UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES FONTES LIPÍDICAS, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NA ADIPOSIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Tatiana Przybylski Ribeiro Magri

RIO DE JANEIRO

Setembro 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TATIANA PRZYBYLSKI RIBEIRO MAGRI

EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES FONTES LIPÍDICAS, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NA ADIPOSIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Maria das Graças Tavares do Carmo
Coorientadora: Flavia Spreafico Fernandes

RIO DE JANEIRO

Setembro 2013

Magri, Tatiana Przybylski Ribeiro

Efeito do consumo materno de dietas contendo diferentes fontes lipídicas, durante a gestação e lactação, na adiposidade e resistência à insulina da prole adulta de camundongos / Tatiana Przybylski Ribeiro Magri. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, 2013.

xvii, 93 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Maria das Graças Tavares do Carmo.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2013.

Referências bibliográficas: f. 89 – 102.

1. Óleo de Palmeira - efeitos adversos. 2. Resistência à Insulina. 3. Lipídeos - análise. 4. Ácidos Graxos Trans. 5. Gorduras na Dieta - metabolismo. 6. Dieta. 7. Prenhez - metabolismo. 8. Fenômenos Fisiológicos da Nutrição Materna. 9. Pesos e Medidas Corporais. 10. Gorduras Vegetais. 11. Modelos Animais. 12. Camundongos Endogâmicos C57BL. 13. Animais. 14. Nutrição - Tese. I. Carmo, Maria das Graças Tavares do. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição. III. Título.

EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES FONTES LIPÍDICAS, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NA ADIPOSIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Tatiana Przybylski Ribeiro Magri

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Tavares do Carmo (Orientadora e Presidente)
Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dr.ª Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha (Revisora e Titular Interno)
Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dr.ª Kelse Tibau Albuquerque (Titular Interno)
Instituto de Nutrição Josué de Castro, Campus Macaé - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.ª Dr.ª Marcia Soares da Mota e Silva Lopes (Suplente Interno)
Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dr.ª Susana Ortiz Costa (Titular Externo)
Faculdade de Nutrição, Centro Universitário Augusto Mota, Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura (Suplente Externo)
Faculdade de Nutrição, Universidade Federal Fluminense

_____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Tavares do Carmo, durante o curso de Pós-Graduação em Nutrição, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação

Aos meus pais Paulo e Denise por todos os ensinamentos transmitidos e por não medirem esforços na minha educação. O amor e o direcionamento de vocês foram fundamentais para me tornar a pessoa e profissional que sou hoje.

À minha irmã Vanessa pela amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos alegres e difíceis por que passei nessa trajetória.

A toda a minha família pelo apoio naqueles momentos em que a vontade de desistir se fazia mais forte do que a de continuar.

Ao meu noivo Alyson por se fazer presente seja de longe ou de perto, transmitindo seu apoio, amor, carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela proteção dada a mim a cada dia, e por ter colocado em meu caminho pessoas que fizeram possível concluir essa etapa.
- À minha orientadora, Prof.ª Maria das Graças, por ter me recebido de braços abertos e confiado a mim esse bonito trabalho. Obrigada pela força naqueles momentos difíceis que passei, pelo carinho e incentivo e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Agradeço também pelo conhecimento acadêmico transmitido que levarei sempre comigo.
- À Flávia Fernandes pelo carinho e pela dedicação oferecida quando mais precisava. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos e pela força na reta final do mestrado.
- À Prof.ª Fátima Sardinha pelos ensinamentos, orientação e esclarecimentos de dúvidas.
- À Prof.ª Márcia Soares por ter me dado oportunidade, ainda na graduação, de ingressar na iniciação científica e ter, dessa forma, despertado em mim o gosto pela ciência. Obrigada pelo carinho e incentivo durante todos esses anos.
- À Prof.ª Claudia Bento por sempre me incentivar, me fazendo acreditar que seria possível atingir meus objetivos acadêmicos e pessoais.
- À Prof.ª Carmem Cabanelas, por ter me aberto as portas e pelo direcionamento. Obrigada também à Prof.ª Isis e a todos os integrantes do Laboratório de Endocrinologia Molecular do Instituto de Biofísica da UFRJ, especialmente à Norma, Aline, Luana e Gabriela, pelos ensinamentos transmitidos e fundamentais para meu amadurecimento científico.
- Ao Prof. Sérgio e ao aluno Thiago pela colaboração nos experimentos da tomografia.
- À Prof.ª Valéria e às alunas Larissa e Marília pela colaboração nos experimentos da morfometria de adipócitos.
- À minha amiga Vanessa Misan, por superar comigo todos aqueles momentos que só nós sabemos o quanto foram difíceis e sofridos. Juntas nós aprendemos, crescemos cientificamente e pessoalmente e fizemos de uma parceria no mestrado uma grande amizade. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos, estatísticas e pela alegria e descontração compartilhadas no laboratório e até mesmo fora dele.
- À minha amiga Aline, pela ajuda nas muitas metilações e nos cromatogramas que pareciam tão complicados num primeiro momento. Obrigada pela força e pela amizade.

- Às alunas de iniciação científica Raisa e Thaiza pela ajuda em todos os experimentos, pelo apoio e por não desistirem quando os obstáculos surgidos pareciam intransponíveis. Obrigada pela amizade e pela parceria durante todo o trabalho.
- Ao aluno João Paulo pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de diversão garantidos.
- Às alunas Larissa Araújo, Dani Tosta e Patrícia Fernandes pela ajuda nos experimentos finais. Obrigada pela dedicação de vocês.
- À Fernanda pela descontração e amizade durante tantos anos, ao Henrique por toda a ajuda e pelos chocolates sempre bem vindos, à Flavia Dias pelos momentos agradáveis vivenciados e a todos os alunos do Lab 21 que de alguma forma participaram e me ajudaram a chegar até aqui.
- À Penha e ao Matheus pelo cuidado com os camundongos.
- À minha amiga Mônica Lobo pela amizade e por todo o incentivo desde quando eu era apenas sua aluna de iniciação científica.
- Às minhas amigas Jaqueline, Brunna, Debby e Déborah pelas conquistas compartilhadas desde o pré-vestibular. Obrigada pela amizade e pela compreensão quando mais precisei.
- Às minhas amigas Gabriela e Verônica por estarem sempre presentes, transmitindo força, fé, carinho e amizade durante todos esses anos.
- Às minhas amigas Michele e Olívia pela amizade e incentivo desde a graduação. Obrigada pelo apoio.
- Às minhas amigas Luciana, Camilla e Mariana por terem estado comigo desde o início da graduação.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Partes dos resultados desta dissertação foram apresentadas nas seguintes reuniões científicas:

Raísa M. A. R. Santos; Thaiza F. Nunes; **Tatiana P. R. Magri**; Vanessa Misan; Maria das Graças T. Carmo. "Consumo materno de gordura interesterificada e seus efeitos na adiposidade visceral e sensibilidade periférica à insulina da prole adulta de camundongos C57BL/6." XXXIV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural- UFRJ. Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2012.

Thaiza F. Nunes; Raísa M. A. R. Santos; Vanessa Misan; **Tatiana P. R. Magri**; Fernanda O. Osso; Amanda S. Souza; Isabela T. Bonomo; Vanessa Estato; Eduardo V. Tibiriçá; Maria das Graças T. Carmo. "Efeito do consumo materno de gordura interesterificada durante a gestação e lactação sobre o estado inflamatório da prole adulta de camundongos C57BL/6." XXXIV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural- UFRJ. Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2012.

Maria das Graças T. Carmo; Isabela T. Bonomo; Vanessa Misan; **Tatiana P. R. Magri**. "Functional capillary density and inflammatory status in adult offsprings of dams fed with *trans* and interesterified fats". 10th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids - Vancouver- Canadá, 26 de maio de 2012.

EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES FONTES LIPÍDICAS, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO, NA ADIPOSIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Tatiana Przybylski Ribeiro Magri
Setembro 2013

Orientadora: Maria das Graças Tavares do Carmo
Coorientadora: Flavia Spreafico Fernandes

RESUMO

A qualidade dos lipídios da dieta materna, durante a gestação e lactação, pode promover obesidade, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus tipo 2 na prole adulta. Em razão do reconhecimento dos efeitos prejudiciais à saúde, decorrentes do consumo da gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH), rica em ácidos graxos *trans*, a indústria de alimentos passou a utilizar, como substituto, frações de óleo de palma (OP) ou gordura interesterificada. A literatura não é consensual acerca do impacto destas fontes lipídicas alternativas sobre a saúde. Comparamos o efeito do consumo de dietas isoenergéticas e normolipídicas, contendo gordura interesterificada (GI), OP (GP), GVPH (GT) ou óleo de soja (GC) por camundongos C57BL/6, durante a gestação e lactação, na adiposidade e homeostase glicêmica da cria (machos) aos três meses de vida. Após acasalamento, as fêmeas prenhas foram separadas nos 4 grupos experimentais. Após o desmame, a cria foi separada de suas respectivas progenitoras e alocados em gaiolas individuais, passando a receber ração a base de soja. A evolução ponderal e o consumo alimentar foram registrados durante a gestação e lactação nas mães e até os 90 dias de vida dos filhotes machos. A avaliação da homeostase glicêmica foi realizada por meio de testes de tolerância i.p. à glicose e à insulina. O modelo de avaliação de resistência à insulina HOMA-IR também foi utilizado. Foi quantificada a massa dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico, realizada morfometria de adipócitos nos tecidos adiposos epididimal e inguinal e avaliada, por imagem, o volume de tecido adiposo interno e externo à cavidade abdominal bem como determinado o perfil de AG nos lipídios do plasma, fígado e tecidos adiposos inguinal e epididimal, por cromatografia gás-líquido. Foi encontrado: aumento da massa corporal nos filhotes GI e GP, desde o desmame até os 90 dias de vida; aumento da massa de tecido adiposo epididimal nos filhotes GI e da massa de tecido adiposo inguinal no grupos GP; aumento do volume de gordura interna, externa e total nos animais GI; hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo epididimal dos filhotes GI e, no tecido adiposo inguinal, de filhotes GT; não foram identificadas diferenças significativas nos testes de avaliação da homeostase glicêmica e sensibilidade à ação periférica da insulina; foram encontrados teores mais elevados de AGS, AGT e AGPI nos lipídios circulantes de filhotes GP, GT e GI, respectivamente, comparados ao grupo GC; teores hepáticos mais reduzidos de AGMI e AGPI em filhotes GT e GI, comparados ao grupo GC e teores mais elevados de AGT nos tecidos adiposos epididimal e inguinal dos filhotes GT. Esses resultados sugerem que a substituição da GVPH por OP ou por GI pode não constituir boa alternativa na medida em que essas gorduras ricas em ácido palmítico, foram capazes de ocasionar, na prole, alterações no desenvolvimento e metabolismo do tecido adiposo, com repercussões na idade adulta, favorecendo o aumento da adiposidade visceral e, consequentemente, o risco de RI.

Palavras-chave: Programação metabólica, óleo de palma, gordura interesterificada, gordura vegetal parcialmente hidrogenada, tecido adiposo, camundongos

EFFECT OF MATERNAL CONSUMING OF DIETS CONTAINING DIFFERENT LIPID SOURCES, DURING PREGNANCY AND LACTATION, ON ADIPOSITY AND INSULIN RESISTANCE OF THE ADULT OFFSPRING OF MICE

Tatiana Przybylski Ribeiro Magri
September 2013

Advisors: Maria das Graças Tavares do Carmo
Flavia Spreafico Fernandes

ABSTRACT

The quality of the lipids of maternal diet during pregnancy and lactation can promote obesity, insulin resistance (IR) and type 2 diabetes mellitus in adult offspring. Due to the recognition of the adverse health effects arising from the consumption of partially hydrogenated vegetable oil (PHVO), rich in trans fatty acids , the food industry has been using as a proxy, fractions of palm oil (PO) or interesterified fat . The literature is not consensus about the impact of these alternative lipid sources on health. In this study we compared the effect of the consuming of isocaloric and normolipidic diets containing interesterified fat (IG) , PO (PG) , PHVO (TG) or soybean oil (CG) for C57BL / 6 mice, during gestation and lactation, on adiposity and glucose homeostasis of the offspring (male) at three months of life. After mating, the female rats were separated into 4 groups. After weaning, the offspring were separated from their respective progenitor and allocated in individual cages starting to receive soy-based diet. The weight gain and food consumption were recorded during pregnancy and lactation, in mothers, and up to 90 days of life, of male offspring. The homeostasis model assessment was performed by i.p. tolerance tests of glucose and insulin. The model assessment of insulin resistance HOMA -IR was also used. Inguinal, epididymal , retroperitoneal and mesenteric adipose tissue mass were quantified, held morphometry of adipocytes in epididymal and inguinal adipose tissues and evaluated by image , the volume of adipose tissue within and outside the abdominal cavity were determined and the profile of the AG of plasma lipids, liver and epididymal adipose tissue and inguinal were determined by gas-liquid chromatography . We found:: increased body mass in young IG and PG, from weaning until 90 days of life , increase mass of epididymal adipose tissue in young IG and inguinal adipose tissue mass in groups PG; increased volume of internal and external fat and overall in IG animals, hypertrophy of adipocytes in epididymal adipose tissue of young IG in inguinal adipose tissue, puppies TG; the differences among tests of glucose homeostasis and sensitivity to peripheral insulin action were not significant; we found higher levels of SFA , TFA and PUFA on circulating lipids of pups PG , TG and IG, respectively, compared to GC; lower liver levels of MUFA and PUFA in puppies GT and GI , compared to the control group and higher levels AGT in epididymal and inguinal adipose tissues of young GT . These results suggest that the substitution of PHVO by PO or interesterified fat may not be a good alternative in that such fats rich in palmitic acid, have been able to cause , in the offspring , changes in development and metabolism of adipose tissue, with repercussions on adulthood, favoring an increase of visceral fat and, consequently, the risk of IR.

Keywords: Metabolic programming, palm oil, interesterified fat; partially hydrogenated vegetable oil; adipose tissue, mice.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido Araquidônico
AG: Ácidos Graxos
AGE: Ácidos Graxos Essenciais
AGL: Ácidos Graxos Livres
AGMI: Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI: Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGPI-CL: Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa
AGS: Ácidos Graxos Saturados
AGT: Ácidos Graxos *trans*
AIN: American Institute of Nutrition
AL: Ácido Linoleico
ALA: Ácido α Linolênico
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS: Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (*American Oil Chemists' Society*)
AUC: Área Sob a Curva (*Area Under the Curve*)
BHT: Butilhidroxitolueno
CLA: Ácido Linoleico Conjugado
DCV: Doenças Cardiovasculares
DHA: Ácido Docosahexanoico
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
ELISA: Teste Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)
EPA: Ácido Eicosapentaenoico
FAO: Organização para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*)
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
GC: Grupo Controle
GI: Grupo Gordura Interesterificada
GP: Grupo Óleo de Palma
GT: Grupo Gordura Vegetal Parcialmente Hidrogenada – *trans*
GVPH: Gordura Vegetal Parcialmente Hidrogenada
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (*High Density Lipoprotein*)
HOMA-IR: Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*)
IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (*Insulin Growth Factor*)
IL-1ß: Interleucina-1ß
IL-6: Interleucina-6
IMC: Índice de Massa Corporal
i.p: Intraperitoneal
IR: Receptor de Insulina (*Insulin Receptor*)
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*)
LDL-c: Lipoproteína de Baixa Densidade –colesterol (*low density lipoprotein – colesterol*)
LPL: Lipase Lipoprotéica
OMS: Organização Mundial da Saúde
OP: Óleo de Palma
PAI-1: Ativador de Plasminogênio-1
PKB: Proteína Quinase B *(Protein kinase B)*
RI: Resistência à Insulina
TAE: Tecido Adiposo Epididimal

TAM: Tecido Adiposo Mesentérico
TARP: Tecido Adiposo Retroperitoneal
TAG: Triacilgliceróis
TNF-α: Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Fator α*)
TTG: Teste de Tolerância Intraperitoneal à Glicose
TTI: Teste de Tolerância Intraperitoneal à Insulina
VLDL: Lipoproteína de Densidade Muito Baixa (*Very Low Density Lipoprotein*)

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

Quadro 1. Principais ácidos graxos naturalmente encontrados: nomenclatura, estrutura e propriedades 23

Figura 1. Metabolismo de ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 25

Figura 2. Representação do metabolismo dos AG em camundongos 26

Figura 3. Estruturas e pontos de fusão dos ácidos graxos esteárico, oléico e elaídico 27

Figura 4. Esquema do processo de interesterificação entre dois triacilglicerois distintos 33

Figura 5. O receptor de insulina quando ativado promove a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos protéicos, como do IRS, Shc e Cbl, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como PI3K, cascata da MAPK e CAP/Cbl 43

Materiais e métodos

Figura 6. Delineamento Experimental 48

Tabela 1. Composição das rações manipuladas, oferecidas aos diferentes grupos experimentais, durante os períodos de gestação e lactação, e até os 60 dias de vida 49

Tabela 2. Composição da dieta controle oferecida após os 60 dias de vida 50

Quadro 2. Composição lipídica da gordura interesterificada 50

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais das dietas oferecidas às fêmeas no período de gestação e lactação 53

Figura 7A. Foto do equipamento utilizado para avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada 54

Figura 7B. Representação do posicionamento do camundongo no equipamento utilizado para avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada 54

Resultados

Figura 8. Consumo alimentar de 24 h médio semanal das camundongas, durante a gestação e lactação 60

Figura 9. Evolução da massa corporal total, das camundongas alimentadas com diferentes fontes lipídicas durante a gestação e lactação. 61

Figura 10. Média semanal do consumo alimenta de 24 h dos filhotes machos, que 62

receberam ração controle desde o desmame até os 3 meses de vida.

Figura 11A. Evolução da massa corporal total, dos filhotes machos durante a lactação. 63

Figura 11B. Evolução da massa corporal total, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame até os 3 meses de vida. 63

Figura 12. Variação da massa corporal total, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame ate os os 3 meses de vida. 64

Figura 13. Gordura interna: volume de tecido adiposo localizado no interior da cavidade abdominal; Gordura externa: volume de tecido adiposo localizado no exterior da cavidade abdominal; Gordura total: somatório do volume interno e externo à cavidade abdominal. 65

Figura 14. Massa dos estoques de tecidos adiposos da prole 66

Figura 15. Massa de gordura visceral (somatório dos estoques dos tecidos adiposos viscerais - retroperitoneal, epididimal e mesentérico); Massa relativa ao somatório dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico e inguinal (obesidade central). 67

Figura 16. Histologia e morfometria do tecido adiposo epididimal. 68

Figura 17. Histologia e morfometria do tecido adiposo inguinal. 69

Figura 18. Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG); Área sob a curva glicêmica calculada no TTG. 70

Figura 19. Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI); Área sob a curva glicêmica calculada no TTI 70

Tabela 4. Concentrações plasmáticas de glicose e insulina, de jejum e HOMA-IR dos camundongos machos, aos 110 dias de vida 71

Figura 20. Massa correspondente aos fígados excisados de camundongos machos, aos 110 dias de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. 71

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do fígado dos filhotes machos aos 110 dias de vida. 73

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do plasma dos filhotes machos aos 110 dias de vida. 75

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 110 dias de vida 77

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do tecido adiposo inguinal dos filhotes machos aos 110 dias de vida 79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1. Importância nutricional dos lipídios e ácidos graxos 21
2.2. Lipídios em alimentos industrializados 27
2.2.1 Gordura vegetal parcialmente hidrogenada 27
2.2.2 O óleo de palma como substituto da gordura vegetal parcialmente hidrogenada 30
2.2.3 Gordura interesterificada como substituta da gordura vegetal parcialmente hidrogenada 32
2.3. Programação metabólica 35
2.3.1 Contextualização conceitual 35
2.3.2 Ácidos graxos como fatores nutricionais envolvidos na programação metabólica 37
2.4. Distribuição da gordura corporal e resistência à insulina 39
2.4.1. Obesidade e tecido adiposo 39
2.4.2. Resistência à insulina induzida pela obesidade 41
3. HIPÓTESE 45
4. OBJETIVOS 46
4.1. Objetivo Geral 46
4.2. Objetivos Específicos 46
5. MATERIAIS E MÉTODOS 47
5.1. Aspectos éticos 47
5.2 Animais e condições experimentais 47
5.3. Elaboração das rações manipuladas 48
5.4. Determinação do perfil de ácidos graxos das rações experimentais 51
5.4.1. Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos 51
5.4.2. Cromatografia gasosa 52
5.5. Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais 53
5.6. Avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada 54
5.7. Avaliação morfométrica de adipócitos dos tecidos adiposos epididimal e inguinal 55
5.7.1. Obtenção e processamento de amostras 55
5.7.2. Morfometria 55
5.8. Avaliação da sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica 56

5.8.1. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG) 56
5.8.2. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI) 56
5.8.3. Dosagem de insulina plasmática de jejum 56
5.8.4. Índice de resistência à insulina HOMA-IR 57
5.9. Sacrifício e coleta dos tecidos hepático e adiposos 57
5.10. Determinação do perfil de ácidos graxos do fígado e dos tecidos adiposos epididimal e inguinal 57
5.11. Determinação do perfil de ácidos graxos do plasma 58
5.11.1. Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos 58
5.11.2. Cromatografia gasosa 58

5.12. Análises estatísticas 59
6. RESULTADOS 60
6.1. Consumo alimentar e massa corporal das mães durante os períodos de gestação e lactação 60
6.2. Consumo alimentar e massa corporal da prole (camundongos machos) 61
6.3. Avaliação por imagem do volume de tecido adiposo interno e externo à cavidade abdominal e da massa dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico de camundongos machos, aos três meses de vida. 64
6.4. Morfometria de adipócitos nos tecidos adiposos epididimal e inguinal de camundongos machos, aos 90 dias de vida 67
6.5. Sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica de camundongos machos, aos três meses de vida 69
6.6. Massa relativa aos fígados de camundongos machos, excisados após sacrifício aos 110 dias de vida 71
6.7. Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do fígado, plasma e tecidos adiposos epididimal e inguinal 72
7. DISCUSSÃO 80
8. CONCLUSÃO 87
REFERÊNCIAS 89
ANEXO A 103

1. INTRODUÇÃO

Doenças metabólicas como a obesidade e a resistência à insulina (RI), principal componente do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), vêm acometendo com maior frequência a população adulta, com prevalência cada vez maior nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil (ALWAN et al., 2010; UNSCN, 2010). Embora o consumo de dietas com elevada densidade energética, o sedentarismo e a predisposição genética sejam considerados suas principais causas, alterações no ambiente nutricional, durante a gestação e lactação, produzem efeitos significativos na gênese dessas desordens (YANG; HUFFMAN, 2013). Estas condições fundamentam a hipótese da "origem fetal", "programação metabólica" ou "plasticidade ontogenética" (DEMMELMAIR; VON ROSEN; KOLETZKO, 2006; MATHEW; AYYAR, 2012). Ambiente nutricional materno desfavorável, tanto em termos de quantidade, quanto da qualidade de nutrientes disponíveis, pode alterar o desenvolvimento do adipócito, resultando no aumento, permanente, da capacidade de proliferação destas células (adipogênese) como também pode afetar os processos envolvidos no armazenamento lipídico (lipogênese), levando ao aumento de massa corporal, conferindo, assim, maior risco para o desenvolvimento da RI (MUHLHAUSLER; SMITH, 2009).

O tecido adiposo pode ser acumulado em diferentes compartimentos corporais, definidos como visceral (ou abdominal) e periférico (ou subcutâneo). A presença de adipócitos maiores (hipertrofia) ou em maior quantidade (hiperplasia) na região abdominal, confere risco aumentado para a ocorrência da resistência periférica à insulina (PEDERSEN, 2013). Esta condição, por sua vez, leva ao desenvolvimento da dislipidemia aterogênica, assim como do estado inflamatório, aumento da pressão arterial sistêmica e ao estabelecimento do DM2 (DESPRES et al., 2008).

A avaliação por imagem, como a técnica da tomografia computadorizada tem sido utilizada em estudos com camundongos para identificar a localização dos diferentes estoques de tecido adiposo (JUDEX et al., 2010). Costa et al. (2007) observaram por meio desta técnica que o tratamento pós desmame com dieta hiperlipídica foi capaz de alterar a distribuição do tecido adiposo em animais submetidos à desnutrição durante a gestação e lactação.

Assim como outros nutrientes, os ácidos graxos (AG) dietéticos constituem fatores ambientais nutricionais capazes de promover efeitos associados à programação

metabólica, estabelecida nos estágios de diferenciação e divisão celular que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e fetal (INNIS, 2011). A utilização de modelos experimentais com animais tem permitido observar os efeitos do consumo de diferentes fontes lipídicas, durante o período perinatal, sobre a saúde da prole na vida adulta. A ingestão de gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH), rica em ácidos graxos *trans* (AGT), durante a gestação e lactação, foi capaz de promover alterações no controle central da ingestão alimentar exercido pela insulina e serotonina, assim como modificações na homeostase glicêmica dos filhotes na idade adulta (ALBUQUERQUE et al., 2006). Recentemente, Bispo (2012) registrou comprometimento da ação anorexígena central da insulina em ratos adultos cujas mães consumiram gordura interesterificada, GVPH ou óleo palma (OP), durante a gestação e lactação. Misan (2012) documentou alteração no estado inflamatório de camundongos adultos, cujas mães consumiram, no período perinatal, dieta contendo AGT, OP ou gordura interesterificada. Considerando estes achados é possível supor que modificações exclusivamente relacionadas à composição lipídica da dieta materna, sem alteração do conteúdo deste nutriente, nos períodos críticos do desenvolvimento, são capazes de comprometer diferentes sistemas fisiológicos e processos metabólicos.

Com o intuito de substituir a gordura animal, reconhecidamente aterogênica, a indústria alimentícia utilizou, durante muito tempo, a hidrogenação parcial de óleos vegetais para obter um produto adequado para a fabricação de alimentos. Como resultado deste processo ocorre redução do grau de insaturação do óleo, que permite o aumento do ponto de fusão e estabilidade oxidativa, conferindo ao produto maior tempo de prateleira com boas características de palatabilidade e reduzido custo de fabricação, gerando, no entanto, isômeros *trans* em sua composição (RIBEIRO et al., 2007). O elevado consumo de produtos fabricados com esse tipo de gordura, como biscoitos, produtos de panificação, margarinas, entre outros, verificado nos últimos anos concorreu para o reconhecimento dos malefícios à saúde associados à ingestão de AGT, já bem descritos na literatura (DE ROOS et al., 2002; SABARENSE; MANCINI FILHO, 2003; SUN et al., 2007).

Mais recentemente, com o objetivo de reduzir o teor de isômeros *trans* em seus produtos, a indústria alimentícia tem empregado outros processos tecnológicos em substituição à hidrogenação parcial de óleos e gorduras. As duas principais alternativas são a utilização de óleos vegetais com maior proporção de ácidos graxos saturados

(AGS), como o óleo de palma e suas frações, e a interesterificação, que pode ser química ou enzimática (HAYES; PRONCZUK, 2010). O OP tem sido bastante utilizado, principalmente em razão de sua adequada textura e estabilidade, e por não conter AGT em sua composição (BERGER; IDRIS, 2005). Já os processos de interesterificação, para a produção da gordura interesterificada, apesar do custo elevado, promovem a redistribuição dos AG na molécula de glicerol, gerando novos triacilgliceróis (TAG), permitindo a formação de óleos e gorduras com baixos teores de isômeros *trans* ou mesmo a ausência destes compostos (RACT; GIOIELLI, 2008). Desta forma, nos últimos anos, tanto o OP, como a gordura interesterificada vêm sendo utilizados como substitutos para a GVPH na fabricação de alimentos industrializados. Porém, ainda são poucos os estudos que avaliam a influência do consumo destas fontes lipídicas na saúde.

