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

CONSUMO MATERNO DE DUAS VARIEDADES DE ÓLEO DE PALMA DURANTE O PERÍODO PERINATAL E SEUS EFEITOS SOBRE A ADIPOSIDADE E TECIDO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos

Rio de Janeiro

Agosto - 2017

CONSUMO MATERNO DE DUAS VARIEDADES DE ÓLEO DE PALMA DURANTE O PERÍODO PERINATAL E SEUS EFEITOS SOBRE A ADIPOSIDADE E TECIDO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN), 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: Patrícia Coelho de Velasco

Rio de Janeiro

Agosto - 2017

Santos, Raísa Magno de Araújo Ramos dos.
Consumo materno de duas variedades de óleo de Palma durante o período perinatal e seus efeitos sobre a adiposidade e tecido hepático da prole adulta de camundongos. / Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro - INJC, 2017.
88 f.; il; 31 cm.

Orientadora: Maria das Graças Tavares do Carmo.

Coorientadora: Patrícia Coelho de Velasco.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós Graduação em Nutrição, 2017.

Referências bibliográficas: f. 79-87.

1. Oléo de Palmeira. 2. Ácidos Graxos 3. Lipídeos. 4. Adiposidade. 5. Mitocôndrias Hepáticas- fisiologia. 6. Desenvolvimento fetal. 7. Nutrição - Tese. I. Carmo, Maria das Graças Tavares do. II. Velasco, Patrícia Coelho de. III. UFRJ, INJC, Programa de Pós Graduação em Nutrição. IV. Título.

CONSUMO MATERNO DE DUAS VARIEDADES DE ÓLEO DE PALMA DURANTE O PERÍODO PERINATAL E SEUS EFEITOS SOBRE A ADIPOSIDADE E TECIDO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO 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 PARA A OBENÇÃO DO GRAU DE **MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA.**

Banca Examinadora:

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

Dr.ª Patrícia Coelho de Velasco
(Coorientadora)
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Prof.ª Dr.ª Wilza Arantes Ferreira Peres
(Titular Interno)
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.ª Dr.ª Gabrielle de Souza Rocha
(Titular Externo)
Faculdade de Nutrição Emilía de Jesus Ferreiro
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Agosto - 2017

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, me acalmando e confortando.

À minha mãe, que é e sempre será meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Sueli e Dorival, pela proteção, amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada por toda a dedicação que tem a mim e a meu irmão Heitor;
- À minha orientadora, Profª Maria das Graças Tavares do Carmo, pela oportunidade que meu deu desde a iniciação científica de ingressar no meio científico. Obrigada por todo o aprendizado durante esse tempo e por ser uma referência de professora e pesquisadora;
- À minha coorientadora, Patrícia Coelho de Velasco, por me ajudar nos experimentos e pela constante ajuda na elaboração dessa dissertação;
- À Professora Márcia Soares, por ter gentilmente aceito o convite para a revisão desse trabalho e também pelos valiosos ensinamentos desde as aulas da graduação;
- Aos amigos, em especial à Cris, Amanda, Thaiza e Raquel, que estão sempre dispostas a me ajudar, aconselhar e a ouvir meus desabafos. Obrigada por todo o carinho de vocês!
- Aos alunos de Iniciação Científica, Tarsis, Rafael, Ana Ruth, João Paulo, Elizabeth e Nathália. Vocês foram fundamentais para a realização desse projeto, obrigada por toda a ajuda durante esse período;
- Ao Prof Sérgio Souza, pela parceria desde 2013 nos experimentos de tomografia computadorizada;
- Ao Prof Antônio Galina pela parceria e colaboração nos experimentos de bioenergética mitocondrial. Obrigada também ao aluno Gustavo Chicaybam pela ajuda nos experimentos e nas análises de dados;
- Às técnicas do laboratório Karla e Juliana, que sempre estiveram dispostas a me ajudar quando precisei, principalmente nos experimentos de metilação. Obrigada pelo excelente trabalho de vocês;
- Aos colegas, professores e alunos do Laboratório de Bioquímica Nutricional por todo o auxílio e pela ótima convivência;
- A todos os professores e funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro pela ajuda e aprendizado desde a graduação.

CONSUMO MATERNO DE DUAS VARIEDADES DE ÓLEO DE PALMA DURANTE O PERÍODO PERINATAL E SEUS EFEITOS SOBRE A ADIPOSIDADE E TECIDO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS

Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos

Agosto/2017

Orientadora: Maria das Graças Tavares do Carmo

Coorientadora: Patrícia Coelho de Velasco

RESUMO:

O óleo de palma africana (OPA), quando consumido em períodos críticos do desenvolvimento, pode predispor a alterações metabólicas associadas com a obesidade na idade adulta. O óleo de palma híbrida (OPH), comparado ao OPA, apresenta menor teor de ácidos graxos saturados (AGS) e maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI). Contudo, ainda são escassos os trabalhos que demonstrem os efeitos do OPH na saúde. Avaliamos o efeito do consumo de dietas normolipídicas contendo essas duas variedades de palma durante o período perinatal sobre a adiposidade e função mitocondrial hepática da prole adulta de camundongos aos 100 dias de vida. As fêmeas prenhas foram alimentadas durante a gestação e lactação com dieta controle (contendo óleo de soja - GC); dieta com OPA (GPA) ou dieta com OPH (GPH). Após o desmame, a prole de machos recebeu dieta controle até ao final dos experimentos. Foi realizada coleta manual dos compartimentos adiposos viscerais e tomografia computadorizada para mensuração da adiposidade dos animais. O tecido hepático foi extraído para isolamento de mitocôndrias, e posteriormente, analisada a função mitocondrial através da respirometria de alta resolução e produção de peróxido de hidrogênio. A avaliação da homeostase glicêmica foi realizada por meio do teste de tolerância intraperotoneal à glicose. A incorporação de ácidos graxos em tecidos foi determinada através da cromatografia gás-líquido. Foram observadas diferenças pontuais de consumo na 1° e 2° semana pós-desmame (GPA > GPH e GC), não havendo diferença significativa de massa corporal entre os grupos. Com relação à adiposidade da prole, foi verificado que o somatório dos compartimentos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico no GPA foi significativamente superior quando comparado ao GC (+60%) e GPH (+34%). Na análise da adiposidade subcutânea abdominal por tomografia computadorizada, foi observado que GPA apresentou maior acúmulo desse tecido em comparação ao GC (+124%), enquanto GPH foi estatisticamente igual ao GC e GPA. O perfil de ácidos graxos do tecido adiposo epididimal demonstra que somente o GPA apresentou menor incorporação de ácido graxo poliinsaturado (AGPI), assim como maior índice de dessaturação (16:1/16:0), quando comparado ao controle. No teste de tolerância intraperitoneal à glicose não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos quando calculada as áreas sob a curva. Aos 100 dias de vida, a prole do GPA apresentou incorporação significativamente maior de AGS totais, especialmente o ácido esteárico, no tecido hepático em relação ao GC e GPH. Na avaliação da capacidade funcional de mitocôndrias hepáticas, não foram encontradas diferenças quanto ao consumo de oxigênio e produção de peróxido de hidrogênio entre os grupos. Enquanto o consumo de OPA promoveu efeitos deletérios no acúmulo de adiposidade e provocou modificações no perfil de ácidos graxos do tecido adiposo e hepático da prole, o consumo de OPH apresentou-se como possível alternativa de fonte lipídica, com desfechos semelhantes ao controle. Esses resultados demonstram que a substituição de AGS por AGMI ou AGPI na dieta durante o período perinatal pode ser benéfica na ocorrência de fenótipos metabólicos mais favoráveis na prole.

MATERNAL CONSUMPTION OF TWO VARIETIES OF PALM OIL DURING THE PERINATAL PERIOD AND ITS EFFECTS ON ADIPOSITY AND HEPATIC TISSUE IN ADULT MALE OFFSPRING

Raísa Magno de Araújo Ramos dos Santos

August/2017

Advisors: Maria das Graças Tavares do Carmo

Patrícia Coelho de Velasco

ABSTRACT:

African palm oil (APO), when consumed at critical times of development, may predispose to metabolic changes associated with obesity in adulthood. Hybrid palm oil (HPO), compared to APO, has a lower content of saturated fatty acids (SFA) and a higher proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA). However, there are still few studies that demonstrate the effects of HPO on health. We evaluated the effect of the consumption of normolipid diets containing these two palm varieties during the perinatal period on the adiposity and hepatic mitochondrial function of the adult offspring of mice at 100 days of age. The pregnant females were fed during gestation and lactation with control diet (containing soybean oil - CG); diet with APO (APG) or diet with OPH (HPG). After weaning, the offspring of males received control diet until the analyzes were completed. A manual collection of visceral compartments and computed tomography were performed to measure the adiposity of the animals. The hepatic tissue was extracted for isolation of mitochondria, and later, mitochondrial function was analyzed through high resolution respirometry and hydrogen peroxide production. The evaluation of glycemic homeostasis was performed by means of the intraperotoneal glucose tolerance test. The incorporation of fatty acids into tissues was determined by gas-liquid chromatography. Occasional differences in consumption were observed in the 1st and 2nd week after weaning (APG> HPG and CG), with no significant difference in body mass between groups. Regarding adiposity of the offspring, the sum of the epididimal, retroperitoneal and mesenteric adipose compartments in APG was significantly higher in relation to CG (+ 60%) and HPG (+ 34%). In the analysis of abdominal subcutaneous adiposity by computed tomography, APG showed greater accumulation of this tissue when compared to CG (+ 124%), while HPG was statistically equal to CG and APG. The fatty acid profile of the epididymal adipose tissue shows that only the APG showed lower PUFA incorporation, as well as a higher desaturation index (16:1/16: 0), when compared to the control. In the intraperitoneal glucose tolerance test, no significant differences were identified between the groups when calculating the areas under the curve. At 100 days of age, APG offspring presented significantly higher total SFA uptake, especially stearic acid, in hepatic tissue relative to CG and HPG. In the evaluation of the functional capacity of hepatic mitochondria, no differences were found regarding oxygen consumption and hydrogen peroxide production between groups. While the consumption of APO promoted deleterious effects on the accumulation of adiposity and caused changes in the fatty acid profile of the adipose and hepatic tissue of the offspring, the consumption of HPO was presented as a possible alternative lipid source, with similar outcomes to the control. These results demonstrate that the replacement of SFA by MUFA or PUFA in the diet during the perinatal period may favor the occurrence of more favorable metabolic phenotypes in the offspring.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina difosfato
AG: Ácido graxo
AGI: Ácido graxo insaturado
AGL: Ácido graxo livre
AGMI: Ácido graxo monoinsaturado
AGPI: Ácido graxo poliinsaturado
AGS: Ácido graxo saturado
AIN: Instituto Americano de Nutrição (*American Institute of Nutrition)*
ALA: Ácido α-linolênico
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA: Ácido araquidônico
ATP: Adenosina trifosfato
AUC: Área sob a curva (*Area Under the Curve*)
BHT: Butilhidroxitolueno
BSA: Albumina sérica bovina
CD: Grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
DCV: Doenças cardiovasculares
DHA: Ácido docosahexanoico
DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2
DNAmit: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNAn: Ácido desoxirribonucleico nuclear
EGTA: Ácido etilenoglicol bis (β aminoetil éter) N,N,N',N' tetraacético
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA: Ácido Eicosapentaenoico
EPM: Erro padrão da média
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FAD^+: Dinucleótido de flavina e adenina
$FADH_2$: Dinucleótido de flavina e adenina na forma reduzida
FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations)*
FCCP: *Carbonyl Cyanide p-Trifluoromethoxyphenylhydrazone*
FMN: Flavina mononucleotidio
GC: Grupo controle
GLUT: Transportador de glicose *(Glucose transporter)*
GPA: Grupo óleo de palma africana
GPH: Grupo óleo de palma híbrida
GVPH: Gordura vegetal parcialmente hidrogenada
HDL-c: Lipoproteína de alta densidade - colesterol (*High density lipoprotein cholesterol*)
HEPES: Ácido 2 [4(2 hidroxiletil) piperazinil(1)] etanossulfônico
IKK: Proteína quinase I-Kappa *(Ikappa kinase)*
IL:Interleucina
IMC: Índice de massa corporal
IRS: Substrato do receptor de insulina (*Insulin receptor substrate*)
IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry)*

JAK-2: Quinase regulada pela sinalização extracelular
LA: Ácido linoleico
LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade - colesterol (*Low density lipoprotein cholesterol*)
LPL: Lipase lipoproteica
LPS: Lipopolissacarídeo
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase)*
MCT: Massa corporal total
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NF-KB: Fator de transcrição nuclear kappa B
OP: Óleo de palma
OPA:Óleo de palma africana
OPH: Óleo de palma híbrida
PAI-1: Ativador de plasminogênio-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*)
PGC-1a: Cofator de transcrição (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α)*
PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase (*Phosphoinositide 3-kinase)*
PKB: Proteína quinase B
PKC: Proteína quinase C
PMG: Piruvato; malato; glutamato
PPAR: Receptores ativados por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor)*
PTPM: Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
RDC: Resolução de Diretoria Colegiada
RI: Resistência à insulina
SCD-1: Estearoil-CoA dessaturase (*stearoyl-CoA desaturase*)
SUCC: Succinato
TG: Triacilgiceróis
TLR-4: Receptor do tipo Toll-4 (*Toll-like receptor-4*)
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)
VET: Valor energético total
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very low density lipoprotein*)

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos (% total) das duas variedades de óleo de palma

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos (mg/g amostra) nos lipídios totais das rações experimentais oferecidas às fêmeas no período de gestação e lactação

RESULTADOS

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido hepático dos filhotes machos aos 21 dias de vida

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido hepático dos filhotes machos aos 100 dias de vida

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Representação do metabolismo de ácidos graxos

Figura 2: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3: Delineamento do estudo em modelo de programação metabólica

Figura 4A: Corte coronal delimitando a gordura existente em tecido subcutâneo abdominal do lado direito do animal

Figura 4B: Corte transversal na mesma topografia da Figura 4A

RESULTADOS

Figura 5: Média semanal do consumo alimentar de 24 horas (g/g massa corporal total, MCT) das camundongas durante a gestação e lactação

Figura 6: Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, das camundongas alimentadas com diferentes fontes lipídicas durante a gestação e lactação

Figura 7: Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos durante a lactação

Figura 8: Média semanal do consumo alimentar de 24 horas dos filhotes machos (g/g massa corporal total, MCT), que receberam ração controle desde o desmame até os 100 dias de vida

Figura 9: Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame até os 100 dias de vida

Figura 10: Massa (g/g massa corporal total, MCT) correspondente aos fígados de camundongos machos, aos 21 dias de vida

Figura 11: Massa (g/g massa corporal total, MCT) dos estoques de tecidos adiposos

Figura 12: Volume do estoque de tecido adiposo da região subcutânea do abdome na altura da lombar 3 (L3), analisado por tomografia computadorizada

Figura 13: Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG)

Figura 14: Área sob a curva glicêmica calculada no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG)

Figura 15: Massa (g/g massa corporal total, MCT) correspondente aos fígados de camundongos machos, aos 100 dias de vida

Figura 16: Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo I

Figura 17: Parâmetros de adaptação derivados do Protocolo de adição de substratos para o Complexo I

Figura 18: Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo II

Figura 19: Parâmetros de adaptação derivados do Protocolo de adição de substratos para o Complexo II

Figura 20: Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo I para produção de H_2O_2

Figura 21: Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo II para produção de H_2O_2

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....14
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....16
2.1 Importância nutricional dos lipídios.....20
2.2 Lipídios em produtos industrializados.....20
2.2.1 Óleo de palma.....20
2.2.1.1 Óleo de palma e aspectos econômicos/ambientais.....23
2.3 Óleo de palma híbrida.....24
2.3.1 Características físico-químicas e implicações metabólicas do óleo de palma híbrida.....25
2.4 Fisiologia mitocondrial.....27
2.4.1 Disfunção mitocondrial e a influência de ácidos graxos.....29
2.5 Programação metabólica e o papel dos lipídios dietéticos.....31
3.0 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE..... 35
4.0 OBJETIVOS.....36
4.1 Objetivo geral.....36
4.2 Objetivos específicos.....36
5.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....38
5.1 Aspectos éticos.....38
5.2 Animais e condições experimentais.....38
5.3 Elaboração de dietas.....42
5.4 Determinação do perfil de ácidos graxos das duas variedades de óleo de palma e das rações experimentais.....42
5.4.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos.....42
5.4.2 Cromatografia gasosa.....43
5.5 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais.....45
5.6 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) 46
5.7 Avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada 46
5.8 Coleta e processamento das amostras.....47
5.9 Determinação do perfil de ácidos graxos do fígado e tecido adiposo epididimal.....47
5.9.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos.....47

5.9.2 Cromatografia gasosa.....48
5.10 Determinação da função mitocondrial hepática.....49
5.10.1 Isolamento de mitocôndrias do fígado de camundongos.....49
5.10.2 Medida do consumo de oxigênio.....49
5.10.3 Determinação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2).....51
5.11 Análises estatísticas.....51
6.0 RESULTADOS.....52
7.0 DISCUSSÃO.....70
8.0 CONCLUSÃO.....78
REFERÊNCIAS.....79
ANEXOS.....88

1. Introdução

A obesidade resulta do desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético e atualmente é considerada um problema de saúde pública, devido à elevação de sua prevalência a nível mundial em diversos grupos populacionais (NG et al., 2014). O consumo de dietas com alta densidade calórica, além do sedentarismo, são os principais fatores para o aumento de peso na população brasileira (BRASIL, 2011). O acúmulo de adiposidade, principalmente na região abdominal, é relacionado à maior susceptibilidade de distúrbios metabólicos, incluindo dislipidemia, doenças cardiovasculares (DCV), resistência à insulina (RI), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; JUNG; CHOI, 2014).

