0,02 ±0,01	ND	0,02 ±0,01	0,01 ±0,01	0,04 ±0,01
Palmitoléico (16:1)	2,18 ±0,35	2,29 ±0,65	2,40 ±0,16	2,60 ±0,28	2,36 ±0,26	3,44 ±0,29
Cis-10-Heptadecanóico (17:1)	ND	0,07 ±0,02	0,08 ±0,04	0,12 ±0,02	0,13 ±0,01	0,11 ±0,02
Oléico (18:1)	16,91 ±1,20	14,94 ±2,61	17,97 ±1,22	19,27 ±1,25	16,57 ±1,31	21,88 ±1,61
Eicosenóico (20:1)	0,08 ±0,01	0,11 ±0,01	ND	0,08 ±0,01	0,11 ±0,01	0,09 ±0,01
Nervônico	0,09 ±0,01	0,08 ±0,01	0,03 ±0,02	0,12 ±0,01	0,12 ±0,01	0,08 ±0,01
AGs Poli-insaturados	31,07 ±1,28	32,05 ±3,61	28,94 ±1,66	28,88 ±1,47	33,56 ±2,79	28,12 ±2,16
Linoléico (18:2)	8,89 ±0,49	10,28 ±0,90	10,31 ±0,58	8,08 ±0,62	11,14 ±0,66	8,67 ±0,38
α-linolênico (18:3)	2,21 ±0,19	0,25 ±0,04	0,15 ±0,02	2,73 ±0,39	0,24 ±0,01	0,18 ±0,02
Eicosadienóico (20:2)	0,08 ±0,03	0,19 ±0,01	0,16 ±0,01	0,10 ±0,01	0,23 ±0,02	0,16 ±0,01
Eicosatrienóico (20:3)	0,92 ±0,05	3,73 ±2,87	0,66 ±0,13	0,74 ±0,09	0,72 ±0,08	0,82 ±0,04
Araquidônico (20:4)	5,89 ±0,14	12,42 ±3,42	13,83 ±0,88	4,38 ±0,39	16,11 ±1,87	13,77 ±1,32
Eicosapentaenóico (20:5)	6,92 ±0,49	0,33 ±0,05	0,23 ±0,02	6,92 ±0,16	0,24 ±0,03	0,34 ±0,03
Docosahexaenóico (22:6)	6,16 ±0,57	4,85 ±0,57	3,61 ±0,23	5,93 ±0,26	4,89 ±0,60	4,18 ±0,48

As diferenças de incorporação entre geração/tratamento estão em letras minúsculas. P < 0,05.