Considerando a hipótese da programação metabólica no sentido dos prejuízos decorrentes do consumo de GVPH, rica em AGT, durante a fase crítica de desenvolvimento, que compreende a gestação e lactação, bem como a escassez de estudos que investiguem os efeitos dos substitutos da GVPH neste período crítico, o presente trabalho, buscou identificar os efeitos do consumo materno de GVPH, óleo de palma e gordura interesterificada, no período perinatal, sobre a adiposidade, homeostase glicêmica e sensibilidade periférica à insulina na prole adulta de camundongos. Os dados gerados pretendem constituir subsídios capazes de proporcionar melhor compreensão acerca da importância da qualidade da fonte lipídica oferecida no início da vida, apontando possíveis processos associados ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância nutricional dos lipídios e ácidos graxos

A importância dos lipídios na alimentação humana já está bem reconhecida. Sabe-se que estes compostos são responsáveis por conferir palatabilidade e maior densidade energética aos alimentos, permitem o transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), são fontes de fosfolipídios, fitoesteróis e ácidos graxos essenciais (FORNAZZARI et al., 2007). Além disso, são precursores de hormônios esteroides, componentes da bile e da membrana celular e de organelas, participam de complexos sistemas de sinalização intracelular e na formação de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (LOTTENBERG, 2009).

Os óleos e as gorduras integram a classe dos lipídios simples - compostos que por hidrólise total dão origem somente a ácidos graxos e álcoois. A diferença entre eles está no estado físico, em temperatura ambiente, na medida em que os óleos são líquidos e as gorduras, sólidas. Ambos apresentam como componente majoritário os triacilgliceróis, compostos por uma molécula do álcool glicerol, esterificada com três ácidos graxos que podem ocupar as posições sn-1, sn-2 e sn-3 (D'AGOSTINI; GIOIELLI, 2002). Aqueles que apresentam ácidos graxos idênticos são considerados TAG simples, e os que possuem AG diferentes, mistos. A presença de longas cadeias carbônicas hidrofóbicas nos ácidos graxos confere a essa estrutura a insolubilidade em solventes aquosos (RIBEIRO et al., 2007).

Os AG podem ser classificados de acordo com o tamanho e a presença de duplas ligações em sua cadeia carbônica. Com relação ao tamanho da cadeia, são classificados como AG de cadeia curta os que possuem menos de seis átomos de carbono, AG de cadeia média, entre oito e quatorze átomos de carbono e, por fim, os AG de cadeia longa, compostos por mais de quatorze átomos de carbono (MARTIN et al., 2006). Já com relação à presença ou não de duplas ligações, são considerados ácidos graxos saturados, aqueles isentos de duplas ligações, ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), os que possuem apenas uma dupla ligação e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), os que apresentam duas ou mais duplas ligações (YOUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000). Os AGPI podem ainda ser classificados em n-3 e n-6, de acordo com a localização da primeira dupla ligação em relação ao seu grupamento metil terminal

(SIDDIQUI et al., 2004). Assim, destacam-se os AGPI pertencentes à família n-6, como os ácidos linoleico (18:2 n-6, AL) e o araquidônico (20:4 n-6, AA) e aqueles pertencentes à família n-3, como os ácidos alfa-linolênico (18:3 n-3, ALA), eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6 n-3, DHA) (PERINI et al., 2010).

Os principais AGS de cadeia longa, presentes na alimentação humana, são o palmítico (C16:0), abundante na gordura animal e algumas gorduras vegetais, como a gordura de palma, e o esteárico (C18:0), encontrado também nas gorduras animais, e gorduras vegetais específicas como a do cacau. O ácido mirístico é um AGS de cadeia média também de importância nutricional, uma vez que está presente no leite e em outras gorduras animais. Já o AGMI mais comum é o oleico, fornecido principalmente pelo óleo de oliva e canola (SANTOS et al., 2013).

O tipo de ácido graxo e a sua posição no triacilglicerol pode implicar em diferentes resultados metabólicos. Durante a digestão, a lipase pancreática hidrolisa preferencialmente os AG situados nas ligações sn-1 e sn-3, em detrimento da sn-2. Desta forma, a presença de AGS na posição sn-2, diferente dos AGMI e AGPI, é capaz de aumentar a eficácia da sua absorção e elevar a lipemia pós-prandial (D'AGOSTINI; GIOIELLI, 2002).

Para representar os AG, tem sido utilizado o sistema alfa numérico, iniciado pela leta C, seguida do número de átomos de carbono na molécula, o número de duplas ligações entre os átomos de carbono e a localização das duplas ligações na cadeia carbônica (FOX; LYLE; ROGGE, 2004). Desta forma, podemos citar como exemplos, o ácido graxo láurico, que por ser um AGS, com 12 carbonos em sua cadeia, é representado pela sigla C12:0, e o ácido graxo oleico, representado por C18:1 (9), pois apresenta dezoito átomos de carbono e uma insaturação no carbono 9, contando-se a partir do radical metila. O **Quadro 1** apresenta os principais AG encontrados nos TAG. É possível observar que, quanto maior a presença de átomos de carbono na molécula do AG, maior o seu ponto de fusão, fato que se deve ao aumento na atração de *van der Waals* entre as moléculas. Por sua vez, a presença de uma ou mais insaturações diminui o ponto de fusão (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Quadro 1 - Principais ácidos graxos naturalmente encontrados: nomenclatura, estrutura e propriedades.

Ácidos Graxos	Nomenclatura Usual	Estrutura Química	Ponto de Fusão (°C)
C12:0	Ácido Láurico	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44,2
C14:0	Ácido Mirístico	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	53,9
C16:0	Ácido Palmítico	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	63,1
C18:0	Ácido Esteárico	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69,6
C20:0	Ácido Araquídico	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	76,5
C24:0	Ácido Lignocérico	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	86,0
C16:1 (9)	Ácido Palmitoleico	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	-0,5
C18:1 (9)	Ácido Oleico	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	13,4
C18:2 n-6 (9, 12)	Ácido Linoleico	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	-5
C18:3 n-3 (9,12, 15)	Ácido α -Linolênico	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	-11
C20:4 n-6 (5, 8, 11, 14)	Ácido Araquidônico	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	-49,5

Adaptado de (NELSON; COX, 2006).

É amplamente reconhecido que uma dieta rica em gordura representa riscos para o ganho de massa corporal e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, além de resistência periférica à insulina e hipertensão arterial sistêmica. Somado a isso, a qualidade do lipídio consumido também é de fundamental importância para a saúde (VALDES-RAMOS; BENITEZ-ARCINIEGA, 2007). É sabido que o consumo de AGS é responsável pela elevação do colesterol total assim como da LDL-c (*low density lipoprotein – colesterol*) plasmática, o que confere risco para doença aterosclerótica (WHITE, 2009). Já os AGMI não afetam de modo significativo o colesterol circulante, e podem melhorar de modo considerável a resposta à ação da insulina, assim como a produção deste hormônio pelas células beta-pancreáticas (ASTRUP, 2008; LOPEZ et al., 2011).

Os AGPI linoleico e alfa-linolênico, das famílias n-6 e n-3, respectivamente, e precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), de grande importância biológica, são considerados ácidos graxos essenciais (AGE), pois não são sintetizados endogenamente pelo organismo humano, em função da carência de enzimas da classe das dessaturases e hidrogenases. Sua obtenção depende, portanto, da ingestão dietética. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à porção inicial da cadeia, enquanto as dessaturases agem oxidando dois carbonos, formando uma dupla ligação com a configuração *cis*. Desta forma o AL dá origem ao AA e o ALA, ao EPA e DHA. A conversão dos AGE em AGPI-CL é limitada em humanos. É importante

ressaltar que a presença de hormônios femininos como o estrogênio e a progesterona, circulantes em mulheres em idade reprodutiva, proporciona conversão mais eficiente dos AGE em seus derivados de cadeia longa, favorecendo, durante a gestação, melhor suprimento desses nutrientes para o feto (BURDGE, 2004; NAKAMURA; NARA, 2004).

A quantidade circulante e tecidual tanto de AA quanto de EPA e DHA constitui reflexo do consumo dietético (MOZAFFARIAN; WU, 2011). As reações de dessaturação são catalisadas pelas enzimas Δ5 e Δ6 dessaturases e tem sido observada redução na atividade destas enzimas na situação de elevado consumo dietético de AGT (MARTIN et al., 2006).

É importante que seja dada atenção à quantidade consumida de AG das famílias n-6 e n-3, na medida em que competem pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia dos AGPI. Apesar de estas enzimas apresentarem maior afinidade pelos AG n-3, a conversão dos AGPI a partir do ALA é fortemente influenciada pelos teores dietéticos de AL. Assim, o elevado consumo de AL pode prejudicar a conversão do ALA em EPA e DHA (LIOU et al., 2007). O AA e o di-homo-gamalinoleico (20:3 n-6) são precursores dos prostanóides das séries 1 e 2, que dão origem a prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos com ação inflamatória no organismo. Já o EPA é precursor dos prostanóides da série 3 que apresentam propriedades antitrombóticas e anti-inflamatórias (CALDER, 2006). Desta forma, tem sido recomendada a redução do consumo de AG n-6 em relação aos AG da família n-3 (SIMOPOULOS, 2004; SANTOS et al., 2013). A **Figura 1** ilustra o metabolismo dos AGPI das famílias n-6 e n-3.

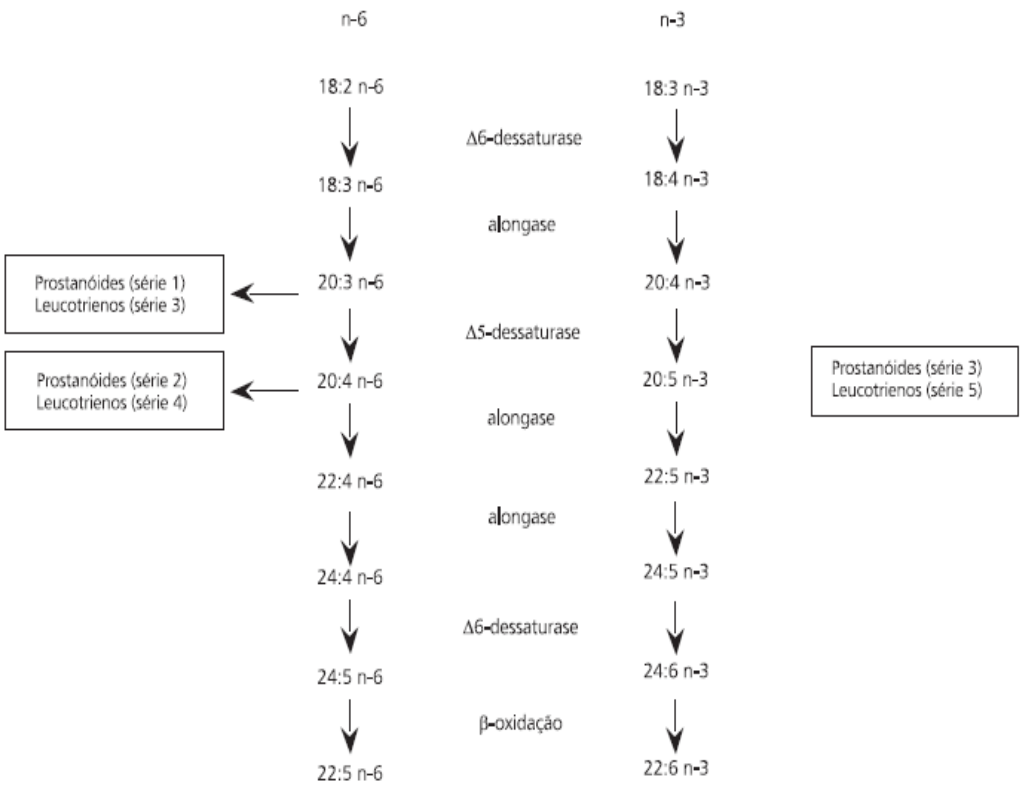


Figura 1 - Metabolismo de ácidos graxos das famílias n-6 e n-3.
Fonte: (INNIS, 2003; MARTIN et al., 2006 – adaptado)

Tem sido demonstrado, nos últimos anos, que o consumo de AGPI n-3 guarda relação com a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV), por regular os lipídios plasmáticos, por meio da redução dos triacilgliceróis e do aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL, *High Density Lipoprotein*), da inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária, além da ação anti-inflamatória e antitrombótica (BALK et al., 2006; DE ROOS; MAVROMMATIS; BROUWER, 2009). Adicionalmente, foram demonstrados efeitos benéficos no desenvolvimento cognitivo de crianças após o consumo materno destes AG nos períodos de gestação e lactação (EILANDER et al., 2007).

Os ácidos graxos n-6 estão presentes, principalmente, nos óleos de milho e girassol, enquanto o ALA é fornecido, preponderantemente pelo óleo de canola e, em quantidades menores, pelo óleo de soja. O óleo de semente de linhaça é excelente fonte de ALA, no entanto, não é utilizado regularmente na alimentação humana. Os derivados de cadeia longa do ALA podem ser obtidos por meio do consumo de peixes de águas muito frias e profundas, assim como pelo consumo do óleo destes peixes (HOSSAIN,

2011). Estes animais utilizam como fontes alimentares os fitoplanctons e zooplanctons que dispõem de concentrações elevadas de AGPI n-3 e são capazes de alongar e dessaturar estes AG, formando EPA e DHA (AKPINAR; GÖRGUN; AKPINAR, 2009). É indicado o consumo de refeições contendo peixe duas vezes por semana, como parte de uma dieta saudável, objetivando diminuir o risco cardiovascular, principalmente entre indivíduos com doença arterial coronariana (SANTOS et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a *Food and Agriculture Organization* (FAO), recomendam o consumo de 20-35% de gordura total, até 10% de AGS, de 15-20% de AGMI e de 6–11% de AGPI em relação ao total de energia ingerida diariamente (FAO, 2011).

Modelos experimentais com a utilização de camundongos têm sido adotados em estudos com lipídios, não apenas em razão da disposição anatômica de estruturas internas, semelhante a do organismo humano, mas principalmente, dadas as similaridades genéticas e relativas ao metabolismo lipídico. (LEON, 2005). Constata-se conversão de AL e ALA em seus respectivos derivados de cadeia longa, de forma semelhante à que ocorre em humanos. Neste sentido, nesses modelos experimentais, as reações de dessaturação e alongamento também ocorrem no fígado, promovendo a síntese daqueles AG que são, então, disponibilizados para outros tecidos (WANG et al., 2005). A representação da metabolização de AG em camundongos é ilustrada na **Figura 2**.

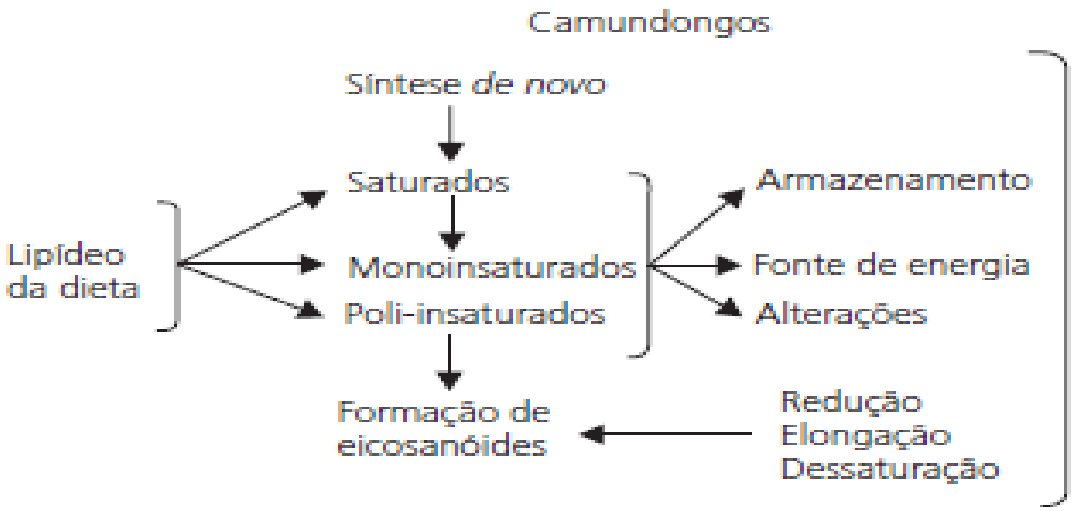


Figura 2 - Representação do metabolismo dos AG em camundongos.
Fonte: (PERINI et al., 2010, adaptado)

2.2 Lipídios em alimentos industrializados

2.2.1 Gordura vegetal parcialmente hidrogenada

A introdução da GVPH no Brasil data das décadas de 50 e 60, com o início da fabricação das margarinas, em substituição à manteiga, em razão das crescentes evidências que associavam o elevado consumo de AGS ao risco cardiovascular aumentado (WILLETT, 2006).

Os ácidos graxos *trans* são isômeros do seu correspondente na configuração *cis* e apresentam os dois átomos de hidrogênio em posições opostas da dupla ligação na cadeia carbônica (HUNTER, 2005). Por suas características estruturais apresentam ponto de fusão mais elevado, quando comparados com os isômeros *cis* correspondentes, porém inferior ao do ácido graxo saturado, que apresenta o mesmo número de carbonos. Desta forma, os AGT podem ser considerados como intermediários entre o ácido graxo insaturado original e outro completamente saturado (RIBEIRO et al., 2007). A **Figura 3** representa a isomeria *cis*, *trans* e o ponto de fusão de determinados ácidos graxos.

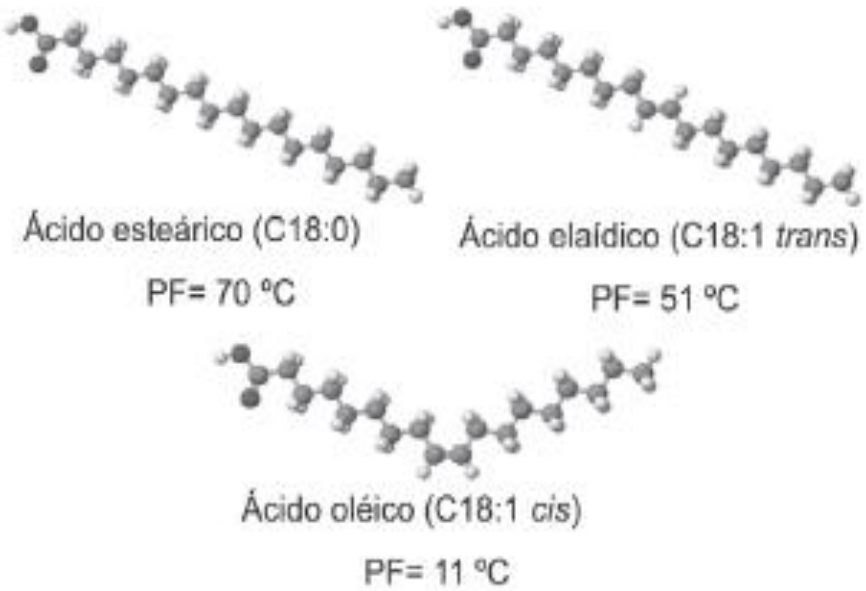


Figura 3 - Estruturas e pontos de fusão dos ácidos graxos esteárico, oléico e elaídico.
Fonte: (RIBEIRO et al., 2007, adaptado).

Os AGT ocorrem de forma natural em ruminantes e estão presentes na forma de ácido linoleico conjugado (CLA) em produtos lácteos, carnes bovinas e caprinas. Os efeitos do CLA sobre a saúde cardiovascular ainda estão sendo investigados, entretanto, já se sabe que não eleva a lipemia na mesma proporção que os AGS (WONSIL; HERBEIN; WATKINS, 1994; FUNCK; BARRERA-ARELLANO; BLOCK, 2006). De outro modo, o ácido elaídico (18:1 (9) *trans*) constitui o isômero *trans* mais frequentemente formado no processo industrial de hidrogenação parcial de óleos vegetais, que consiste na adição de átomos de hidrogênio visando reduzir o grau de insaturação dos AG. Desta forma, a indústria de alimentos consegue a produção de gorduras sólidas, neste aspecto, semelhante às saturadas, com consistência e palatabilidade adequadas à produção de alimentos mais crocantes e com maior tempo de prateleira (SEMMA, 2002). A maior contribuição destes lipídios na dieta se justifica pelo consumo de margarinas, sorvetes, chocolates, produtos de panificação, como pães de queijo, folheados, pão de batata, salgadinhos do tipo *Chips*, molhos para saladas, maionese, cremes para sobremesas e óleos para fritura industrial (BERTOLINO et al., 2006; VARDAVAS et al., 2007).

Os AGT têm sido considerados fatores dietéticos de risco para o desenvolvimento de DCV. O consumo elevado deste tipo de AG está associado ao aumento nos teores séricos de TAG e LDL, redução de HDL e aumento da relação LDL/HDL, além de favorecimento ao desenvolvimento de RI (SALMERON et al., 2001; SUN et al., 2007; MOZAFFARIAN; CLARKE, 2009). Estes AG induzem maior atividade da proteína envolvida na etapa do transporte reverso do colesterol, que transfere o colesterol da HDL para a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, *very low density lipoprotein*) e LDL, reduzindo, assim as concentrações plasmáticas de HDL (MATTHAN et al., 2000). Além disso, foi demonstrado em estudos observacionais, a associação do elevado consumo de AGT com a disfunção endotelial e aumento das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6) e proteína- C- reativa (MOZAFFARIAN et al., 2004; LOPEZ-GARCIA et al., 2005).

Tem sido demonstrado comprometimento da sensibilidade à ação da insulina induzido pelos AGT (IBRAHIM; BASAK; EHTESHAM, 2009). Comparados aos

AGS, os AGT prejudicam a tolerância à glicose, avaliada pelo HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*), devido à maior lipogênese hepática (TETRI et al., 2008). Além disso, AGT também são capazes de induzir a redução da síntese das proteínas estimuladoras de acilação, responsáveis pela captação de triacilgliceróis pelo adipócito, assim como pela captação de glicose independente da ação da insulina. Desta forma, a diminuição dessas proteínas, em razão do consumo de AGT, poderia contribuir de forma indireta para a ocorrência da resistência periférica à insulina, considerada a principal alteração que precede a predisposição à síndrome metabólica (BENDSEN et al., 2011), um transtorno complexo, que associa a obesidade central a fatores de risco cardiovasculares como hiperglicemia, hipertensão arterial e dislipidemia (ALBERTI et al., 2009).

Em um estudo experimental com ratas, Osso et al. (2008) demonstraram que o consumo de AGT no período de lactação levou a alterações do metabolismo glicídico na prole adulta. Neste estudo, comparados ao grupo controle, os animais, aos 60 dias de vida, cujas mães consumiram AGT no período crítico de desenvolvimento apresentaram valores de insulinemia, razão insulinemia/glicemia e HOMA-IR significativamente superiores. Os autores sugeriram que a ingestão deste tipo de AG, no início da vida, está relacionada ao estabelecimento de RI na prole, quando adulta.

Adicionalmente, tem sido observado que o consumo de AGT pode aumentar o ganho de massa corporal e acúmulo de gordura, particularmente a visceral (KOH-BANERJEE et al., 2003). Aliado a isto, existe o fato de que estes tipos de ácidos graxos dietéticos são transportados pelo plasma e estocados em órgãos e tecidos. A este respeito, Clifton et al. (2004) mostraram que a redução do consumo de AGT promoveu rápida diminuição do estoque destes AG no tecido adiposo dos indivíduos avaliados. Estes autores também demonstraram associação positiva entre o conteúdo de AGT no tecido adiposo e risco de infarto do miocárdio. Silva et al. (2006) mostraram que a ingestão de dietas ricas em GVPH, durante o período perinatal, promoveu na prole jovem de ratas, acúmulo dessa gordura no tecido adiposo branco, além de elevação da adipogênese, comparado aos animais controle.

Em razão das evidências científicas relativas aos efeitos deletérios do consumo de AGT, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou em 2003, por meio da resolução RDC n° 360, a obrigatoriedade para produtos industrializados quanto à descrição, no rótulo, de informação relativa à quantidade de

AGT presente na porção do alimento (ANVISA, 2003). Posteriormente, foi regulamentado que, para ser denominado "zero *trans*", o alimento precisa apresentar quantidades iguais ou inferiores a 0,2 g de AGT por porção (ANVISA, 2010). Além disso, é recomendado que a ingestão deste tipo de AG, proveniente de alimentos industrializados, seja a menor possível, não devendo ultrapassar 2 g/dia ou 1% do valor energético total (SANTOS et al., 2013). Em razão dessas exigências, as indústrias alimentícias brasileiras precisaram passar a elaborar produtos adequados às normas vigentes. Neste contexto, passaram a utilizar como matéria prima, gorduras com quantidades reduzidas de AGT e a desenvolver novas tecnologias para obtenção de produtos com as mesmas características organolépticas exigidas pelo consumidor brasileiro (GAIDUS; DALLAROSA; SILVA, 2007; AUED-PIMENTEL; SILVA; KUS, 2009). Neste sentido, dois tipos de gordura têm sido utilizadas em substituição à GVPH: o óleo de palma e a gordura interesterificada (HAYES; PRONCZUK, 2010).

2.2.2 O óleo de palma como substituto da gordura vegetal parcialmente hidrogenada

Também conhecido como azeite de dendê, o óleo de palma é extraído da palma (*Elaesis guineensis*), uma planta originada da África e cultivada no Brasil desde o século XVII, da qual também é retirado o óleo de palmiste (MUKHERJEE; MITRA, 2009; BRASIL, 2011). O OP é obtido a partir da prensagem mecânica, a frio, do mesocarpo da planta, enquanto o óleo de palmiste (oleína) é extraído da amêndoa dos frutos. Da oleína pode ser formada a estearina sólida, utilizada na fabricação de ração animal (HASSAN, 1988).

O OP não contém AGT e é composto por 50,2% de AGS; 39,3% de AGMI e 10,5% de AGPI. Os ácidos graxos saturados predominantes são o ácido palmítico (44%) e o esteárico (4,5%) e, dentre os mono e poli-insaturados, predominam o oleico (39,2%) e linoleico (10,1%), respectivamente (EBONG; OWU; ISONG, 1999; ONG; GOH, 2002). Já óleo de palmiste apresenta 47% de ácido láurico e 16% de mirístico (AGROPALMA, 2011). O interesse da indústria na utilização do OP se deve ao fato desta gordura ser resistente à oxidação, em razão da presença de antioxidantes como o tocoferol, além de apresentar boa estabilidade e textura sólida em temperatura ambiente,

dado seu elevado teor de AGS (BERGER, 2007; OGUNTIBEJU; ESTERHUYSE; TRUTER, 2009).