Além da evidente interação entre padrões alimentares, estilo de vida e a ocorrência de obesidade, vários estudos epidemiológicos e experimentais demonstram a influência da nutrição materna durante os períodos críticos do desenvolvimento sobre a prevalência dessa desordem na prole. Os insultos ambientais ocorridos durante a gestação e lactação, tais como dietas desbalanceadas em macro ou micronutrientes, por exemplo, são capazes de modificar o metabolismo de órgãos e sistemas do feto, produzindo consequências em longo prazo na ocorrência de doenças, sendo esta hipótese reconhecida como "programação metabólica" (BARKER, 1995).

Os lipídios, assim como outros nutrientes, podem atuar como gatilhos de programação e predispor à prole ao desenvolvimento de adaptações fisiológicas (SIEMELINK et al., 2002; IBRAHIM; BASAK; EHTESHAM, 2009). Desta maneira, o consumo de gorduras presentes em produtos industrializados, que estão cada vez mais inseridos no hábito de compra da população brasileira (IBGE, 2010), pode promover efeitos significativos na ocorrência desse fenômeno.

O óleo de palma (OP) africana vem sendo largamente utilizado na fabricação de alimentos processados, principalmente após o governo brasileiro tornar obrigatória a rotulagem nutricional em embalagens, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 360/03 (ANVISA, 2003). A indústria alimentícia passou a substituir a gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH), reconhecidamente aterogênica (LICHTENSTEIN, 2014) pelo OP na tentativa de comercializar seus produtos de forma mais saudável, apresentando-os como "zero *trans*". A escolha pelo OP (*Elaeis guineenses*) se deve pela sua resistência à oxidação, em virtude do elevado teor de ácidos graxos saturados (AGS), especialmente de ácido palmítico, e o fato do mesmo ser usado sem hidrogenação, devido a sua textura semi-sólida à temperatura

ambiente (BERGER, 2007). Entretanto, apesar de ser considerado um substituto adequado por não conter isômeros *trans*, vários estudos apontam que a ingestão de OP ocasiona efeitos metabólicos similares e até mesmo deletérios quando comparado ao consumo de GVPH e a outras fontes lipídicas (VEGA-LOPEZ et al., 2006; MAGRI et al., 2015).

Nos últimos anos, foi desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) um híbrido interespecífico de palma (*Elaeis guineenses x Elaeis oleífera)*, com menor proporção de AGS e maior teor de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), em comparação ao óleo derivado da espécie *Elaeis guineenses*. A substituição na dieta de AGS por AGMI se mostra benéfica para a saúde, principalmente na prevenção de desordens metabólicas associadas à obesidade (SANTOS et al., 2013). Este híbrido, portanto, apresenta perfil lipídico vantajoso, em relação ao OP africana, para reduzir as concentrações plasmáticas da lipoproteína de baixa densidade-colesterol (*Low density lipoprotein cholesterol*, LDL-c), diminuir os riscos de eventos cardiovasculares e melhorar a sensibilidade à insulina (XAVIER et al., 2013). Até o momento, não há estudos que avaliem os efeitos do óleo derivado do híbrido interespecífico da palma oferecido em uma dieta normolipídica, durante o período da gestação e lactação, sobre a saúde da prole na idade adulta.

Neste projeto, pretendemos comparar o efeito do consumo de dieta isoenergética e normolipídica, contendo OP africana, OP híbrida, ou óleo de soja (OS, grupo controle) por fêmeas de camundongos C57BL/6, durante a gestação e lactação, sobre a adiposidade e função mitocondrial hepática da prole na idade adulta. A presente proposta poderá auxiliar na identificação de conhecimentos acerca dessa nova fonte lipídica, de composição diferenciada, sendo promissora, portanto, na utilização pela indústria e na promoção da saúde da população. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho fornecerão maiores esclarecimentos sobre a importância da qualidade lipídica da dieta durante os períodos críticos do desenvolvimento.

2. Revisão da literatura

2.1 Importância nutricional dos lipídios

Lipídios, óleos e gorduras consistem em uma variedade de compostos orgânicos, insolúveis em água, que possuem reconhecida importância fisiológica para diversos processos biológicos. Os fosfolipídios são responsáveis pela estrutura básica de membranas celulares; o colesterol é precursor de hormônios esteroidais, de ácidos bilares, e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K); e os triacilgliceróis (TG) constituem uma das formas mais importantes de armazenamento energético do organismo. Estes últimos, que representam aproximadamente 98% da gordura ingerida por alimentos, são formados por uma molécula de glicerol esterificada a três moléculas de ácidos graxos (AG's) que podem ocupar as posições sn-1, sn-2 e sn-3 (CURI et al., 2001; WANG et al., 2013).

Os AG's são ácidos carboxílicos constituídos de cadeias hidrocarbonadas, sendo classificados pelo comprimento da cadeia, pelo número de duplas ligações na cadeia e pela configuração das duplas ligações. Quanto ao comprimento, se o AG tiver menos de 8 átomos de carbono em sua estrutura é considerado de cadeia curta, se tiver entre 8 e 12 átomos de carbono é classificado como AG de cadeia média e se possuir mais de 12 átomos de carbono é nomeado de AG de cadeia longa. Em relação à presença de duplas ligações (insaturações) na cadeia carbônica, se houver ausência destas ao longo da cadeia, o AG é denominado saturado (AGS); se houver apenas uma ligação é chamado de AG monoinsaturado (AGMI), e se houver duas ou mais ligações duplas é nomeado de AG poliinsaturado (AGPI). Os AG's insaturados (AGI) também são classificados quanto à configuração da dupla ligação. São designados *cis* quando os átomos de hidrogênio da dupla ligação encontram-se do mesmo lado da molécula, e *trans* quando esses átomos se encontram em lados opostos (WANG et al., 2013).

Essas características químicas são determinantes para o estado físico à temperatura ambiente de óleos e gorduras. A cadeia hidrocarbonada de um AGS, por não conter insaturações, existe sob uma forma linear, estendida, contribuindo para maior interação entre as moléculas, enquanto os AGI possuem dobramentos rígidos ao longo da cadeia em decorrência das insaturações, dificultando a formação de cristais e interação entre moléculas. Como consequência, os AGS possuem ponto de fusão maior que os AGI. Além disso, quanto maior for o número de átomos de carbono de um AG, maior será seu ponto de fusão, devido ao aumento da atração de Van der Waals entre as moléculas (CURI et al., 2001; MU; PORSGAARD, 2005).

A nomenclatura dos AG's pode ser feita seguindo-se as regras da União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) para química orgânica ou pode ser apresentada de forma abreviada, utilizando-se o sistema alfa numérico. Desta última maneira, mais simplificada, o átomo de carbono, simbolizado pela letra C, é seguido do número de carbonos presentes na cadeia, do número de duplas ligações (caso existam), da posição e configuração da dupla ligação. No caso dos AGI, indica-se a posição da dupla ligação mais próxima do carbono do terminal metila, sendo neste caso representado pelo símbolo ômega (ω) ou a letra "n". Exemplificando, o AGS palmítico é representado por C16:0, por apresentar 16 átomos de carbono e nenhuma ligação dupla ao longo da cadeia, o AGMI oleico é representado por C18:1n-9, por apresentar 18 átomos de carbono e uma ligação dupla localizada à 9 átomos de carbono do terminal metila, e o AGPI linoleico é representado por C18:2n-6, por apresentar 18 átomos de carbono e duas ligações duplas, sendo a primeira localizada à 6 átomos de carbono do terminal metila.

A distribuição de AG's nas moléculas de TG implica na facilidade com que esses compostos serão absorvidos pelo organismo. No duodeno, a enzima lipase pancreática age hidrolisando os TG's, formando AG's livres (antes localizados na posição sn-1 e sn-3) e 2-monoacilglicerol. O produto 2-monoacilglicerol é mais facilmente absorvido, enquanto os AG's localizados nas posições sn-1 e sn-3, especialmente os de cadeia longa, são mais suscetíveis à saponificação e excreção, devido a seu baixo coeficiente de absorção (KARUPAIAH; SUNDRAM, 2007).

Os principais AGS obtidos pela alimentação são o mirístico (C14:0), encontrado no leite e seus derivados, o palmítico (C16:0), encontrado no OP e em gorduras animais, e o esteárico (C18:0), muito presente em produtos de origem animal e em vegetais, como o cacau. Entre os AGMI, o mais abundante pela alimentação é o oleico (C18:1n-9), encontrado no azeite de oliva, e entre os AGPI, os principais são linoleico (LA, C18:2n-6), presente em óleos vegetais (milho, algodão, gergelim e girassol), o araquidônico (ARA, C20:4n-6), presente em produtos de origem animal, o α-linolênico (ALA, C18:3n-3), encontrado em abundância no óleo de canola, linhaça e soja, e os ácidos docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) e eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3), ambos encontrados em grandes quantidades em peixes de águas frias e profundas (MARTIN et al., 2006; SANTOS et al., 2013).

O consumo de AGS, quando comparado aos AGMI ou AGPI, é relacionado ao aumento do LDL-c, hipercolesterolemia, ao maior risco de desenvolvimento de DCV, RI e hipertensão arterial sistêmica, como evidenciado por estudos epidemiológicos e experimentais (RICCARDI; GIACCO; RIVELLESE, 2004; RISÉRUS; WILLETT; HU, 2009; MICHA;

MOZAFFARIAN, 2010). Alguns mecanismos já foram propostos para essa diferenciação de efeitos entre os AG's. Têm-se observado que os AGS estimulam a atividade da acil-coA colesterol aciltransferase, enzima que catalisa a formação de ésteres de colesterol em lipoproteínas contendo apoliproteína B, e que além desse mecanismo, os AGS diminuem a atividade dos receptores de LDL-c hepáticos (DAUMERIE; WOOLLETT; DIETSCHY, 1992; LEE; CARR, 2004). Este último mecanismo é sustentado pelo fato de que os AGS alteram a fluidez da membrana de hepatócitos, deixando-a mais rígida, e levando desse modo a menor interação e afinidade do LDL-c ao seu receptor (FERNANDEZ; WEST, 2005). Devido ao consumo excessivo de alimentos contendo AGS pela população, a substituição dietética de AGS por AGMI e AGPI tem sido recomendada pelas principais diretrizes internacionais e brasileiras de saúde, objetivando o controle do colesterol e redução do LDL-c plasmático para consequente declínio do risco de possíveis eventos cardiovasculares.

Os AGS e AGMI podem ser obtidos através da dieta ou pela síntese *de novo*, e por esse motivo não são considerados essenciais (**Figura 1**).

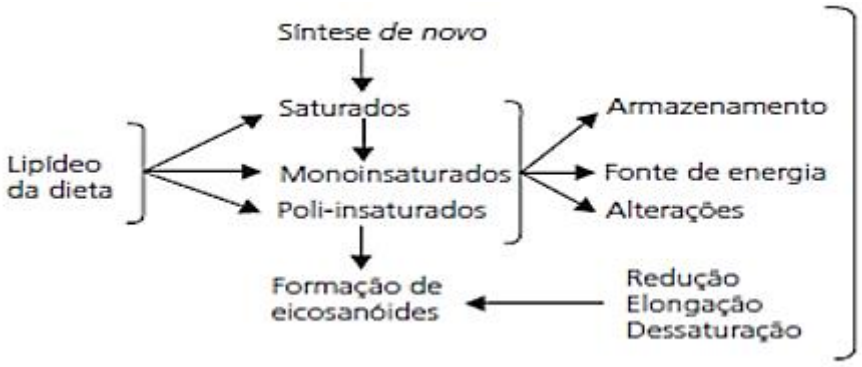

Figura 1: Representação do metabolismo de ácidos graxos (Adaptado de PERINI et al., 2010)

Entretanto, os mamíferos apesar de possuírem a capacidade para dessaturar e alongar os AG's para transformá-los, posteriormente, em AGPI de cadeia longa, só o fazem a partir de precursores que devem estar presentes na constituição da dieta. Esses precursores correspondem ao ácido linoleico (LA, C18:2n-6) e ao α-linolênico (ALA, C18:3n-3), que são considerados AG's estritamente essenciais, os quais vão gerar AGPI de cadeia longa com 20 e 22 átomos de carbono, incluindo os ácidos araquidônico (ARA, C20:4n-6), docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) e eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3), que possuem importante papel no processo inflamatório e imunológico do organismo. O ARA, DHA e EPA são formados pela

metabolização de AG's estritamente essenciais por uma série de reações alternadas de dessaturação (adição de duplas ligações) e elongação (adição de duas unidades de carbono), podendo também ser obtidos através da dieta (DAS, 2006; MARTIN et al., 2006). Desta forma, o LA dá origem ao ARA, enquanto o ALA, ao EPA e DHA. Esse processo ocorre no retículo endoplasmático, especialmente por células hepáticas, e está ilustrado pela **Figura 2**.

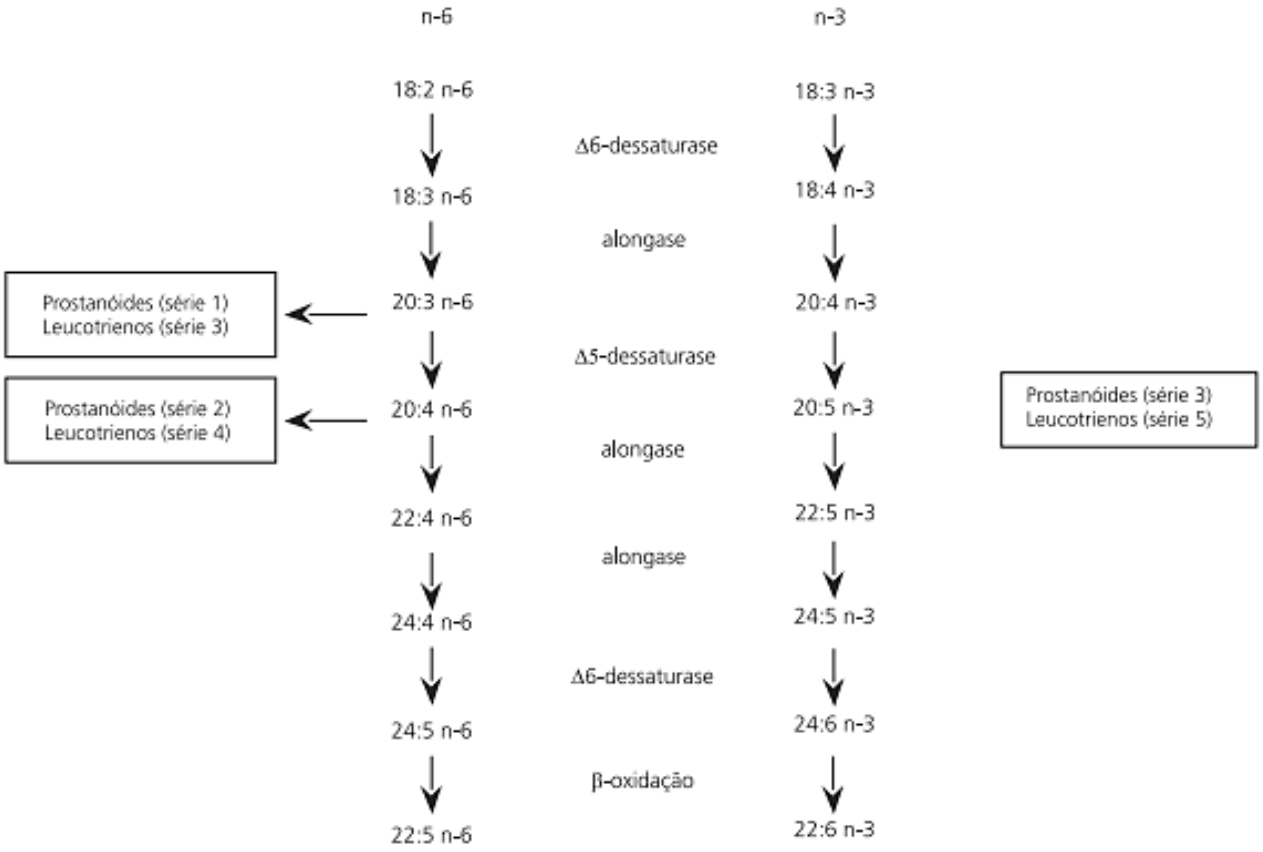

Figura 2: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 (Adaptado de MARTIN et al., 2006).

O DHA possui importante papel no desenvolvimento do cérebro e da retina, sendo encontrado nas membranas celulares. Os AG's EPA e AA são precursores de eicosanóides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. O AA dá origem a eicosanóides que participam de processos inflamatórios, principalmente prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos da série 2, enquanto o EPA dá origem a eicosanoides com propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2006). Pelo fato dos AG's da série n-3 e n-6 competirem pelas mesmas enzimas, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes desses AG's assume grande

importância nutricional (LIOU et al., 2007). A maior parte dos estudos conclui que, para benefícios na saúde, a relação n-6/n-3 na dieta deveria ser mais baixa do que atualmente é encontrada na população ocidental, pois o excesso de ingestão de alimentos fontes de n-6 pode declinar a síntese dos AG's EPA e DHA, devido à competitividade enzimática (LIOU et al., 2007; SANTOS et al., 2013).

As recomendações dietéticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization,* FAO) preconizam que o consumo de lipídios na dieta seja de 20-35% do VET (valor energético total) e que a ingestão de AGS não ultrapasse 10% do (VET) da dieta, considerando que esse valor seja no máximo de 7% para indivíduos adultos que apresentem fatores de risco associados a DCV. Além disso, é recomendado o consumo de 6–11% de AGPI sobre o VET, e para os AGMI, calcula-se a diferença entre o valor desses AG's (FAO, 2011).

2.2 Lipídios em produtos industrializados

2.2.1 Óleo de palma

O OP de origem africana, também conhecido como "azeite de dendê" no Brasil, é um lipídio extraído do mesocarpo da palma (*Elaeis guineenses*) e obtido através de prensagem mecânica. Sua composição apresenta diversos componentes benéficos do ponto de vista nutricional, como TG, vitamina E, carotenoides e fitoesteróis, assim como algumas impurezas, tais como AG's livres (AGL) e produtos de peroxidação lipídica, que podem ser removidos através de processos de refinamento (MANCINI et al., 2015).