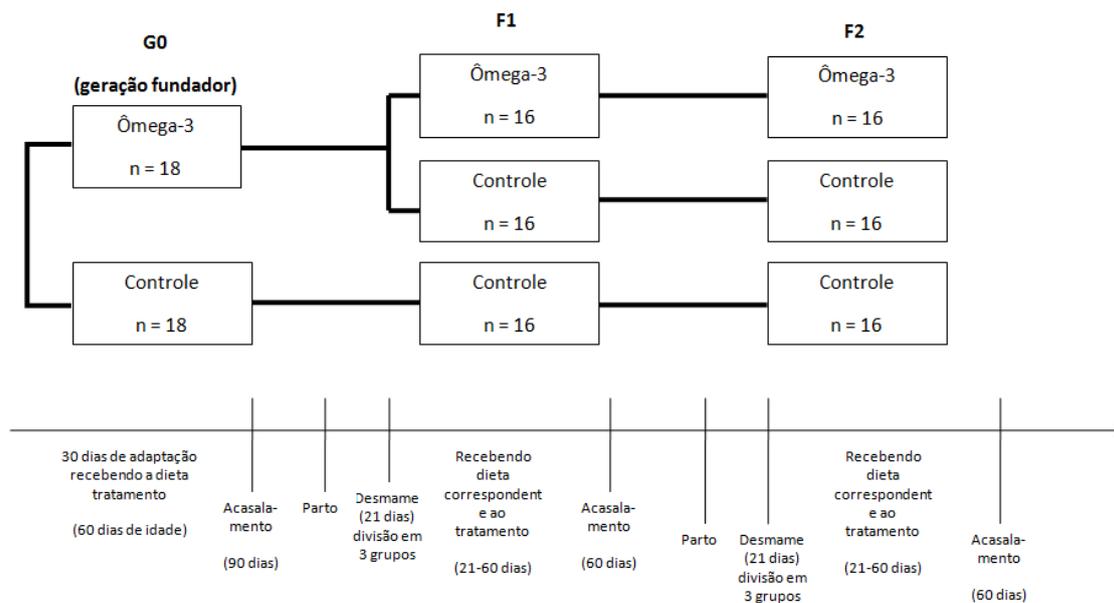


Figura 1: Delineamento experimental para avaliação da variação transgeracional em ratos com dietas contendo ômega 3 e 6.

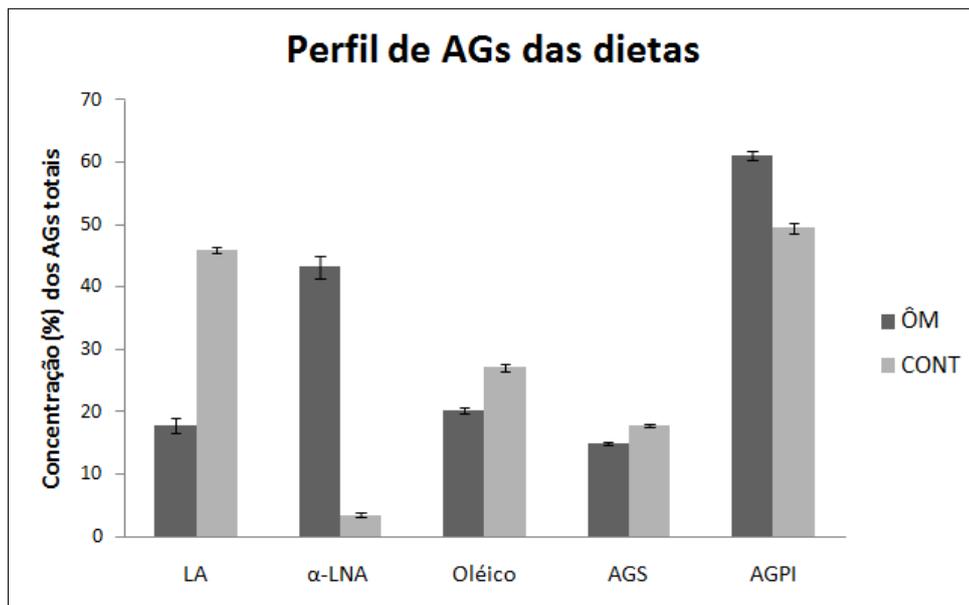


Figura 2: Principais ácidos graxos das dietas ÔM (com óleo de linhaça) e CONT (com óleo de soja).

LA – Linoléico; α-LNA – alfa linolênico.