Considerada a localização dos ácidos graxos nos TAG do OP, são observados maiores teores do AGMI oleico na posição sn-2 e dos AGS palmítico e esteárico nas posições sn-1 e sn-3 que, conforme anteriormente mencionado, são preferencialmente hidrolisados pela lipase pancreática. Esta característica confere ao OP implicações metabólicas distintas daquelas atribuídas aos alimentos que apresentam elevado conteúdo de AGS localizados na posição sn-2 dos TAG, como acontece no leite, banha e toucinho. Esta última configuração é capaz de promover maior concentração de lipídios pós-prandiais, conferindo risco aumentado para as DCV (D'AGOSTINI; GIOIELLI, 2002; KARUPAIAH; SUNDRAM, 2007). De qualquer forma, é reconhecido que o elevado consumo de alimentos contendo OP influencia o perfil lipídico sanguíneo, promovendo aumento no teor plasmático de ácido palmítico (EDEM, 2002).

A literatura, entretanto, ainda é bastante controversa no que diz respeito à influência do consumo destas fontes lipídicas na saúde. De acordo com Muller et al. (1998), o OP conferiu efeitos benéficos ao perfil lipídico plasmático, uma vez que produziu aumento na HDL e redução da relação LDL/HDL, comparativamente aos efeitos produzidos com o consumo de AGT. Estes dados foram resultantes da comparação entre três tipos de margarinas, consumidas por vinte e sete mulheres jovens por um período de dezessete dias, contendo OP, GVPH ou AGPI. Neste sentido, do ponto de vista nutricional, o OP poderia ser considerado boa alternativa para a substituição da GVPH nos alimentos. Entretanto, em 2003, a OMS alertou que havia fortes evidências de que o elevado consumo de OP aumentaria o risco para o desenvolvimento das DCV (WHO, 2003).

O estudo de Silva et al. (2005) comparou os efeitos metabólicos produzidos por dietas contendo óleo de palma ou óleo de soja parcialmente hidrogenado, como fontes lipídicas, oferecidas a ratas *Wistar* durante a lactação e até os 45 dias de vida dos filhotes. A cria que recebeu OP consumiu maior quantidade de ração e apresentou massa corporal significativamente superior a dos filhotes tratados com dieta à base de GVPH. O maior ganho ponderal no grupo que consumiu OP pôde ser explicado pela aumentada taxa de lipogênese que implicou na elevação das massas dos tecidos

adiposos perirrenal, retroperitoneal e epididimal. Entretanto, as concentrações séricas de colesterol total e TAG foram maiores no grupo que recebeu GVPH.

Vega-López et al. (2006) realizaram um estudo com homens e mulheres com idade igual ou superior a 50 anos e compararam os efeitos do consumo de OP, GVPH e de gorduras ricas em AGMI (óleo de canola) e AGPI (óleo de soja) na homeostase glicêmica e no metabolismo das lipoproteínas. A GVPH e o OP elevaram as concentrações de LDL quando comparados aos óleos de soja e de canola. Neste estudo, portanto, o OP mostrou efeitos hipercolesterolêmicos similares ao de outras gorduras saturadas ou ricas em AGT, quando comparado a outros óleos ricos em AGMI e AGPI.

Um estudo randomizado duplo cego, realizado com 32 homens saudáveis, comparou o efeito do ácido palmítico, proveniente de fonte vegetal (oleína de palma) e de fonte animal (banha de porco), com o óleo de soja (rico em AGPI), sobre o perfil lipídico, glicemia, insulinemia e marcadores inflamatórios destes indivíduos. Foi observado aumento significativo de LDL e colesterol total nos grupos que receberam oleína de palma e banha de porco, quando comparados ao grupo que consumiu soja como fonte lipídica, entretanto, não houve diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose e insulina entre os grupos (THOLSTRUP; HJERPSTED; RAFF, 2011).

2.2.3 Gordura interesterificada como substituta da gordura vegetal parcialmente hidrogenada

Com a finalidade de se obter produtos com características organolépticas semelhantes àquelas verificadas em gêneros alimentícios que apresentam em sua composição a GVPH, a indústria tem utilizado o processo de interesterificação como alternativa para a substituição deste tipo de gordura, uma vez que esta tecnologia facilita os processos de produção, aumenta o tempo de prateleira e confere consistência desejada ao produto em temperatura ambiente ou sob refrigeração (TARRAGO-TRANI et al., 2006).

A interesterificação consiste em se misturar vários tipos de óleos e/ou gorduras vegetais, promovendo a redistribuição dos AG na molécula do TAG, por meio do rompimento simultâneo das ligações éster existentes e formação de novas ligações nas moléculas glicerídicas. Deste modo, após a hidrólise, os AG permanecem inalterados e sofrem rearranjo aleatório em cada posição (sn-1, sn-2 e sn-3). O resultado é a formação

de gorduras com baixo teor ou desprovidas de AGT (RIBEIRO et al., 2007). Há três tipos de reações por meio das quais a interesterificação pode ocorrer: acidólise, alcoólise e transesterificação. A primeira é caracterizada pela troca de radicais acil entre uma mólecula lipídica e ácidos graxos livres (AGL); na segunda, se utiliza o composto lipídico e outro alcoólico, e a terceira, compreende o rearranjo dos AG no TAG, constituindo o processo mais usual de interesterificação (BERRY, 2009). Embora o rearranjo dos AG no TAG, não implique em alteração nos tipos de AG presentes nas novas moléculas lipídicas, comparadas às estruturas iniciais, os novos TAG, produzidos no processo de interesterificação, passam a apresentar propriedades físicas, como ponto de fusão, curva de sólidos, espalhabilidade e estrutura cristalina, distintas do composto inicial (RACT; GIOIELLI, 2008). **(Figura 4).**

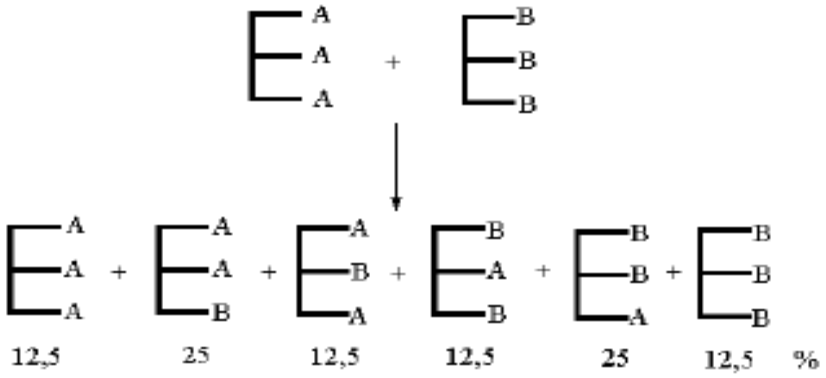


Figura 4 - Esquema do processo de interesterificação entre dois triacilglicerois distintos. Fonte: (GUNSTONE; PADLEY, 1997, adaptado).

Para a produção da gordura interesterificada, duas técnicas industriais são utilizadas: a interesterificação enzimática e a química. Na primeira, são utilizados biocatalisadores, tais como lipases microbianas estéreo específicas, que liberam os AG do glicerol (RODRIGUES; GIOIELLI, 2003). A vantagem desta técnica consiste no fato de que estas enzimas permitem a clivagem específica de AG nas diferentes posições no TAG. Desta forma, é possível a seleção de enzimas com afinidade para a posição sn-2 e, assim, inserir AG previamente definidos, como AGMI e AGPI-CL, por exemplo, proporcionando melhores respostas metabólicas associadas à estes AG, tendo em vista a maior afinidade da lipase pancreática pela posição sn-2, como descrito anteriormente (D'AGOSTINI; GIOIELLI., 2002). No procedimento químico, largamente empregado

em razão do seu baixo custo, são utilizados catalizadores que promovem rearranjo dos AG de forma aleatória, mediante aquecimento. O processo termina com adição de água, que inativa o catalisador, obtendo-se um produto de textura mais sólida (SILVA; ESCOBEDO; GIOIELLI, 2008). Neste caso, o catalisador aplicado com maior frequência é o metóxido de sódio, embora outras bases, ácidos e metais estejam disponíveis (RIBEIRO et al., 2007).

Informações conclusivas acerca dos efeitos do rearranjo de AG na gordura interesterificada sobre parâmetros metabólicos, relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose bem como aos riscos cardiovasculares ainda não estão disponíveis. Contudo, cabe ressaltar que há grande predominância de AGS na gordura interesterificada de utilização industrial (SANTOS et al., 2013). A indústria alimentícia brasileira utiliza gorduras confeccionadas a partir da mistura do óleo de palma refinado, interesterificado com o óleo de soja e, por isso, livres de AGT, porém, ricas em AGS, uma vez que o OP é utilizado como matéria prima (GRIMALDI; GONÇALVES; ANDO, 2005). A mistura de óleo líquido e óleo totalmente hidrogenado é utilizada para a produção de margarinas com teores elevados de AGPI e reduzidos de AGT. A título de exemplo, a mistura contendo óleo de soja líquido e óleo de soja totalmente hidrogenado, é submetida ao processo de interesterificação, para obtenção de margarina cremosa, composta por 51,5 % de AGPI e 1,6 % de AGT (LIST et al., 1995).

Kritchevsky et al. (2002) realizaram uma série de experimentos, em ratos, destinados a avaliar a aterogenicidade de gorduras apresentando diferentes composições e posicionamento dos AG na molécula do TAG. Os autores sugeriram que elevadas concentrações de TAG, contendo ácido palmítico na posição sn-2, ao invés do ácido esteárico, estão associadas a alterações na aterogênese. Adicionalmente, esses autores observaram que a interesterificação química do OP produziu efeitos mais aterogênicos do que os observados para o OP natural. Foi verificado, ainda, que a banha de porco, composta majoritariamente por ácido palmítico na posição sn-2, produziu efeitos mais aterogênicos do que as gorduras com menor proporção deste AG nesta mesma posição.

Sundram et al. (2007) compararam os efeitos do consumo de dietas ricas em gordura *trans*, interesterificada ou saturada, sobre as concentrações plasmáticas de lipoproteínas, glicose, insulina e peptídeo–C. Após quatro semanas de tratamento dietético, os grupos de indivíduos que consumiram as dietas ricas em gordura *trans* ou interesterificada, apresentaram aumento significativo na relação LDL/HDL-colesterol

bem como na glicemia de jejum. O grupo que recebeu a dieta com gordura interesterificada apresentou valores de glicemia cerca de 20% mais elevados do que o grupo que consumiu a dieta rica em gordura saturada. A insulinemia de jejum foi 10% menor no grupo que recebeu gordura *trans* e, 22% menor, no grupo que consumiu a gordura interesterificada, que também apresentou os menores teores de peptídeo-C e os maiores valores de glicemia pós-prandial, comparados aos demais.

Posteriormente, Robinson et al (2009) avaliaram os efeitos da gordura interesterificada sobre os fatores de risco para DM2 e DCV em indivíduos obesos e eutróficos. Os autores quantificaram as concentrações de TAG, colesterol, glicose, insulina e AGL, seis horas após o consumo de 1 g de gordura interesterificada por Kg de massa corporal. Nestas condições não foram observadas alterações na glicemia, insulinemia, AGL ou colesterolemia pós-prandial. Também não foram verificadas modificações nas concentrações plasmáticas de TAG pós-prandial nos indivíduos eutróficos, entretanto, entre os obesos, o consumo da gordura interesterificada determinou aumento de 85% no conteúdo circulante destes compostos.

2.3 Programação metabólica

2.3.1 Contextualização conceitual

A designação “programação metabólica” ou “metabolic imprinting” diz respeito ao fenômeno relacionado às alterações epigenéticas, estabelecidas durante os períodos críticos do desenvolvimento orgânico (gestação e lactação), em razão de estímulos ou estresses de diferentes naturezas, incluindo nutricional, que são capazes de gerar modificações moleculares e funcionais que podem se tornar permanentes. Atribui-se a este processo, possível origem da vulnerabilidade individual às desordens metabólicas como obesidade, DCV e DM2, desenvolvidas na maturidade (GLUCKMAN et al., 2005; LEVIN, 2006).

Widdowson e McCance (1963) estão entre os primeiros autores a reportarem resultados acerca de alterações na massa e composição corporais de ratos, persistentes na vida adulta, decorrentes de desnutrição, restrita aos primeiros dias de vida pós-natal. Cerca de 10 anos depois, em 1974, o termo “Programação” foi introduzido na literatura científica pelo Professor Gunter Dorner, ex-chefe do Instituto Experimental de

Endocrinologia do Hospital Charité, na Alemanha. Em um artigo de revisão, apresentando uma série de dados clínicos e experimentais, Dorner concluiu que as concentrações disponíveis de hormônios, metabólitos e neurotransmissores, durante períodos iniciais do desenvolvimento, seriam capazes de programar o indivíduo no que diz respeito aos aspectos funcionais, predisposição a algumas doenças, desenvolvimento cerebral, bem como disfunção reprodutiva na idade adulta (DORNER, 1975). Dorner também teorizou acerca da possibilidade de ocorrer interação entre o material genético do indivíduo e a sua exposição aos fatores ambientais, durante as etapas iniciais do desenvolvimento orgânico, capazes de influenciar o metabolismo e a funcionalidade de órgãos e tecidos na maturidade (SCHMIDT et al., 2001; OZANNE; FERNANDEC-TWINN; HALES, 2004).

O conceito originalmente atribuído à programação metabólica tem sido questionado, na medida em que pressupõe, de forma determinista, o desenvolvimento de enfermidades na vida adulta. Neste sentido, foi proposto o termo “plasticidade ontogenética”, caracterizando o conjunto de processos capazes de gerar fenótipos alternativos, dada a interação entre o genótipo e fatores ambientais, durante os períodos críticos do desenvolvimento. Neste período há maior probabilidade de ocorrer alterações ontogenéticas, entretanto, não se pode afirmar, categoricamente, que ocorrerão (GLUCKMAN; HANSON, 2007).

Mais recentemente, os prováveis mecanismos envolvidos com o estabelecimento da programação metabólica ou plasticidade ontogenética têm sido estudados sob a ótica da epigenética, que constitui ramo da ciência que investiga as alterações na função de genes, mitótica e/ou meioticamente hereditárias, não decorrentes de modificações na sequência do DNA, mas que podem persistir por uma ou mais gerações (WU; MORRIS, 2001; BIRD, 2007)..

As alterações epigenéticas podem, portanto, levar a prejuízos na organogênese, modificando a estrutura e função de determinados órgãos e tecidos, e assim, conduzir ao acometimento de doenças em longo prazo. As perturbações fisiológicas, assim produzidas, podem permanecer e serem transmitidas de uma geração para outra, caracterizando o efeito transgeracional (LUCAS, 1994; FOWDEN et al., 2006; WHITELAW; WHITELAW, 2006).

Os mecanismos de regulação epigenética envolvem três processos: metilação do DNA (ligação de grupamento metil ao DNA), modificações das histonas e

“silenciamento” do RNA. Dentre estes, o mais frequente é o primeiro (UMLAUF; FRASER; NAGANO, 2008). Já foi descrito que a nutrição materna inadequada, durante os períodos críticos de desenvolvimento fetal e pós-natal, promove prejuízo no processo de metilação do DNA, aumentando ou diminuindo a expressão de determinados genes chaves para o metabolismo (AGUILERA et al., 2010).

O período de gestação e lactação, portanto, é crítico para a ocorrência de modificações epigenéticas no organismo fetal. Estas alterações podem favorecer o desenvolvimento, na vida adulta, de doenças como obesidade, DM2, hipertensão arterial sistêmica, DCV e câncer (STOCKER; ARCH; CAWTHORNE, 2005). Neste sentido, fortes evidências demonstram que alterações no padrão alimentar materno, tais como, dietas ricas em gordura ou, especificamente, em AGS, ricas em carboidratos ou deficientes em proteínas e diferentes vitaminas e minerais, durante a gestação e lactação, são capazes de aumentar o risco de desenvolvimento de síndrome metabólica na prole adulta (BRUCE; HANSON, 2010; HEERWAGEN et al., 2010).

2.3.2 Ácidos graxos como fatores nutricionais envolvidos na programação metabólica

A composição lipídica da dieta materna constitui um dos fatores determinantes da qualidade dos ácidos graxos que são transferidos para o feto através da placenta e também daqueles secretados no leite materno. Desta forma, a oferta inadequada de ácidos graxos, tanto em quantidade quanto em qualidade, durante a gestação e lactação, pode contribuir para o surgimento de desordens metabólicas futuras no organismo em desenvolvimento (SAMUELSSON et al., 2008). Os mecanismos potenciais da programação decorrente do suprimento inadequado de AG têm relação direta com os estágios chave de diferenciação e divisão celular, que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, fetal ou durante a infância e a adolescência (BUCKLEY et al., 2005).

Durante a vida intrauterina, a transferência placentária de AG é relativamente baixa, já que a eficiência de transporte é maior para a glicose seguida de aminoácidos (HERRERA et al., 2006). Após o nascimento, o organismo da criança se adapta para permitir a digestão e absorção dos constituintes do leite materno, cuja principal fonte energética é o lipídio, que fornece cerca de 50% da energia total deste alimento. Sendo

assim, são esperadas adaptações estruturais, metabólicas e endócrinas no organismo, envolvendo órgãos como fígado, pâncreas, intestino, rins, tecido adiposo, músculo e cérebro, com o objetivo de desenvolver mecanismos não apenas relacionados à homeostase energética, mas também à regulação da fome e saciedade (INNIS, 2011).

É reconhecido para os AG outras importantes ações, além do seu papel como constituinte das frações fosfolipídicas de células e organelas. Por atuarem na regulação da expressão gênica e função de moléculas de sinalização lipídica, envolvidas no controle do apetite e metabolismo energético, entre outros processos, atribui-se aos ácidos graxos estreito envolvimento com os mecanismos relacionados à programação metabólica (WOLMARANS, 2009; MACCARRONE et al., 2010).

A este respeito, já foi documentado que dietas ricas em AGS, consumidas por ratas gestantes e lactantes, promoveram, na prole adulta, alterações como hipertensão arterial sistêmica e disfunção endotelial (KOUKKOU et al., 1998; KHAN et al., 2004). Em outra investigação, envolvendo animais, foi registrada predisposição da prole adulta à resistência à insulina, após o consumo materno de dieta enriquecida com AGS, desde o acasalamento até o desmame, o que não foi observado no grupo experimental cujas mães receberam, durante o mesmo período, dieta mais rica em AGPI n-3 (SIEMELINK et al., 2002). Posteriormente, Ibrahim et al. (2009) investigaram os efeitos da composição lipídica da dieta materna na saúde da prole. As rações oferecidas às ratas, durante a gestação e a lactação, apresentavam conteúdo mais elevado de AL, ALA ou AGT. Os resultados mostraram maiores concentrações plasmáticas de colesterol e AGL na prole das ratas que receberam a dieta contendo AGT, que também se tornou mais propensa ao desenvolvimento de RI na vida adulta. Os autores sugeriram a necessidade de se restringir o consumo desses isômeros nos estágios iniciais da vida.

Consideradas estas evidências, o tipo de ácido graxo, presente na dieta materna, constitui fator ambiental nutricional capaz de promover alterações funcionais (e estruturais) no organismo em desenvolvimento, que se tornam permanentes, programando o indivíduo para o desenvolvimento, em longo prazo, de desordens metabólicas.

2.4 Distribuição da gordura corporal e resistência à insulina

2.4.1 Obesidade e tecido adiposo

A obesidade e o sobrepeso tornaram-se prioridade global na área da saúde, pois é crescente o número de pessoas que se encontram nestas condições (SLIVKOFF-CLARK; JAMES; MANO, 2012). O Índice de Massa Corporal (IMC), representado pela relação entre a massa corporal, em quilogramas (kg), e a estatura, em metros ao quadrado, é o indicador mais amplamente utilizado para a caracterização da obesidade entre indivíduos não atletas. Valores iguais ou superiores a 25 kg/m² apontam para algum grau de excesso de peso, enquanto valores superiores a 30 kg/m² são considerados indicativos de obesidade (WHO, 2004). Segundo a OMS, no ano de 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos, com idade acima de 20 anos, se encontravam acima do peso. Entre os obesos, mais de 200 milhões eram homens e cerca de 300 milhões, mulheres. Além disso, em 2011, mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos também se encontravam acima do peso (WHO, 2013).

A obesidade resulta do balanço inadequado entre a ingestão e o gasto energético e sua etiologia é complexa e multifatorial, envolvendo a interação de fatores genéticos, ambientais, emocionais e relacionados ao estilo de vida (HILL; PETERS, 1998; RANKINEN et al., 2006; GODOY-MATOS et al., 2009). Este distúrbio aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento de DM2, hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio, doença hepática gordurosa não alcoólica, demência, apneia obstrutiva do sono e diversos tipos de câncer (BLUHER, 2013). Pela primeira vez, foi reportado declínio significativo na expectativa de vida até 2020, como consequência das comorbidades associadas à obesidade, principalmente à aterosclerose, DM2 e câncer (OLSHANSKY et al., 2005; WHO, 2007). Tem sido descrito que diferenças individuais na composição corporal, distribuição e função do tecido adiposo podem contribuir de formas distintas na gênese das comorbidades associadas à obesidade (MULLER et al., 2012).

O tecido adiposo humano é classificado em tecido adiposo marrom, com atividade termogênica, e tecido adiposo branco, que possui funções mais abrangentes do que simplesmente armazenar gordura (DULLOO et al., 2010). Além de conferir ao organismo proteção mecânica e isolamento térmico, o tecido adiposo branco apresenta

importante função nos processos metabólicos e fisiológicos, já que produz substâncias com ações endócrinas, parácrinas e autócrinas, denominadas adipocinas. Dentre estas, se incluem a leptina, a adiponectina, interleucinas, resistina, TNF-α e o ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Este tecido é constituído por diferentes tipos de células, tais como fibroblastos, pré-adipócitos, adipócitos maduros e macrófagos e possui localização tanto visceral, quanto subcutânea (SANCHEZ-MUNOZ et al., 2005).

A hipertrofia dos adipócitos localizados na região visceral é intensamente influenciada pela dieta e está relacionada à maior suceptibilidade de desenvolvimento das doenças associadas à obesidade, como a RI (DONOHOE; DOYLE; REYNOLDS, 2011; PATEL; ABATE, 2013). Por outro lado, os depósitos subcutâneos são menos ativos metabolicamente, embora secretem mais leptina e adiponectina e menos AGL. O aumento do estoque de lipídios neste compartimento está associado à hiperleptinemia e resistência à ação central desta adipocina, o que torna o indivíduo mais susceptível ao ganho de massa corporal (SMITH et al., 2001).

O tecido adiposo inicia seu desenvolvimento no útero, sendo os adipócitos originados de células-tronco, com potencial para se tornar tecido adiposo marrom ou branco (SMAS; SUL, 1995). Após o nascimento, ocorre rápida expansão do tecido adiposo, como resultado do aumento do tamanho e do número de células. O número de adipócitos pode variar em função de alterações no complexo mecanismo de proliferação e diferenciação do pré-adipócito em adipócito maduro (FONSECA-ALANIZ et al., 2006), denominado adipogênese. Este processo é reconhecidamente sensível ao ambiente nutricional materno durante as fases de gestação e lactação (MUHLHAUSLER; SMITH, 2009). Há referências acerca do fato de que, na vida adulta, a taxa de proliferação de adipócitos é reduzida, reforçando a ideia de que os períodos pré e pós-natal são cruciais para o desenvolvimento e formação do tecido adiposo (STRAWFORD et al., 2004; SPALDING et al., 2008).

Tem sido relatado que o excesso ou a restrição alimentar, durante os períodos críticos de desenvolvimento, são responsáveis por maior adipogênese, assim como pela maior capacidade de armazenamento lipídico ou lipogênese (FERNANDEZ-TWINN et al., 2005; MUHLHAUSLER; DUFFIELD; MCMILLEN, 2007). Adipócitos hipertróficos e hiperplásicos apresentam menor densidade de receptores de insulina e elevada densidade de receptores beta-3 adrenérgicos, aumentando a taxa de lipólise e

favorecendo a liberação de AGL que, como consequência, provocam aumento na produção de radicais livres oxigênio-derivados, indução de RI, sinergismo na ação de IL-6 e TNF-α assim como indução de apoptose em células beta pancreáticas adultas (COTTRELL; OZANNE, 2008). Juntos, estes efeitos são categorizados como lipotoxicidade, que é responsável por lesões anatômicas e funcionais em diferentes linhagens celulares. A disfunção do tecido adiposo, bem como a lipotoxicidade, provocadas pela obesidade, constituem processos que explicam o estado pró-inflamatório e a RI característica do organismo nesta condição (DENG; SCHERER, 2010; KLUTH et al., 2011).

2.4.2 Resistência à insulina induzida pela obesidade

Glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída são referidas como estágio de pré-diabetes, e constituem fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 e DCV (EEG-OLOFSSON et al., 2009).

A insulina é um hormônio com ação periférica anabólica, responsável por inúmeras funções como, aumento da captação de glicose, principalmente no músculo e tecido adiposo; estímulo à síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio; inibição da produção hepática de glicose e inibição da lipólise e da proteólise. Adicionalmente, o hormônio atua no transporte de íons e aminoácidos, na proliferação e diferenciação celulares e na síntese endotelial de óxido nítrico (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

A ação deste hormônio é iniciada com a sua ligação ao receptor de insulina (IR), uma proteína heterotetramérica, com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β, localizada na membrana celular. A ligação extracelular com a subunidade α transmite um sinal através da membrana plasmática que ativa o domínio da tirosina quinase da subunidade β. O receptor, em seguida, sofre uma série de reações intramoleculares de fosforilação, em que uma subunidade β fosforila outra adjacente, em múltiplos resíduos específicos de tirosina, aumentando, ainda mais, sua atividade (PESSIN; SALTIEL, 2000).

Após a ativação do IR ocorre a fosforilação, também nos resíduos de tirosina, presentes em vários substratos proteicos intracelulares, incluindo membros da família dos substratos do IR (IRS1, 2, 3, 4), isoformas da proteína adaptadora Shc, membros da

família SIRP (*signal regulatory protein*), Gab-1, Cbl, e APS. A fosforilação da tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia para Src 2 (SH2, *src homology 2*), incluindo a PI3 – quinase (enzima fosfatidil inositol 3, PI3K) (WATSON; PESSIN, 2001). Estudos realizados com camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2 mostraram que na ausência de expressão do IRS1 ocorre discreta RI (ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994). Por outro lado, quando o gene IRS2 não é expresso, observa-se RI e DM2 (WITHERS et al., 1998).

A PI3K é essencial para a translocação do GLUT4 (*glucose transporter 4*) apresentando, portanto, extrema importância no transporte de glicose mediado por insulina. Esta proteína possui ação serina/quinase, interagindo com outras moléculas sinalizadoras como a serina/treonina quinase Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB). A ativação da Akt/PKB resulta no aumento do transporte de glicose e localização permanente do GLUT4 na membrana plasmática. Em paralelo à ativação da PI3K, a insulina estimula a via CAP/Cbl que também contribui para o transporte de glicose, via receptor específico, assim como a cascata da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), envolvida na proliferação e diferenciação celular (BAUMANN et al., 2000). A **Figura 5** ilustra a via de sinalização da insulina.