O perfil de AG's do OP é caracterizado pela ausência de isômeros *trans,* pelo alto teor de AGS (49,9%), e de AGMI (39,2%), sendo baixa a proporção AGPI, que é de apenas 10%. O principal AGS encontrado é o ácido palmítico (44%), enquanto o ácido oleico é o mais predominante entre os AGMI (39,2%). Devido a esse perfil lipídico, o OP apresenta textura semi-sólida à temperatura ambiente, além de possuir grande estabilidade oxidativa e ser menos suscetível à rancificação. As moléculas de TG do OP são constituídas principalmente por ácido palmítico, localizado predominantemente na posição sn-1 e sn-3, e ácido oleico, comumente encontrado na posição sn-2 (EDEM, 2002).

O OP passou a ser utilizado em larga escala pela indústria alimentícia brasileira, em substituição à GVPH (rica em isômeros *trans*), após a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornar obrigatória a rotulagem nutricional em embalagens, incluindo a informação da quantidade de ácidos graxos *trans* presentes na porção do alimento (ANVISA, 2003). Essa medida também foi influenciada pelo movimento de diversas Agências Reguladoras de Saúde,

que passaram a recomendar a redução da ingestão desse AG pela população mundial, diante das inúmeras evidências de que seu consumo contribui para o desenvolvimento de DCV. Na tentativa de não afastar os consumidores para a compra de seus produtos, a indústria passou a rotular os alimentos processados como "mais saudáveis" e "zero *trans*", utilizando para isso o OP no processo de fabricação, já que este possui características organolépticas similares àquelas encontradas na GVPH.

Recentemente, no mês de maio de 2017, foi aprovado pelo Senado o Projeto de Lei no Senado nº478, que altera o Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Esse Projeto de Lei estabelece que a indústria alimentícia deverá ser proibida de utilizar a gordura *trans* na fabricação de alimentos, e que Poder Público deverá estimular o desenvolvimento de tecnologias que dispensem o uso de outras gorduras danosas na manufatura dos alimentos industrializados de forma a substituir a gordura *trans*. Atualmente, esse projeto se encontra remetido à Câmara dos Deputados, e se aprovado, deverá ainda ser encaminhado para o Presidente da República para sanção ou veto. Sendo sancionada, as indústrias terão um prazo de três anos para se adequar às novas normas.

Entretanto, apesar de não possuir isômeros *trans*, o OP possui grandes teores de AGS, especialmente de ácido palmítico, que estão associados a distúrbios metabólicos, como aumento do LDL-c e DCV (SANTOS et al., 2013). O estudo multicêntrico de CHEN et al. (2011) constata preocupantes efeitos sobre a saúde causados pelo consumo de OP. Foram analisados dados de 23 países, nos anos de 1980-1997, sendo constatado que nos países em desenvolvimento, para cada quilograma per capita adicional de óleo de palma consumido anualmente, existe um aumento no índice de mortalidade por cardiopatia isquêmica correspondente a 68 mortes por 100.000. O estudo conclui que o OP representa uma preocupante fonte de gordura saturada e que seu consumo deveria ser evitado para a prevenção de DCV.

O estudo de Vega-Lopez et al. (2006), que teve a participação de voluntários dos sexos feminino e masculino, ambos com 50 anos ou mais, comparou o efeito do consumo de diferentes fontes lipídicas (GVPH, OS, OP ou óleo de canola) sobre o perfil lipídico plasmático e homeostase glicêmica dos participantes. Foi concluído que tanto o OP quanto a GVPH provocaram o aumento de LDL-c sérico de homens e mulheres, em comparação aos óleos de soja e canola, que são ricos em gorduras insaturadas. Contudo, os pesquisadores não encontraram diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros glicêmicos.

O trabalho de Sun et al. (2015) revisou sistematicamente os efeitos do consumo de OP e de outras gorduras comumente utilizadas para preparação de alimentos, sobre o perfil lipídico

sanguíneo. Os resultados da meta-análise mostram que o OP aumenta significativamente os valores de LDL-c, em comparação à gorduras com baixa proporção de AGS, assim como também eleva os valores da lipoproteína de alta densidade-colesterol (*high density lipoprotein cholesterol,* HDL-c), em relação à GVPH.

O experimento realizado por Silva et al. (2005) submeteu ratos machos a dietas contendo GVPH ou OP, como fontes lipídicas principais, durante o período de lactação até o 45° dia de vida. A substituição de GVPH por OP repercutiu no aumento da proporção de ARA e diminuição de ALA no plasma e em maior massa corporal dos filhotes ao final do tratamento dietético. O aumento da adiposidade da prole alimentada com OP pôde ser explicada pela elevação da taxa lipogênica de tecidos adiposos viscerais (perirrenal, retroperitoneal e epididimal).

O grupo de pesquisa de Kochikuzhyil et al. (2010) observou o efeito de dietas "*high-fat*" contendo óleo de amendoim (grupo controle), óleo de côco (rico em ácido láurico) ou OP (rico em ácido palmítico), em ratos diabéticos. Os animais alimentados com OP tiveram aumento de TG's séricos em comparação ao grupo controle e apresentaram a pior resposta glicêmica no teste de tolerância oral à glicose, em relação aos outros dois grupos. Os autores atribuem esses resultados ao potencial hipercolesterolêmico do ácido palmítico, ofertado em grande quantidade no grupo que recebeu OP.

Laugerette et al. (2013) analisaram o impacto da composição lipídica da dieta sobre o metabolismo de endotoxinas e inflamação em camundongos. Para tal, dividiram os animais em 4 diferentes grupos, cada um recebendo dieta enriquecida com gordura láctea, OP, óleo de canola ou óleo de girassol. O grupo que recebeu OP apresentou maior concentração de interleucina (IL)-6 no plasma e maior expressão do receptor do tipo Toll-4 (*toll-like receptor-4,* TLR-4) e grupamento de diferenciação (*cluster of differentiation,*CD*)*-14 no tecido adiposo branco. Os autores também observaram *in vitro* que adipócitos incubados com ácido palmítico tiveram um aumento na secreção de IL-6, em comparação aos adipócitos incubados com ácido mirístico, linoleico ou a-linolênico. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado um efeito cooperativo entre AG's e lipopolissacarídeo (LPS), confirmando o papel de lipídios dietéticos na modulação de sinais inflamatórios.

Os estudos que avaliaram o consumo de OP durante períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e lactação, mostram que esse lipídio é capaz de predispor a prole adulta para diversas desordens, como aumento de adiposidade, alteração da regulação da ingestão alimentar em resposta à administração central de insulina e desencadeamento de vias inflamatórias no cérebro, em comparação com a GVPH ou OS (BISPO et al., 2015; MAGRI et

al., 2015; MISAN et al., 2015). Diante desses resultados, é plausível supor que o OP utilizado em alimentos industrializados pode contribuir para efeitos metabólicos negativos sobre a saúde à curto e longo prazo.

2.2.1.1 Óleo de palma e aspectos econômicos/ambientais

A palmicultura destaca-se a nível mundial como a mais produtiva e rentável em relação a todas as outras culturas de óleos, superando inclusive a produção de óleo de soja a partir do ano de 2006, de acordo com os dados disponíveis pela FAO (2013). Nesse contexto, a expansão da cultura de OP nas áreas desmatadas da Amazônia é reconhecida como uma alternativa sustentável do ponto de vista econômico, social e ambiental, sendo amparada pelo Governo Federal através do "Programa de Produção Sustentável de Óleo de Palma no Brasil" (BRASIL, 2010).

Esse programa estabelece regras, com foco na recuperação do meio ambiente, incentivo à inovação tecnológica e geração de renda na agricultura familiar. Entre os instrumentos utilizados para garantir a expansão sustentável, destaca-se o zoneamento agroecológico da palma, que foi realizado sob coordenação da EMBRAPA, sendo aprovado por meio do decreto Nº 7.172, de 7 de maio de 2010 (BRASIL, 2010).

O zoneamento agroecológico da palma atua como ferramenta de organização territorial e tem como objetivo delimitar as áreas aptas para cultivo de palma no Brasil em regiões previamente modificadas pelo homem, de forma a garantir a sustentabilidade em diversos aspectos do meio de produção. Este documento analisa critérios específicos de aptidão climática (precipitação de chuva, horas de brilho solar, umidade relativa do ar e temperaturas máxima/mínima) e de terras (textura, relevo, drenagem interna e profundidade), com ênfase na interação entre solo e clima (RAMALHO-FILHO et al., 2010). É importante salientar que o zoneamento considera como bloqueadas para o cultivo de OP todas as áreas cobertas com vegetação nativa, os territórios presentes em unidades de conservação ambiental, terras indígenas demarcadas e os ecossistemas sensíveis, sendo priorizadas pelo programa as regiões degradadas na Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima), e aquelas com forte presença de agricultura familiar (INCRA, 2010).

Além disso, um projeto de lei enviado pelo Governo Federal ao Congresso Nacional, prevê mais duas restrições adicionais para o cultivo de OP: proibição de desmatamento da vegetação nativa para o plantio de palma e restrição do licenciamento ambiental para indústrias que utilizem o óleo oriundo de áreas não aprovadas pelo zoneamento agroecológico. Com essas

medidas, espera-se que o cultivo de OP constitua uma alternativa de sustentabilidade econômica e social por promover a recuperação de áreas já desmatadas da Amazônia, por propiciar impactos ambientais positivos, como a fixação de carbono, por gerar desenvolvimento de emprego e renda, além de estimular a produção local desse insumo, fortalecendo ainda mais a economia regional (RAMALHO-FILHO et al., 2010). Atualmente, o total de áreas disponíveis para plantação de palma em território nacional, seguindo esses critérios citados anteriormente, corresponde a 31,8 milhões de hectares (INCRA, 2010).

O cultivo de palma em solo brasileiro requer investimento em tecnologias para que ocorra de forma eficaz. A EMBRAPA, desde a década de 80, vem investindo em programas de melhoramento genético da semente, com o intuito de desenvolver cultivares que contribuam para a expansão sustentável e competitiva dessa cultura no país. O melhoramento genético do dendezeiro tornou-se especialmente importante pelo fato dessa plantação no Brasil apresentar a ocorrência de uma anomalia de etiologia desconhecida, denominada de "Amarelecimento Fatal", que inviabiliza o plantio adequado de palma. Dessa forma, a hibridização interespecífica assegurou a produção de sementes com maior resistência a essa praga e com características agronômicas superiores ao dendezeiro africano (BOARI, 2008).

2.3 Óleo de palma híbrida

O híbrido de palma (*Elaeis guineenses x Elaeis oleífera*), denominado cultivar BRS Manicoré, desenvolvido pela EMBRAPA, é o resultado do cruzamento interespecífico entre a palma de origem africana (*Elaeis guineenses)* e a palma nativa da América Central e do norte da América do Sul, também conhecida como "Caiaué", ou ainda, dendê americano (*Elaeis oleífera).* Vários programas de melhoramento genético, vinculados a órgãos de pesquisa de diversos países, vêm desenvolvendo cultivares híbridos interespecíficos com a utilização desta última palmeira de origem americana (RIOS et al., 2012).

A *Elaeis oleífera* apresenta resistência a diversas pragas e à anomalia denominada "Amarelecimento Fatal", que é o principal obstáculo ao cultivo de palma africana na América latina e responsável por milhares de mortes de plantas nos países produtores, como Brasil, Colômbia, Equador e Costa Rica. Por isso, essa espécie tornou-se largamente explorada pelos pesquisadores, pois oferece a principal característica de interesse para o melhoramento do dendezeiro (BOARI, 2008). O Caiaué possui outras características superiores à *Elaeis guineenses*, como reduzida taxa de crescimento do tronco, facilitando assim o manejo e a colheita de cachos, e alta proporção de AGI, que conferem menor ponto de fusão e maior fluidez

ao óleo à temperatura ambiente. Entretanto, não é uma cultura viável economicamente, pois apresenta baixa produtividade em relação à palma atualmente comercializada (LOPES; CUNHA; RESENDE, 2012). Cruzamentos assistidos entre os dendês de origem africana e americana vêm sendo realizados pela EMBRAPA desde a década de 80 com o objetivo de combinar as características favoráveis das duas espécies: a resistência à anomalia da *Elaeis oleífera* e a alta produtividade da *Elaeis guineenses*. Com isso, espera-se desenvolver cultivares interespecíficas tão produtivas como as cultivares atuais de dendezeiro, introduzir resistência as pragas nas regiões mais afetadas pelo Amarelecimento Fatal e tornar o óleo mais insaturado, e, portanto, mais vantajoso do ponto de vista nutricional (RIOS et al., 2012).

A cultivar BRS Manicoré foi lançada pela Embrapa em 2010 e possui grande aceitação por produtores e agricultores familiares, principalmente aqueles lotados nos municípios próximos do Estado do Pará, região mais afetada por pragas (ABRATES, 2011). A última estimativa, realizada no ano de 2010, constatou que já existiam 2000 hectares plantados da palma híbrida em áreas do Pará (CUNHA; LOPES, 2010).

2.3.1 Características físico-químicas e implicações metabólicas do óleo de palma híbrida

As propriedades nutracêuticas e características físico-químicas dessa variedade híbrida foram mais exploradas recentemente, embora seja escassa a documentação dos efeitos dessa fonte lipídica sobre a saúde até o momento.

Cadena et al. (2013) analisaram os óleos da espécie *Elaeis guineenses* e do híbrido *Elaeis guineenses x Elaeis oleífera*, realizando diversas análises para verificar a qualidade de ambos. Os pesquisadores demonstraram que a atividade da enzima hidrolítica denominada lipase é menor no OP híbrida, em comparação ao óleo da espécie africana. Esta enzima está presente no mesocarpo da palma e é responsável pela geração de AGL, que aceleram a rancificação e deterioração do óleo. Avaliaram também o índice de iodo, com o intuito de medir o teor de AGI presentes (palmitoleico, oleico, linoleico e linolênico). O OP híbrida apresentou índices de iodo maiores que o OP africana, que foram respectivamente de 66,3 g I_2 100 g^{-1} e 52 g I_2 100 g^{-1}. Considerando esses parâmetros, os autores concluem que o híbrido de palma oferece um óleo de qualidade superior, menos suscetível à rancificação, em decorrência da menor atividade lipolítica, e mais benéfico do ponto de vista nutricional, por conta do maior teor de AGI, constituindo uma alternativa interessante ao OP africana.

O estudo de Mozzon et al. (2013), caracterizou pela primeira vez a distribuição de AG's nas moléculas de TG do OP híbrida bruto. Primeiramente, o perfil desses ácidos foi analisado

e verificou-se que nas variedades *Elaeis guineenses* e *Elaeis guineenses x Elaeis oleífera*, aproximadamente 80% dos AG's correspondiam ao somatório de oleico (18:1) e palmítico (16:0). O OP híbrida, em comparação com o OP africana, apresentou porcentagens significativamente maiores de 18:1 (54,6 ± 1,0 x 41,4 ± 0,3) e de AGMI (55,1 ± 1,1 x 41,6 ± 0,2), enquanto os conteúdos de 16:0 (28,3 ± 1,0 x 40,1 ± 0,1) e de AGS (33,5 ± 0,5 x 47,3 ± 0,1) foram significativamente menores, respectivamente.

Com relação à distribuição estereoespecífica, foi constatado que a posição sn-2 foi esterificada predominantemente por 18:1 em ambos os óleos, tendo variado de 55,1-58,2 mol% no OP africana e de 64,7-66,0 mol% no OP híbrida. A distribuição, em mol%, de AGMI na posição sn-2 foi significativamente maior no OP híbrida (65,5 ± 0,7) em comparação ao OP africana (56,7 ± 1,6). A esterificação de AGS nessa região foi estatisticamente maior no OP africana (23,8 ± 2,3) em relação ao híbrido interespecífico (14,7 ± 1,0), assim como o conteúdo de 16:0 (18,7 ± 1,7 x 10,0 ± 1,2). Todos esses achados conduzem para implicações metabólicas favoráveis ao OP híbrida sobre o ponto de vista nutricional.

O consumo excessivo de gordura saturada está positivamente relacionado com elevação do LDL-c plasmático e aumento de risco cardiovascular, sendo recomendada sua substituição na dieta por fontes lipídicas mono e poliinsaturadas (SANTOS et al., 2013). Tendo em vista que o OP híbrida apresenta maiores teores de AGMI e menor proporção de AGS, seu consumo em substituição ao OP africana pode trazer benefícios na saúde, incluindo diminuição dos riscos de eventos cardiovasculares e melhora da sensibilidade à insulina.

O padrão de distribuição de ácidos graxos na molécula de TG também pode conferir efeitos fisiológicos positivos na absorção e lipemia pós-prandial. Alguns estudos têm demonstrado que a presença de AGS na posição sn-2, como o ácido palmítico, pode contribuir para efeitos negativos na lipemia, secreção de insulina, homeostase glicêmica e metabolismo lipídico (HAYES; PRONCZU, 2010). Tendo em vista que o OP híbrida possui menor teor de AGS na posição sn-2 em relação à variedade africana, o consumo deste lipídio dietético poderia conferir consequências favoráveis.

Além dessas características, foi verificado que o óleo proveniente do híbrido interespecífico possui quantidades expressivas de compostos antioxidantes. Durante o desenvolvimento dessa palma até o momento da colheita para extração do óleo, há um aumento progressivo e significativo do conteúdo total de tocóis (derivado da vitamina E) e de AGI (oleico e linoleico), em contraste com a diminuição de AGS (palmítico e esteárico), decaindo assim, a proporção de AGS/AGI no seu ponto ótimo de amadurecimento (LUCCI et al., 2015).

Em outro trabalho, Rodríguez et al. (2016) analisaram o OP híbrida comercializado na

Colômbia e concluíram que as maiores concentrações de compostos fenólicos estão presentes na palma em fases iniciais de maturação, e estes sofrem diminuição até o ponto adequado para extração. Ainda assim, a quantidade desses compostos na fase ideal de produtividade foi compatível com os teores comumente encontrados no azeite de oliva extra virgem.