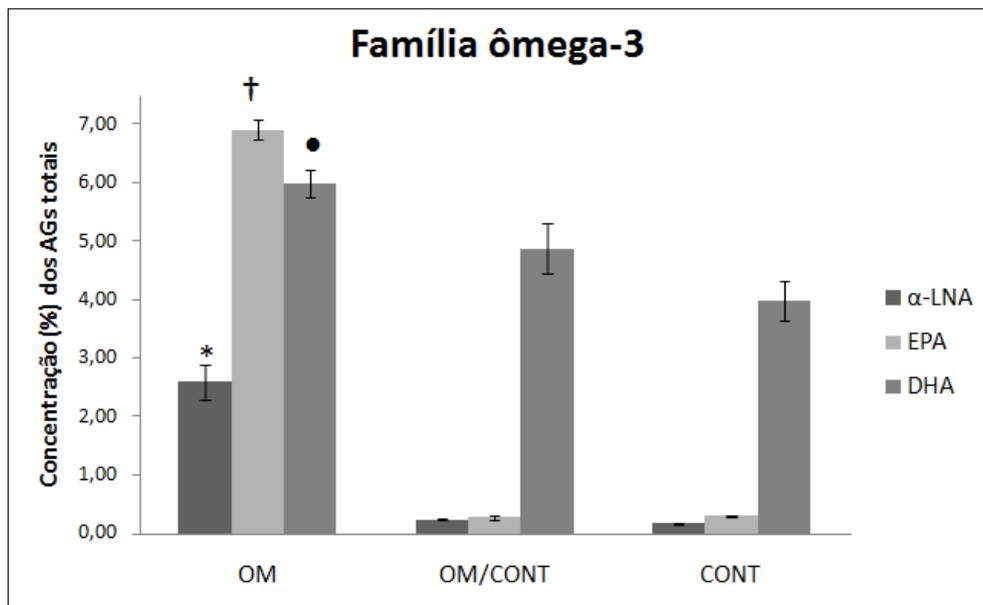


Figura 3: Incorporação hepática de ácidos graxos da família ômega-3 em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.

Os asteriscos mostram diferenças do ácido graxo α -LNA (alfa-linolênico); as cruzinhas mostram diferença do EPA (eicosapentaenóico) e o círculo mostra diferença do DHA (docosahexaenóico) entre tratamentos.

Utilizada média geral das gerações F1 e F2, com $P < 0,05$.

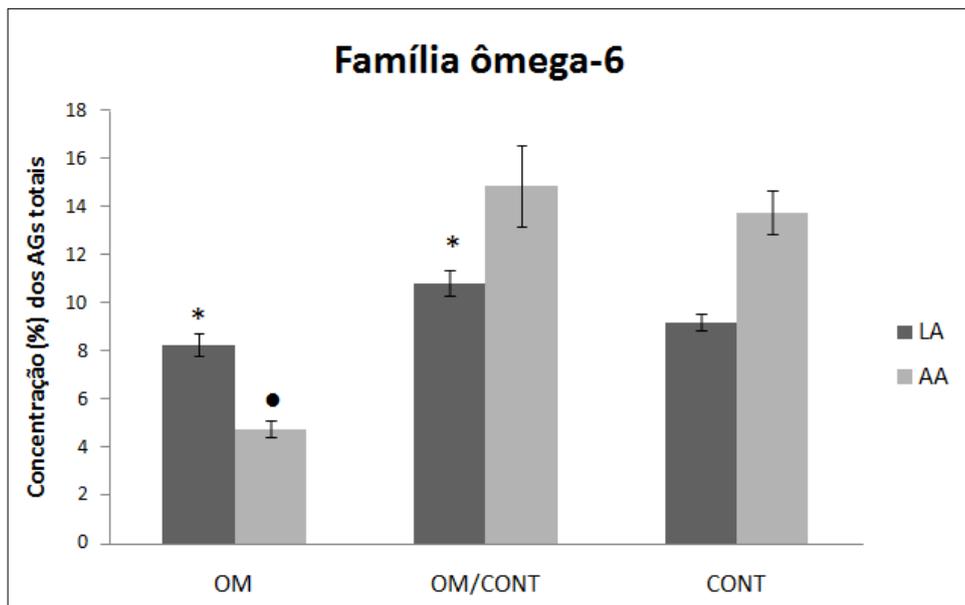


Figura 4: Ácidos graxos da família ômega-6 em ratas submetidas a diferentes tratamentos com ômega-3 e ômega-6.

O asterisco mostra diferenças do ácido graxo LA (linoléico) entre tratamentos e o círculo mostra a diferença do AA (araquidônico) entre tratamentos.

Média das gerações F1 e F2 com $P < 0,05$.