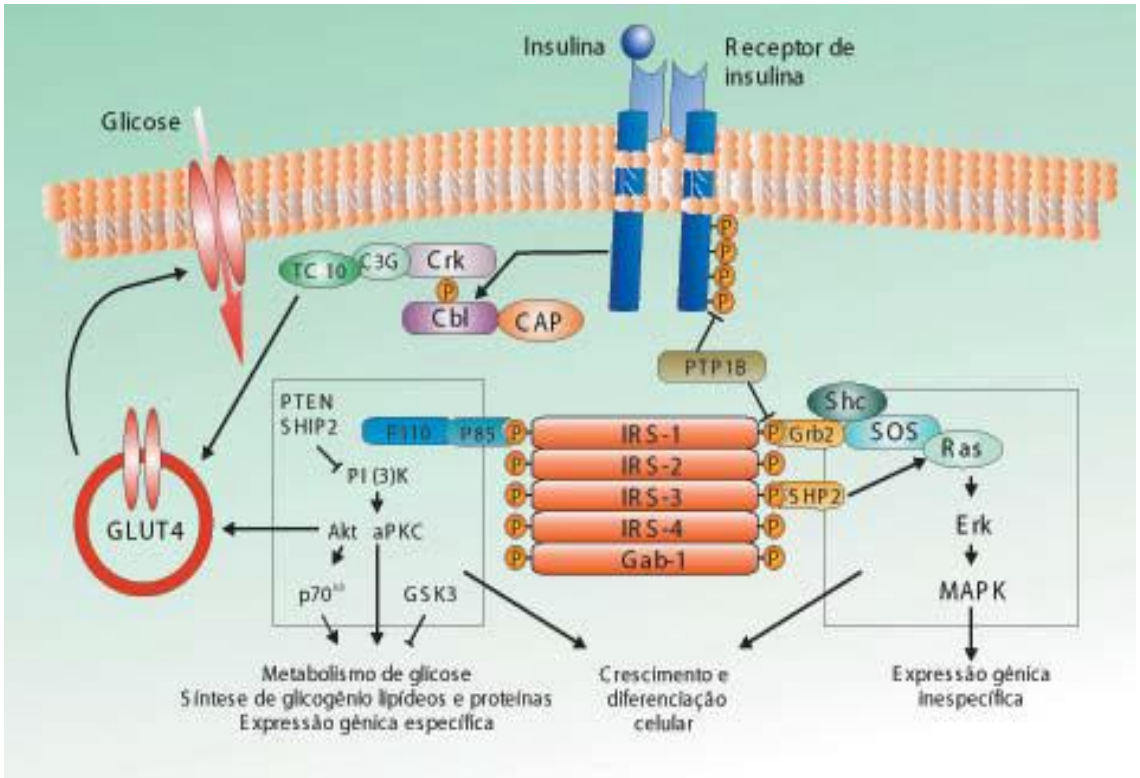


Figura 5 - O receptor de insulina quando ativado promove a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos proteicos, como do IRS, Shc e Cbl, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como PI3K, cascata da MAPK e CAP/Cbl.
Fonte: (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004, adaptado).

A resistência à insulina se caracteriza por alterações nos mecanismos de sinalização deste hormônio, merecendo destaque: a redução da concentração e ativação do IR, modificações na fosforilação do IRS-1 e 2 bem como na atividade das enzimas intracelulares e, ainda, a deficiência na ativação da PI3K, com consequente alteração na translocação do GLUT4, prejudicando a homeostase glicêmica (PETERSEN; SHULMAN, 2006). Com isto as concentrações hormonais se elevam a fim de manter a adequada glicemia bem como permitir a utilização suficiente de glicose pelos tecidos periféricos, incluindo o adiposo, músculo e fígado (WANG; GOALSTONE; DRAZNIN, 2004).

Conforme já salientado, a obesidade está relacionada ao desenvolvimento de RI, e dois mecanismos são implicados neste processo: a liberação de AGL, por lipólise, e a produção de adipocinas pelos adipócitos. O acúmulo de gordura visceral promove maior liberação de AGL para a circulação. Estes AG vão favorecer a inibição, tanto da captação e oxidação da glicose, quanto da síntese de glicogênio, além de estimular a síntese hepática de glicose e, até mesmo, reduzir a secreção de insulina, por induzir a disfunção das células β- pancreáticas (BERGMAN; ADER, 2000). O mecanismo para

elucidar o papel dos AGL na RI foi inicialmente proposto por Randle et al. (1963). Segundo estes autores, AGL promovem aumento das razões acetil CoA/CoA e NADH/NAD^+ que, por sua vez, leva à inativação da enzima piruvato desidrogenase, aumentando as concentrações intracelulares de citrato e inibindo a fosfofrutoquinase, enzima chave na via glicolítica. Desta forma, ocorre aumento da glicose-6-fosfato, com consequente inibição da atividade da hexoquinase II, resultando em elevação dos teores intracelulares de glicose e redução da captação plasmática via GLUT4. Alternativamente, também foi sugerido ocorrer inativação dos receptores de insulina, já que as AGL circulantes reduzem a fosforilação insulino-estimulada do IRS-1 na tirosina e, consequentemente, da PI3K, inibindo a translocação do GLUT4, o que leva à menor captação de glicose (SHULMAN, 2000).

Considerando a implicação das citocinas liberadas pelo tecido adiposo em processos relacionados à RI, cabe salientar que a obesidade tem sido considerada um processo inflamatório crônico de baixa intensidade (FLORES; BARQUERA; CARRIÓN, 2006). Neste sentido, já foi descrito que a liberação de TNF-α, IL-1β e IL-6 promove fosforilação inibitória de resíduos de serina da proteína IRS-1, por meio da ação de quinases, desencadeando a RI (TAUBES, 2009).

Adicionalmente, outras adipocinas exercem papel importante no desenvolvimento da RI. A leptina atua no sistema nervoso central, promovendo inibição da ingestão alimentar e aumento no gasto energético (HALAAS; FRIEDMAN, 1997). Seus efeitos também se estendem ao metabolismo lipídico, na medida em que promove aumento da oxidação lipídica no músculo esquelético e no fígado e reduz a síntese de TAG. A RI, portanto, pode ser decorrente, entre outros fatores, de estados de deficiência ou resistência à leptina (ASILMAZ et al., 2004). De outro modo, a adiponectina é responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina. Sabe-se que o acúmulo de gordura visceral está envolvido na diminuição da secreção desta adipocina, o que explicaria seu papel na RI (MUHLHAUSLER; SMITH, 2009).

3 HIPÓTESE

A nutrição materna, durante os períodos críticos de desenvolvimento, é determinante para o risco de alterações metabólicas e funcionais, estabelecidas no organismo do feto e/ou neonato, que podem se tornar permanentes. Ácidos graxos disponibilizados pela mãe, durante a vida intrauterina, e por meio da secreção láctea, no período de amamentação, podem modular, de maneira distinta, processos celulares capazes de produzir modificações metabólicas na vida adulta. Já foram descritos prejuízos decorrentes do consumo de gordura parcialmente hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, durante esta fase crítica de desenvolvimento. Neste estudo, com camundongos C57BL/6, testamos a hipótese de que o consumo, durante a gestação e lactação, de dietas normolipídicas, contendo gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou as fontes lípídicas alternativas (gordura interesterificada ou óleo de palma), que vêm sendo utilizadas em grande escala pela indústria alimentícia, pode programar a prole para alterações na adiposidade, homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina na vida adulta.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a repercussão sobre a adiposidade, homeostase glicêmica e sensibilidade periférica à insulina, na prole adulta de camundongos C57BL/6 que receberam, durante a gestação e lactação, dietas isoenergéticas e normolipídicas, contendo gordura interesterificada, gordura vegetal parcialmente hidrogenada, óleo de palma ou óleo de soja (grupo controle).

4.2 Objetivos específicos

Em camundongas C57BL/6 que consumiram gordura interesterificada, gordura vegetal parcialmente hidrogenada, óleo de palma ou óleo de soja (grupo controle), durante a gestação e lactação, avaliar:

i. A evolução da massa corporal e do consumo de ração.

Na prole (machos) destes animais, realizar caracterização metabólica, avaliando:

ii. A evolução da massa corporal, desde o nascimento, até os 3 meses de vida;

iii. O consumo de ração, desde o desmame, até os 3 meses de vida;

E ainda, aos 3 meses de vida:

iv. A adiposidade, *in vivo*;

v. A morfometria de adipócitos no tecido adiposo epididimal e inguinal,

vi. A glicemia e insulinemia de jejum;

vii. A sensibilidade periférica à insulina;

viii. O perfil de ácidos graxos incorporados nos lipídios totais dos tecidos adiposos epididimal e inguinal, fígado e plasma.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de referência INJC011 (ANEXO A).

5.2 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, com cerca de dois meses de vida, provenientes do Centro de Criações de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional (LBqN) do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da UFRJ, em condições controladas de temperatura (24 ± 1ºC), ciclo de luminosidade (12h claro e 12h escuro) e livre acesso à ração (Nuvilab®) e à água. Aos três meses de idade as fêmeas acasalaram, na proporção de três fêmeas para um macho. Após detecção de provável prenhez, caracterizada pela presença de *plug* vaginal, as fêmeas foram internadas em gaiolas individuais e aleatoriamente distribuídas em quatro grupos experimentais, cujas designações específicas, descritas a seguir, dizem respeito à ração manipulada à base de caseína, isoenergética e normolipídica, contendo diferentes bases lipídicas, que passaram a consumir, durante toda a gestação e a lactação:

Grupo Controle (GC), constituído por animais que receberam dieta contendo 7% de óleo de soja;

Grupo Gordura Vegetal Parcialmente Hidrogenada (GT), constituído por animais que receberam dieta contendo 6% de GVPH e 1% de óleo de soja;

Grupo Óleo de Palma (GP), constituído por animais que receberam dieta contendo 5% de OP refinado e 2% de óleo de soja;

Grupo Gordura Interesterificada (GI), constituído por animais que receberam dieta contendo 5% de gordura interesterificada e 2% de óleo de soja;

Três dias após o parto, as ninhadas foram ajustadas para seis/oito filhotes por cada mãe para garantir o desempenho lactotrófico. O desmame foi realizado aos 21 dias, quando os filhotes machos foram separados de suas mães e agrupados em gaiolas coletivas, mantendo designação correspondente aos respectivos grupos maternos, passando a receber, até os 60 dias de vida, ração manipulada à base de caseína, contendo 7% de óleo de soja, conforme preconizado para o crescimento (Soja G) pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93) descrito por Reeves et al. (1993). A partir dos 60 dias de vida, e até os três meses de idade, quando foram realizados os experimentos, os animais receberam ração manipulada de manutenção (Soja M), contendo 4% de óleo de soja, conforme recomendado para animais adultos (REEVES et al., 1993). O acesso às rações e agua permaneceu *ad libitum* ao longo de todo o período experimental.

Na **Figura 6** está representado, esquematicamente, o delineamento do estudo realizado.

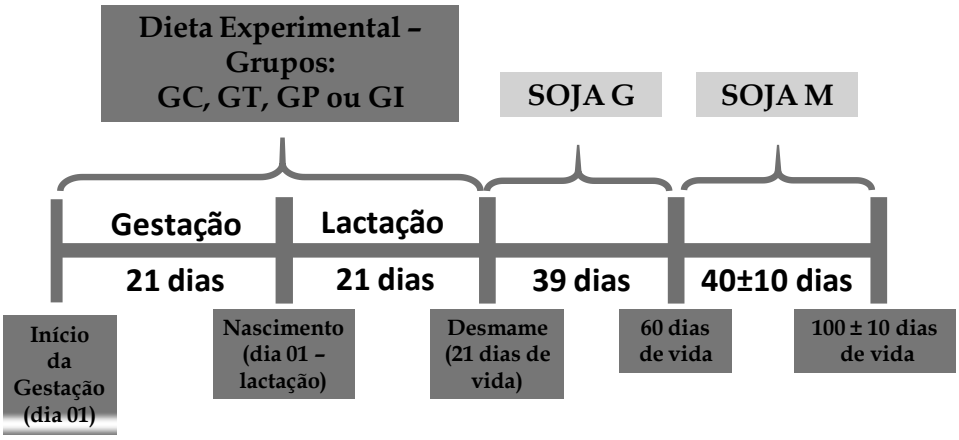


Figura 6 - Delineamento experimental

Os resultados referentes às análises de glicemia, insulinemia, conteúdo de ácidos graxos nos tecidos adiposos e hepático, tomografia computadorizada e morfometria dos tecidos adiposos epididimal e inguinal, referem-se ao *pool* de dois animais de cada grupo.

5.3 Elaboração das rações manipuladas

Todas as rações foram confeccionadas no LBqN e, conforme mencionado na seção anterior, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition*

(REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com modificações na fonte lipídica, exceto para a ração controle (GC). A adição do óleo de soja às rações GT, GP e GI foi destinada a prevenir a deficiência de ácidos graxos essenciais **(Tabelas 1 e 2).**

Tabela 1 – Composição das rações manipuladas, oferecidas aos diferentes grupos experimentais, durante os períodos de gestação e lactação, e até os 60 dias de vida (**Soja G**), segundo as recomendações da AIN-93, com modificações na fonte lipídica para **GT,GP** e **GI**

Ingredientes (g/kg)	**ração GC (Soja G)**	**ração GT**	**ração GP**	**ração GI**
Amido	397,49	397,49	397,49	397,49
Caseína	200	200	200	200
Dextrina	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100
Celulose	50	50	50	50
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50
L-cistina	3	3	3	3
Mix de minerais G[1]	35	35	35	35
Mix de vitaminas[2]	10	10	10	10
BHT	0,014	0,014	0,014	0,014
Óleo de soja	70	10	20	20
Gordura parcialmente hidrogenada	-	60	-	-
Óleo de palma	-	-	50	-
Gordura interesterificada	-	-	-	50
Valor energético (Kcal/kg)	3950	3950	3950	3950

BHT: Butilidroxitolueno; GC = Grupo Controle, GT= Grupo gordura parcialmente hidrogenada, GP = Grupo palma e GI= Grupo gordura interesterificada. [1]Mix de minerais G (mg/Kg dieta): cálcio 5000,0; fósforo 1561,0; potássio 3600,0; enxofre 300,0; sódio 1019,0; cloro 1571,0; magnésio 507,0; ferro 35,0; zinco 30,0; magnésio 10,0; cobre 6,0; iodo 0,2; molibidênio 0,15; selênio 0,15; silício 5,0; cromo 1,0; fluoreto 1,0; níquel 0,5; boro 0,5; lítio 0,1; vanádio 0,1 (AIN 93G); [2]Mix de vitaminas (U/Kg dieta): ácido nicotínico 30mg; pantotenato 15mg; piridoxina 6mg; tiamina 5mg; riboflavina 6mg; ácido fólico 2mg; vitamina K 750µg; D-biotina 200µg; vitamina B-12 25µg; vitamina A 4000 UI; vitamina D3 1000UI; vitamina E 75UI (AIN 93).

Tabela 2 - Composição da ração manipulada de manutenção (**Soja M)**, oferecida a todos os grupos experimentais, após os 60 dias de vida, **(g/kg)**

Ingredientes (g/kg)	**ração Soja M**
Amido	465,69
Caseína	140
Dextrina	155
Sacarose	100
Celulose	50
Bitartarato de colina	2,50
L-cistina	2
Mix de minerais M[1]	35
Mix de vitaminas[2]	10
BHT	0,008
Óleo de soja	40
Valor energético (Kcal/kg)	3800

BHT: Butilhidroxitolueno; [1]Mix de minerais M (mg/Kg dieta): cálcio 5000,0; fósforo 1992,0; potássio 3600,0; enxofre 300,0; sódio 1019,0; cloro 1571,0; magnésio 507,0; ferro 35,0; zinco 30,0; magnésio 10,0; cobre 6,0; iodo 0,2; molibidênio 0,15; selênio 0,15; silício 5,0; cromo 1,0; fluoreto 1,0; níquel 0,5; boro 0,5; lítio 0,1; vanádio 0,1 (AIN 93M). [2]Mix de vitaminas (U/Kg dieta): ácido nicotínico 30mg; pantotenato 15mg; piridoxina 6mg; tiamina 5mg; riboflavina 6mg; ácido fólico 2mg; vitamina K 750µg; D-biotina 200µg; vitamina B-12 25µg; vitamina A 4000 UI; vitamina D3 1000UI; vitamina E 75UI (AIN 93).

Os ingredientes utilizados na confecção das rações experimentais foram adquiridos da Empresa Prag Soluções, exceto as gorduras interesterificada e parcialmente hidrogenada assim como o óleo de palma, que foram doados pela Empresa Triângulo Alimentos Ltda, e o óleo de soja Lisa®, que foi adquirido em mercado local.

De acordo com a empresa fornecedora, na fabricação da GVPH foi utilizado o óleo de soja e, na da gordura interesterificada, uma mistura de quatro diferentes tipos de lipídios, conforme apresentado no **Quadro 2.**

Quadro 2 - Composição lipídica da gordura interesterificada.

Matéria Prima	**%**
Óleo de palmiste	2,5
Estearina de palma	45
Óleo de soja	45
Gordura totalmente hidrogenada	7,5

Fonte: Indústria Triângulo Alimentos Ltda

Após pesagem, as matérias-primas foram transferidas para uma batedeira planetária 12L (Gastromaq, Brasil), sob agitação constante, obedecendo a seguinte sequência de adição dos ingredientes: amido, caseína, dextrina, sacarose, celulose, bitartarato de colina, L-cistina, mistura de minerais, mistura de vitaminas, antioxidante BHT e, por fim, o óleo ou gordura (de acordo com a ração experimental específica). A homogeneização prosseguiu até a completa mistura de todos os ingredientes. Posteriormente, ainda sob agitação, foi acrescentada água à temperatura de ± 60 ºC, gradativamente, até formar uma massa com textura lisa que foi peletizada. Os *pellets* obtidos foram armazenados em sacos Ziploc®, onde foi introduzido gás nitrogênio a fim de evitar a oxidação dos ácidos graxos. As rações foram então armazenadas em freezer – 20 ºC, sendo oferecidas em porções diárias aos animais.

5.4 Determinação do perfil de ácidos graxos das rações experimentais

5.4.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos

Os teores relativos de ácidos graxos dos lipídios totais em amostras das rações experimentais oferecidas aos animais foram determinados por cromatografia gás-líquido, utilizando equipamento Agilent Technologies 7890A CG System, equipado com detector de chama ionizável (FID), acoplado ao software EZChrom Elite CDS (Agilent Technologies, Inc., CA, USA).

A extração de lipídios, saponificação e metilação dos AG foi realizada por metilação direta alcalina conforme método (Ce 2b-11) descrito por AOCS (2011).

Alíquotas de 1g de amostras de cada ração experimental, pesadas em balança digital analítica SHIMADZU, modelo AUY220, foram transferidas para tubos Pirex® e homogeneizadas em 5 mL de NaOH/metanol 0,5 M com o auxílio de bastões de vidro. Posteriormente foi adicionado 1mL de padrão interno (C13:0 em hexano; 5,0 mg/mL) sofrendo aquecimento a 100 ºC por 15 minutos. Após este período, os tubos foram imediata e parcialmente imersos em gelo por aproximadamente 5 minutos e receberam 5 mL de trifluoreto de boro 14 %/metanol sob leve agitação, aquecidos à mesma temperatura anterior, por 2 minutos, e novamente resfriados em gelo. Em seguida,

foram adicionados 3 mL de NaCL saturado e 4 mL de hexano a cada tubo, sob agitação suave. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos para a separação das fases.

Os ésteres metílicos formados na parte superior do tubo foram filtrados e coletados em *vials* de 1 mL, próprios para amostrador automático de cromatógrafo a gás, contendo 50 mg de sulfato de sódio anidro, e estocados em freezer -20 ºC para posterior análise do perfil de ácidos graxos.

5.4.2 Cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos foram separados em coluna capilar de sílica fundida SP-2560 de bis-cianopropil polisiloxano (Supelco Inc., PA, USA) com 100 m x 0,25 µm x 0,2 µm de diâmetro interno, cuja programação de temperatura da coluna foi estabelecida para 100°C, com taxa de aumento de 3°C/minuto alcançando a temperatura de 140°C. A taxa de aumento da temperatura foi de 0,5°C/minuto até alcançar 170°C, sendo depois de 3,2°C/minuto até 220°C, permanecendo nesta temperatura por 35 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram de 250ºC. Os fluxos de gases (Linde Gases, RJ, BR) foram de 0,75 mL/minuto para o gás de arraste (hidrogênio); 25 mL/minuto para o gás auxiliar (nitrogênio); 30 mL/ minuto e 400 mL/ minuto para o hidrogênio e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/75. As injeções foram realizadas por meio de injetor automático e o volume de injeção foi de 1 µL.

Os ácidos graxos metilados foram identificados com base na comparação com o tempo de retenção relativo dos picos do padrão (Nu-Chek Prep. Inc., mistura de ésteres metílicos 463) e a quantificação de cada ácido graxo foi realizada utilizando o padrão interno C13:0 (Sigma-Aldrich) como referência. Os valores foram expressos como mg de AG/ g de ração conforme apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos (mg/g amostra) nos lipídios totais das rações experimentais oferecidas às fêmeas no período de gestação e lactação

Ácidos Graxos	GC		GT		GP		GI	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
Σ AGS	8,56	± 0,38 [a]	15,46	± 3,39 [ab]	25,23	± 3,76 [b]	16,62	± 4,27 [ab]
C16:0	5,83	± 0,26 [a]	8,24	± 1,82 [a]	20,40	± 3,04 [b]	13,35	± 3,31 [ab]
C18:0	1,93	± 0,07 [a]	6,47	± 1,41 [a]	3,53	± 0,54 [a]	2,41	± 0,70 [a]
Σ AGMI	13,90	± 0,32 [a]	21,93	± 4,29 [a]	22,96	± 2,97 [a]	10,62	± 2,51 [a]
C18:1 9c (Oleico)	11,89	± 0,61 [a]	8,26	± 1,74 [a]	21,64	± 3,33 [b]	9,44	± 2,58 [a]
Σ AGPI	22,53	± 2,54 [a]	4,33	± 1,05 [b]	13,00	± 2,19 [ab]	13,32	± 4,26 [ab]
Σ AGT	0,47	± 0,07 [a]	10,86	± 3,03 [b]	0,38	± 0,04 [a]	0,68	± 0,18 [a]
C18:2 n-6 (AL)	20,98	± 1,37 [a]	3,91	± 0,79 [b]	11,92	± 1,56 [ab]	12,15	± 3,55 [ab]
C18:3 n-3 (ALA)	2,07	± 0,17 [a]	0,34	± 0,06 [b]	1,00	± 0,13 [b]	0,86	± 0,27 [b]
Σ AGPI n-3	2,11	± 0,17 [a]	0,35	± 0,06 [b]	1,04	± 0,13 [b]	0,89	± 0,29 [b]
Σ AGPI n-6	21,17	± 1,38 [a]	4,13	± 0,85 [b]	12,21	± 1,60 [ab]	12,32	± 3,60 [ab]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; Σ AGT: somatório dos ácidos graxos *trans*; AL: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; Σ AGPI n-6: somatório de ácidos graxos da família n-6; Σ AGPI n-3: somatório de ácidos graxos da família n-3. Valores representam a média ± erro padrão da média. (n=6/grupo). Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$, determinado de acordo com o pós-teste de Newman-Keuls. GC: grupo controle; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada; GP: grupo óleo de palma e GI: grupo gordura interesterificada.

5.5 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais

Foi realizada avaliação do consumo alimentar e do ganho ponderal durante todo o período experimental. O controle do consumo dietético foi realizado diariamente, desde o início da gestação até o final do desmame, sendo calculada a média dos valores semanais. A massa corporal total das fêmeas durante os períodos de gestação e lactação foi registrada uma vez por semana de modo a evitar excesso de manipulação dos animais, uma vez que constitui fator de estresse, especialmente nos períodos referidos. Por esta razão, não foi realizada pesagem na última semana de gestação, assim como no início da primeira semana de lactação. A massa corporal total da cria, durante a lactação, também foi registrada apenas uma vez por semana, do oitavo dia até o vigésimo primeiro (desmame).

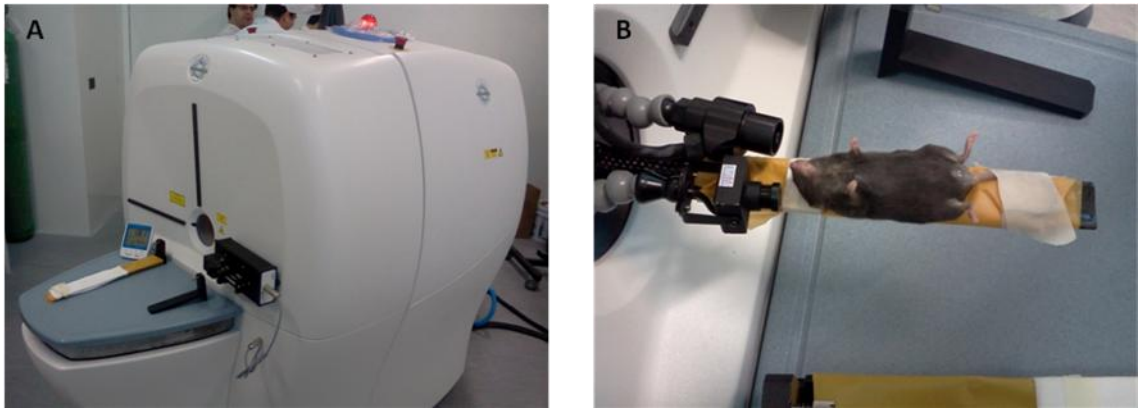
Após o desmame (21° dia de vida), com a transferência dos filhotes machos de cada grupo experimental para gaiolas individuais, as medidas de consumo de ração passaram a ser realizadas diariamente, assim como as referentes à massa corporal total.

Todas as medidas foram tomadas no período da manhã, em balança eletrônica Bioprecisa JH2102.

5.6 Avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada

Aos 90 dias de vida os animais passaram por tomografia computadorizada para análise da distribuição corporal dos depósitos de tecido adiposo. Foi utilizado o equipamento PET/SPECT/Micro-CT (Triumph, Gamma-medica ideas, Canada) (**Figura 7A).** Baseado no protocolo de aquisição helicoidal, por meio de cortes axiais de espessura de 5 mm, colimação de 1,5 mm, 1 *frame* de 512 *slices*, 75 Kvp, 140 microAs, perfazendo total de 2,13 minutos, foram realizadas medidas da espessura do tecido adiposo intra-abdominal e intraperitoneal, na região entre a L4 e L5, sendo selecionadas as áreas de interesse, utilizando o programa Amira versão 4.1.2, por meio da técnica de processamento, LabelField, de acordo com a metodologia proposta por Yoshizumi et al. (1999).

Para a realização deste procedimento, os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg massa corporal), sedados com Xilazina (16 mg/kg massa corporal), via intraperitoneal e, posicionados em decúbito ventral na esteira do equipamento, conforme ilustrado na **Figura 7B**.



Figuras 7A - Foto do equipamento utilizado. **7B -** Representação do posicionamento do camundongo no equipamento (Laboratório PET/SPECT/micro-CT Cenabio/UFRJ)

5.7 Avaliação morfométrica de adipócitos dos tecidos adiposos epididimal e inguinal

5.7.1 Obtenção e processamento de amostras

Uma semana após a realização da tomografia computadorizada, os animais pertencentes a cada um dos quatro grupos experimentais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg massa corporal) e sedados com Xilazina (16 mg/kg massa corporal) e, em seguida, perfundidos com solução salina 0,9 % acrescida de heparina sódica (5000 UI/L), seguida de paraformaldeído 4 % em tampão fosfato de sódio. As amostras dos tecidos adiposos epididimal e inguinal foram retiradas e mantidas por 15 horas em paraformaldeído 4 % em tampão fosfato de sódio.