Os estudos até o momento que avaliaram os efeitos do consumo de OP híbrida sobre a saúde se concentraram em um único ensaio clínico randomizado composto de 160 pessoas, homens e mulheres com 50 anos ou mais, submetidos à suplementação diária de 25 ml de OP híbrida ou azeite de oliva, durante 3 meses. Foi constatado que a ingestão dessa fonte lipídica produziu os mesmos efeitos benéficos que o consumo de azeite de oliva no perfil de lipídios plasmáticos após 3 meses, com diminuição dos valores de colesterol total e LDL-c dos participantes, em relação ao início do tratamento, não sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos suplementados nos valores de TG, colesterol total, LDL-c e HDL-c séricos (LUCCI et al., 2016). Outros dois estudos desse mesmo protocolo experimental constataram que a suplementação de OP híbrida foi capaz de promover aumento da capacidade antioxidante do plasma (OJEDA et al., 2016) e da incorporação de AGI (especialmente o miristoleico e linoleico) nos eritrócitos, concomitante à diminuição de AGS (especialmente o esteárico), contribuindo, portanto, para maior fluidez da membrana de hemácias (PACETTI et al., 2016). Os autores atribuíram estes efeitos positivos do OP híbrida às características anteriormente comentadas, como alta proporção de AGMI nas moléculas de TG, menor esterificação de AGS na posição sn-2 e ao conteúdo significativo de compostos antioxidantes presentes.

2.4 Fisiologia mitocondrial

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas, de formato oval, que estão presentes em células eucarióticas e possuem importante papel na homeostase celular. Estão envolvidas diretamente na integralidade da célula, tendo destaque na modulação da sinalização de cálcio (Ca^{2+}), no controle do equilíbrio redox, na regulação de vias de biossíntese, morte celular e apoptose, na termogênese adaptativa e principalmente no metabolismo energético, através da produção de adenosina trifosfato (ATP) (DUCHEN, 2004; GAMBERT; RICQUIER, 2007; SZYMAŃSKI et al., 2017).

Sua estrutura é compartimentalizada em duas membranas lipoprotéicas: a externa, bastante permeável à maioria das moléculas pequenas e iontes, devido à presença de porinas, e a interna, que contém uma série de invaginações denominadas cristas mitocondriais, e possui

maior impermeabilidade, fundamental para a integridade morfológica e funcional da mitocôndria. Aderidas às cristas, encontram-se proteínas integrantes da cadeia transportadora de elétrons, que participam da fosforilação oxidativa, além de carreadores de intermediários de vias metabólicas. Entre essas membranas, encontra-se o espaço intermembranar, onde proteínas regulatórias se localizam, como o citocromo c, caspase 9, creatina quinase e fator indutor de apotose. A matriz mitocondrial abriga diversas enzimas do ciclo do ácido cítrico, da β-oxidação de ácidos graxos, do ciclo da ureia, e também contém o DNA mitocondrial (DNAmit) (SHERRATT, 1991; DUCHEN, 2004; MARCHI et al., 2017).

A mitocôndria possui seu próprio DNA, que codifica 13 proteínas da cadeia respiratória de elétrons, sendo que algumas proteínas mitocondriais também são codificadas pelo DNA nuclear (DNAn). O genoma mitocondrial, comparado ao nuclear, é mais suscetível às mutações, por não ser protegido por histonas e pela alta exposição ao estresse oxidativo, devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes da cadeia transportadora de elétrons (WEY, 1998; COSTA et al., 2011). Lesões ao DNAmit ou em sequências específicas do DNAn comprometem a funcionalidade da organela e levam a um declínio na eficiência energética, desequilíbrios redox e consequente disfunção mitocondrial, contribuindo para diversos distúrbios metabólicos degenerativos (CHINNERY et al., 2002; COSTA et al., 2011). Além disso, a produção excessiva de EROs causa lesões em compartimentos da mitocôndria que interferem em sua homeostase, incluindo danos em proteínas e peroxidação de membranas (ORRENIUS, 2007).

O poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) está localizado na membrana mitocondrial interna e sua abertura é estimulada por concentrações suprafisiológicas de Ca^{2+} e também pelo estresse oxidativo. A abertura deste canal causa uma permeabilidade não seletiva da membrana mitocondrial interna, provocando assim a passagem de moléculas maiores, dissipação do potencial de membrana, inchamento da organela e ruptura de membrana mitocondrial externa, com liberação de proteínas para o citosol, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose, que estão associados a vários modelos de morte celular (WONG; STEENBERGEN; MURPHY, 2012).

Na membrana mitocondrial interna encontram-se os chamados complexos do sistema transportador de elétrons, divididos em complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (Succinato desidrogenase), complexo III (Ubiquinona citocromo c oxidoredutase), citocromo c e complexo IV (citocromo c oxidase). O principal objetivo da cadeia respiratória é a oxidação da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e do dinucleótido de flavina e adenina ($FADH_2$), provenientes de outras vias metabólicas, e o transporte de equivalentes reduzidos ao longo dos

transportadores, até o aceptor final, o oxigênio (LEHNINGER, 2005; SCIALÒ; FERNÁNDEZ-AYALA; SANZ, 2017).

O complexo I é encarregado do acoplamento da oxidação de NADH à respiração e síntese de ATP. Por possuir uma molécula de flavina mononucleotidio (FMN), esta será o aceptor inicial do elétron proveniente do NADH. O complexo II mitocondrial consiste na mesma enzima do ciclo de Krebs que promove a oxidação do succinato à fumarato. Essa oxidação leva a redução do dinucleótido de flavina e adenina (FAD^+) a $FADH_2$. A função do complexo II é receber os 2 elétrons do $FADH_2$ (do ciclo de Krebs) e transportá-los até à ubiquinona. Em virtude de não ser uma proteína transmembrana, o complexo II fornece um menor fluxo de prótons em comparação ao complexo I. O complexo III é capaz de acoplar a transferência de dois elétrons ao bombeamento de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. O citocromo c é uma proteína solúvel encontrada no espaço intermembrana, onde atua fazendo a transferência de elétrons entre o complexo III e o complexo IV. O complexo IV é o último da cadeia transportadora. Quando dois elétrons atravessam esse complexo gera-se um fluxo de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Dois prótons são utilizados como substratos para a redução de oxigênio à agua e outros dois são translocados para o espaço intermembrana (LEHNINGER, 2005; LENAZ et al., 2016).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias, ou nas biomembranas. As principais espécies reativas de oxigênio são: o radical Superóxido (O_2^-), o radical Hidroperoxila (HO_2^-), o radical Hidroxila (OH^-), e o Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GENOVA et al., 2004; COSTA et al., 2011). O não emparelhamento de elétrons na última camada, a exceção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), confere alta reatividade a essas moléculas ou átomos. Dos vários complexos do sistema transportador de elétrons, o complexo I e III são responsáveis pela maior parte da produção de radicais O_2^- e de H_2O_2 (WEI, 1998). O H_2O_2 é uma espécie química permeável através de membranas, podendo ser removida por diferentes enzimas com atividade peroxidase. A produção aumentada das espécies reativas de oxigênio ou o desequilíbrio na atividade de antioxidantes para neutralizar estas espécies, podem conduzir ao chamado estresse oxidativo (KIRKINEZOS & MORAES, 2001; STEPIEN et al., 2017)

2.4.1 Disfunção mitocondrial e a influência de ácidos graxos

A disfunção mitocondrial tem sido associada à obesidade, RI, diabetes e DHGNA em modelos humanos e animais. Pelo fato do metabolismo de glicose e lipídios ser largamente

dependente da mitocôndria, quando há um desajuste na atividade dessa organela a oxidação de nutrientes é prejudicada, podendo contribuir para a gênese de diversas doenças em curto e longo prazo (CIVITARESE; SMITH; RAVUSSIN, 2007; SZENDROEDI; PHIELIX; RODEN, 2012; STEPIEN et al., 2017). Os fatores que antecedem a disfunção são caracterizados por um ponto em comum, o estímulo à alta produção de EROs, que leva à danos na estrutura da mitocôndria e ocasionam mutações gênicas, peroxidação de membranas e diminuição de sua biogênese, caracterizando assim a disfunção mitocondrial. O estabelecimento da disfunção mitocondrial leva a um desgaste na metabolização de nutrientes e produção de ATP na célula, trazendo como consequência o início de desordens em diversos tecidos, como declínio da sensibilidade à insulina, depleção da atividade das células β-pancreáticas e esteatose hepática (KIM; WEI; SOWERS, 2008; AUGER et al., 2015).

A relação entre dietas hiperlipídicas e disfunções mitocondriais é bem explorada pela comunidade científica. Os trabalhos que avaliam a qualidade dos lipídios em parâmetros funcionais da organela focam basicamente nos efeitos específicos de AG's sobre a indução da transição de permeabilidade mitocondrial e consequente morte celular. Kong e Rabkin (2000) verificaram em modelo in vitro, que a presença de ácido palmítico em cultura de cardiomiócitos aumentou o teor de citocromo c no citosol (marcador de apoptose) e induziu a abertura do PTPM, esclarecendo desta forma os primeiros mecanismos pelos quais os AG's atuam na necrose e apoptose celular. Posteriormente, em outro estudo, foi elucidado que os AGS de cadeia longa, como o palmítico e esteárico, possuem maior afinidade por íons de Ca^{2+}, em comparação aos AGI, aos AG's de cadeia curta e aos fosfolipídios. Na presença de Ca^{2+}, o ácido palmítico forma o complexo ácido palmítico/Ca^{2+}, que induz abertura de poros insensíveis à ciclosporina A e à permeabilidade não seletiva da membrana mitocondrial, contribuindo para a morte celular (MIRANOVA et al., 2001). Mais recentemente, o estudo de Belosludtsev et al. (2014) comparou o potencial dos ácidos palmítico e oleico em causar permeabilização não seletiva da mitocôndria na presença de Ca^{2+}, seguindo também ensaio *in vitro*. Nesse experimento, feito em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, foi observado que o ácido oleico, assim como o palmítico, foi apto em causar inchamento mitocondrial, porém, com requerimento de Ca^{2+} em maior quantidade (30µm x 100µm para ácido palmítico e oleico, respectivamente).

Buscando compreender a relação entre AGL, RI e disfunção mitocondrial, Hirabara et al. (2012) incubaram a linhagem de células musculares C2C12 por 24 horas com AGS (palmítico ou esteárico) ou AGI (oleico, linoleico, EPA ou DHA) com o intuito de analisar diferentes AG's e suas capacidades em causar disfunção mitocondrial, mimetizando os efeitos

da lipólise exacerbada na situação de obesidade. Após esse período, os pesquisadores constataram que as células expostas aos AGS tiveram sua função mitocondrial comprometida, caracterizada pela diminuição da produção de ATP, diminuição da síntese de glicogênio induzida por insulina e declínio da oxidação de glicose, concomitante à menor atividade da proteína quinase B (PKB), em comparação as células incubadas com AGI. Os autores concluíram que os AGS podem contribuir de maneira significativa tanto para a disfunção mitocondrial de células musculares, como para o agravamento da RI induzida pela obesidade.

De Velasco et al. (2017) verificaram que em modelo experimental de programação, os animais que consumiram gordura *trans* durante a gestação e lactação tiveram no tecido hepático adulto menor consumo de oxigênio nos complexos I e II e parâmetros respiratórios mitocondriais significativamente menores em relação aos grupos que consumiram óleo de soja e óleo de palma no mesmo período. Nesse mesmo estudo, foi verificado que o grupo que consumiu gordura interesterificada no período perinatal, apresentou na idade adulta aumento significativo na produção de H_2O_2 por mitocôndrias hepáticas quando comparado ao grupo controle.

2.5 Programação metabólica e o papel dos lipídios dietéticos

O termo "programação metabólica" é também definido como "programação fetal", "*imprinting* genômico" ou "plasticidade ontogenética" (GODFREY; BARKER, 2001; REIK; WALTER, 2001; HANLEY, 2010). Esse conceito diz respeito às alterações epigenéticas ocorridas no genoma do feto e induzidas por fatores ambientais durante os períodos críticos do desenvolvimento, que correspondem à gestação e a lactação. Os ambientes intra e extra-uterino podem oferecer insultos capazes de influenciar a estrutura de órgãos e tecidos do bebê, predispondo à ocorrência de desordens metabólicas na vida adulta, como doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão, RI e DM 2 (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007).

A alteração epigenética consiste em mudanças na estrutura da cromatina em consequência de metilações no DNA e acetilação de histonas, sem qualquer alteração do código genético nuclear. Essas modificações ocorrem com alta frequência em regiões promotoras do DNA e exercem profundo impacto sobre a expressão gênica (JOSS-MOORE & LANE, 2012). As variações são estáveis durante o processo de divisão celular e podem ser transmitidas às gerações seguintes, sendo capazes de gerar adaptações dos indivíduos em meios hostis, como os de privação ou excesso de nutrientes (WHITELAW; WHITELAW, 2006)

Os primeiros estudos sobre programação, tanto epidemiológicos quanto experimentais, abordaram principalmente o impacto da desnutrição no período perinatal sobre a regulação do peso corporal e o estabelecimento de características da síndrome metabólica na idade adulta. Em um desses trabalhos, Ravelli et al. (1976) estudaram uma coorte de 300.000 homens, filhos de mulheres expostas à escassez alimentar na II guerra mundial, e foi observado que esses indivíduos apresentaram maior prevalência de obesidade na idade adulta quando submetidos à desnutrição durante a primeira metade da gravidez.

Nos últimos anos, com o avanço da transição nutricional, outros modelos experimentais de programação passaram a ser alvos de pesquisa, como os de superalimentação dos filhotes durante a lactação, de obesidade materna e de modulação de macro e micronutrientes (LISBOA et al., 2015; GRIFFITHS et al., 2016; SILVA et al., 2017.) Nesse sentido, os lipídios dietéticos tanto em termos de quantidade como em qualidade, podem exercer um papel importante na gênese de doenças na prole adulta.

Durante a gestação, o metabolismo materno sofre profundos ajustes para atender às necessidades de nutrientes do feto, principalmente em relação à regulação lipídica. O estado anabólico da mãe, evidente durante os dois primeiros trimestres de gravidez, contribui para o acúmulo de gordura, devido ao aumento da lipogênese e da atividade da enzima lipoproteína lipase (LPL) no tecido adiposo (HERRERA et al., 2006). No terceiro trimestre de gestação, os requerimentos energéticos do bebê estão aumentados devido ao rápido crescimento e desenvolvimento que ocorrem durante esse período. Nesse momento, a mulher apresenta estado catabólico, culminando com a mobilização dos estoques de TG do tecido adiposo (induzida pela enzima lipase-hormônio sensível) e consequente elevação das concentrações séricas de glicerol, que servem de substrato para a gliconeogênese e provimento de glicose tanto para a mãe como para o filho. Além disso, são disponibilizados para a corrente sanguínea AG's não esterificados ligados à albumina, que podem atravessar a placenta para chegar à circulação fetal; podem ser utilizados para o metabolismo energético em diferentes tecidos; ou podem ser captados pelo fígado para esterificação em TG's e incorporação nas VLDL. Ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da atividade da LPL no tecido adiposo, há um aumento de atividade da LPL-placentária, que hidrolisa as lipoproteínas circulantes, colaborando com a oferta de AG's que serão metabolizados pelo feto (HERRERA; ORTEGA-SENOVILLA, 2014).

Desta maneira, a ingestão lipídica da mãe durante a gestação define o perfil de AG's que serão acumulados no tecido adiposo e implica na qualidade desses compostos que serão transferidos para o bebê através da placenta e do leite materno (HERRERA et al., 2006). Após o nascimento, o organismo do recém-nascido se adapta para digerir e absorver os nutrientes

fornecidos pela amamentação, como os lipídios, que correspondem até 55% da energia total oferecida pelo leite (KOLETZKO et al., 2001).

Os AG's estão envolvidos não somente no metabolismo energético, mas também na composição da membrana fosfolipídica, diferenciação celular e regulação da expressão gênica (INNIS, 2011), e por isso, desbalanços na sua oferta podem causar perturbações no ambiente celular e promover a ocorrência de distúrbios relacionados à programação metabólica. Os mecanismos moleculares envolvidos na programação da síndrome metabólica da prole pelo consumo materno de gordura durante a gestação ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, o estudo realizado por Jones et al. (2009) promoveu informações adicionais acerca dessa questão. Neste trabalho, verificou-se que o consumo de dieta hiperlipídica por camundongas promoveu alterações na regulação transplacentária de nutrientes, levando ao aumento da atividade dos transportadores de aminoácidos, juntamente com a elevação da expressão de GLUT-1 na membrana dos microvilos do sinciciotrofoblasto da placenta, resultando assim, em maior absorção de macronutrientes e crescimento fetal.

De fato, diversos estudos verificam que o consumo materno de dietas hiperlipídicas, ricas em AGS, durante a gestação e lactação, promovem na prole adulta o aumento de adiposidade, disfunção endotelial e RI (KHAN et al., 2005; ASHINO et al., 2012; TSUDUKI et al., 2013; DESAI et al., 2014). Siemelink et al. (2002) observaram que ratas alimentadas com dietas hiperlipídicas contendo AGS ou AGMI, durante o período perinatal, apresentaram proles com diferentes perfis metabólicos. Os filhotes alimentados com AGMI durante esse período, apresentaram menor evolução ponderal até os 3 meses de idade e melhor resposta glicêmica ao teste oral de tolerância à glicose, comparado a aqueles alimentados com AGS.

Em estudo prospectivo com 965 grávidas da Dinamarca, Maslova et al. (2015) analisaram a associação entre o padrão de consumo de lipídios durante a gestação e indicadores antropométricos da prole adulta. Foi documentado que a ingestão materna de dieta hiperlipídica (>=35% do valor energético total da dieta) se relacionou com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e da circunferência da cintura de seus filhos do sexo masculino com idade entre 19-21 anos.