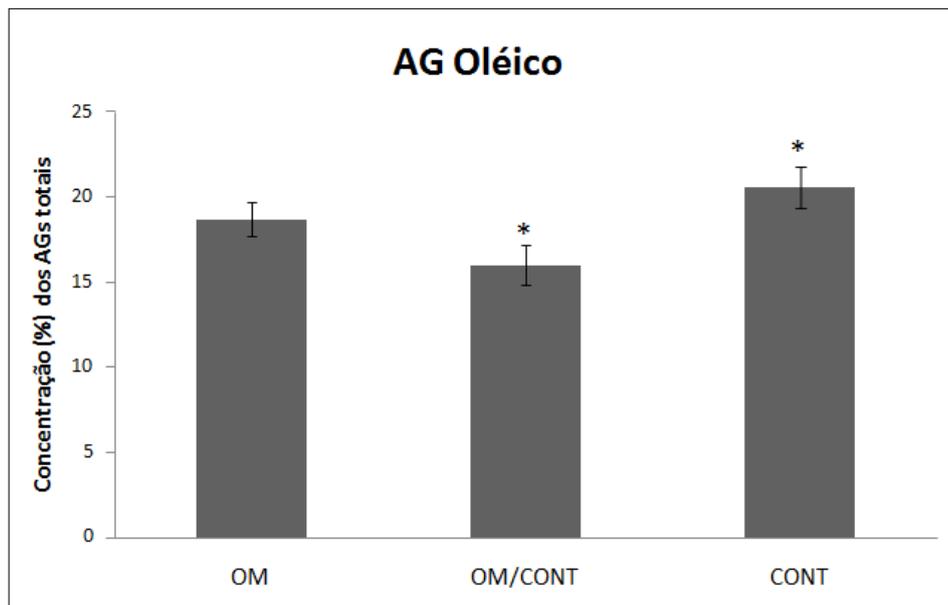


Figura 5: Incorporação hepática do ácido graxo oléico em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.

Os asteriscos mostram diferenças do ácido graxo entre tratamentos.

Foi utilizada a média geral das gerações F1 e F2, com $P=0,0235$.

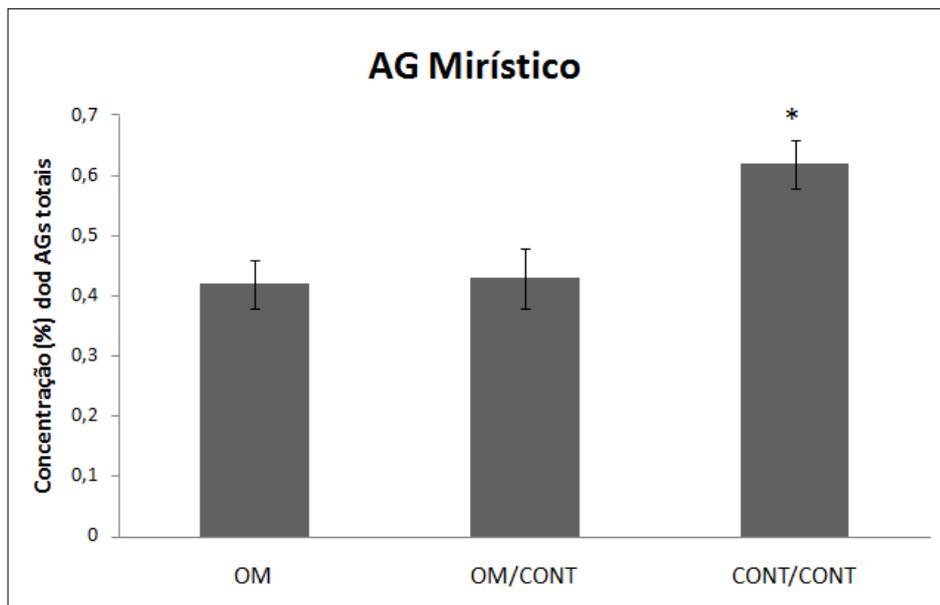


Figura 6: Incorporação hepática do ácido graxo mirístico em ratas submetidas a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.

O asterisco mostra a diferença do ácido graxo entre tratamentos

Foi utilizada a média geral das gerações F1 e F2, com $P=0,0037$.