Seguiu-se o procedimento de desidratação com cinco banhos, iniciando em álcool 70 %, seguido de álcool 95 % (I), álcool 95 % (II) e álcool absoluto (100 %), por 1 hora em cada solução e, álcool absoluto, *overnight*. No dia seguinte, os tecidos foram incubados novamente em álcool absoluto, seguida de dois banhos em xileno, por 1 hora cada. Posteriormente, foram realizados três banhos em parafina por 30 minutos cada, a 60 °C. As amostras foram emblocadas, seccionadas em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (PUTNAM et al., 2012).

5.7.2 Morfometria

As amostras dos tecidos adiposos epididimal e inguinal de cada animal foram fotografadas em microscópio de luz, com objetiva 40 x. Três áreas randômicas de cada amostra de tecido adiposo foram utilizadas para tratamento estatístico, considerando a amostragem de três animais por grupo experimental. Este procedimento foi conduzido em colaboração com o Laboratório de Imunofisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ. A área de cada adipócito foi mensurada em cada fotomicrografia, excluindo-se as células incompletas das extremidades, sendo expressa em μm^2. O programa IMAGE J (*Image Processing and Analysis in Java*) foi utilizado para obtenção desta medida. Para fins estatísticos, foram considerados os dados em triplicata para cada animal de acordo com a equação apresentada a seguir.

$$\text{Dados (em triplicata para cada animal)} = \frac{\text{Área dos adipócitos em pixels}^2}{(1\ \mu\text{m em pixels})^2}$$

5.8 Avaliação da sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica

5.8.1 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG)

Aos 90 dias de vida, e após período de jejum de 8 horas, foi realizado o TTG mediante infusão i.p. de solução de glicose (2 g/kg massa corporal). As glicemias foram determinadas nas amostras de sangue obtidas da veia caudal, nos tempos zero (antes da infusão), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a infusão, utilizando-se glicosímetro (One Tuch-Ultra – Johnson & Johnson Medical).

As glicemias (mg/dL), em função do tempo (minuto), foram plotadas em gráfico e, para a comparação entre os quatro grupos experimentais, foi calculada a área sob a curva (AUC, *Area Under the Curve*) (HEIKKINEN et al., 2007).

5.8.2 Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI)

Aos 100 dias de vida foi realizado o TTI. Após uma hora de jejum, a glicemia basal foi determinada e, em seguida, os animais receberam infusão i.p. de solução de insulina regular (0,75 UI/kg massa corporal). Assim como descrito para o TTG, a glicemia basal (tempo zero) bem como às relativas aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, após a infusão de insulina, foram determinadas nas amostras de sangue obtidas da veia caudal, utilizando-se glicosímetro (One Tuch-Ultra – Johnson & Johnson Medical). Do mesmo modo, as glicemias (mg/dL), em função do tempo (minuto), foram plotadas em gráfico e, para a comparação entre os quatro grupos experimentais, foi calculada a AUC (HEIKKINEN et al., 2007).

5.8.3 Dosagem de insulina plasmática de jejum

Aos 110 dias de vida, após jejum *overnight*, os animais foram contidos, anestesiados com Ketamina (100 mg/kg massa corporal) e sedados com Xilazina (16 mg/kg massa corporal). O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos contendo

EDTA 8% e centrifugado a 3500 rpm, 4ºC, por 5 minutos e, posteriormente, o plasma foi separado e armazenado a -80ºC até a realização de ensaio ELISA (*rat/mouse insulin ELISA kit* Millipore®) para a quantificação das concentrações de insulina.

O ensaio empregado, tipo "sanduíche", com limite de detecção de 0,2 ng/mL e variação ideal de valores entre 0,2 e 10 ng/mL, consiste no direcionamento de um anticorpo de captura, previamente conhecido, ao hormônio de interesse, considerado o antígeno, já fixado na placa de poliestireno. As determinações foram realizadas em duplicata, com leitura em espectrofotômetro (Modulus ™ II Microplate Multimode Reader modelo RS232) a 450 e 590nm, conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL.

5.8.4 Índice de resistência à insulina HOMA-IR

A sensibilidade à insulina foi estimada por meio do modelo de avaliação de resistência à insulina HOMA-IR, validado em ratos, conforme proposto por Cacho et al. (2008).

HOMA-IR = [Glicemia de jejum (mg/dL) x Insulinemia de jejum (µU/mL)] / 2430

5.9 Sacrifício e coleta dos tecidos hepático e adiposos

Aos 110 dias de vida, após a coleta do sangue por punção cardíaca, conforme descrito na seção 5.8.3, os animais tiveram o fígado e os tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico dissecados, pesados em balança digital SHIMADZU, modelo AUY 220 e, imediatamente, congelados a -80ºC até as análises correspondentes.

Os valores de massa dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram somados e, dessa forma, foi caracterizada a obesidade central. Já para a caracterização do acúmulo de gordura visceral, foram somadas as massas correspondentes aos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico (FANTUZZI; MAZZONE, 2007)

5.10 Determinação do perfil de ácidos graxos do fígado e dos tecidos adiposos epididimal e inguinal

Os teores relativos de ácidos graxos dos lipídios totais de amostras de fígado e dos tecidos adiposos epididimal e inguinal dos quatro grupos experimentais foram determinados por cromatografia gás-líquido, exatamente conforme procedimentos descritos nas seções 5.4.1 e 5.4.2, a partir da análise de alíquotas de 150 mg de fígado e 100 mg de cada um dos tecidos adiposos, exceto que para o fígado a razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/25.

5.11 Determinação do perfil de ácidos graxos do plasma

5.11.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos

Na extração de lipídios, saponificação e metilação dos ácidos graxos plasmáticos, foi empregado o método, a frio, descrito por Lepage e Roy (1986), recentemente adaptado por Zhidong et al. (2010).

Alíquotas de 25 µL de padrão interno (C13:0 em hexano; 5,0 mg/mL) foram transferidas para tubos Pirex® que foram evaporados em gás nitrogênio até atingir massa constante em balança digital analítica SHIMADZU modelo AUY220. Em seguida foram adicionados 100 µL de plasma e 2 mL de metanol: tolueno-BHT. Posteriormente, os tubos foram parcialmente imersos em gelo, sendo adicionados, cuidadosamente, 100 µL de solução de cloreto de acetila. Os tubos foram agitados em *vortex* e, em seguida, cobertos com papel alumínio e armazenados em ambiente escuro por 24 horas, a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 500 µL de tolueno-BHT, seguido de 5 mL de solução de carbonato de potássio 6 %. Os tubos foram então agitados em *vortex* por 30 segundos e levados à centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a fase superior foi transferida para outro tubo Pirex® sendo evaporada com gás nitrogênio. Os ésteres metílicos presentes na fase superior, anteriormente evaporada, foram ressuspendidos com a adição de 1 mL de hexano sendo, posteriormente, filtrados e coletados em *vials* de 1 mL, próprios para amostrador automático de cromatógrafo a gás, contendo 50mg de sulfato de sódio anidro e estocados em freezer -20ºC para posterior análise do perfil de ácidos graxos.

5.11.2 Cromatografia gasosa

Os procedimentos e condições referentes à cromatografia gás-líquido, realizada no equipamento Agilent Technologies 7890A CG System, destinada a separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos plasmáticos foram exatamente conforme descritos na seção 5.4.2, exceto que a razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/25.

5.12 Análises estatísticas

Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média e, após a verificação da normalidade da distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk, submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA) com *post hoc* de *Newman-Keuls* para comparação dos quatro grupos experimentais. O nível de significância adotado foi $p<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Consumo alimentar e massa corporal das mães durante os períodos de gestação e lactação

Na **Figura 8** estão representados os resultados relativos ao consumo alimentar de 24 horas médio semanal, expresso em gramas de ração/ grama de massa corporal total, de camundongas durante o período de gestação e lactação. Diferenças significativas somente foram verificadas na última semana da lactação (21º dia), quando os grupos GP e GI mostraram consumo mais elevado do que o do GC.

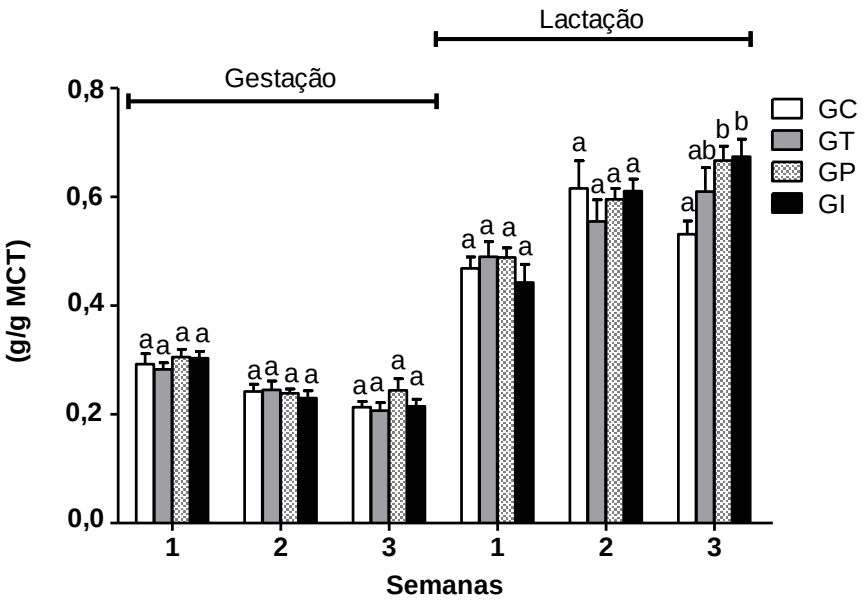


Figura 8 – Consumo alimentar de 24 h médio semanal (g/g massa corporal total, MCT), durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=10; GP: grupo óleo de palma, n=9 e GI: grupo gordura interesterificada, n=12. Letras diferentes, na mesma semana, representam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

A **Figura 9** apresenta os valores relativos à massa corporal total (MCT), expressos em gramas, verificada semanalmente, das camundongas que receberam as rações experimentais durante os períodos de gestação e lactação. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos durante todo o período estudado.

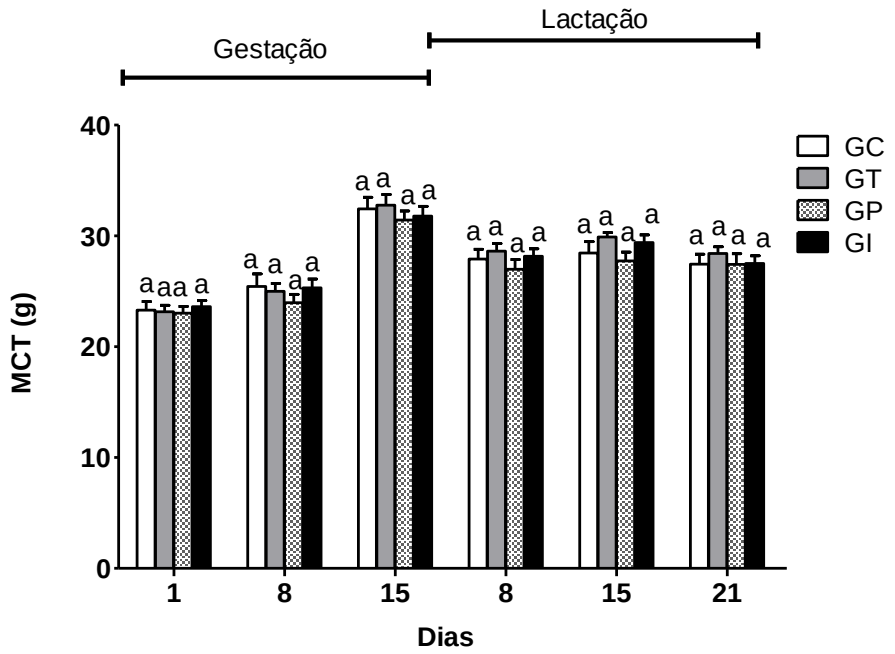


Figura 9 - Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, das camundongas alimentadas com diferentes fontes lipídicas durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=10; GP: grupo óleo de palma, n=9 e GI: grupo gordura interesterificada, n=12.Os valores estão expressos como média ± E.P.M.

6.2 Consumo alimentar e massa corporal da prole (camundongos machos)

A média do consumo alimentar diário, dos filhotes machos pertencentes a cada um dos quatro grupos experimentais, foi calculada ao final de cada semana de acompanhamento pós desmame, até os três meses de vida dos animais. Conforme mostra a **Figura 10**, algumas diferenças pontuais entre os grupos foram observadas, entretanto, nas duas últimas semanas de acompanhamento, assim como na 3ª e 4ª semanas, nenhuma diferença significativa foi mantida. Na 1ª e 2ª semanas, os filhotes cujas mães consumiram dieta contendo gordura interesterificada e palma apresentaram consumo de ração menor (GI: 0,34 ± 0,01g e 0,26 ± 0,01 g, respectivamente; GP: 0,32 ± 0,01 g e 0,24 ± 0,01 g, respectivamente) que o grupo controle (GC: 0,40 ± 0,02 g e 0,32 ± 0,01 g, respectivamente) e o grupo que recebeu GVPH (GT: 0,42 ± 0,02 g e 0,34 ± 0,02, respectivamente). Na 5ª semana bem como na 7ª semana, o consumo do grupo GP foi menor (0,15 ± 0,01 g e 0,15 ± 0,01 g, respectivamente) que o dos demais grupos (GI: 0,20 ± 0,01 g e 0,22 ± 0,01 g; GT: 0,26 ± 0,02 g e 0,23 ± 0,01 g; GC: 0,22 ± 0,01 g e

0,26 ± 0,01 g, respectivamente), e ainda, o do GT, maior do que o dos grupos GC e GI na 5ª semana. Na 6ª semana, diferenças significativas somente foram identificadas entre os grupos GI e GT (GI: 0,24 ± 0,01 g > GT: 0,20 ± 0,01 g). Já na 8ª semana, o consumo do grupo GP foi menor (0,17 ± 0,01 g) do que o dos grupos GI (GI: 0,22 ± 0,01 g) e GC (GC: 0,21 ± 0,01 g).

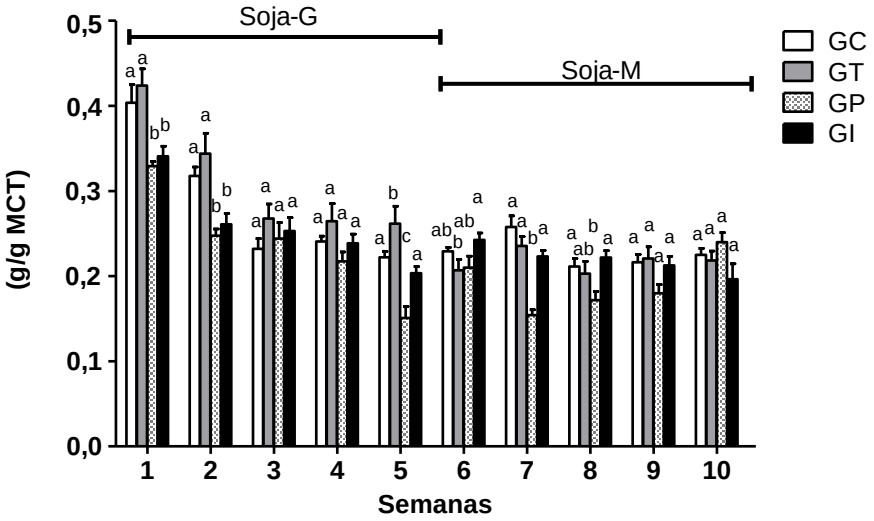


Figura 10- Média semanal do consumo alimentar de 24 h dos filhotes machos (g/g massa corporal total, MCT), que receberam ração controle desde o desmame até os 3 meses de vida. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=14; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=13; GP: grupo óleo de palma, n=12 e GI: grupo gordura interesterificada, n=23. Letras diferentes em uma mesma semana representam diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

Conforme assinalado na **Figura 11A** não foram identificadas diferenças significativas entre as MCT dos filhotes pertencentes aos distintos grupos estudados, avaliadas semanalmente, durante o período em que foram amamentados. Entretanto, após o desmame, quando todos os animais passaram a receber a ração manipulada controle, adequada às diferentes fases de desenvolvimento (soja-G ou soja-M), os grupos GP e GI mostraram valores de MCT significativamente superiores aos dos grupos GC e GT, até a nona semana de acompanhamento. Na última semana (décima), apenas o GI se manteve significativamente mais pesado, comparado aos demais **(Figura 11B).**

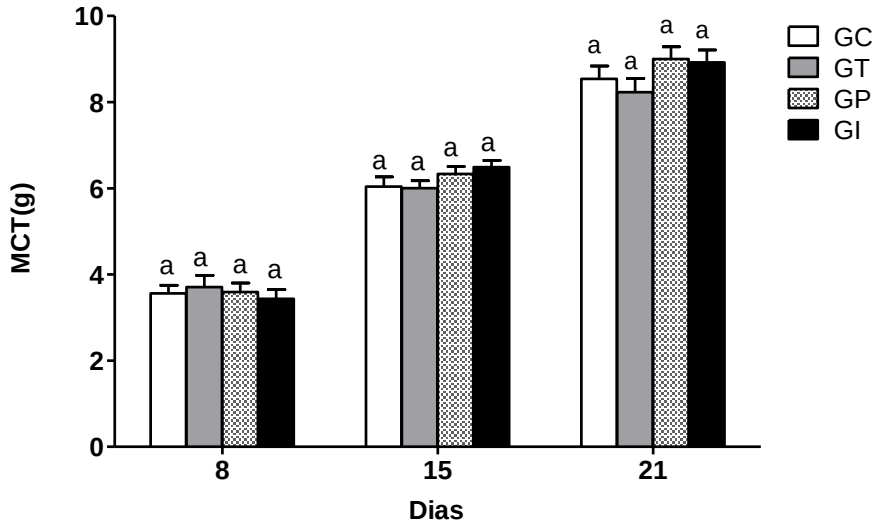


Figura 11A - Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos durante a lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=10; GP: grupo óleo de palma, n=9 e GI: grupo gordura interesterificada, n=12.

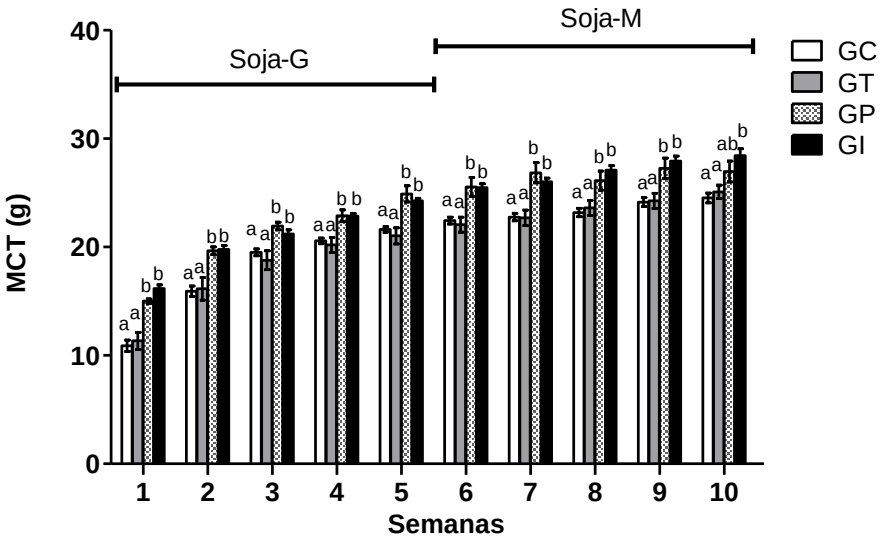


Figura 11B - Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame até os 3 meses de vida. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=14; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=13; GP: grupo óleo de palma, n=12 e GI: grupo gordura interesterificada, n=23. Letras diferentes na mesma semana representam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

No entanto, quando foi calculada a variação da MCT (valores médios da massa corporal de cada grupo, na décima semana após o desmame, subtraídos dos respectivos valores médios, correspondentes à primeira semana pós desmame), nenhuma diferença significativa foi mantida entre os grupos estudados (**Figura 12)**.

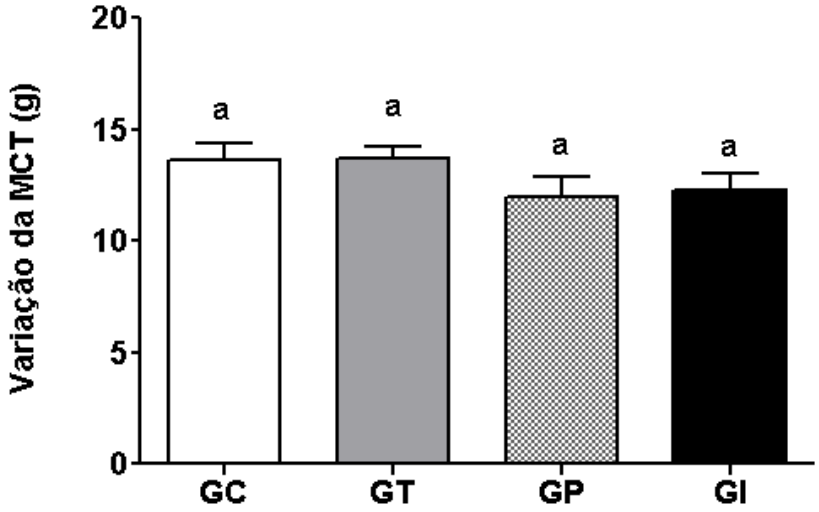


Figura 12 - Variação da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame ate os 3 meses de vida. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=14; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=13; GP: grupo óleo de palma, n=12 e GI: grupo gordura interesterificada, n=23.

6.3 Avaliação por imagem do volume de tecido adiposo interno e externo à cavidade abdominal e da massa dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico de camundongos machos, aos três meses de vida.

Na avaliação dos depósitos de tecido adiposo dos camundongos machos, aos três meses de vida (90 dias), realizada por bioimagem, o grupo de animais cujas mães consumiram dieta contendo gordura interesterificada, durante toda a gestação e lactação, apresentou volume de gordura, localizada nas regiões interna e externa à cavidade abdominal, assim como o correspondente ao somatório destas medidas (gordura total), significativamente superior ao dos demais grupos (**Figura 13)**.

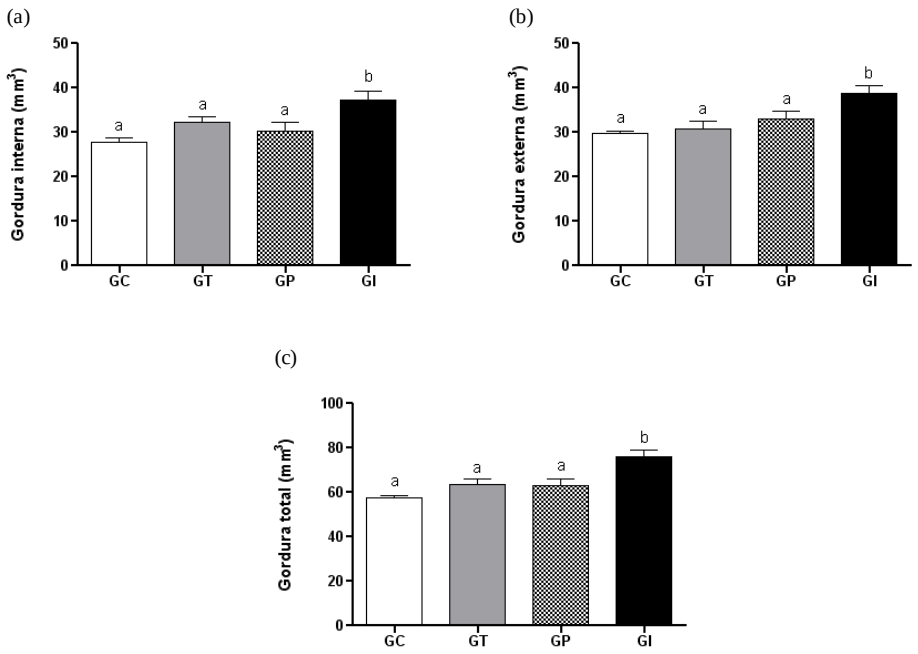


Figura 13 - (a) Gordura interna: volume de tecido adiposo localizado no interior da cavidade abdominal; (b) Gordura externa: volume de tecido adiposo localizado no exterior da cavidade abdominal; (c) Gordura total: somatório do volume interno e externo à cavidade abdominal. Dados referentes aos camundongos machos, aos três meses de vida (90 dias), alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Avaliação por tomografia computadorizada. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=9; GP: grupo óleo de palma, n=9 e GI: grupo gordura interesterificada, n=10. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

A **Figura 14** apresenta os valores correspondentes às massas dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal e mesentérico dos camundongos machos, aos três meses de vida. Considerados todos os grupos estudados, enquanto os animais GP acumularam maior quantidade de tecido adiposo inguinal, os pertencentes ao grupo GI, acumularam mais tecido adiposo epididimal. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere aos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico.

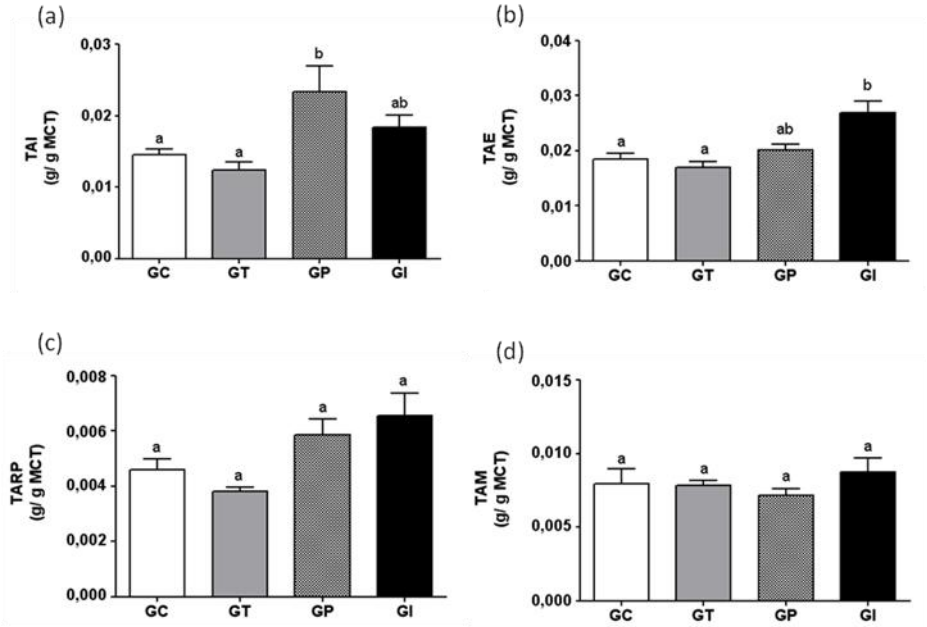


Figura 14 - Massa (g/g massa corporal total, MCT) dos estoques de tecidos adiposos: (a) TAI: Tecido adiposo inguinal; (b) TAE: Tecido adiposo epididimal; (c) TARP: Tecido adiposo retroperitoneal; (d) TAM: Tecido adiposo mesentérico. Dados referentes aos camundongos machos, aos três meses de vida (110 dias) alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=6; GP: grupo óleo de palma, n=5 e GI: grupo gordura interesterificada, n=11. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

Quando considerado o acúmulo de gordura visceral, as diferenças entre os grupos não alcançaram significância estatística. Do mesmo modo, na avaliação da obesidade central, também não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos estudados **(Figura 15)**.