Com relação à qualidade lipídica da dieta, o trabalho de Albuquerque et al. (2006) observou que ratas alimentadas com dietas ricas em ácidos graxos *trans* durante a gestação e lactação, tiveram proles adultas com alterações no controle central de ingestão alimentar, em comparação ao grupo controle (dieta à base de OS). Recentemente, foi verificado que o consumo de dietas normolipídicas contendo gordura interesterificada ou OP durante o período perinatal, promoveu na prole adulta de machos maior propensão à obesidade (MAGRI et al.,

2015) e desencadeou vias inflamatórias no cérebro (MISAN et al., 2015), em comparação aos filhotes alimentados com dieta controle durante o mesmo período.

Considerando esses achados, é possível constatar que o padrão alimentar materno de lipídios representa um importante fator ambiental capaz de gerar modificações epigenéticas e consequências em longo prazo na saúde, e sendo assim, as repercussões fisiológicas sobre a prole, estudadas principalmente em modelos experimentais, variam em função da quantidade e do tipo de ácido graxo ofertado durante o período perinatal.

3.0. Justificativa e hipótese

Atualmente no Brasil, o óleo de palma de origem africana constitui o óleo vegetal mais utilizado pela indústria de alimentos. Apesar de ter sido promovido no Brasil como a principal fonte lipídica, capaz de substituir a gordura parcialmente hidrogenada e produzir alimentos livres de gordura *trans*, estudos já demonstraram associações positivas entre o consumo de óleo de palma nos países em desenvolvimento e um aumento no índice de mortalidade por DCV. O óleo de palma de origem africana constitui, portanto, preocupante fonte dietética que merece destaque nas políticas públicas voltadas à promoção da saúde. Sabe-se ainda que a nutrição materna é determinante para o risco de alterações fisiológicas no feto e neonato na idade adulta. Nesse sentido, o OP africana presente em produtos industrializados, quando consumido por gestantes e lactantes, pode constituir um insulto nutricional capaz de modular a gênese de doenças crônicas na prole, como já observado em estudos experimentais.

Desta forma, a presente pesquisa está em consonância com a necessidade de se buscar novas fontes alternativas lipídicas para os produtos alimentícios no Brasil. Na perspectiva de eliminar a gordura *trans* nos alimentos industrializados brasileiros, um projeto de Lei do Senado (PLS 478/2015) que proíbe o uso de gorduras vegetais hidrogenadas na fabricação de alimentos foi recentemente aprovado pela Comissão de Assuntos Sociais. De acordo com o projeto de Lei, o poder público deverá incentivar e financiar estudos e pesquisas que tenham por objetivo a substituição gradual dessas gorduras na produção de alimentos.

O OP híbrida, desenvolvido pela EMBRAPA, apresenta menor proporção de AGS e maior teor de AGMI e, portanto, poderia conferir efeitos benéficos em longo prazo sobre a saúde, principalmente quando ofertado durante períodos críticos do desenvolvimento. As pesquisas envolvendo a análise dessa variedade híbrida são de total relevância para que se possa estimular o uso de fontes lipídicas alternativas e expandir medidas de prevenção de doenças através da modulação de fatores de risco modificáveis. Este estudo assume a hipótese de que a ingestão de OP híbrida durante a gestação e lactação de camundongas trará resultados benéficos em parâmetros metabólicos da prole, quando comparado ao consumo de OP africana, devido à sua composição lipídica diferenciada.

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Comparar o efeito do consumo de dieta isoenergética e normolipídica, contendo OP africana (*Elaeis guineenses),* OP híbrida (*Elaeis guineenses x Elaeis oleífera),* ou óleo de soja (grupo controle) por camundongas C57BL/6 durante a gestação e lactação sobre a adiposidade e função mitocondrial hepática da prole de machos.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar nas camundongas C57BL/6 que consumiram OP africana (*Elaeis guineenses),* OP híbrida (*Elaeis guineenses x Elaeis oleífera),* ou óleo de soja (grupo controle) durante a gestação e lactação:

- Evolução da massa corporal e consumo de ração.

Na prole destes animais, realizar caracterização metabólica, avaliando:

- A evolução da massa corporal, desde o nascimento, até os 3 meses de vida;
- O consumo de ração controle, desde o desmame, até os 3 meses de vida.

Na prole aos 21 dias, avaliar:

- O perfil de ácidos graxos incorporados nos lipídios totais no fígado;

Na prole aos 90-100 dias de vida, avaliar:

- Adiposidade corporal;
- Tolerância intraperitoneal à glicose;
- O perfil de ácidos graxos incorporados nos lipídios totais no fígado;
- O perfil de ácidos graxos incorporados nos lipídios totais no tecido adiposo epididimal;

- A capacidade funcional da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias das células do tecido hepático;
- A produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no fígado.

5.0 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 com 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, provenientes do Biotério de Roedores do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BIONUT). A manipulação e o sacrifício dos animais respeitaram as normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de pesquisa científica, sendo submetido e aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-CCS/UFRJ). Os animais foram mantidos no biotério em condições controladas de temperatura (24 ± 1ºC), ciclo de luminosidade (12h claro e 12h escuro) e livre acesso à ração oferecida e à água. Aos três meses de idade as fêmeas foram separadas para acasalamento, na proporção de três fêmeas para um macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal. A partir do 1° dia de detecção do *plug,* foram ofertadas as dietas experimentais, que passaram a ser consumidas durante toda a gestação e a lactação. As dietas isoenergéticas e normolipídicas foram preparadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* – AIN-93 (REEVES et al, 1993), sendo diferenciadas apenas pelo componente lipídico conforme descrição a seguir:

- Grupo Controle (GC), constituído por animais que receberam dieta contendo 7% de óleo de soja, conforme preconizado pela AIN-93;

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

- Grupo Óleo de Palma Híbrida (GPH), constituído por animais que receberam dieta contendo 5% de OP híbrida refinado e 2% de óleo de soja.

O acréscimo de óleo de soja nas dietas experimentais teve como objetivo alcançar as recomendações de lipídios insaturados necessários ao adequado desenvolvimento do sistema nervoso central. Três dias após o parto, as ninhadas foram ajustadas para 6-8 filhotes por cada

mãe para garantir o desempenho lactotrófico. O desmame foi realizado aos 21 dias, quando os filhotes foram separados e agrupados em gaiolas individuais passando a receber, até os 60 dias de vida, ração manipulada à base de caseína, contendo 7% de OS, conforme preconizado para o crescimento (Soja G) pelo AIN-93 (**Tabela 1**) e a partir desta idade e até os 90-100 dias de vida, os animais receberam ração manipulada de manutenção (Soja M), contendo 4% de OS, conforme recomendado para animais adultos (**Tabela 2**). O acesso às rações e água permaneceram *ad libitum* ao longo de todo o período experimental.

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 GPA e GPH

Ingredientes (g/Kg)	**Ração GC (Soja G)**	**Ração GPA**	**Ração GPH**
Amido de milho	397,49	397,49	397,49
Caseína	200	200	200
Dextrina	132	132	132
Sacarose	100	100	100
Celulose	50	50	50
Mix de mineral G [a]	35	35	35
Mix de vitaminas [b]	10	10	10
L-cistina	3	3	3
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5
BHT	0,014	0,014	0,014
Óleo de soja	70	20	20
Óleo de palma africana	-	50	-
Óleo de palma híbrida	-	-	50
Valor energético (Kcal/Kg)	3950	3950	3950

BHT:Butilidroxitolueno; GC = Grupo Controle, GPA= Grupo óleo de palma africana, GPH = Grupo óleo de palma híbrida. ¹Mix 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); ²Mix de vitaminas (U/Kg dieta): ácido nicotínico 30mg; pantotenato 15mg; piridoxina 6mg; tiamina 5mg; riboflavina 6mg; ácido fólico 2mg; vitamina K 750µg; Dbiotina 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

Ingredientes (g/Kg)	**Ração Soja M (AIN-93)**
Amido de milho	465,69
Caseína	140
Dextrina	155
Sacarose	100
Celulose	50
Mix de mineral M[1]	35
Mix de vitaminas[2]	10
L-cistina	2
Bitartarato de Colina	2,5
BHT	0,008
Óleo de soja	40
Valor energético (Kcal/Kg)	3800

BHT: Butilhidroxitolueno; ¹Mix 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). ²Mix 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).

Na **Figura 3** está representado, esquematicamente, o delineamento do estudo realizado.

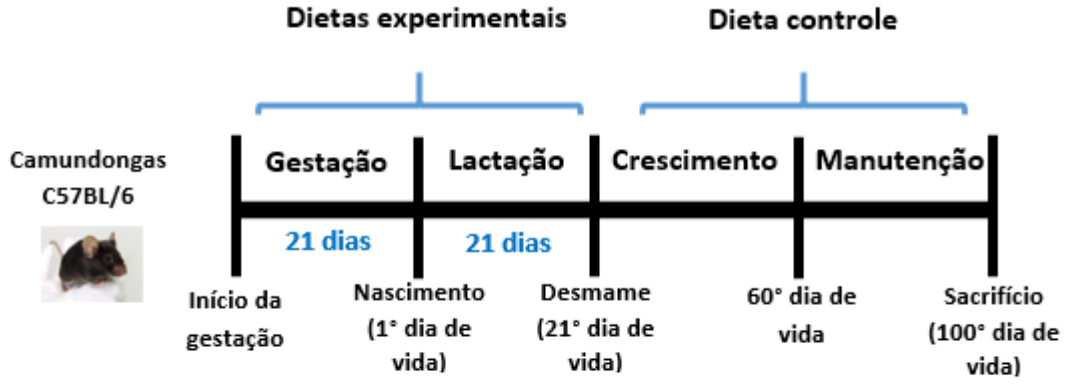

Figura 3: Delineamento do estudo em modelo de programação metabólica

5.3 Elaboração das dietas

Todas as rações experimentais foram confeccionadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional da UFRJ. Os ingredientes comuns a todas as rações experimentais foram adquiridos das Empresas Prag Soluções e Farmos. Os óleos de palma africana e híbrida foram fornecidos pela Empresa Agropalma. O óleo de soja Lisa® foi adquirido em mercado local. As matérias-primas para o preparo das rações foram homogeneizadas em uma batedeira planetária 12L (Gastromaq, Brasil), sob a agitação constante, e após a completa mistura de todos os ingredientes foi acrescentada água à temperatura de ± 60 ºC, gradativamente, até formar uma massa com textura que permitisse a formação de *pellets*, que foram armazenados em sacos plásticos vedados e então armazenados em freezer –20 ºC, sendo oferecidas em porções diárias aos animais.

5.4 Determinação do perfil de ácidos graxos das duas variedades de óleo de palma e das rações experimentais

5.4.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos

Os teores relativos de ácidos graxos das duas variedades de óleo de palma e 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's foi realizada por método descrito por AOCS (2011).

Alíquotas de 100 mg de amostra de cada lipídio dietético e alíquotas de 1g de cada ração experimental foram pesadas em balança digital analítica SHIMADZU, modelo AUY220, e transferidas para tubos Pirex®, sendo homogeneizadas em 5 mL de NaOH/metanol 0,5 M com o auxílio de bastões de vidro. Posteriormente foi adicionado 1 mL 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 imediatamente 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 1 hora 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 SP2560 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. O perfil de ácidos graxos encontrado nas duas variedades de óleo de palma e nas rações experimentais se encontram na **Tabela 3 e 4**, respectivamente:

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos (% total) das duas variedades de óleo de palma

Ácidos Graxos	GPA			GPH		
	Média		EPM	Média		EPM
Σ AGS	47,7	±	0,1	38,9	±	0,1
C16:0 (palmítico)	40,9	±	0,2	32,8	±	0,1
C18:0 (esteárico)	5,0	±	0,1	4,6	±	0,0
Σ AGMI	42,9	±	0,0	50,2	±	0,0
C 18:1 9c (oleico)	42,1	±	0,0	49,6	±	0,0
Σ AGPI	9,5	±	0,1	10,6	±	0,1
C18:2 n-6 (LA)	9,1	±	0,1	10,1	±	0,1
C18:3 n-3 (ALA)	0,0	±	0,0	0,0	±	0,0
Σ AGPI n-3	0,1	±	0,0	0,2	±	0,0
Σ AGPI n-6	9,1	±	0,1	10,1	±	0,1

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poliinsaturados; 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. (n=3/grupo).

Tabela 4 - 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		GPA		GPH	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
∑ AGS	12,92	± 0,18[a]	26,24	± 0,29[b]	20,71	± 1,86[c]
C16:0 (palmítico)	8,95	± 0,12[a]	20,43	± 0,24[b]	14,77	± 1,19[c]
C18:0 (esteárico)	2,40	± 0,15[a]	3,90	± 0,25[b]	4,13	± 0,56[b]
∑ AGMI	19,16	± 0,22[a]	25,90	± 0,99[b]	30,07	± 1,20[c]
C18:1 9c (oleico)	18,31	± 0,21[a]	24,44	± 1,02[b]	29,38	± 1,16[c]
∑ AGPI	34,58	± 0,38[a]	13,63	± 0,97[b]	14,89	± 1,30[b]
C18:2 n-6 (LA)	29,87	± 0,47[a]	11,53	± 0,93[b]	13,04	± 0,94[b]
C18:3 n-3 (ALA)	1,65	± 0,08[a]	1,32	± 0,21[a]	1,46	± 0,19[a]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados; LA: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico. Dados referentes ao perfil lipídico das dietas ofertadas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$ (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=4; GPA: grupo óleo de palma africana, n=4 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

5.5 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal dos animais

Foi aferida a massa corporal das camundongas grávidas ao longo de toda a gestação, semanalmente, em balança analítica. Os filhotes, durante a lactação, também foram monitorados quanto à evolução ponderal no intervalo de 1 semana, do 7° dia de vida até o 21° (desmame). Após o desmame, os filhotes foram pesados semanalmente até o final do protocolo experimental, aos 90-100 dias de vida. O consumo alimentar de mães e filhotes foi registrado diariamente até o encerramento dos experimentos. Para o cálculo da quantidade de ração ingerida em 24 horas, foi calculada a diferença entre a quantidade total de ração colocada no dia anterior e o peso da ração que restou na gaiola. Todas as medidas foram tomadas no período da manhã, em balança eletrônica Bioprecisa JH2102.

5.6 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Aos 90 dias de vida, após a retirada prévia da ração (que ocorria por volta das 9 horas da manhã), por um período de 6 horas, foi realizado o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG) mediante infusão intraperitoneal 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 três grupos experimentais, foi calculada a área sob a curva (*Area Under the Curve,* AUC).

5.7 Avaliação da adiposidade por tomografia computadorizada

Aos 100 dias de vida os animais passaram por tomografia computadorizada para análise da distribuição corporal dos depósitos de tecido adiposo. Foi utilizado o equipamento Optima 560 PET/CT scanner (GE Healthcare, Boston, USA). Baseado no protocolo de aquisição helicoidal, por meio de cortes axiais de espessura de 0,625 mm (colimação de 16 x 0,625 mm), 48 imagens, colimação do feixe de 10mm e diâmetro selecionável de interesse de 10cm, foram realizadas medidas de volume do tecido adiposo intra-abdominal na região próxima à L3 (**Figuras 4A e 4B**). O tubo de raios-x foi programado para 120 kV e 80 mA. O tempo total de cada análise foi de 12 segundos. Unidades Hounsfield (coeficientes de atenuação linear para diferentes tecidos) foram analisadas utilizando-se o software OsiriX para quantificar o tecido adiposo na área de interesse. 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.

4a) **4b)**

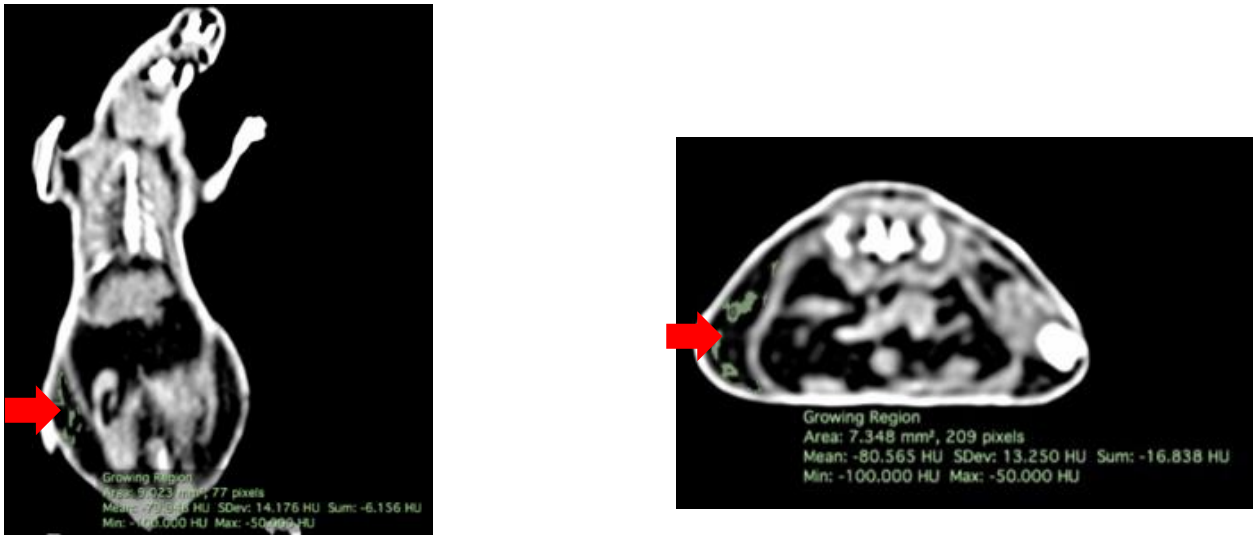

Figura 4A- Seta em vermelho indica corte coronal delimitando a gordura existente em tecido subcutâneo abdominal do lado direito do animal;
Figura 4B- Seta em vermelho indica corte transversal na mesma topografia da Figura 4A.