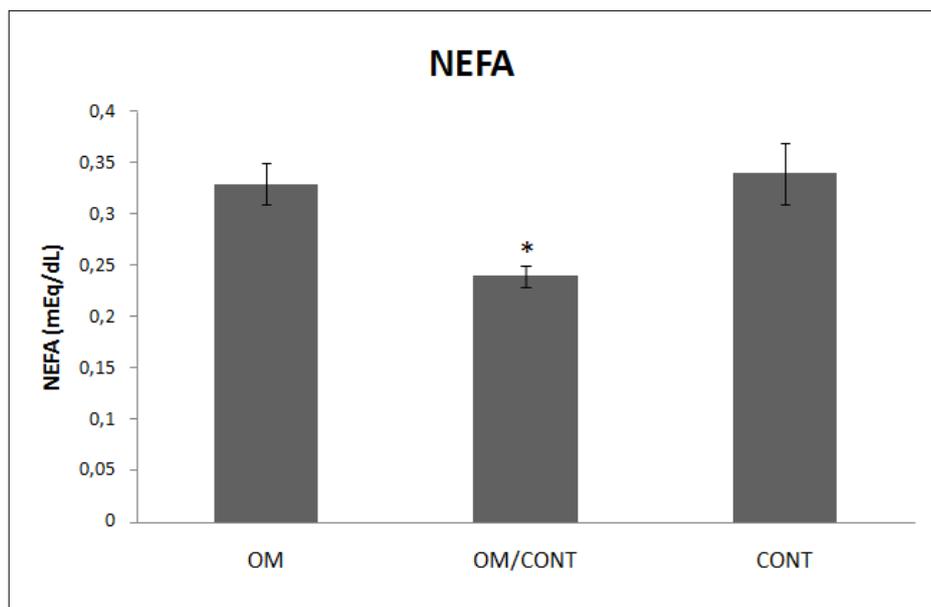


Figura 7: Ácidos Graxos não esterificados em soro de ratos submetidos a diferentes tratamentos contendo ômega-3 e ômega-6.

O asterisco mostra a diferenças do NEFA entre tratamentos

Foi utilizada a média geral das gerações F1 e F2, com $P=0,0067$.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O fornecimento de uma grande quantidade do ácido graxo α -LNA fez com que os animais do grupo OM incorporassem uma maior quantidade tanto deste AG quanto dos seus metabólitos de cadeia longa.

Não houve alteração na incorporação dos AGs fornecidos na dieta através das gerações, apenas entre tratamentos, porém de alguma forma houve uma possível modulação no metabolismo lipídico, demonstrado pela incorporação do ácido graxo oléico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abayasekara, D. R. and D. C. Wathes (1999). "Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility." **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 61(5): 275-287.

Blank, C., M. A. Neumann, et al. (2002). "Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio." **J Lipid Res** 43(9): 1537-1543.

Brenna, J. T., N. Salem, Jr., et al. (2009). "alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans." **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 80(2-3): 85-91.

Cabre, E. and M. A. Gassull (1996). "Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance." **Nutrition** 12(7-8): 542-548.

Cheng, Z., R. S. Robinson, et al. (2001). "Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow." **J Endocrinol** 171(3): 463-473.

Gibson, R. A., B. Muhlhausler, et al. (2011). "Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life." **Matern Child Nutr** 7 Suppl 2: 17-26.

Godfrey, K. M. and D. J. Barker (2000). "Fetal nutrition and adult disease." **Am J Clin Nutr** 71(5 Suppl): 1344S-1352S.

Haggarty, P. (2010). "Fatty acid supply to the human fetus." **Annu Rev Nutr** 30: 237-255.

Holman, R. T. (1998). "The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health." **J Nutr** 128(2 Suppl): 427S-433S.

Howie, G. J., D. M. Sloboda, et al. (2009). "Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet." **J Physiol** 587(Pt 4): 905-915.

Langley-Evans, S. C., L. Bellinger, et al. (2005). "Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour." **Matern Child Nutr** 1(3): 142-148.

Mattos, R., C. R. Staples, et al. (2000). "Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants." **Rev Reprod** 5(1): 38-45.

Nakamura, M. T. and T. Y. Nara (2004). "Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases." **Annu Rev Nutr** 24: 345-376.

Newnham, J. P., T. J. Moss, et al. (2002). "Nutrition and the early origins of adult disease." **Asia Pac J Clin Nutr** 11 Suppl 3: S537-542.

Pellizzon, M. A., J. T. Billheimer, et al. (2007). "Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic mouse models." **J Am Coll Nutr** 26(1): 66-75.

Shankar, K., A. Harrell, et al. (2008). "Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 294(2): R528-538.

Stanley, J. C., R. L. Elsom, et al. (2007). "UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health." **Br J Nutr** 98(6): 1305-1310.

Takasaki, M., T. Honma, et al. (2011). "Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice." **J Nutr Biochem**.