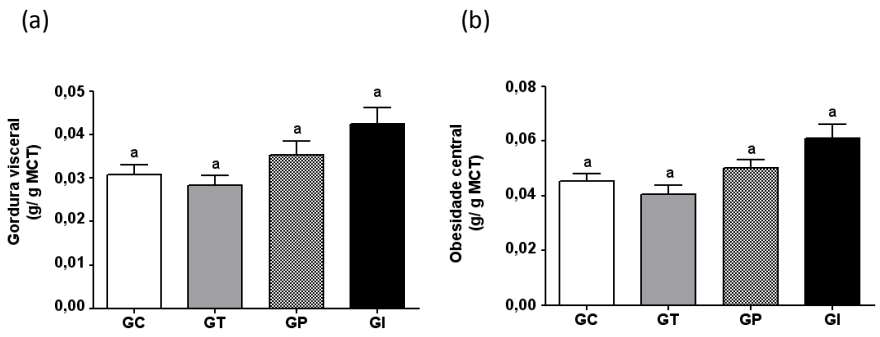
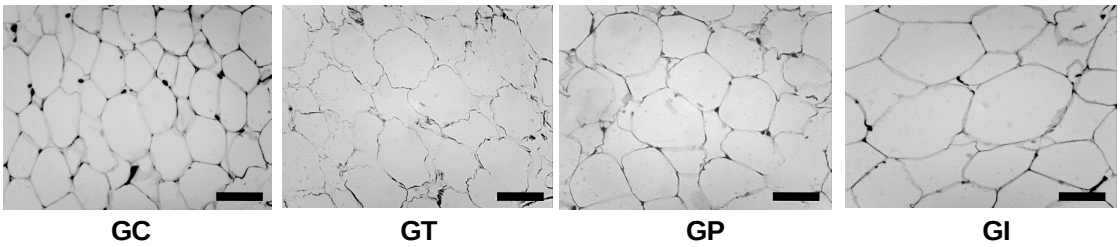


Figura 15- (a) Massa (g/g massa corporal total, MCT) de gordura visceral (somatório dos estoques dos tecidos adiposos viscerais - retroperitoneal, epididimal e mesentérico); (b) Massa (g/g massa corporal total, MCT) relativa ao somatório dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal, mesentérico e inguinal (obesidade central). Dados referentes aos camundongos machos, aos três meses de vida (110 dias), alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=6; GP: grupo óleo de palma, n=5 e GI: grupo gordura interesterificada, n=11. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

6.4 Morfometria de adipócitos nos tecidos adiposos epididimal e inguinal de camundongos machos, aos 90 dias de vida

Os filhotes de mães que consumiram dieta contendo GVPH, OP ou gordura interesterificada apresentaram, aos 90 dias de vida, adipócitos isolados do tecido adiposo branco da região epididimal com áreas significativamente superiores a dos filhotes GC. Adicionalmente, foi identificada, neste tecido, maior área entre os adipócitos do grupo GI, comparada a do grupo GT. Foram semelhantes as áreas correspondentes aos animais GT e GP, assim como entre GI e GP (**Figura 16)**.



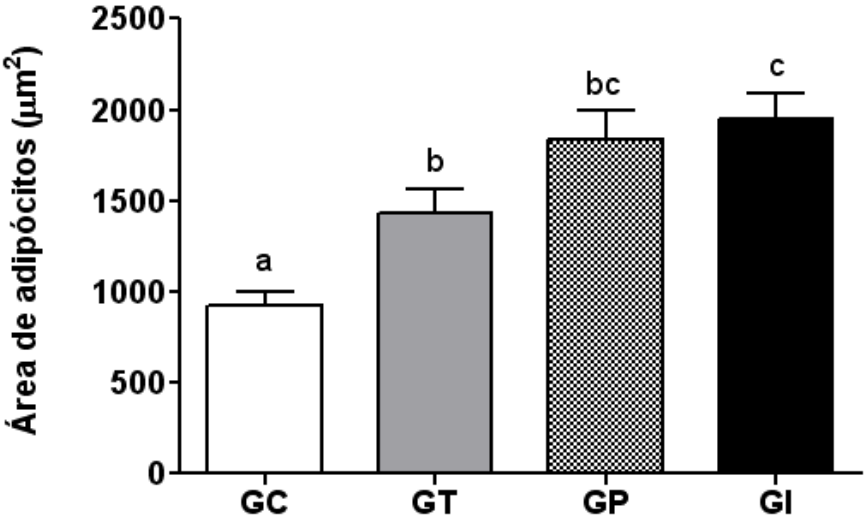
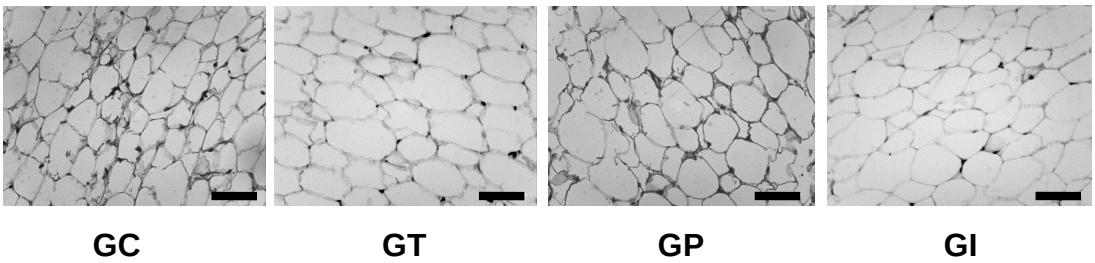


Figura 16 – Histologia e morfometria do tecido adiposo epididimal. Dados referentes aos camundongos machos, aos 90 dias de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Área dos adipócitos medidas dentro de cada fotomicrografia, ignorando as células incompletas nas extremidades, considerando a barra de escala = 50 µm. As avaliações foram feitas em triplicata para cada animal. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=3; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=3; GP: grupo óleo de palma, n=3 e GI: grupo gordura interesterificada, n=3. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

Considerada a morfometria do tecido adiposo inguinal, os filhotes de mães que consumiram dieta contendo GVPH, OP ou gordura interesterificada também apresentaram, aos 90 dias de vida, adipócitos isolados desse tecido com áreas significativamente superiores a dos filhotes GC, existindo também diferenças no sentido dos maiores valores corresponderem às áreas dos adipócitos dos animais GT, seguidos do GI e GP (**Figura 17)**.



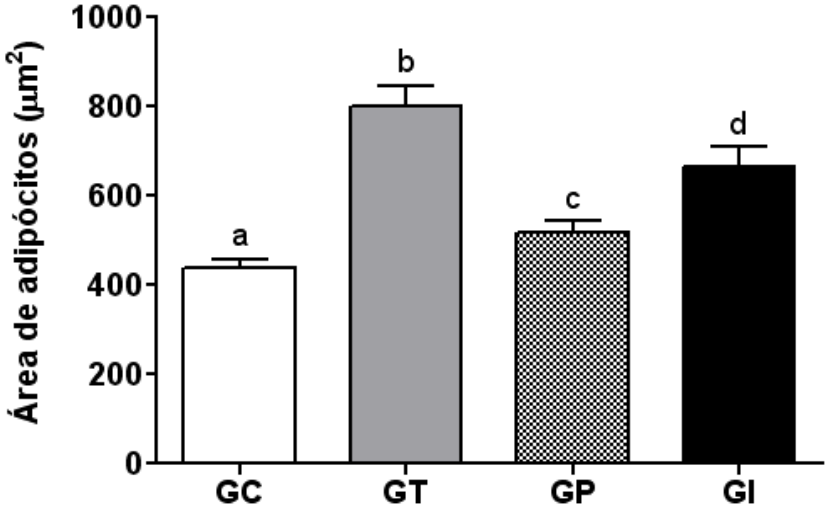


Figura 17 – Histologia e morfometria do tecido adiposo inguinal. Dados referentes aos camundongos machos, aos 90 dias de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Área dos adipócitos medidas dentro de cada fotomicrografia, ignorando as células incompletas nas extremidades, considerando a barra de escala = 50 µm. As avaliações foram feitas em triplicata para cada animal. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=3; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=3; GP: grupo óleo de palma, n=3 e GI: grupo gordura interesterificada, n=3. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

6.5 Sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica de camundongos machos, aos três meses de vida

Para avaliar a tolerância à glicose, após sua administração i.p., foi calculada a área sob a curva das glicemias ao longo do tempo. Apesar dos valores mais elevados, observados

especialmente nos animais GP e GI, não foram identificadas diferenças significativas entre os 4 grupos experimentais (**Figura 18)**.

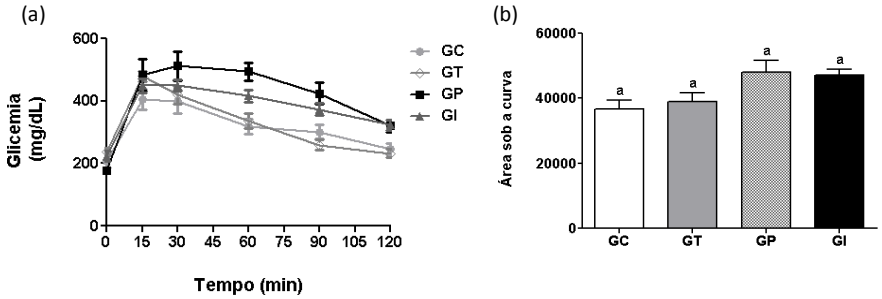


Figura 18 - (a) Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG). (b) Área sob a curva glicêmica calculada no TTG. Dados referentes aos camundongos machos, aos três meses de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=5; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=6; GP: grupo óleo de palma, n=4 e GI: grupo gordura interesterificada, n=9.

Também foi calculada a área sob a curva das glicemias ao longo do tempo para avaliar a tolerância à insulina, após administração i.p. de insulina. Neste teste, também não foram identificadas diferenças significativas entre os 4 grupos experimentais (**Figura 19)**.

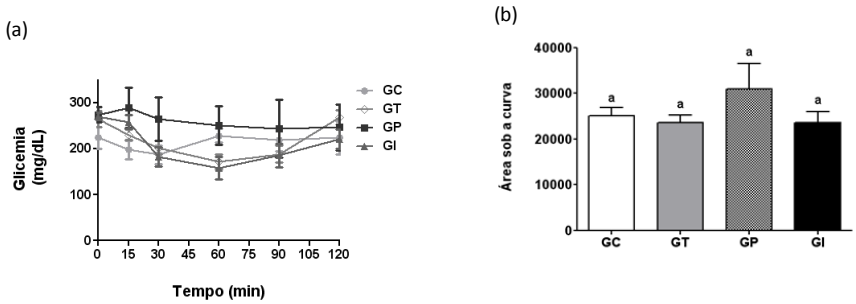


Figura 19 - (a) Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à insulina (TTI). (b) Área sob a curva glicêmica calculada no TTI. Dados referentes aos camundongos machos, aos três meses de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=5; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=5; GP: grupo óleo de palma, n=3 e GI: grupo gordura interesterificada, n=9.

Valores relativos à glicemia e insulinemia de jejum bem como ao índice HOMA-IR estão apresentados na **Tabela 4.** As diferenças relativas a todos os valores, entre todos os grupos, não foram significativas

Tabela 4– Concentrações plasmáticas de glicose e insulina, de jejum e HOMA-IR dos camundongos machos, aos 110 dias de vida

	GC	GT	GP	GI
Glicose, mg/dL	208,7 ± 22,9[a]	237,8 ± 12,9[a]	177,0 ± 9,4[a]	223,7±16,28[a]
Insulina, ng/mL	0,25 ± 0,07[a]	0,20 ± 0,12[a]	0,14 ± 0,02[a]	0,19 ± 0,08 a
HOMA-IR (valores $x10^{-7}$)	5,66 ± 1,79 [a]	5,68 ± 1,79 [a]	3,02 ± 9,84 [a]	5,76 ± 1,89 [a]

Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=5; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=5; GP: grupo óleo de palma, n=3 e GI: grupo gordura interesterificada, n=9.

6.6 Massa relativa aos fígados de camundongos machos, excisados após sacrifício aos 110 dias de vida

A massa relativa (g/g de massa corporal total) dos fígados dos animais, excisados após sacrifício aos 110 dias de vida, não diferiu entre todos os grupos, conforme demonstrado na **Figura 20.**

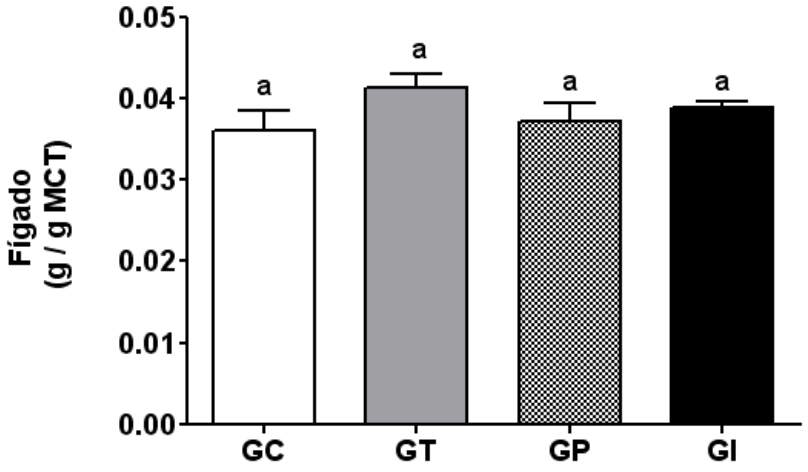


Figura 20 - Massa (g/g massa corporal total, MCT) correspondente aos fígados excisados de camundongos machos, aos 110 dias de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo óleo de soja, palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada ou gordura interesterificada, durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=9; GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, n=6; GP: grupo óleo de palma, n=5 e GI: grupo gordura interesterificada, n=11.

6.7 Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do fígado, plasma e tecidos adiposos epididimal e inguinal

As concentrações relativas de ácidos graxos identificados nos lipídios totais das amostras de fígado, obtidas dos filhotes machos aos 110 dias de vida, encontram-se descritas na **Tabela 5**. Observa-se no grupo GC em comparação aos demais grupos estudados, com exceção do grupo GP, maiores teores de C16:0. Comparando o grupo GC com os demais grupos, podem ser observadas maiores concentrações do AG oleico e do somatório de AGMI, do somatório de isômeros C16:1, C18:3 n-6, ALA, EPA e somatório de AGPI n-6. Os grupos GT e GI apresentaram quantidades significativamente inferiores relativas ao somatório de AGPI e AL, quando comparados aos grupos GC e GP.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (mg/ g de amostra) nos lipídios totais do fígado dos filhotes machos aos 110 dias de vida.

Ácidos Graxos	**GC**		**GT**		**GP**		**GI**	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
Σ AGS	23,85	± 2,28 [a]	19,11	± 1,44 [a]	23,25	± 1,66 [a]	21,86	± 1,86 [a]
C16:0	19,80	± 1,49 [a]	12,25	± 0,93 [b]	16,13	± 1,59 [ab]	14,30	± 0,84 [b]
C18:0	5,30	± 0,29 [a]	5,24	± 0,12 [a]	6,04	± 0,33 [a]	5,53	± 0,19 [a]
Σ AGMI	35,89	± 2,17 [a]	21,79	± 1,89 [b]	24,66	± 2,19 [b]	22,05	± 1,46 [b]
C18:1 n-9 (Oleico)	24,67	± 2,28 [a]	14,25	± 1,49 [b]	18,96	± 1,69 [b]	14,07	± 1,59 [b]
C18:1 - outros *cis* isômeros[a]	1,88	± 0,17 [a]	1,99	± 0,24 [a]	2,17	± 0,14 [a]	2,40	± 0,6 [a]
Total de *trans* do C18:1[b]	0,06	± 0,01 [a]	0,07	± 0,00 [a]	0,07	± 0,02 [a]	0,06	± 0,00 [a]
Σ Isômeros C16:1	4,89	± 0,46 [a]	2,34	± 0,25 [b]	2,57	± 0,23 [b]	3,14	± 0,26 [b]
Σ AGPI	28,43	± 2,45 [a]	20,65	± 1,69 [b]	28,82	± 1,51 [ac]	20,68	± 1,27 [b]
AGS/AGPI	0,93	± 0,05 [a]	0,93	± 0,02 [a]	0,91	± 0,05 [a]	1,07	± 0,09 [a]
Σ AGT	0,33	± 0,04 [a]	0,37	± 0,02 [a]	0,37	± 0,01 [a]	0,39	± 0,03 [a]
C18:2 n-6 (AL)	14,93	± 1,41 [a]	8,38	± 0,81 [b]	13,64	± 0,73 [a]	9,29	± 1,08 [b]
C18:3 n-6	0,47	± 0,08 [a]	0,11	± 0,02 [b]	0,25	± 0,02 [b]	0,12	± 0,01 [b]
C18:3 n-3 (ALA)	1,33	± 0,10 [a]	0,65	± 0,07 [b]	0,83	± 0,09 [b]	0,82	± 0,07 [b]
C20:2 n-6	0,10	± 0,01 [a]	0,11	± 0,01 [a]	0,07	± 0,00 [a]	0,11	± 0,02 [a]
C20:3 n-6	0,49	± 0,03 [a]	0,53	± 0,01 [a]	0,61	± 0,04 [a]	0,64	± 0,06 [a]
C20:3 n-3	0,01	± 0,00 [a]	0,01	± 0,00 [a]	0,01	± 0,00 [a]	0,01	± 0,00 [a]
C20:4 n-6 (AA)	5,90	± 0,30 [a]	5,40	± 0,14 [a]	5,77	± 0,14 [a]	5,27	± 0,13 [a]
C20:5 n-3 (EPA)	0,23	± 0,02 [a]	0,12	± 0,01 [b]	0,17	± 0,02 [b]	0,15	± 0,01 [b]
C22:5 n-6 (DPA)	0,16	± 0,01 [a]	0,13	± 0,01 [b]	0,11	± 0,00 [a]	0,12	± 0,01 [a]
C22:5 n-3 (DPA)	0,30	± 0,03 [a]	0,15	± 0,02 [b]	0,31	± 0,04 [a]	0,16	± 0,02 [b]
C22:6 n-3 (DHA)	3,73	± 0,24 [a]	3,17	± 0,18 [a]	3,69	± 0,18 [a]	3,13	± 0,18 [a]
Σ AGPI n-3	5,31	± 0,44 [a]	4,21	± 0,24 [a]	5,13	± 0,23 [a]	4,38	± 0,21 [a]
Σ AGPI n-6	23,17	± 1,28 [a]	16,02	± 1,44 [b]	20,75	± 1,99 [ab]	15,84	± 1,17 [b]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; a: inclui todos os isômeros de posição *cis* do C18:1, exceto o C18:1 n-9 (oleico); b: inclui todos os isômeros de posição *trans* do C18:1; ΣAGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; Σ AGT: somatório dos ácidos graxos *trans*; Σ AGPI n-6: somatório de ácidos graxos da família n-6; Σ AGPI n-3: somatório de ácidos graxos da família n-3; AL: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; DPA: ácido docosapentaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico. Valores representam a média ± erro padrão da media em percentagem. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$, determinado de acordo com o pós-teste de Newman-Keuls. GC: grupo controle (n=6), GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada (n=6), GP: grupo óleo de palma (n=5) e GI: grupo gordura interesterificada (n=6).

A **Tabela 6** mostra os resultados referentes às concentrações relativas de ácidos graxos identificados nos lipídios totais das amostras de plasma dos filhotes machos aos 110 dias de vida. É possível verificar que o somatório de AGS foi menor no grupo GP, comparado aos valores correspondentes encontrados para os animais GC e GI, embora o GI tenha apresentado os maiores teores do AGS 16:0. O somatório de AGMI foi maior no GC, comparado ao encontrado para os animais GT e GP, sendo a quantidade de oleico menor no GP. Não foram identificados isômeros *trans* do C18:1 nos grupos GC e GP, entretanto, estavam presentes no plasma dos animais GT e GI. Considerados os teores relativos ao somatório de AGT, o grupo GT apresentou os valores mais elevados, comparados aos dos demais grupos experimentais. Maiores concentrações do AGPI C18:2 n-6 (AL) foram identificadas no grupo GI, comparadas as dos animais GT e GP. Quanto aos AGPI C20:2 n-6, C20:3 n-3, C22:4 n-6 e EPA, o grupo GP apresentou os valores mais reduzidos e significativamente diferentes dos demais grupos. As quantidades de AA e as relativas ao somatório de AGPI n-6 no grupo GI foram superiores às verificadas para os demais grupos experimentais.

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos (mg/ mL de amostra) nos lipídios totais do plasma dos filhotes machos aos 110 dias de vida.

Ácidos Graxos	**GC**	**GT**	**GP**	**GI**
	MÉDIA EPM	MÉDIA EPM	MÉDIA EPM	MÉDIA EPM
Σ AGS	46,00 ± 4,50 [a]	37,72 ± 3,19 [ab]	30,87 ± 2,39 [b]	51,11 ± 4,63 [a]
C16:0	21,41 ± 2,67 [ab]	16,29 ± 1,63 [a]	14,98 ± 0,86 [a]	23,70 ± 1,24 [b]
C18:0	10,34 ± 1,12 [a]	8,88 ± 1,72 [a]	6,84 ± 0,51 [a]	10,97 ± 1,42 [a]
Σ AGMI	32,21 ± 5,19 [a]	18,13 ± 2,21[bc]	13,97 ± 1,38 [c]	25,04 ± 2,51 [ab]
C18:1 9c (Oleico)	21,52 ± 5,45 [a]	12,07 ± 1,49 [ab]	7,39 ± 0,70 [b]	15,02 ± 1,78 [ab]
C18:1 - outros *cis* isômeros [a]	2,66 ± 0,59 [a]	2,05 ± 0,35 [a]	1,18 ± 0,09 [a]	2,54 ± 0,41 [a]
Total de *trans* do C18:1 [b]	NID	0,72 ± 0,14	NID	0,52 ± 0,06
Σ Isômeros C16:1	2,73 ± 0,36 [ab]	2,35 ± 0,18 [a]	1,96 ± 0,19 [a]	3,47 ± 0,38 [b]
Σ AGPI	46,00 ± 2,75 [ab]	40,03 ± 3,95 [ab]	33,32 ± 1,77 [a]	52,69 ± 5,02 [b]
AGS/AGPI	0,98 ± 0,06 [a]	1,03 ± 0,03 [a]	1,05 ± 0,05 [a]	0,89 ± 0,06 [a]
Σ AGT	0,45 ± 0,07 [a]	1,15 ± 0,23 [b]	0,02 ± 0,01 [c]	0,68 ± 0,04 [a]
C18:2 n-6 (AL)	19,46 ± 1,74 [ab]	15,73 ± 1,54 [a]	15,44 ± 1,35 [a]	23,28 ± 1,69 [b]
C18:3 n-6	0,33 ± 0,05 [a]	0,23 ± 0,05 [a]	0,15 ± 0,02 [a]	0,29 ± 0,04 [a]
C18:3 n-3 (ALA)	0,68 ± 0,09 [a]	0,55 ± 0,02 [a]	0,42 ± 0,03 [a]	0,66 ± 0,05 [a]
C20:2 n-6	0,11 ± 0,01 [ab]	0,15 ± 0,02 [a]	0,08 ± 0,01 [b]	0,16 ± 0,01 [a]
C20:3 n-6	0,82 ± 0,15 [a]	1,15 ± 0,19 [a]	0,63 ± 0,07 [a]	1,27 ± 0,15 [a]
C20:3 n-3	0,15 ± 0,00 [a]	0,13 ± 0,00 [a]	0,00 ± 0,00 [c]	0,43 ± 0,08 [b]
C20:4 n-6 (AA)	14,87 ± 2,06 [ab]	12,76 ± 1,01 [ab]	11,63 ± 0,25 [a]	18,49 ± 1,93 [b]
C20:5 n-3 (EPA)	0,26 ± 0,07 [ab]	0,37 ± 0,03 [a]	0,19 ± 0,04 [b]	0,42 ± 0,04 [a]
C22:4 n-6	0,11 ± 0,01 [a]	0,11 ± 0,01 [a]	0,00 ± 0,00 [b]	0,08 ± 0,02 [a]
C22:5 n-6 (DPA)	0,36 ± 0,05 [a]	0,23 ± 0,02 [b]	0,11 ± 0,01 [b]	0,19 ± 0,01 [b]
C22:5 n-3 (DPA)	0,24 ± 0,05 [ab]	0,25 ± 0,04 [ab]	0,17 ± 0,03 [a]	0,31 ± 0,03 [b]
C22:6 n-3 (DHA)	4,99 ± 0,95 [a]	3,51 ± 0,53 [a]	3,58 ± 0,24 [a]	6,13 ± 0,69 [a]
Σ AGPI n-3	7,64 ± 1,48 [a]	4,87 ± 0,53 [a]	3,85 ± 0,17 [a]	7,73 ± 0,94 [a]
Σ AGPI n-6	37,97 ± 3,09 [ab]	27,98 ± 2,82 [a]	28,11 ± 1,63 [a]	44,23 ± 3,97 [b]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; a: inclui todos os isômeros de posição *cis* do C18:1, exceto o C18:1 n-9 (oleico); b: inclui todos os isômeros de posição *trans* do C18:1; NID: não identificado; ΣAGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; Σ AGT: somatório dos ácidos graxos *trans*; Σ AGPI n-6: somatório de ácidos graxos da família n-6; Σ AGPI n-3: somatório de ácidos graxos da família n-3; AL: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; DPA: ácido docosapentaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico. Valores representam a média ± erro padrão da média em percentagem. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$, determinado de acordo com o pós-teste de Newman-Keuls. GC: grupo controle (n=6), GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada (n=6), GP: grupo óleo de palma (n=5) e GI: grupo gordura interesterificada (n=6).

Na **Tabela 7** encontram-se descritos os teores relativos dos ácidos graxos presentes no tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 110 dias de vida. Os animais GT, comparados aos pertencentes ao grupo GC, apresentaram quantidades significativamente superiores do AG esteárico (C18:0). As quantidades do AG oleico e de seus isômeros *cis* foram mais elevadas no grupo GT, em comparação ao GC, enquanto os isômeros *trans* do C18:1, assim como o somatório de AGT, foram significativamente mais elevados no grupo GT, quando comparados aos demais grupos. O grupo GT também apresentou quantidade elevada de C18:3 n-6 em relação ao GC. Os teores relativos do AG C20:3 n-3 foram significativamente mais reduzidos nos grupos GT e GP, comparados aos grupos GC e GI. Também foi significativamente maior a quantidade de C22:4 n-6 do grupo GC em relação a dos demais grupos.