5.8 Coleta e processamento das amostras

Aos 100 dias de vida, após a retirada prévia da ração por um período de 4 horas, os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg massa corporal) e sedados com Xilazina (16 mg/kg massa corporal). Em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos contendo EDTA 8%, centrifugado a 3500 rotações por minuto (rpm), 4ºC, por 15 minutos e, posteriormente, o plasma foi separado e armazenado a -80ºC. Após a coleta de sangue por punção cardíaca, os animais tiveram o fígado e os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico dissecados, pesados em balança digital e imediatamente, congelados a -80ºC até o momento das análises correspondentes. Os valores de massa dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram somados e, dessa forma, caracterizada a obesidade visceral. (FANTUZZI; MAZZONE, 2007)

5.9 Determinação do perfil de ácidos graxos do fígado e tecido adiposo epididimal

5.9.1 Extração de lipídios, saponificação e metilação de ácidos graxos

Os teores relativos de ácidos graxos dos lipídios totais em amostras de fígado e tecido adiposo epididimal 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 de AG's foi realizada por método descrito por AOCS (2011).

Alíquotas de 150 mg de fígado e 100 mg de tecido adiposo, 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 imediatamente 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 1 hora para a separação das fases. Os ésteres metílicos formados na parte superior dos tubos 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.

5.9.2 Cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos foram separados em coluna capilar de sílica fundida SP2560 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 1/25. As injeções sforam 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.

5.10 Determinação da função mitocondrial hepática

5.10.1 Isolamento de mitocôndrias do fígado de camundongos

Aos 100 dias de vida os animais foram eutanasiados e o tecido hepático retirado e conservado em 15 mL de tampão de isolamento contendo Manitol 225 mM; Sacarose 75 mM; Ácido etilenoglicol bis(β aminoetil éter) N,N,N',N' tetraacético (EGTA) 1 mM; albumina sérica (BSA) 0,1% e Ácido 2 [4(2 hidroxiletil) piperazinil(1)] etanossulfônico (HEPES) 10 mM (pH 7,2) a 4ºC. As mitocôndrias hepáticas foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial proposto por Frezza et al. (2007) com modificações. Após a retirada, o tecido hepático foi partido em pequenos pedaços em um tubo Falcon® com o auxílio de uma tesoura de aço inoxidável, e em seguida o material foi lavado com 10 mL de tampão de isolamento. Após quatro lavagens para remoção de contaminação por sangue, o tecido foi homogeneizado manualmente em 20 mL de tampão com um homogeneizador potter-elvehjem de vidro com um pistão rotativo de Teflon, durante aproximadamente seis ciclos. O homogenato foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos em uma centrífuga Hitachi refrigerada, Modelo CR21GII, com um rotor R20A2. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e centrifugado a 10.000 rpm por 8 minutos. Em seguida o sobrenadante foi eliminado e o precipitado homogenizado em 1 mL de tampão de isolamento com o auxílio de um pincel para soltar o precipitado, e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 8 minutos. Após esta etapa, o precipitado foi homogenizado em 1 mL de tampão de isolamento e considerado como a fração mitocondrial. A concentração de proteína foi determinada como descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina padrão.

5.10.2 Medida do consumo de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio foi mensurada pela técnica de polarografia utilizando um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-O2K, Oroboros Instruments®, Innsbruck, Áustria) com o uso do programa no software DatLab versão 4.2.0.73 (Oroboros Instruments®, Innsbruck, Áustria). As medições foram realizadas em um ambiente controlado termicamente com a estabilidade de temperatura em torno de 37ºC ± 0,001°C. O eletrodo foi calibrado entre

0 e 100% de saturação (220 µM O2) a pressão atmosférica (101,3 kPa). As mitocôndrias hepáticas (0,5 mg/mL) foram incubadas com 2,0 mL de tampão de respiração MIR05 contendo sacarose 110 mM; EGTA 0,5 mM; MgCl2 3 mM; MES 60 mM; Taurina 20 mM; KH2PO4 10 mM; HEPES 20 mM; BSA 0,1% (pH 7,2), sob agitação constante. A cubeta foi fechada imediatamente antes do início do experimento. Após a obtenção do fluxo de consumo basal, a respiração foi iniciada de acordo com Pesta & Gnaiger (2012) com modificações, com adição sequencial de substratos do complexo I (piruvato/malato/glutamato, PMG, 2 mM de cada reagente) ou substrato do complexo II (succinato 2 mM), seguido de adenosina difosfato (ADP) 100 µM, ADP 1 mM, Oligomicina 1µM, Carbonyl Cyanide p-Trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 0,25 µM, FCCP 0,25 µM, e Antimicina A (Ant A) 5 µM (PESTA & GNAIGER, 2012). Os resultados foram expressos em pmol de O2 / mg de proteína * segundo.

Para a avaliação de parâmetros respiratórios, diferentes indutores e inibidores da cadeia transportadora foram subsequentemente adicionados ao isolado de mitocôndrias na câmara do oxígrafo e seus efeitos sobre o consumo de oxigênio foram observados. Dando início ao protocolo, foram adicionados sequencialmente piruvato, malato e glutamato como substratos para o complexo I. Logo após foi adicionado ADP para ser observado o consumo de O_2 em um estado fosforilante. Cabe destacar que neste modelo de mitocôndrias isoladas de fígado, é possível observar o "controle respiratório", onde toda a quantidade de ADP adicionado foi convertida em ATP pela ATP sintase, notado pela queda no consumo de O_2 observado pelos valores de ADP mínimo. Então, para garantir o consumo máximo de O_2 em um estado fosforilante, foi adicionado novamente ADP, mas em concentração maior. A adição com oligomicina inibe o consumo de O_2 através da inibição da subunidade F0 da ATP sintase, caracterizando um estado de vazamento inespecífico de prótons, independente da ATP sintase. Em seguida para avaliação da capacidade de respiração máxima, foi adicionado o ionóforo de prótons FCCP. Após a adição de FCCP, foi acrescentado ao protocolo de adição de substratos a rotenona, um inibidor natural do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Finalizando o protocolo, foi adicionado um inibidor do complexo III (Ant A – antimicina A) para avaliação do consumo de O_2 residual não relacionado à mitocôndria. Nesta última etapa, o consumo residual de oxigênio resultante representa o consumo não-mitocondrial de oxigênio, ou seja, o consumo realizado por outras organelas e processos bioquímicos celulares independentes da mitocôndria.

Foi avaliada também a determinação de consumo de O_2 por um substrato específico somente para o complexo II individualmente (succinato). Para este protocolo, utilizamos o malonato como um inibidor do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial.

5.10.3 Determinação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada pelo método de oxidação do Amplex Red® (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazine) proposto por Starkov (2010). Mitocôndrias hepáticas (0,5 mg proteína/mL) foram incubadas em tampão de respiração MIR05 (pH 7,2), com a adição de Amplex Red® 5 µM e Peroxidase de rabanete 4 U/mL. A geração de H_2O_2 foi monitorada por um Espectrofluorímetro (Varian Cary Eclipse®, Agilent Technologies) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 nm (slit 5 nm) e 587 nm (slit 5 nm), respectivamente, a 37ºC, sob agitação constante. O cálculo da concentração de H_2O_2 foi realizado por meio de uma curva padrão com titulação de quantidades conhecidas de H_2O_2. Os resultados foram expressos em pmol de H_2O_2 / mg de proteína * min.

5.11 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testados para a distribuição normal e em seguida todas as amostras foram submetidas à análise de variância de 1 via (1way ANOVA) ou a análise de variância de 2 vias (2way ANOVA). Quando constatada a presença de diferença estatística, foram realizados os testes *pos-hoc* de Tukey (1way ANOVA) ou Bonferroni (2way ANOVA). Em todos os casos foi considerada uma significância de $p<0,05$. Os resultados foram processados pelo programa *GraphPad Prism versão 6.0* (*GraphPad Software*, La Jolla-Ca, USA) e expressos como média ± erro padrão média (EPM).

6.0 Resultados

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

Na **Figura 5**, estão representados os resultados referentes à média semanal do consumo de 24 horas, expressos em gramas de ração consumida/gramas de massa corporal total (MCT) das camundongas durante o período de gestação e lactação. Diferenças significativas de consumo foram observadas somente na 2ª semana se lactação, onde GPA apresentou maior consumo que GC (GC:0,50g ± 0,03 < GP:0,70g ± 0,09, p<0,01).

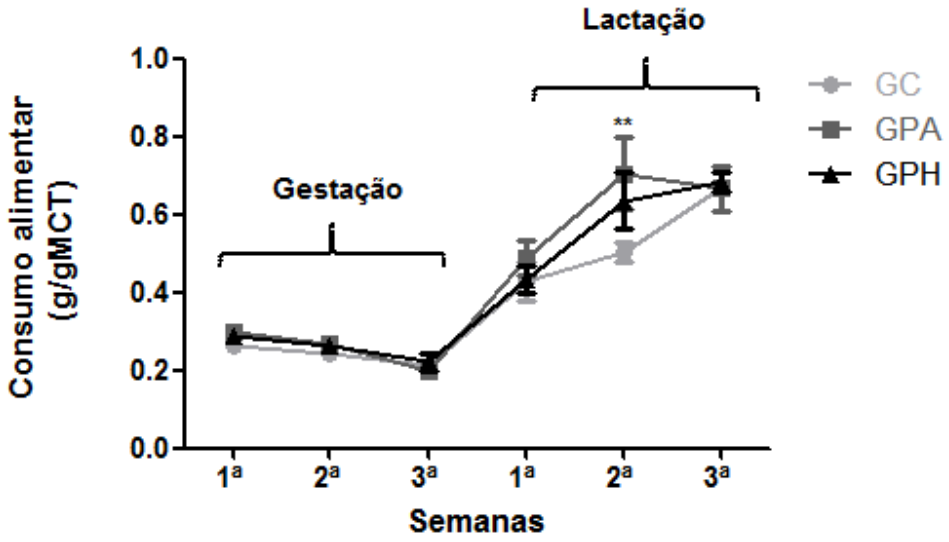

Figura 5 – Média semanal do consumo alimentar de 24 horas (g/g massa corporal total, MCT) das camundongas durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. **P<0,01 quando comparado ao GC (Análise de Variância de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni). GC: grupo controle, n=10; GPA: grupo óleo de palma africana, n=10 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=9.

6.2 Evolução da massa corporal das mães durante os períodos de gestação e lactação

A **Figura 6** representa a evolução ponderal das mães durante o período de gestação e lactação. Nenhuma diferença significativa de massa corporal entre os três grupos foi constatada durante esse período.

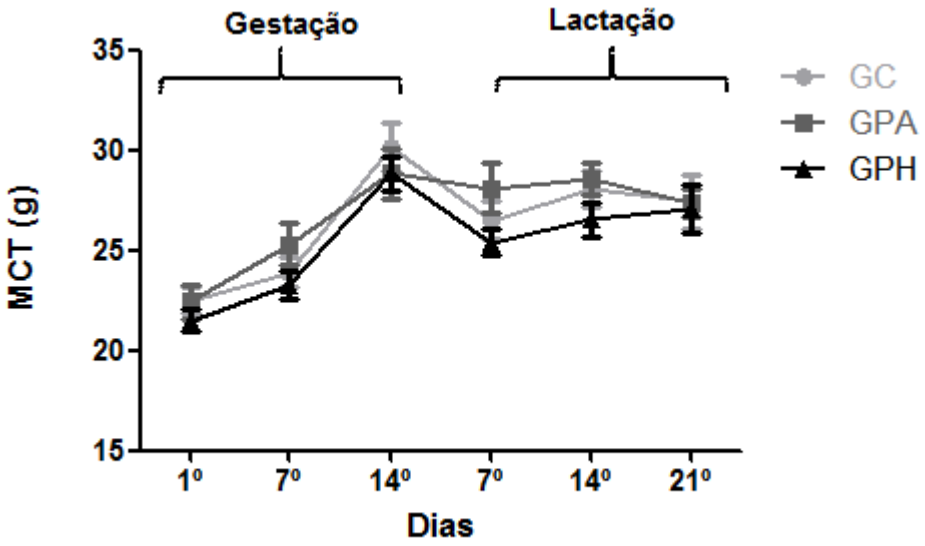

Figura 6 – Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, das camundongas alimentadas com diferentes fontes lipídicas durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=10; GPA: grupo óleo de palma africana, n=10 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=10.

6.3 Evolução da massa corporal dos filhotes machos durante o período de lactação

A **Figura 7** representa a evolução ponderal dos filhotes machos durante o período de lactação. Nenhuma diferença significativa de massa corporal entre os três grupos foi constatada durante esse período.

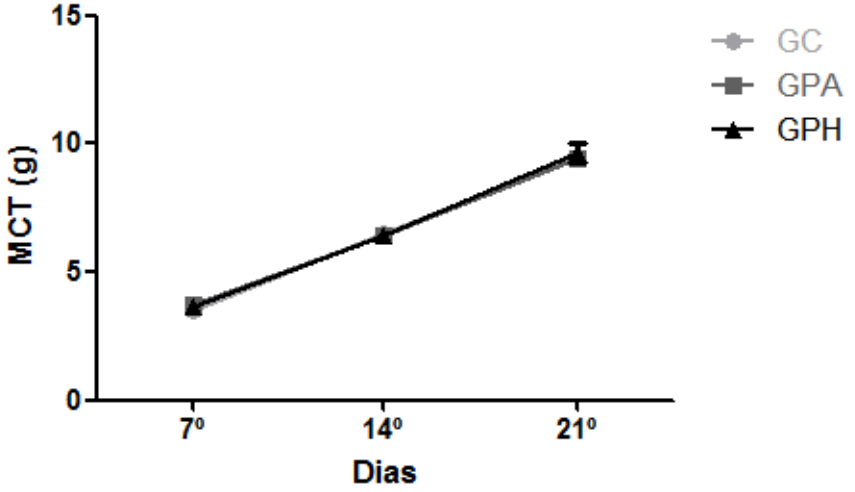

Figura 7 – Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos durante a lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=24; GPA: grupo óleo de palma africana, n=20 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=17.

6.4 Consumo alimentar dos filhotes machos desde o desmame até os 100 dias de vida

Na **Figura 8**, estão apresentados os resultados referentes à média semanal do consumo de 24 horas, expressos em gramas de ração consumida/gramas de MCT dos filhotes machos, verificados desde o desmame até os 100 dias de vida. Diferenças pontuais foram constatadas apenas na 1ª semana, com GPA apresentando maior consumo que GC e GPH (GC:0,41g ± 0,01 e GPH:0,43g ± 0,05 < GPA:0,57g ± 0,07, p<0,001) e na 2ª semana, com GPA também tendo maior consumo que os outros dois grupos (GC:0,25g ± 0,01 < GPA:0,44g ± 0,04 p<0,01 e GPH:0,33g ± 0,05 < GPA:0,44g ± 0,04, p<0,05).

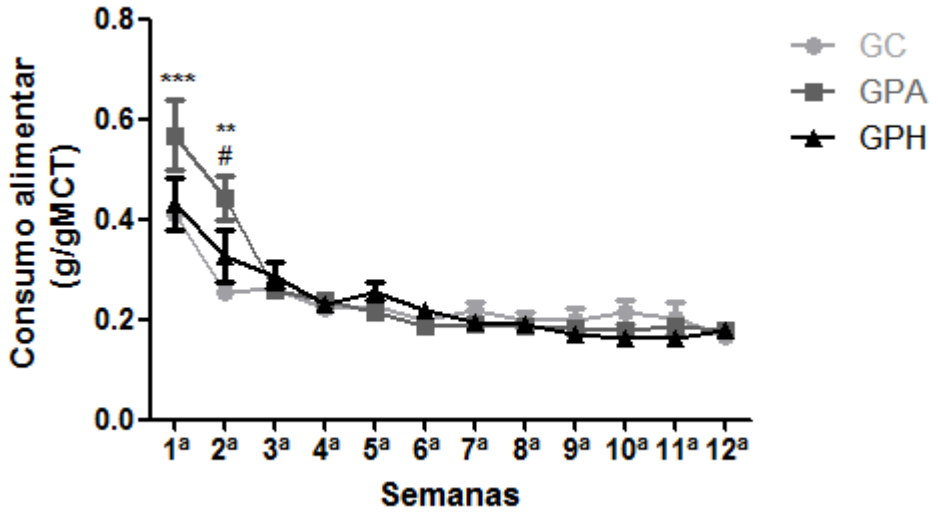

Figura 8 - Média semanal do consumo alimentar de 24 horas dos filhotes machos (g/g massa corporal total, MCT), que receberam ração controle desde o desmame até os 100 dias de vida. Valores expressos como média ± EPM. ***P<0,001 quando comparado ao GC e GPH; **P<0,01 quando comparado ao GC; #P<0,05 quando comparado ao GPH (Análise de Variância de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni). GC: grupo controle, n=15; GPA: grupo óleo de palma africana, n=14 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=14.

6.5 Evolução da massa corporal dos filhotes machos desde o desmame até os 100 dias de vida

A **Figura 9** representa a evolução ponderal dos filhotes machos desde o desmame até os 100 dias de vida. Nenhuma diferença significativa de massa corporal entre os três grupos foi constatada durante esse período.

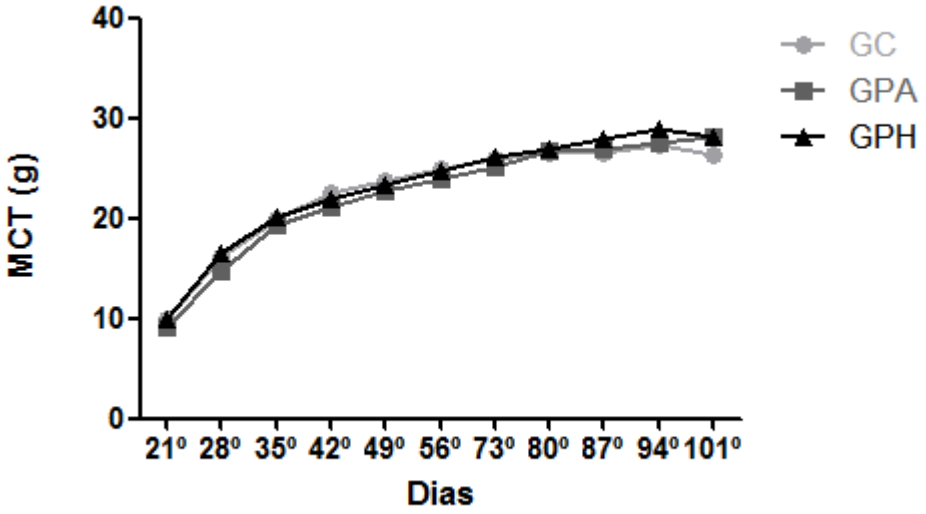

Figura 9 – Evolução da massa corporal total (MCT), expressa em gramas, dos filhotes machos que receberam ração controle desde o desmame até os 100 dias de vida. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=15; GPA: grupo óleo de palma africana, n=13 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=14

6.6 Massa correspondente aos fígados dos filhotes machos ao desmame

A **Figura 10** apresenta a massa relativa (g/g de MCT) dos fígados de animais aos 21 dias de vida, que por sua vez não diferiu entre os grupos, conforme demonstrado a seguir:

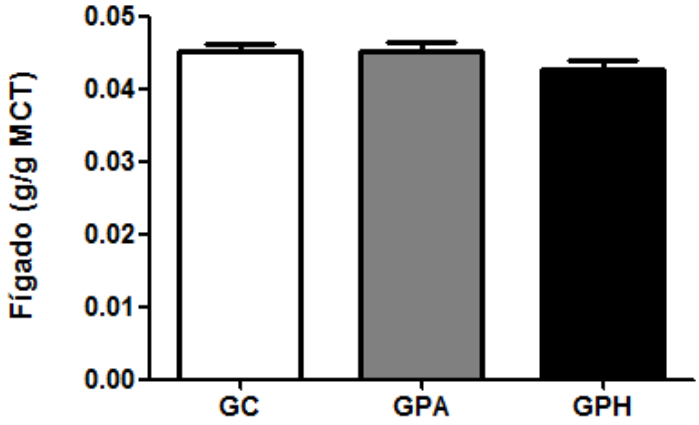

Figura 10 – Massa (g/g massa corporal total, MCT) correspondente aos fígados de camundongos machos, aos 21 dias de vida, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante a gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=10; GPA: grupo óleo de palma africana, n=10 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=9.

6.7 Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do fígado dos filhotes machos ao desmame

As concentrações relativas de ácidos graxos identificados nos lipídios totais das amostras de fígado, obtidas dos filhotes machos aos 21 dias de vida, encontram-se na **Tabela 5.** Observa-se que o GC apresentou incorporação significativamente inferior de AGS totais, quando comparado ao GPA, sendo esta diferença ocasionada principalmente pela menor incorporação de ácido palmítico no tecido hepático dos filhotes que consumiram dieta controle durante a gestação e lactação. Também foi verificado que a incorporação de AGMI no tecido hepático dos filhotes ao desmame foi significativamente maior no GPH, em relação ao GC e GPA. Ainda, é possível constatar que o GC apresentou teores significativamente elevados de AGPI quando comparado ao GPA e GPH, sendo esta diferença ocasionada pela maior incorporação de LA, EPA e DHA nos filhotes do grupo GC.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido hepático dos filhotes machos aos 21 dias de vida

Ácidos graxos	GC		GPA		GPH	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
∑ AGS	42,98	± 0,80^{a}	45,52	± 0,50^{b}	43,11	± 0,40^{ab}
C16:0 (palmítico)	26,48	± 0,22^{a}	29,43	± 0,17^{b}	29,00	± 0,30^{b}
C18:0 (esteárico)	14,12	± 0,53^{a}	13,94	± 0,53^{ab}	11,93	± 0,55^{b}
∑ AGMI	27,40	± 1,36^{a}	30,61	± 1,73^{a}	38,54	± 1,10^{b}
C18:1 9c (oleico)	14,34	± 1,33^{a}	17,61	± 1,45^{a}	24,17	± 1,32^{b}
∑ AGPI	29,62	± 0,72^{a}	22,37	± 1,82^{b}	18,35	± 1,01^{b}
C18:2 n-6 (LA)	14,35	± 0,44^{a}	8,21	± 0,65^{b}	7,06	± 0,20^{b}
C18:3 n-3 (ALA)	0,03	± 0,00^{a}	0,03	± 0,00^{a}	0,03	± 0,00^{a}
C20:4 n-6 (AA)	0,10	± 0,02^{a}	0,13	± 0,01^{a}	0,15	± 0,02^{a}
C20:5 n-3 (EPA)	0,47	± 0,02^{a}	0,21	± 0,00^{b}	0,21	± 0,00^{b}
C22:6 n-3 (DHA)	10,54	± 0,34^{a}	7,61	± 1,10^{b}	6,12	± 0,35^{b}

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poliinsaturados; LA: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico. Dados referentes aos camundongos machos aos 21 dias de vida, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$ (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=5; GPA: grupo óleo de palma africana, n=5 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=5.

6.8 Avaliação da massa dos estoques de tecidos adiposos dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Na avaliação dos depósitos de compartimentos adiposos da prole de machos aos 100 dias, foi possível observar que no tecido adiposo epididimal (TAE) o GPA apresentou adiposidade significativamente superior ao GC (+55%, p<0,01), enquanto o GPH se apresentou significativamente igual aos outros dois grupos. No tecido adiposo mesentérico (TAM), o GPA apresentou maior conteúdo de tecido adiposo em relação a GC (+80%, p<0,05) e GPH (+67%, p<0,05). Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere ao tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Quando avaliado o somatório dos três compartimentos adiposos (TAE + TAM + TARP) para caracterização de adiposidade visceral, foi constatado que o GPA apresentou maior conteúdo total desse tecido, sendo estatisticamente maior ao GC (+60%, p<0,001) e GPH (+34%, p<0,01) (**Figura 11**).

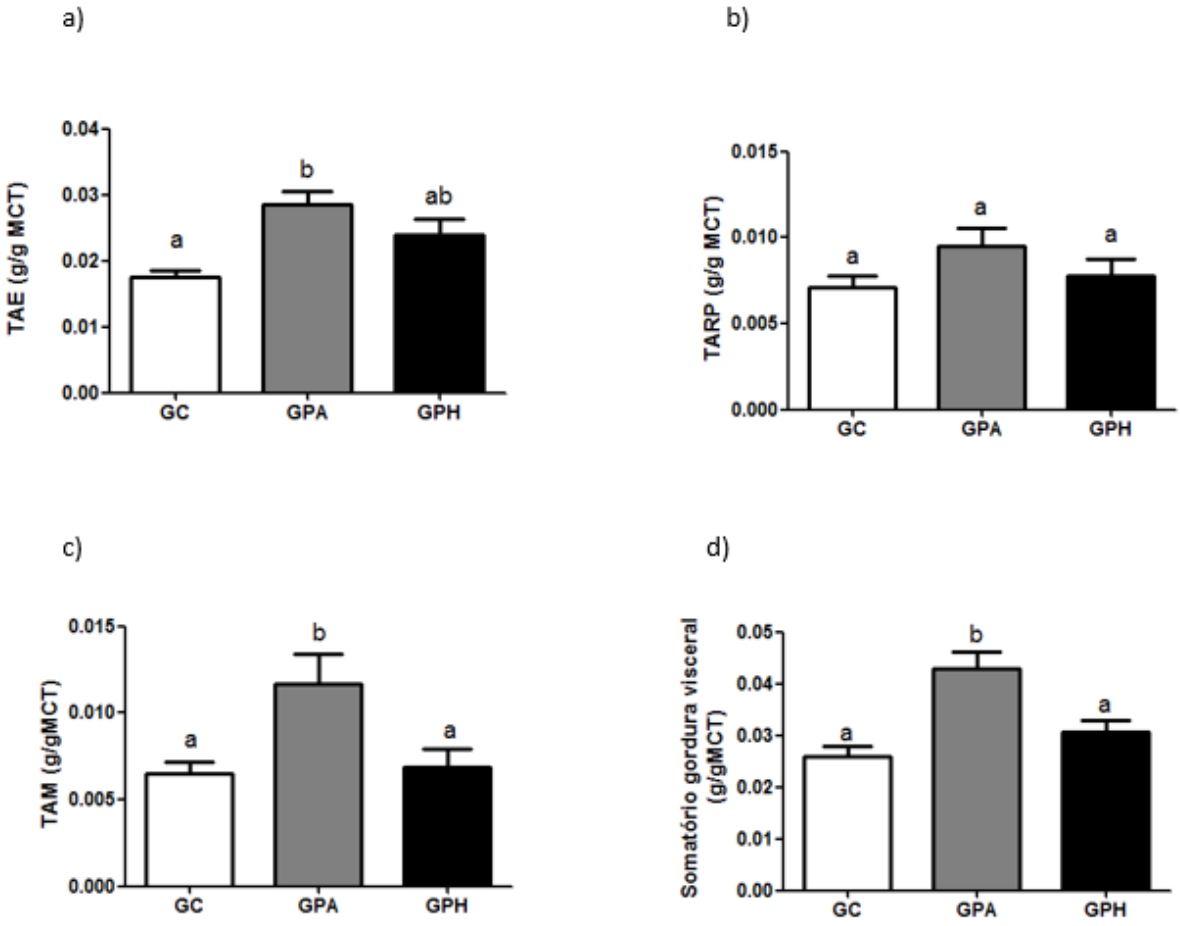

Figura 11 - Massa (g/g massa corporal total, MCT) dos estoques de tecidos adiposos: (a) TAE: Tecido adiposo epididimal; (b) TARP: Tecido adiposo retroperitoneal; (c) TAM: Tecido adiposo mesentérico; (d) Somatório dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM Letras diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05) (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=9; GPA: grupo óleo de palma africana, n=10 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=9.

6.9 Avaliação por tomografia computadorizada do volume de tecido adiposo subcutâneo abdominal

Na avaliação por tomografia do volume de tecido adiposo subcutâneo abdominal, a prole cujas mães consumiram óleo de palma africana durante toda a gestação e lactação apresentou maior volume de gordura na região próxima à L3 quando comparado ao controle (+124%, p<0,05), enquanto o GPH apresentou adiposidade similar ao GC e GPA (**Figura 12**).

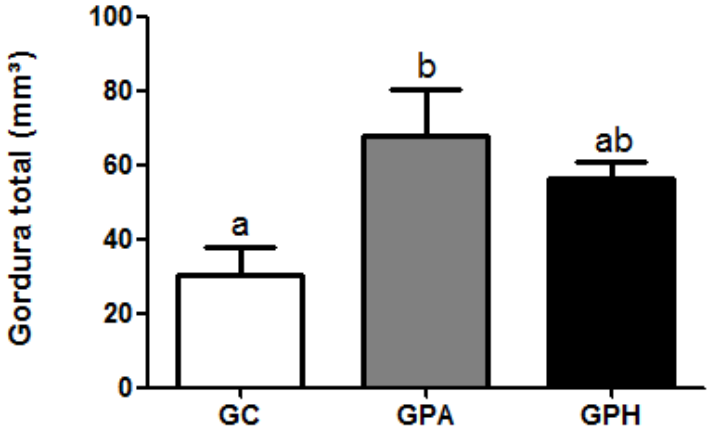

Figura 12 – Volume do estoque de tecido adiposo da região subcutânea do abdômen na altura da lombar 3 (L3), analisado por tomografia computadorizada. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05) (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=9; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=10.

6.10 Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Conforme descrito na **Tabela 6,** não foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos com relação ao conteúdo total de AGS e AGMI. Contudo, os animais do GPA apresentaram incorporação estatisticamente menor de AGPI total em relação ao GC, sendo esta diferença relacionada também com menor conteúdo de ácido linoleico (LA). Quando calculado o índice de dessaturação (16:1/16:0), observamos que o GPA apresentou maior valor desse parâmetro em relação ao GC, enquanto o GPH apresentou resultado estatisticamente igual ao GC e GPA.

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos (mg /100mg amostra) nos lipídios totais do tecido adiposo epididimal dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Ácidos graxos	GC		GPA		GPH	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
∑ AGS	24,14	± 0,44[a]	24,72	± 0,39[a]	24,57	± 0,51[a]
C16:0 (palmítico)	21,19	± 0,40[a]	21,54	± 0,42[a]	21,02	± 0,51[a]
C18:0 (esteárico)	1,02	± 0,03[a]	1,28	± 0,18[a]	1,61	± 0,16[a]
∑ AGMI	48,76	± 0,29[a]	50,34	± 0,32[a]	49,26	± 0,73[a]
C16:1 9c (palmitoleico)	7,49	± 0,16[a]	8,51	± 0,43[a]	7,79	± 0,22[a]
C18:1 9c (oleico)	37,60	± 0,32[a]	39,12	± 1,57[a]	39,01	± 0,87[a]
∑ AGPI	27,09	± 0,54[a]	24,93	± 0,56[b]	26,16	± 0,71[ab]
C18:2 n-6 (LA)	26,02	± 0,52[a]	23,79	± 0,59[b]	24,83	± 0,64[ab]
C20:5 n-3 (EPA)	0,03	± 0,00[a]	0,04	± 0,00[a]	0,03	± 0,00[a]
C22:6 n-3 (DHA)	0,15	± 0,01[a]	0,14	± 0,01[a]	0,15	± 0,01[a]
Dessaturase (16:1/16:0)	0,35	± 0,01[a]	0,40	± 0,01[b]	0,38	± 0,08[ab]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poliinsaturados; LA: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenóico. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$ (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=6; GPA: grupo óleo de palma africana, n=6 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=5.

6.11 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Foi constatado que entre os três grupos não houve diferença estatística referente à glicemia basal de jejum (Tempo 0'). Entretanto, após a infusão intraperitoneal de glicose, o GPA apresentou pico glicêmico no tempo 15' estatisticamente superior aos grupos GC (GC: 409,5 mg/dL ± 18,88 < GPA: 474,1 mg/dL ± 19,14, p <0,01) e GPH (GPH: 392,6 mg/dL ± 11,74 < GPA: 474,1 mg/dL ± 19,14, p< 0,001). Após 30 minutos da administração de glicose nos animais, o GPA manteve o pico glicêmico significativamente superior aos demais grupos GC (GC: 417,2 mg/dL ± 21,01 < GPA: 475,4 mg/dL ± 20,21, p<0,05) e GPH (GPH: 423,4 mg/dL ± 18,09 < GPA: 475,4 mg/dL ± 20,21, p<0,05). Na análise dos tempos conseguintes 60', 90' e 120', não foram observadas diferenças significativa entre os grupos (**Figura 13**).

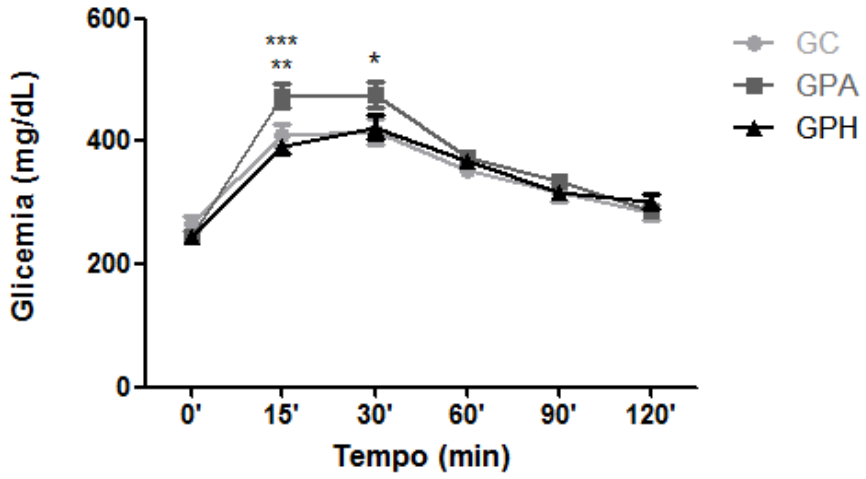

Figura 13 – Curva glicêmica obtida no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG). Dados referentes aos camundongos machos aos 90 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM. ***P<0,001 quando comparado ao GPH; **P<0,01 quando comparado ao GC; *P<0,05 quando comparado ao GC e ao GPH (Análise de Variância de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni). GC: grupo controle, n=12; GPA: grupo óleo de palma africana, n=14 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=14.

Também foi calculada a área sob a curva das glicemias ao longo do tempo e não se verificou diferença significativa entre os grupos (**Figura 14**).

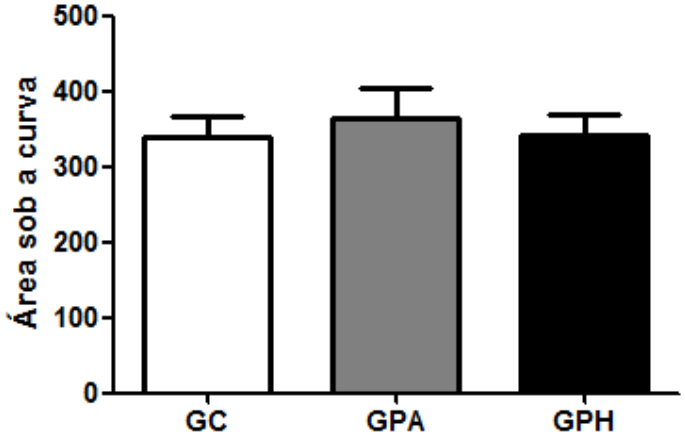

Figura 14 – Área sob a curva glicêmica calculada no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG). Dados referentes aos camundongos machos aos 90 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. GC: grupo controle, n=15; GPA: grupo óleo de palma africana, n=14 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=14.

6.12 Massa correspondente aos fígados dos filhotes machos aos 100 dias de vida

A massa relativa (g/g de MCT) dos fígados dos animais aos 100 dias de vida não diferiu entre todos os grupos, conforme demonstrado na **Figura 15.**

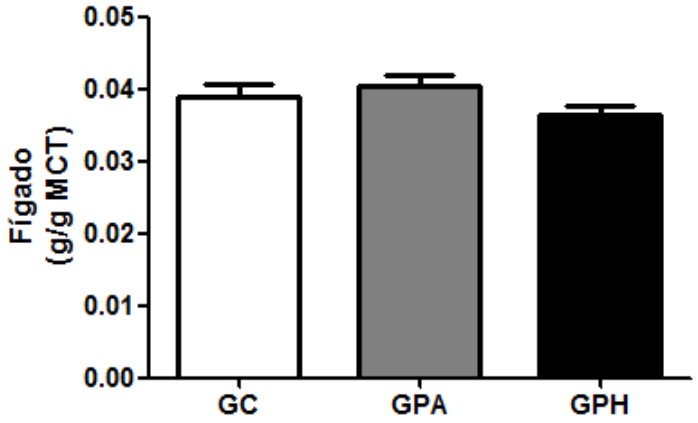

Figura 15 – Massa (g/g massa corporal total, MCT) correspondente aos fígados de camundongos machos, aos 100 dias de vida, alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. GC: grupo controle, n=9; GPA: grupo óleo de palma africana, n=10 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=9.