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 110 dias de vida

Ácidos Graxos	**GC**		**GT**		**GP**		**GI**	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
Σ AGS	19,97	± 0,68 [a]	22,09	± 1,20 [a]	19,70	± 0,73 [a]	21,52	± 0,56 [a]
C16:0	16,92	± 0,67 [a]	18,74	± 1,05 [a]	16,68	± 0,64 [a]	18,48	± 0,51 [a]
C18:0	1,32	± 0,11 [a]	1,71	± 0,10 [b]	1,51	± 0,07 [ab]	1,52	± 0,05 [ab]
Σ AGMI	43,94	± 1,00 [a]	49,16	± 1,96 [a]	43,09	± 1,77 [a]	48,59	± 1,28 [a]
C18:1 9c (Oleico)	30,52	± 1,05 [a]	36,16	± 1,47 [b]	32,45	± 0,60 [ab]	34,75	± 0,87 [b]
C18:1 - outros *cis* isômeros [a]	2,36	± 0,18 [a]	3,03	± 0,15 [b]	2,74	± 0,09 [ab]	3,21	± 0,13 [b]
Total de *trans* do C18:1 [b]	0,11	± 0,01 [a]	0,18	± 0,01 [b]	0,12	± 0,01 [a]	0,12	± 0,00 [a]
Σ Isômeros C16:1	6,56	± 0,79 [a]	7,2	± 0,43 [a]	6,42	± 0,22 [a]	7,72	± 0,25 [a]
Σ AGPI	24,35	± 0,61 [a]	25,18	± 0,76 [a]	25,57	± 0,63 [a]	26,39	± 0,72 [a]
AGS/AGPI	0,82	± 0,04 [a]	0,87	± 0,02 [a]	0,77	± 0,04 [a]	0,82	± 0,03 [a]
Σ AGT	0,77	± 0,06 [a]	1,06	± 0,04 [b]	0,85	± 0,03 [a]	0,90	± 0,02 [a]
C18:2 n-6 (AL)	22,84	± 0,60 [a]	23,52	± 0,69 [a]	24,07	± 0,61 [a]	24,76	± 0,69 [a]
C18:3 n-6	0,06	± 0,00 [a]	0,08	± 0,00 [b]	0,07	± 0,00 [ab]	0,07	± 0,00 [ab]
C18:3 n-3 (ALA)	0,11	± 0,01 [a]	0,11	± 0,01 [a]	0,13	± 0,01 [a]	0,13	± 0,01 [a]
C20:2 n-6	0,14	± 0,01 [a]	0,15	± 0,01 [a]	0,14	± 0,00 [a]	0,13	± 0,01 [a]
C20:3 n-6	0,17	± 0,02 [a]	0,20	± 0,01 [a]	0,20	± 0,01 [a]	0,21	± 0,01 [a]
C20:3 n-3	0,03	± 0,00 [a]	0,01	± 0,00 [b]	0,01	± 0,00 [b]	0,03	± 0,00 [a]
C20:4 n-6 (AA)	0,36	± 0,02 [a]	0,36	± 0,02 [a]	0,31	± 0,02 [a]	0,35	± 0,01 [a]
C20:5 n-3 (EPA)	0,03	± 0,00 [a]	0,04	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]	0,04	± 0,00 [a]
C22:4 n-6	0,11	± 0,00 [a]	0,08	± 0,00 [b]	0,08	± 0,00 [b]	0,07	± 0,00 [b]
C22:5 n-6 (DPA)	0,06	± 0,01 [a]	0,06	± 0,01 [a]	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]
C22:5 n-3 (DPA)	0,08	± 0,00 [a]	0,07	± 0,01 [a]	0,08	± 0,01 [a]	0,09	± 0,00 [a]
C22:6 n-3 (DHA)	0,16	± 0,01 [a]	0,15	± 0,01 [a]	0,15	± 0,01 [a]	0,17	± 0,01 [a]
Σ AGPI n-3	0,39	± 0,03 [a]	0,38	± 0,02 [a]	0,40	± 0,02 [a]	0,47	± 0,02 [a]
Σ AGPI n-6	23,74	± 0,61 [a]	24,46	± 0,73 [a]	24,91	± 0,62 [a]	25,64	± 0,70 [a]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; a: inclui todos os isômeros de posição *cis* do C18:1, exceto o C18:1 n-9 (oleico); b: inclui todos os isômeros de posição *trans* do C18:1; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; Σ AGT: somatório dos ácidos graxos *trans*; Σ AGPI n-6: somatório de ácidos graxos da família n-6; Σ AGPI n-3: somatório de ácidos graxos da família n-3; AL: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; DPA: ácido docosapentaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico. Valores representam a média ± erro padrão da media em percentagem. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$, determinado de acordo com o pós-teste de Newman-Keuls. GC: grupo controle (n=6), GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada (n=6), GP: grupo óleo de palma (n=5) e GI: grupo gordura interesterificada (n=6).

As concentrações relativas de ácidos graxos identificados nas amostras de tecido adiposo inguinal, obtidas dos filhotes machos aos 110 dias de vida, encontram-se descritas na **Tabela 8**. Verifica-se maior quantidade de isômeros *cis* do C18:1, assim como do somatório de isômeros do C16:1, nos tecidos dos animais GI, em comparação aos demais grupos. A quantidade de AGT totais foi maior em GT e GI, comparados ao GC. Os animais GI apresentaram maior depósito de AL no adiposo inguinal, quando comparados aos estoques dos animais GC. Os animais GI apresentaram, ainda, valores significativamente mais reduzidos do AG C20:3 n-3, comparados aos demais grupos e, comparados ao GC, valores significativamente mais elevados referentes ao total de AGPI n-6.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido adiposo inguinal dos filhotes machos aos 110 dias de vida

Ácidos Graxos	**GC**		**GT**		**GP**		**GI**	
	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
Σ AGS	18,54	± 0,89 [a]	19,7	± 0,52 [a]	17,97	± 0,91 [a]	18,62	± 0,49 [a]
C16:0	15,06	± 0,64 [a]	16,16	± 0,42 [a]	14,79	± 0,73 [a]	15,57	± 0,38 [a]
C18:0	1,78	± 0,18 [a]	1,91	± 0,13 [a]	1,59	± 0,20 [a]	1,46	± 0,10 [a]
Σ AGMI	41,6	± 2,47 [a]	43,86	± 0,67 [a]	42,95	± 1,10 [a]	46,43	± 1,28 [a]
C18:1 9c (Oleico)	30,29	± 1,73 [a]	32,64	± 0,61 [a]	31,34	± 0,72 [a]	34,06	± 0,58 [a]
C18:1 - outros *cis* isômeros [a]	2,09	± 0,09 [a]	2,45	± 0,04 [b]	2,45	± 0,14 [b]	2,88	± 0,07 [c]
Total de *trans* do C18:1 [b]	0,13	± 0,01 [a]	0,14	± 0,01 [a]	0,14	± 0,02 [a]	0,11	± 0,00 [a]
Σ Isômeros C16:1	6,48	± 0,61 [a]	6,33	± 0,34 [a]	6,83	± 0,38 [a]	8,16	± 0,19 [b]
Σ AGPI	18,78	± 1,15 [a]	20,23	± 0,72 [a]	21,07	± 1,16 [a]	22,84	± 0,46 [a]
AGS/AGPI	0,99	± 0,04 [a]	0,98	± 0,05 [a]	0,86	± 0,08 [a]	0,82	± 0,03 [a]
Σ AGT	0,66	± 0,03 [a]	0,82	± 0,04 [b]	0,74	± 0,06 [ab]	0,84	± 0,03 [b]
C18:2 n-6 (AL)	17,57	± 1,09 [a]	19,02	± 0,71 [ab]	19,95	± 1,07 [ab]	21,55	± 0,47 [b]
C18:3 n-6	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]
C18:3 n-3 (ALA)	0,13	± 0,01 [a]	0,11	± 0,01 [a]	0,13	± 0,01 [a]	0,13	± 0,01 [a]
C20:2 n-6	0,12	± 0,00 [a]	0,11	± 0,00 [a]	0,11	± 0,00 [a]	0,12	± 0,00 [a]
C20:3 n-6	0,13	± 0,01 [a]	0,13	± 0,00 [a]	0,14	± 0,01 [a]	0,15	± 0,00 [a]
C20:3 n-3	0,03	± 0,00 [a]	0,04	± 0,00 [a]	0,04	± 0,00 [a]	0,01	± 0,00 [b]
C20:4 n-6 (AA)	0,26	± 0,02 [a]	0,25	± 0,01 [a]	0,24	± 0,02 [a]	0,28	± 0,01 [a]
C20:5 n-3 (EPA)	0,03	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]
C22:4 n-6	0,06	± 0,01 [a]	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]	0,05	± 0,00 [a]
C22:5 n-6 (DPA)	0,04	± 0,01 [a]	0,04	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]	0,03	± 0,00 [a]
C22:5 n-3 (DPA)	0,05	± 0,00 [a]	0,04	± 0,00 [a]	0,06	± 0,00 [a]	0,06	± 0,00 [a]
C22:6 n-3 (DHA)	0,11	± 0,01 [a]	0,09	± 0,00 [a]	0,11	± 0,01 [a]	0,12	± 0,01 [a]
Σ AGPI n-3	0,35	± 0,03 [a]	0,31	± 0,01 [a]	0,34	± 0,02 [a]	0,36	± 0,02 [a]
Σ AGPI n-6	18,24	± 1,12 [a]	19,65	± 0,72 [ab]	20,59	± 1,11 [ab]	22,24	± 0,47 [b]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; a: inclui todos os isômeros de posição *cis* do C18:1, exceto o C18:1 n-9 (oleico); b: inclui todos os isômeros de posição *trans* do C18:1; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; Σ AGT: somatório dos ácidos graxos *trans*; Σ AGPI n-6: somatório de ácidos graxos da família n-6; Σ AGPI n-3: somatório de ácidos graxos da família n-3; AL: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenóico; DPA: ácido docosapentaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico. Valores representam a média ± erro padrão da media em percentagem. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$, determinado de acordo com o pós-teste de Newman-Keuls. GC: grupo controle (n=6), GT: grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada (n=6), GP: grupo óleo de palma (n=5) e GI: grupo gordura interesterificada (n=6).

7. DISCUSSÃO

Diferentes investigações, conduzidas nas últimas décadas, têm sugerido a existência de associação entre eventos ocorridos durante a vida intrauterina e pós-natal imediato à etiologia das DCV e metabólicas, como obesidade, hipertensão arterial sistêmica e DM2, frequentemente estabelecidas na maturidade. A este respeito, tem sido documentado efeitos sobre a saúde da prole adulta de animais de experimentação, atribuídos ao consumo de distintas fontes dietéticas de lipídios (ALBUQUERQUE et al., 2006; OSSO et al., 2008; PISANI et al, 2008; BISPO, 2012; PIMENTEL et al, 2011; MISAN, 2012; SARDINHA et al., 2013). Por outro lado, a indústria alimentícia vem empregando processos tecnológicos alternativos, destinados a substituir a hidrogenação parcial de óleos e gorduras, de forma a reduzir o teor de isômeros *trans* em seus produtos, não existindo, entretanto, massa crítica acerca das consequências para a saúde frente a utilização destes novos produtos. Neste contexto, considerando a hipótese da programação metabólica, investigamos, no presente estudo, se o consumo de fontes lipídicas substitutas da GVPH, como a gordura interesterificada e o óleo de palma, exclusivamente durante a gestação e lactação, foi capaz de predispor a prole adulta de camundongos à obesidade bem como a alterações na homeostase glicêmica e resistência periférica à insulina.

As rações manipuladas, oferecidas aos quatro grupos experimentais, somente diferiram em termos da qualidade de seus lipídios constituintes. A análise da distribuição de ácidos graxos presentes refletiu, conforme esperado, a composição do lipídio utilizado na sua formulação. Assim, a ração oferecida ao grupo controle, manipulada com óleo de soja, apresentou teores relativos ao total de AGPI n-3 e n-6 significativamente mais elevados do que os encontrados nas demais rações experimentais, em razão das quantidades de ALA (C18:3 n-3) e AL (C18:2 n-6), características do óleo de soja (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Já na ração consumida pelo GT foram identificadas as maiores quantidades de isômeros *trans*, assim como os menores teores de AGPI totais, em relação às demais rações experimentais. É sabido que no processo de hidrogenação parcial de óleos e gorduras, ocorre redução das insaturações presentes na cadeia carbônica, com consequente aumento do índice de saturação e formação de isômeros *trans* nas duplas ligações remanescentes, assim, o conteúdo de AGT bem como de AGS na GVPH encontra-se

elevado (HUNTER, 2005). A ração confeccionada com o óleo de palma revelou os maiores teores de AGS em sua composição refletindo as proporções dos AG palmítico e esteárico, presentes no OP (AGROPALMA, 2011). Embora sem significância estatística, a ração manipulada com gordura interesterificada apresentou maiores quantidades de AGS em comparação à ração confeccionada exclusivamente com óleo de soja. Este resultado possivelmente se deve ao fato da gordura interesterificada conter, em sua formulação, OP (palmiste e estearina de palma) e gordura totalmente hidrogenada, ambas com elevado percentual de AGS, entretanto, sem presença significativa de AGT. De fato, a mistura de óleos líquidos, como o óleo de soja, com gordura vegetal totalmente hidrogenada, tem sido a alternativa mais utilizada pela indústria alimentícia para a produção de alimentos isentos ou com baixo teor de AGT, de modo a atender à legislação, estabelecendo maior apelo comercial, gerado pelos produtos conhecidos como *low trans* (RIBEIRO et al., 2009).

O período de gestação compreende duas etapas metabólicas distintas, inicialmente anabólica, seguida da catabólica (HERRERA et al., 2006). A primeira se caracteriza pelo aumento da ingestão alimentar e lipogênese, com consequente ganho de massa corporal, em razão, principalmente, do acúmulo de tecido adiposo. De outro modo, na fase catabólica ocorre intensa mobilização dos substratos estocados no tecido adiposo materno, acumulado na etapa anabólica que são, então, disponibilizados para o feto, via transferência placentária. Assim, a composição dos ácidos graxos da dieta materna é tanto determinante do perfil dos AG estocados em seu tecido adiposo, quanto do tipo de AG que é transferido para o feto (FERNANDES et al., 2012). Durante a lactação, a composição dos AG do leite materno também reflete a qualidade das fontes lipídicas ingeridas pela mãe, influenciando, de fato, o desenvolvimento neonatal (TINOCO et al., 2007). Considerados estes aspectos, a presença de AGE, como o AL e o ALA, nas rações manipuladas oferecidas aos quatro grupos experimentais, possibilitou o crescimento adequado da prole durante a lactação. Esses dois AGPI e seus derivados de cadeia longa, como o AA e o DHA, são fundamentais para a formação de novos tecidos durante o desenvolvimento fetal e pós-natal (FERNANDES et al., 2012). Sendo assim, a formulação das rações experimentais, contendo óleo de soja, permitiu o fornecimento suficiente desses AGE à prole, promovendo ganho de massa corporal semelhante entre os grupos durante a lactação, independentemente da fonte lipídica majoritária.

Com a modificação da dieta após o desmame, quando os filhotes pertencentes aos 4 grupos experimentais, passaram a receber a ração controle, manipulada exclusivamente com óleo de soja como fonte lipídica, observamos elevação na massa corporal total da prole cujas mães receberam, durante a gestação e lactação, dietas à base de óleo de palma e gordura interesterificada. Constatamos, ainda, que nos animais adultos, além do aumento significativo da massa corporal, quando comparados aos grupos GC e GT, aqueles que pertenciam ao grupo GI acumularam mais tecido adiposo epididimal, enquanto os animais GP aumentaram sua massa de tecido adiposo inguinal.

Quando analisamos as imagens obtidas por tomografia computadorizada verificamos maior distribuição de tecido adiposo nos compartimentos corporais nos animais do grupo GI. Misan (2012), utilizando o mesmo protocolo experimental do presente estudo, encontrou que as dietas à base de OP e gordura interesterificada, oferecidas durante a gestação e lactação, promoveram aumento de massa corporal e adiposidade da prole adulta. É possível que o elevado conteúdo de ácido palmítico (cerca de 20% do total dos AG), presente na ração consumida pelos animais GI, durante a gestação e lactação, tenha contribuído para o acúmulo de massa corporal, observado na cria destes animais, quando adulta. Já foi descrito ocorrer aumento da lipogênese no tecido adiposo bem como da adiposidade em animais cujas mães foram alimentadas com dieta à base de OP, durante a lactação, que foi mantida após o desmame, até os 45 dias de vida (SILVA et al., 2006).

Esses resultados sugerem que a ingestão materna de gordura interesterificada e/ou óleo de palma é capaz de programar a prole, metabolicamente, em relação à massa corporal e que o tipo de AG, especificamente o ácido palmítico, oferecido às mães no período crítico de desenvolvimento, seja o principal responsável pelo aumento da massa corporal e adiposidade dos animais GI na vida adulta.

A análise da morfometria de adipócitos no tecido adiposo epididimal e inguinal mostrou diferenças significativas entre os grupos. Foram observadas alterações compatíveis com quadro de maior adiposidade nos animais adultos dos grupos GI e GT. No grupo GI observou-se aumento do tamanho dos adipócitos localizados no tecido adiposo epididimal e, no grupo GT, ocorreu hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo inguinal.

O tecido adiposo inicia sua formação durante a vida intrauterina, no entanto, é durante a lactação que ocorre o período de rápida hiperplasia e hipertrofia das células

adiposas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Sabendo-se que o processo de adipogênese é influenciado de forma importante pelo ambiente nutricional materno, durante a gestação e lactação (MUHLHAUSLER; SMITH, 2009) e, ainda, que a lactação em roedores é uma etapa dinâmica, no que diz respeito ao crescimento do tecido adiposo (HAUNER et al., 2009), é possível supor que os AGS, presentes na gordura interesterificada e no OP, assim como os AGT, tenham sido capazes de interagir com fatores de transcrição, modulando, epigeneticamente, a expressão de genes, e promovendo alterações significativas nos processos de adipogênese e lipogênese (MILAGRO et al., 2012).

Em nosso estudo também observamos, no grupo GI, maior acúmulo de tecido adiposo na região visceral. Tem sido reportado que a RI, em obesos, está diretamente relacionada à hipertrofia de adipócitos e ao acúmulo excessivo de tecido adiposo na região visceral (DONOHOE; DOYLE; REYNOLDS, 2011). A presença de adipócitos com maior volume é o principal fator contribuinte para o aumento no acúmulo de massa adiposa, resultando em aumentada capacidade do tecido adiposo para armazenar lipídios (CINTI, 2005). A obesidade visceral também promove maior liberação de ácidos graxos livres, devido à intensa atividade da lipase lipoproteica, o que leva ao acúmulo aumentado de AGL no fígado, músculo esquelético e pâncreas. O depósito de lipídios no fígado e no tecido muscular resulta em redução na atividade da insulina nestes tecidos, com consequente aumento na liberação hepática de glicose e redução da sua captação pelo músculo. No pâncreas, ocorre disfunção nas células beta pancreáticas, reduzindo a secreção de insulina. Esses fatores, em conjunto, promovem resistência periférica à insulina e hiperglicemia, que pode evoluir para DM2. Além disso, o tecido adiposo visceral secreta menor quantidade de adiponectina, o que também contribui para a resistência periférica à insulina. Em contrapartida, o depósito de tecido adiposo na região subcutânea, leva à menor liberação de AGL gerando, assim, menores consequências metabólicas (MUHLHAUSLER; SMITH, 2009).

Reunidas, estas informações conduzem ao entendimento de que a gordura interesterificada não seria boa alternativa para substituir a gordura *trans*, uma vez que aumentaria o risco de alterações da secreção de adipocinas pelo tecido adiposo bem como o risco de ocorrência de problemas cardiovasculares, resistência à insulina e obesidade.

Entretanto, quando procedemos à análise dos resultados relativos à avaliação da homeostase glicêmica (testes de tolerância intraperitoneal à glicose e à insulina, glicemia e insulinemia de jejum) bem como dos dados referentes ao modelo de avaliação de resistência à insulina aplicado (HOMA-IR), não identificamos diferenças significativas entre os grupos investigados. Desta forma, o consumo de diferentes fontes lipídicas, exclusivamente durante a gestação e lactação, não foi capaz de alterar parâmetros relacionados à homeostase glicêmica da prole aos três meses de idade.

A literatura tem demonstrado que a instalação da RI está relacionada ao envelhecimento, o que poderia justificar os resultados encontrados neste estudo, uma vez que aos três meses de idade, estes animais ainda são jovens (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Karakelides et al. (2010) compararam indivíduos jovens, eutróficos e obesos, com idosos em ambas as condições. Estes autores encontraram, entre indivíduos com idade avançada, associação negativa entre sensibilidade à insulina e adiposidade. Gomez-Perez et al. (2011) avaliaram alterações na sensibilidade à insulina relacionadas à idade e ao sexo de ratos. Os autores mostraram que ratos machos apresentaram redução da sensibilidade à insulina após os 3 meses de idade. Entretanto, os teores de insulina e glicemia plasmáticas de jejum, assim como os valores do HOMA-IR e dos testes de tolerância oral à glicose, apresentaram valores significativamente maiores em animais bem mais velhos (18 meses), quando comparados aos mais jovens. Deste modo, estes autores concluíram que o envelhecimento de ratos machos induz à menor tolerância à glicose, quando comparados aos machos mais jovens. Recentemente, Sardinha et al. (2013) avaliaram os efeitos do consumo de dietas com diferentes perfis de AG, durante os 12 primeiros dias de gestação, sobre a adiposidade e sensibilidade à insulina, na prole, ratos machos e fêmeas, quando adulta. Foram oferecidas às fêmeas prenhas, dietas normolipídicas e isoenergéticas, contendo óleos de soja, oliva, peixe, linhaça e palma. As análises foram conduzidas aos 4, 8 e 12 meses de vida da prole. A insulinemia de jejum sofreu elevação, conforme o aumento da idade dos ratos machos pertencentes a todos os grupos experimentais. Com 8 meses de idade os machos do grupo palma apresentaram valores mais elevados de AUC relativos ao teste de tolerância oral à glicose realizado. Os machos tratados, durante a fase anabólica da gestação, com ração a base de OP, apresentaram valores referentes ao HOMA-IR progressivamente maiores com o avanço da idade.

As evidências científicas apresentadas, em confronto com os resultados obtidos no presente estudo, sugerem a necessidade de estender o período experimental originalmente delineado, de modo a viabilizar possível identificação de efeitos de natureza semelhante aos já relatados na literatura, no que diz respeito às alterações na homeostase glicêmica dos animais, quando mais velhos.

Os AG podem se incorporar aos fosfolipídios de membrana e afetar diferentes funções celulares e processos bioquímicos e inflamatórios (CONNOR; NEURINGER; LIN, 1990). Sob essa ótica, buscamos avaliar a distribuição dos AG nos lipídios circulantes, bem como nos tecidos hepático e adiposos epididimal e inguinal, dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais, aos três meses de idade. Considerando que todos os grupos passaram a receber ração manipulada a base de óleo de soja (controle), a partir do desmame, a presença significativa dos AG predominantes nas dietas oferecidas às suas respectivas progenitoras, durante a gestação e lactação, nos tecidos destes animais adultos, pode resultar, em longo prazo, no desenvolvimento de síndrome metabólica, em razão dos efeitos atribuídos a alguns desses AG.

O conteúdo de AGT no plasma dos animais do grupo GT, parece refletir os estoques corporais referentes à ingestão materna, durante a gestação e lactação, de GVPH. A incorporação dos AGT nos tecidos adiposos epididimal e inguinal dos animais GT está associada aos estoques construídos durante a lactação e, certamente, não à ingestão após o desmame. Também não reflete a síntese endógena, uma vez que esses AG não são sintetizados por animais não ruminantes.

O perfil de AG do fígado dos animais GT e GI reflete menor quantidade de AGE (AL) e AGPI totais. Sabe-se que a GVPH além de influenciar o metabolismo dos AGE, prejudicando a conversão destes em seus AGPI-CL, também contém menor quantidade de AGE (MARTIN et al., 2006). Além disso, a menor concentração de AGPI, como ALA e EPA, presentes no tecido hepático dos animais GT e GI, quando comparados ao GC, pode induzir a uma resposta inflamatória, uma vez que, já é reconhecido o papel anti-inflamatório dos AGE da série n-3 (CALDER, 2006). Um trabalho desenvolvido recentemente por Itariu et al. (2012) mostrou que o tratamento dietético com ácidos graxos n-3 foi capaz de modular favoravelmente o sistema inflamatório em indivíduos obesos não diabéticos.

Com base nos resultados aqui apresentados, podemos concluir que a alternativa atualmente utilizada pela indústria de alimentos, compreendendo a substituição da gordura vegetal parcialmente hidrogenada, por óleo de palma ou gordura interesterificada, duas gorduras ricas em ácido palmítico, pode não ser a melhor, considerando seus efeitos negativos para saúde. A exposição a essas fontes lipídicas, durante a gestação e lactação, foi capaz de ocasionar, na prole, alterações no desenvolvimento e metabolismo do tecido adiposo, com repercussões na idade adulta, favorecendo o aumento da adiposidade visceral e, consequentemente, o risco de RI. Nosso entendimento é no sentido de que a gordura rica em AGT deve, de fato, ser reduzida na alimentação, devido aos seus efeitos deletérios, no entanto, pesquisas sobre os substitutos da GVPH permanecem exigindo investigações adicionais.

8. CONCLUSÃO

Em síntese, o consumo de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, gordura interesterificada, óleo de palma ou óleo de soja (grupo controle), exclusivamente durante a gestação e lactação, produziu em camundongos C57BL/6 e sua prole (machos) aos 3 meses de idade:

- Aumento da ingestão alimentar das camundongas GI e GP, ao final da lactação;
- Aumento da massa corporal nos filhotes GI e GP, desde o desmame até os 90 dias de vida;
- Aumento da massa de tecido adiposo epididimal nos filhotes GI;
- Aumento da massa de tecido adiposo inguinal nos filhotes GP;
- Aumento do volume de gordura interna, externa e total nos filhotes GI;
- Hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo epididimal dos filhotes GI;
- Hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo inguinal dos filhotes GT;
- Diferenças não significativas em testes de avaliação da homeostase glicêmica e sensibilidade à ação periférica da insulina (TTG, TTI, HOMA-IR) entre todos os grupos experimentais;
- Teores mais elevados de AGT e AGPI nos lipídios circulantes de filhotes GT e GI, respectivamente, comparados ao grupo GC;
- Teores hepáticos mais reduzidos de AGMI e AGPI em filhotes GT e GI, comparados ao grupo GC;
- Teores mais elevados de AGT nos tecidos adiposos epididimal e inguinal dos filhotes GT, comparados ao GC.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a alternativa atualmente utilizada pela indústria de alimentos com o objetivo de reduzir os isômeros *trans* em gêneros alimentícios, disponibilizados para o consumo, pode concorrer para o estabelecimento de agravos à saúde, especialmente por ter sido o óleo de palma e a gordura interesterificada implicados com o aumento da adiposidade corporal. A gordura interesterificada, disponibilizada exclusivamente durante os períodos críticos do desenvolvimento, promoveu aumento da massa corporal em razão, principalmente, do acúmulo de massa adiposa em região visceral, cuja relação com a promoção da RI já está bem estabelecida na literatura. Neste sentido, maior atenção deve ser dirigida para a seleção de tecnologias mais apropriadas no sentido de produzir substitutos para os AGT ou selecionar fontes lipídicas não associadas a efeitos deletérios saúde. Em que pese a contribuição dos resultados obtidos neste estudo, investigações adicionais permanecem sendo necessárias.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2003. Resolução RDC nº 360/2003. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de dezembro de 2003

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2010. Gordura trans. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/gordura_trans.pdf
Acesso: jun. 2011.

AGROPALMA, 2011. Óleo de palma. Disponível em
http://www.agropalma.com.br/produto.asp?/4/18/oleo-de-palma/
Acesso: mar. 2011.

AGUILERA, O. et al. Epigenetics and environment: a complex relationship. J Appl Physiol., v. 109, n. 1, p. 243-251, jul. 2010.

AKPINAR, M. A.; GÖRGUN, S.; AKPINAR, A. E. A comparative analysis of the fatty acids profiles in the liver and muscle of male and female Salmo trutta macrostigma. Food Chem., v. 112, p. 6-8, 2009.

ALBERTI, K.G.M.M. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation., v 120, p. 1640-1645, oct 2009.

ALBUQUERQUE, K. T et al. Intake off trans fatty acid-rich hydrogenated during pregnancy and lactation effects of central insulin in the adult offspring. Nutrition., v. 22, n. 7-8, p. 820-829, jul./aug. 2006.

ALWAN, A. et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. Lancet., v. 376, n. 9755, p. 1861-1868, nov. 2010.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). 2011. Official Method Ce 2b-11. Direct Methylation of Lipids in Foods by Alkali Hydrolysis.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p, 2002.
Disponível em: <http://books.scielo.org>.
Acesso em: set. 2013.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature., v. 372, n. 6502, p. 186-190, nov. 1994.

ASILMAZ, E. et al. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. J Clin Invest., v. 113, n. 3, p. 414-424, feb. 2004.

ASTRUP, A. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. N Engl J Med., v 359, n.3, p. 2169-2170, jul 2008.

AUED-PIMENTEL, S.; SILVA, S. A.; KUS, M. M. M. Evaluation of total fat, saturated and trans fatty acids in foodstuffs with the claim “trans free”. Braz J Food Technol.,v 2, p. 51-57, jun 2009.

BALK, E. M. et al. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. Atherosclerosis, v 189, n.1, p. 19-30, nov 2006.

BAUMANN, C.A. et al. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. Nature, v 407, p. 202-207, sep 2000.

BENDSEN, N.T. et al. Effect of trans fatty acid intake on insulin sensitivity and intramuscular lipids- -a randomized trial in overweight postmenopausal women. Metabolism., v 60, n.7, p. 906-913, jul 2011.

BERGER, K.G. Trans-Free Fats With the Products of the Oil Palm – a Selective Review. Czech J Food Sci., v 25, n.4, p. 174-181, 2007.

BERGER, K.G.; IDRIS, N.A. Formulation of Zero-trans Acid Shortenings and Margarines and Other Food Fats with Products of the Oil Palm. JAOCS., v 82, n.11, p. 775-782, nov 2005.

BERGMAN, R.N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab., v 11, n.9, p. 351-356, nov 2000.

BERRY, S.E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. Nutr Res Rev., v 22, n.1, p. 3-17, jun 2009.

BERTOLINO, C.N. et al. Dietary trans fatty acid intake and serum lipid profile in Japanese-Brazilians in Bauru, São Paulo, Brazil. Cad Saúde Pública., v 22, n.2, p. 357-364, fev 2006.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. Nature., v 447, p. 396-368, may 2007.

BISPO, K.P. Efeitos do consumo de gordura interesterificada, trans ou óleo de palma, durante a gestação e lactação, sobre a sensibilidade à ação da insulina no hipotálamo da prole adulta de ratas Wistar. [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BLUHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab., v 27, n.2, p. 163-177, apr 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura. 2011. Ministério orienta o plantio de palma de óleo de dendê para evitar perdas. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/03/22/ministerio-orienta-plantio-de-palma-de-oleo-dende-para-evitar-perdas. Acessado em março de 2011.

BRUCE, K.D.; HANSON, M.A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. J Nutr., v 140, n.3, p. 648-652, mar 2010.

BUCKLEY, A.J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fatfed rats. Metabolism., v 54, n.4, p. 500-507, apr 2005.

BURDGE, G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., v 7, n.2, p. 137- 144, mar 2004

CACHO, J. et al. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. Am J Physiol Endocrinol Metab., v 295, p. 1269-1276, sep 2008.

CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr., v 83, p. 1505-1519, jun 2006.

CINTI, S. The adipose organ. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids., v 73, n. 1, p. 9-15, jul 2005.

CLIFTON, P.M.; KEOGH, J.B.; NOAKES, M. Trans Fatty Acids in Adipose Tissue and the Food Supply Are Associated with Myocardial Infarction. J Nutr., v 134, n.4, p. 874-879, apr 2004.

CONNOR, W.E.; NEURINGER, M.; LIN, D.S. Dietary effects on brain fatty acid composition; the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexenoic acid in the brain, liver, plasma and erythrocytes of infant piglets. J Lipid Res., v 31, n.2, p. 237-247, feb 1990.

COSTA, C.A.S. et al. Tomografia computadorizada na Avaliação da distribuição do tecido adiposo abdominal de ratos alimentados com rações hiperlipídicas após desnutrição neonatal. Radiol Bras., v 40, n.5, p. 337-340, 2007.

COTTRELL, E.C.; OZANNE, S.E. Early life programming of obesity and metabolic disease. Physiol Behav., v 94, n.1, p. 17-28, apr 2008.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L.A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences., v 38, n.3, p. 345-354, set 2002.

DEMMELMAIR, H.; VON ROSEN, J.; KOLETZKO, B. Long-term consequences of early nutrition. Early Hum Dev., v 82, n.8, p. 567-574, aug 2006.

DENG, Y.; SCHERER, P.E. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. Ann N Y Acad Sci., v 1212, p.1-19, nov 2010.

DE ROOS, B.; MAVROMMATIS, Y.; BROUWER, I.A. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. Br J Pharmacol., v 158, n.2, p. 413-428, sep 2009.

DE ROOS, N.M. et al. Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. Eur J Clin Nutr., v 56, n.7, p. 674-679, jul 2002.

DESPRES, J.P. et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol., v 28, n.6, p. 1039-1049, jun 2008.

DONOHOE, C.L.; DOYLE, S.L.; REYNOLDS, J.V. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. Diabetol Metab Syndr., v 3, n.12, p. 1-13, jun 2011.

DÖRNER, G. Perinatal hormone levels and brain organization. In: Stumpf WE, Grant LD. Anatomical neuroendocrinology. S Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney. p. 245-252, 1975.

DULLOO, A.G. et al. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. Int J Obes., v 34, p. 4-17, dec 2010.

EBONG, P.E.; OWU, D.U.; ISONG, E.U. Influence of palm oil (Elaesis guineensis) on health. Plant Foods Hum Nutr., v 53, n.3, p. 209-222, 1999.

EDEM, D.O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review. Plant Foods Hum Nutr., v 57, n. 3-4, p. 319-341, 2002

EEG-OLOFSSON, K. et al. Risk of cardiovascular disease and mortality in overweight and obese patients with type 2 diabetes: an observational study in 13,087 patients. Diabetologia., v 52, n.1, p. 65-73, jan 2009.

EILANDER, A. et al. Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., v 76, p. 189-203, jan 2007.

FANTUZZI, G.; MAZZONE, T. Nutrition and Health: Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease. Part I - Adipose Tissue: Structure and Function; Chapter 1 - The Adipose Organ. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007

FERNANDES, F.S. et al. Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., v 86, p. 167-174, mar 2012.

FERNANDES, F.S. Influence of maternal diet during early pregnancy on the fatty acid profile in the fetus at late pregnancy in rats. Lipids., v 47, p. 505-17, feb 2012.

FERNANDEC-TWINN, D.S. et al. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., v 288, n.2, p. 368-373, feb 2005.

FLORES, M.; BARQUERA, S.; CARRIÓN, C. Inflamación obesidad y diabetes mellitus tipo 2. In Sobrepeso y Obesidad, 1st ed. Eds.; Instituto Nacional de Salud Pública: México, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. Arq Bras Endocrinol Metabol., v 50, n.2, p. 216-229, apr 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr., v 83, p. 192-203, nov 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2011. Fats and Fatty Acids in Human Nutrition - Report of an Expert Consultation. FAO - Food and Nutrition Paper, 91.

FORNAZZARI, I.M. et al. Ácido graxo ômega 3 e a saúde humana: V Semana de Tecnologia em alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, v 2, p. 1-14, 2007.

FOWDEN, A.L. et al. Programming placental nutrient transport capacity. J Physiol., v 572, p. 5-15, apr 2006.

FOX, B.G.; LYLE, K.S.; ROGGE, C.E. Reactions of the diiron enzyme stearoyl-acyl carrier protein desaturase. Acc Chem Res., v 37, n.7, p. 421-429, jul 2004.

FUNCK, L.G.; BARRERA-ARELLANO, D.; BLOCK, J.M. Conjugated linoleic acid (CLA) and its relationship with cardiovascular disease and associated risk factors. Arch Latinoam Nutr., v 56, n.2, p. 123-134, jun 2006.

GAIDUS, C.L.; DALLAROSA, D.; SILVA, E.B. Avaliação sensorial de biscoitos tipo wafer sabor chocolate com reduzido teor de gordura trans. Nutr Bras., v 6, p. 223-229, 2007.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Developmental plasticity and human disease: research directions. J Intern Med., v 261, n.5, p. 461-471, may 2007.

GLUCKMAN, P.D. et al. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. Proc Biol Sci., v 272, p. 671-677, apr 2005.

GODOY-MATOS, A.F. et al. Diretrizes brasileiras de obesidade. Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica (Abeso). 3ª edição. São Paulo. 2009.

GOMEZ-PEREZ, Y. et al. Age-related decline of skeletal muscle insulin sensitivity in rats: effect of sex and muscle type. Rejuvenation Res., v 14, n.2, p. 153-161, apr 2011.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; ANDO, M.Y. Otimização da Reação de Interesterificação Química do Óleo de Palma. Quim. Nova., v 28, n.4, p. 633-636, feb 2005.

GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. Lipid Technologies and Applications: Marcel Dekker. New York, p. 834, 1997.

HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M. Leptin and its receptor. J Endocrinol., v 155, n.2, p. 215-216, nov 1997.

HASSAN, A.H. Palm oil and health. The Planter., v 64, p. 505-519, 1988.

HAUNER, H. et al. The impact of nutritional fatty acids during pregnancy and lactation on early human adipose tissue development. Rationale and design of the INFAT study. Ann Nutr Metab., v 54, n.2, p. 97-103, mar 2009.

HAYES, K.C.; PRONCZUK, A. Replacing trans fat: the argument for palm oil with a cautionary note on interesterification. J Am Coll Nutr., v 29, s.3, p. 253-284, jun 2010.

HEERWAGEN, M.J. et al. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., v 299, n.3, p. 711-722, sep 2010.

HEIKKINEN, S., et al. Evaluation of glucose homeostasis. Curr Protoc Mol Biol., Chapter 29, Unit 29B3, s. 77, p. 1-22, jan 2007.

HERRERA, E. et al. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. Horm Res., v 65, s.3, p. 59-64, apr 2006.

HILL, J.O.; PETERS, J.C. Environmental contributions to the obesity epidemic. Science., v 280, p. 1371-1374, may 1998.

HOSSAIN, M.A. Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild? Adv J Food Sci and Technol., v 3, n.6, p. 455-466, dec 2011.

HUNTER, J.E. Dietary levels of trans fatty acids: basis for health concerns and industry effort to limit use. Nutr Res., v 25, n.5, p. 499-513, may 2005.

IBRAHIM, A.; BASAK, S.; EHTESHAM, N.Z. Impact of maternal dietary fatty acid composition on glucose and lipid metabolism in male rat offspring aged 105 d. Br J Nutr., v 102, n.2, p. 233-241, jul 2009.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. J Pediatr., v 143, s.4, p. 1-8, oct 2003.

INNIS, S.M., Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. Matern Child Nutr., v 7, s.2, p. 112-123, apr 2011.

ITARIU, B.K. et al. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr., v 96, n.5, p. 1137-1149, nov 2012.

JUDEX, S. et al. Quantification of adiposity in small rodents using micro-CT. Methods., v 50, n.1, p. 14-19, jan 2010.

KARAKELIDES, H. et al. Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function. Diabetes., v 59, n.1, p. 89-97, jan 2010.

KARUPAIAH, T.; SUNDRAM, K. Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. Nutr Metab., v 4, n.16, p. 1-17, jul 2007.

KHAN, I.Y. et al. 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. 127-133, aug 2004.

KLUTH, O. et al. Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. Diabetologia., v 54, p. 605-616, mar 2011.

KOH-BANERJEE, P. et al. Prospective study of the association of changes in dietary intake, physical activity, alcohol consumption, and smoking with 9-y gain in waist circumference among 16 587 US men. Am J Clin Nutr., v 78, n.4, p. 719-727, oct 2003.

KOUKKOU, E. et al. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. Circulation., v 98, n.25, p. 2899-2904, 1998.

KRITCHEVSKY, D. et al. Cholesterol Vehicle in Experimental Atherosclerosis Refined, Bleached, Deodorized (RBD) Palm Oil, Randomized Palm Oil and Red Palm Oil. Nutr Res., v 20, p. 887-892, 2002.

LEON, L.R. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. J Thermal Biol., v 30, p. 273-288, jan 2005.

LEPAGE, G.; ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J Lipid Res., v 27, p. 114-120, 1986.

LEVIN, B.E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., v 361, p. 1107-1121, jun 2006.

LIOU, Y.A. et al. Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. J Nutr., v 137, p. 945-952, jan 2007.
LIST, G.R. et al. Margarine and Shortening Oils by Interesterification of Liquid and Trisaturated Triglycerides. JAOCS., v 72, p. 379-382, 1995.

LOPEZ-GARCIA, E. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. J Nutr., v 135, n.3, p. 562-566, mar 2005.

LOPEZ, S. et al. Effects of meals rich in either monounsaturated or saturated fat on lipid concentrations and on insulin secretion and action in subjects with high fasting triglyceride concentrations. Am J Clin Nutr., v 93, n.3, p. 494-499, mar 2011.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. Arq Bras Endocrinol Metab., v 53, n.5, p. 595-607, jul 2009.

LUCAS, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. Arch Dis Child., v 71, n.4, p. 288-290, oct 1994.

MACCARRONE, M., et al. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. Annu Rev Nutr., v 30, p. 423-440, aug 2010.

MARTIN, C.A. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. Rev Nutr Campinas., v 19, n.6, p. 761-770, dec 2006.

MATHEW, V.; AYYAR, S.V. Developmental origins of adult diseases. Indian J Endocrinol Metab., v 16, n.4, p. 532-541, jul 2012.

MATTHAN, N.R. et al. Hydrogenated fat consumption affects cholesterol synthesis in moderately hypercholesterolemic women. J Lipid Res., v 41, p. 834-839, 2000.

MILAGRO, F.I. et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progress and perspectives. Mol Aspects Med., v 34, n. 4, p. 782-812, jul 2012.

MISAN, V. Avaliação da microcirculação e da resposta inflamatória na prole cujas mães receberam durante a gestação e lactação dietas contendo gordura interesterificada, óleo de palma ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada. [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

MOZAFFARIAN, D.; CLARKE, R. Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. Eur J Clin Nutr., v 63, s.2, p. 22-33, may 2009.

MOZAFFARIAN, D. et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. Am J Clin Nutr., v 79, n.4, 606-612, apr 2004.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J.H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. J Am Coll Cardiol., v 58, n.20, p. 2047-2067, nov 2011.

MUHLHAUSLER, B.S.; DUFFIELD, J.A.; MCMILLEN, I.C. Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor-g (PPARg), adiponectin and leptin mRNA expression in adipose tissue before birth. Endocrinology., v 148, n.2, p. 878-885, feb 2007.

MUHLHAUSLER, B.; SMITH, S.R. Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. Trends Endocrinol Metab., v 20, n.2, p. 51-57, mar 2009.

MUKHERJEE, S.; MITRA, A. Health Effects of Palm Oil. J Hum Ecol., v 26, n.3, p. 197-203, 2009.

MULLER, H. et al. Replacement of partially hydrogenated soybean oil by palm oil in margarine without unfavorable effects on serum lipoproteins. Lipids., v 33, n.9, p. 879-887, sep 1998.

MULLER, M.J. et al. Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome. Obes Rev., v 13, s.2, p. 6-13, dec 2012.

NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. Annu Rev Nutr., v 24, p. 345-376, feb 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 4ª Edição, 2006

OGUNTIBEJU, O.O.; ESTERHUYSE, A.J.; TRUTER, E.J. Red palm oil: nutritional, physiological and therapeutic roles in improving human wellbeing and quality of life. Br J Biomed Sci., v 66, n.4, p. 216-222, 2009.

OLSHANSKY, S.J. et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. N Engl J Med., v 352, n.11, p. 1138-1145, mar 2005.

ONG, A.S.H.; GOH, S.H. Palm oil: a healthful and cost-effective dietary component. Food Nutr Bull., v 23, n.1, p. 11-22, mar 2002.

OSSO, F.S. et al. Trans fatty acids in maternal milk lead to cardiac insulin resistance in adult offspring. Nutrition., v 24, p. 727-732, mar 2008.

OZANNE, S.E.; FERNANDEC-TWINN, D.; HALES, CN. Fetal growth and adult diseases. Semin Perinatol., v 28, n.1, 81-87, feb 2004.

PATEL, P.; ABATE, N. Body fat distribution and insulin resistance. Nutrients., v 5, n.6, p. 2019-2027, jun 2013.

PEDERSEN, S.D. Metabolic complications of obesity. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab., v 27, n.2, p. 179-193, apr 2013.

PERINI, J.Â.L. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. Rev Nutr Campinas., v 23, n.6, p. 1075-1086, dec 2010.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest., v 106, n.2, p. 165-169, jul 2000.

PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Etiology of insulin resistance. Am J Med., v 119, n.5, s.1, p 10-16, may 2006.

PIMENTEL, G D. et al. Intake of trans fatty acid during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NK κ Bp65 signaling in adult offspring. Journal of Nutritional Biochemistry,v 23, n.3, p.265-271, mar 2011

PISANI, L. P. et al. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid and adipokine mRNA in 21-day-old rats. Nutrition, v 24, n.3, p. 255-261, mar 2008

PUTNAM, K. et al. Deficiency of angiotensin type 1a receptors in adipocytes reduces differentiation and promotes hypertrophy of adipocytes in lean Mice. Endocrinology. v 153, n.10, p. 4677-4686

RACT, J.N.R.; GIOIELLI, L.A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. Quim Nova., v 31, n.8, p. 1960-1965, oct 2008.

RANDLE, P.J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet., v 1, n.7285, p. 785-789, apr 1963.

RANKINEN, T. et al. The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. Obesity., v 14, n.4, p. 529-644, 2006.

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. 1939-1951, nov 1993.

RIBEIRO, A.P.B. et al. Interesterificação química de óleo de soja e óleo de soja totalmente hidrogenado: influência do tempo de reação. Quim Nova., v 32, n.4, p. 939-945, feb 2009.

RIBEIRO, A.P.B. et al. Interesterificação Química: Alternativa Para Obtenção de Gorduras Zero Trans. Quim Nova., v 30, n.5, p. 1295-1300, may 2007.

ROBINSON, D.M. et al. Influence of interesterification of a stearic acid-rich spreadable fat on acute metabolic risk factors. Lipids., v 44, n.1, p. 17-26, jan 2009.

RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. Food Res Intern., v 36, n.2, p.149-159, nov 2003.

SABARENSE, C.M.; MANCINI FILHO, J. Effect of the partially hydrogenated vegetable fat on the incorporation of trans fatty acids in rat tissues. Rev Nutr Campinas., v 16, N.4, p. 399-407, dec 2003.

SALMERON, J. et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. Am J Clin Nutr., v 73, n.6, p. 1019 -1026, jun 2001.

SAMUELSSON, A.M. et al. 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. 383-392, feb 2008.

SANCHEZ-MUNOZ, F. et al. Adipocitokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells. Gac Med Mex., v 141, n.6, p. 505-512, dec 2005.

SANTOS, R.D. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. Arq Bras Cardiol., v 100, n.1, s.3, p. 1-40, jan 2013.

SARDINHA, F.L. et al. 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., v 304, n.4, p. 313-320, feb 2013.

SCHMIDT, I. et al. Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. Am J Physiol Physiol Genomics., v 3, n.2, p. 113-120, aug 2000.

SEMMA, M. Trans Fatty Acids: Properties, Benefits and Risks. Journal of Health Science., v 48, n.1, p. 7-13, 2002.

SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest., v 106, n.2, p. 171-176, jul 2000.

SIDDIQUI R.A. et al. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. Review. Mini Rev Med Chem., v 4, n.8, p. 859-871, oct 2004.

SIEMELINK, M. et al. 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. 1397-1403, oct 2002.

SILVA, A.P. et al. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. Lipids., v 41, n.6, p. 535-541, jun 2006.

SILVA, A.P. et al. Plasma fatty acids, lipid metabolism and lipoproteins in rats fed on palm oil and partially hydrogenated soybean oil. Rev Nutr Campinas., v 18, n.2, p. 229-237, apr 2005.

SILVA, R.C.; ESCOBEDO, J.P.; GIOIELLI, L.A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados por interesterificação química de banha e óleo de soja. Quim Nova., v 31, n.2, p.330-335, 2008.
SIMOPOULOS, A.P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. Food Rev Int., v 20, n.1, p. 77-90, 2004.

SLIVKOFF-CLARK, K.M.; JAMES, A.P.; MAMO, J.C. The chronic effects of fish oil with exercise on postprandial lipaemia and chylomicron homeostasis in insulin resistant viscerally obese men. Nutr Metab., v 9, n.9, p. 1-9, feb 2012.

SMAS, C.M.; SUL, H.S. Control of adipocyte differentiation. Biochem J., v 309, p. 697-710, aug 1995.

SMITH, S.R. et al. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. Metabolism., v 50, n.4, p. 425-435, apr 2001.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. Química Orgânica, 8ª edição, 2005.

SPALDING, K.L. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature., v 453, n.7196, p. 783-787, jun 2008.

STOCKER, C.J.; ARCH, J.R.; CAWTHORNE, M.A. Fetal origins of insulin resistance and obesity. Proc Nutr Soc., v 64, n.2, p. 143-151, may 2005.

STRAWFORD, A. et al. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O. Am J Physiol Endocrinol Metab., v 286, n.4, p. 577-588, apr 2004.

SUN, Q. et al. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. Circulation., v 115, n.14, p. 1858-1865, apr 2007.

SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K.C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. Nutr Metab., v 4, n.3, p. 1-12, jan 2007.

TAMEMOTO, H. et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature., v 372, n.10, p. 182-186, nov 1994.

TARRAGO-TRANI, M.T. et al. New and existing oils and fats used in products with reduced trans-fatty acid content. J Am Diet Assoc., v 106, n.6, 867-880, jun 2006.
TAUBES, G. Insulin resistance. Prosperity's plague. Science., v 325, p. 256-260, 2009.

TETRI, L.H. et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., v 295, p. 987-995, n.5, nov 2008.

THOLSTRUP, T.; HJERPSTED, J.; RAFF, M. Palm olein increases plasma cholesterol moderately compared with olive oil in healthy individuals. Am J Clin Nutr., v 94, n.6, p. 1426-1432, dec 2011.

TINOCO, S.M. et al. The importance of essential fatty acids and the effect of trans fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. Cad Saude Publica., v 23, n.3, p. 525-534, mar 2007.

UMLAUF, D.; FRASER, P.; NAGANO, T. The role of long non-coding RNAs in chromatin structure and gene regulation: variations on a theme. Biol Chem., v 389, n.4, p. 323-331, apr 2008.

UNSCN. 6th Report on the World Nutrition Situation – Progress in Nutrition. United Nations System Standing Committee on Nutrition, Geneva, Switzerland. 2010 Disponível em http://www.unscn.org/files/Publications/RWNS6/report/SCN_report.pdf Acessado em setembro de 2011.

VALDÉS-RAMOS, R.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A.D. Nutrition and immunity in cancer. Br J Nutr, v 98, s.1, p. 127-132, 2007.

VARDAVAS, C.I. et al. Fatty acid and salt contents of snacks in the Cretan and Cypriot market: a child and adolescent dietary hazard. Food Chemistry., v 101, p. 924-931, 2007.

VEGA-LOPEZ, S. et al. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. Am J Clin Nutr., v 84, p. 54-62, mar 2006.

WANG, C.C.; GOALSTONE, M.L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. Diabetes., v 53, n.11, p. 2735-2740, nov 2004.

WANG, Y. et al. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. J Lipid Res., v 46, n.4, p. 706-715, apr 2005.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. Recent Prog Horm Res., v 56, p. 175-193, 2001

WHITE, B. Dietary fatty acids. Am Fam Physician., v 80, n.4, p. 345-350, aug 2009.

WHITELAW, N.C.; Whitelaw, E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. Hum Mol Genet., v 15, n.2, oct 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, Nutrition and The Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series, v 916, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health Report, 2007.
Disponível em: http://www.who.int/whr/2007/en/. Acessado em julho de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva, 2004. Disponível em: < http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/index.html>. Acesso : 03 set. 2013.
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. 2013 Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.Acesso : jun. 2013.

WIDDOWSON, E.M.; MCCANCE, R.A. The Effect of Finite Periods of Undernutrition at Different Ages on the Composition and Subsequent Development of the Rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci., v 158, p. 329-342, 1963.

WILLETT, W.C. Trans fatty acids and cardiovascular disease-epidemiological data. Atheroscler Suppl., v 7, n.2, p. 5-8, may 2006.

WITHERS, D.J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature., v 391, n.6670, p. 900-904, feb 1998.

WOLMARANS, P. Background paper on global trends in food production, intake and composition. Ann Nutr Metab., v 55, p. 244-272, 2009.

WONSIL, B.; HERBEIN, J.; WATKINS, B. Dietary and ruminally derived trans 18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. J Nutr., v 124, n. 4, p. 556-565, apr 1994.

WU, CT.; MORRIS, J.R. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. Science., v 293, n.5532, p. 1103-1105, aug 2001.

YANG, Z.; HUFFMAN, S.L. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. Matern Child Nutr., v 9, s.1, p. 105-119, jan 2013.

YOSHIZUMI, T. et al. Abdominal Fat: Standardized Technique for Measurement at CT. Radiology., v 211, n.1, p. 283-286, apr 1999.

YOUDIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. Int J Dev Neurosci., v 18, p. 383-399, aug 2000.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos Moleculares De Resistência À Insulina Na Síndrome Metabólica. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo., v 14, n. 4, p. 574-589, aug 2004.

ZHIDONG, Xu, et al. An Improved Method for Determining Medium- and Long-Chain FAMEs Using Gas Chromatography. Lipids., v 45, p.199-208, jan 2010.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 28 de Fevereiro de 2012

Prezada Professora Maria das Graças Tavares do Carmo

A Comissão de Ética com uso de animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Efeito do Consumo Materno de Gordura Interesterificada, Parcialmente Hidrogenada e Óleo de Palma na Sensibilidade à Insulina e Homeostase Glicêmica da Prole Adulta"**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **INJC011.**

Atenciosamente;

PROF. PAULO DE ASSIS M.
REG. 52163
ICB-UFRJ

Prof. Paulo Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

Decania do CCS: Av.Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br