6.13 Perfil de ácidos graxos nos lipídios totais do fígado dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Conforme observado na **Tabela 7,** ao final do tratamento dietético aos 100 dias de vida, apenas o GPA apresentou incorporação significativamente maior de AGS totais no tecido hepático em relação ao GC e GPH, obtendo maior proporção de ácido esteárico em relação aos outros dois grupos. Com relação à incorporação de AGMI e AGPI no tecido hepático desses animais, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos. No cálculo do índice de dessaturação (16:1/16:0), não identificamos diferenças entre os grupos.

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

Ácidos graxos	GC			GPA			GPH		
	Média		**EPM**	**Média**		**EPM**	**Média**		**EPM**
∑ AGS	34,29	±	1,12[a]	38,98	±	0,71[b]	32,93	±	0,60[a]
C16:0 (palmítico)	23,59	±	0,68[ab]	25,42	±	0,69[a]	22,49	±	0,43[b]
C18:0 (esteárico)	8,32	±	0,47[a]	11,32	±	0,61[b]	8,41	±	0,71[a]
∑ AGMI	40,65	±	1,26[a]	39,12	±	1,04[a]	40,56	±	2,66[a]
C16:1 9c (palmitoleico)	4,47	±	0,35[a]	4,26	±	0,42[a]	4,27	±	0,46[a]
C18:1 9c (oleico)	28,88	±	1,34[a]	26,56	±	1,33[a]	28,77	±	2,41[a]
∑ AGPI	23,64	±	1,16[a]	22,16	±	0,49[a]	23,72	±	3,43[a]
C18:2 n-6 (LA)	10,67	±	0,49[a]	10,78	±	0,62[a]	11,26	±	1,18[a]
C20:5 n-3 (EPA)	0,92	±	0,25[a]	0,28	±	0,04[a]	0,48	±	0,17[a]
C22:6 n-3 (DHA)	6,30	±	0,29[a]	7,90	±	0,44[a]	6,85	±	0,56[a]
Dessaturase (16:1/16:0)	0,19	±	0,0[a]	0,17	±	0,02[a]	0,18	±	0,01[a]

Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poliinsaturados; LA: ácido linoleico; ALA: ácido alfa-linolênico; AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM. Letras diferentes na mesma linha sinalizam valores significativamente diferentes com $p < 0,05$ (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=6; GPA: grupo óleo de palma africana, n=6 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=6.

6.14 Consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas dos filhotes machos aos 100 dias de vida

Na **Figura 16**, é demonstrada a avaliação do consumo de O_2 por substratos específicos (Piruvato/Malato/Glutamato – representados pela sigla PMG) para o complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Não observamos diferenças significativas entre os grupos no consumo de O_2.

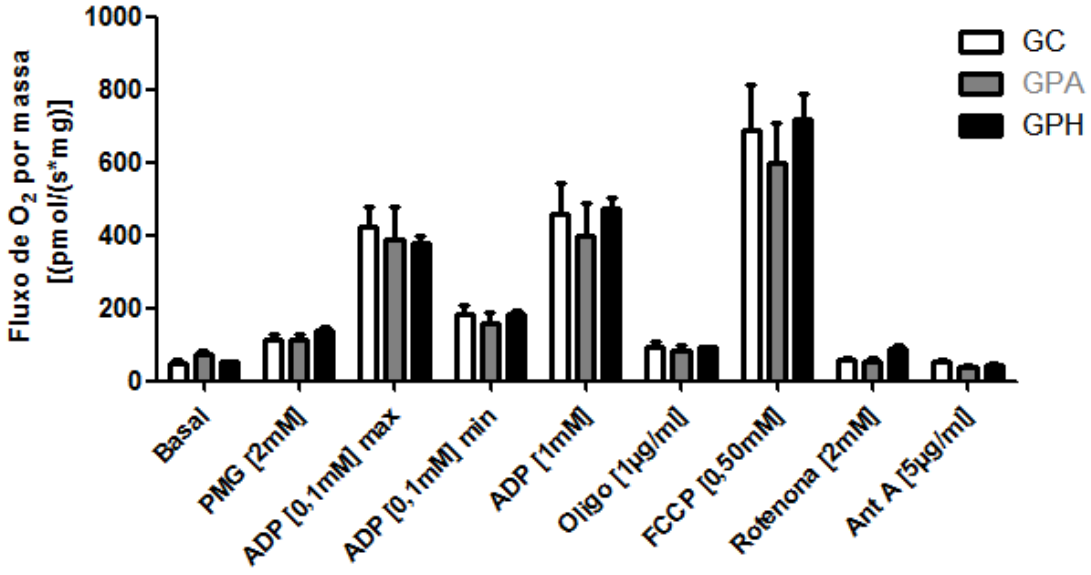

Figura 16 – Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo I. Foi utilizado PMG (P: Piruvato, M: Malato e G: Glutamato) como substratos para o complexo I. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM. GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

Os resultados referentes à derivação dos parâmetros de adaptações mitocondriais se encontram na **Figura 17**. Para todos os parâmetros avaliados, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos.

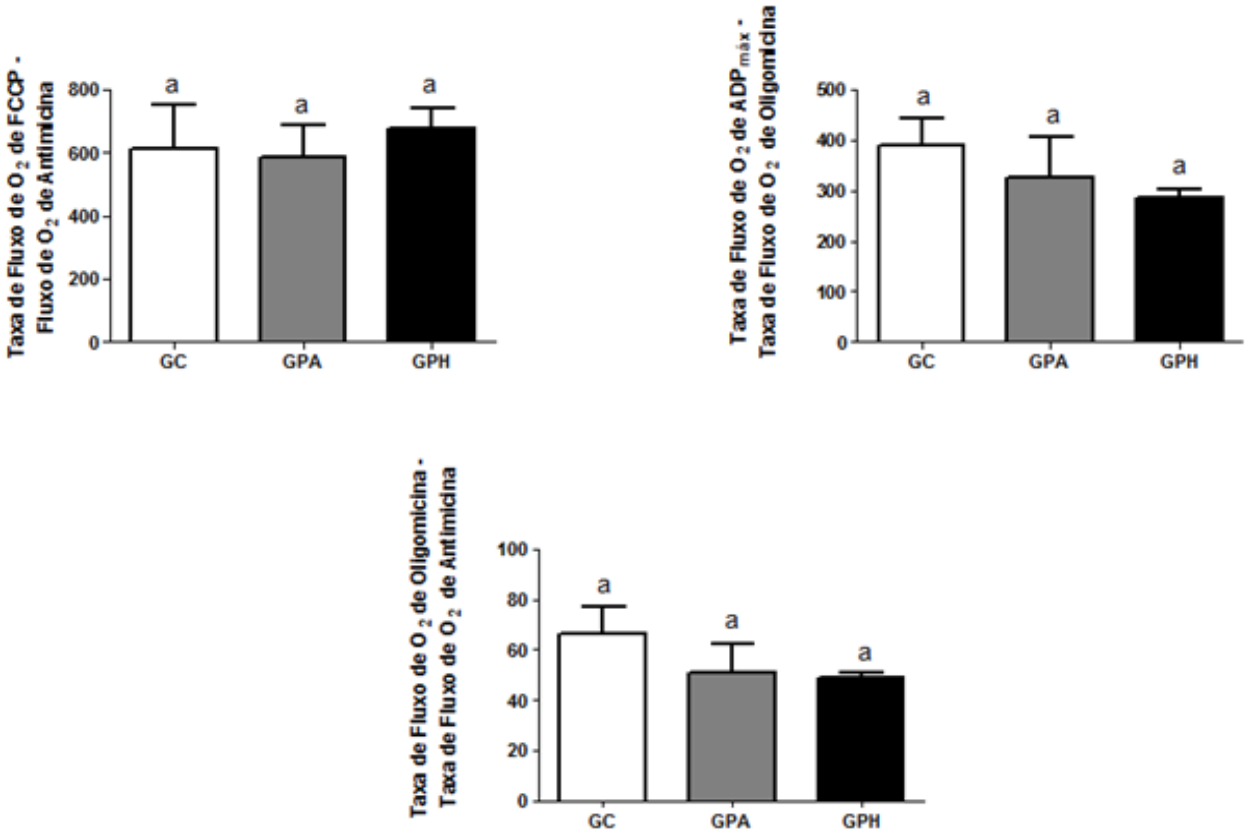

Figura 17 – Parâmetros de adaptação derivados do Protocolo de adição de substratos para o Complexo I. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

Na **Figura 18,** podemos observar o perfil do protocolo de adição com substrato apenas para o complexo II, onde não observamos diferenças significativas entre os grupos no consumo de O_2. Em seguida derivamos os mesmos parâmetros para este protocolo.

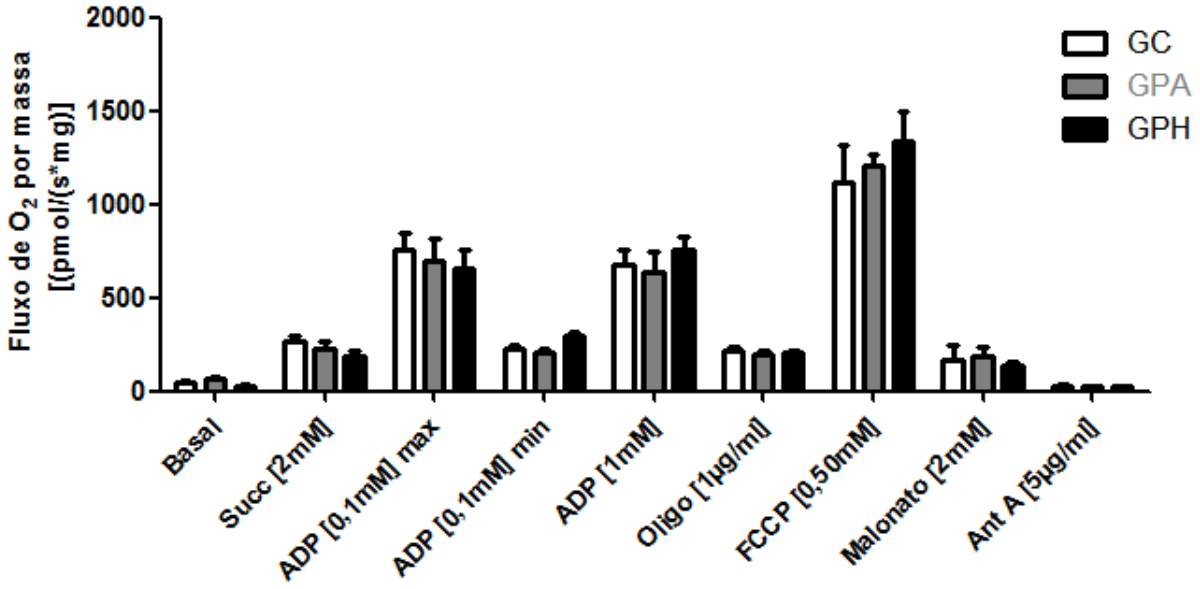

Figura 18 – Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo II. Foi utilizado succinato (succ) como substrato para o complexo II. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores representam a média ± EPM . GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

Os resultados referentes à derivação dos parâmetros de adaptações mitocondriais se encontram na **Figura 19**. Para todos os parâmetros avaliados, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos.

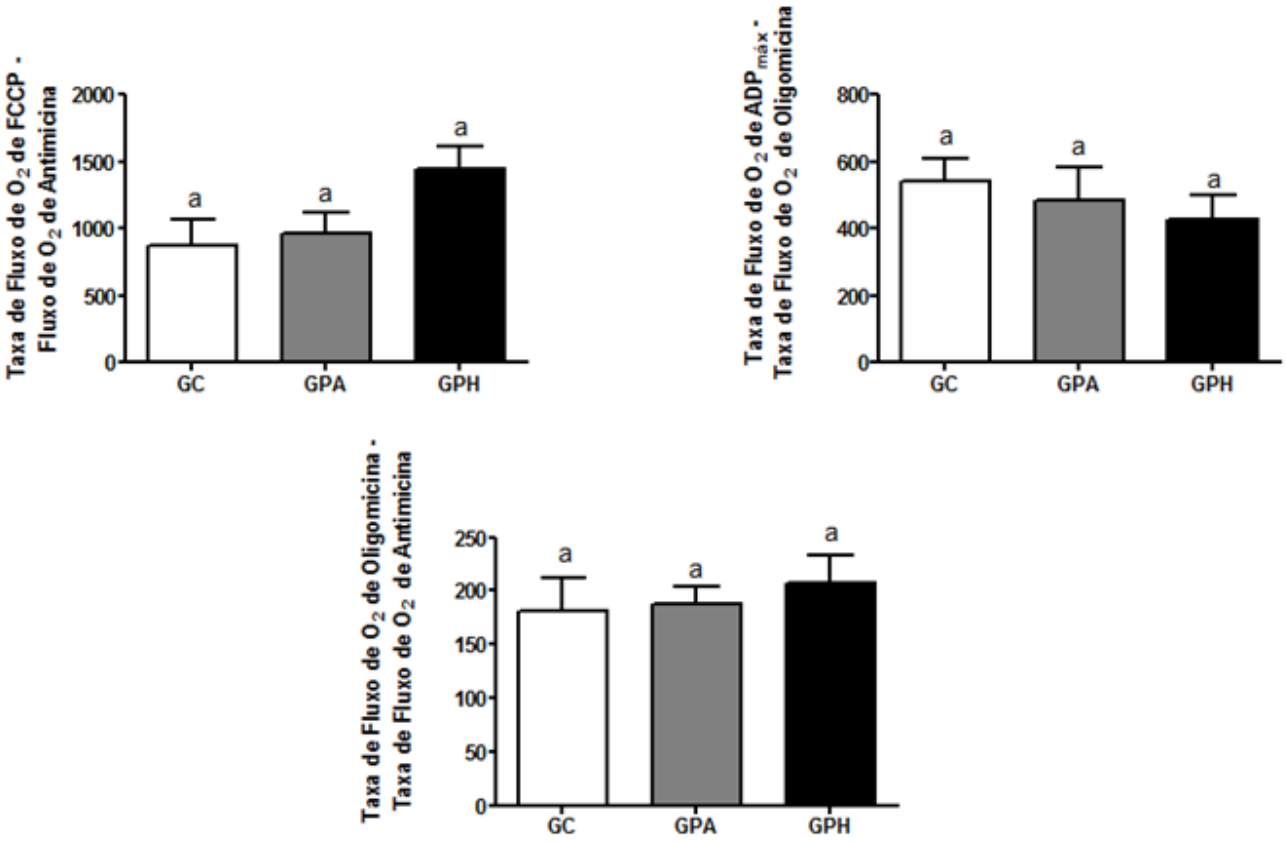

Figura 19 – Parâmetros de adaptação derivados do Protocolo de adição de substratos para o Complexo II. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) (Análise de Variância com pós-teste de Tukey). GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

6.15 Produção de peróxido de hidrogênio

Para os experimentos de produção de H_2O_2 utilizamos o reagente Amplex Red, uma sonda específica para esta molécula através da reação, com a formação de resorufina, a qual é detectada por fluorescência. Através dos gráficos, é obtida a inclinação (slope) dos fluxos específicos de produção de H_2O_2 por fluorescência de cada adição no experimento, onde se obtém valores que são convertidos e expressos em pmol de H_2O_2 / mg de proteína * min. Os resultados com os fluxos específicos de produção de H_2O_2 dos protocolos de adição de substratos para o complexo I (**Figura 20**) e complexo II (**Figura 21**) estão apresentados a seguir. Não observamos diferenças significativas entre os grupos.

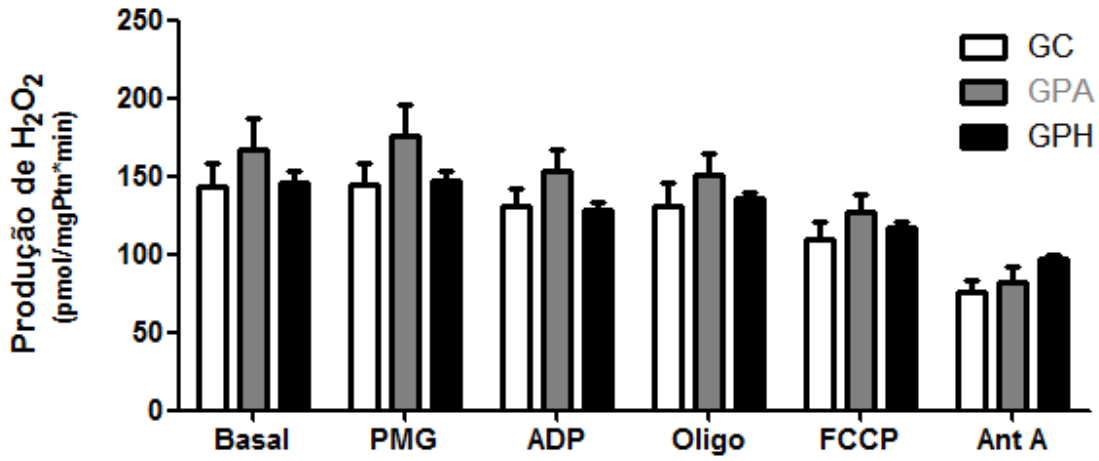

Figura 20 - Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo I para produção de H_2O_2. Foi utilizado PGM (P: Piruvato, M: Malato e G: Glutamato) como substratos para o complexo I. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

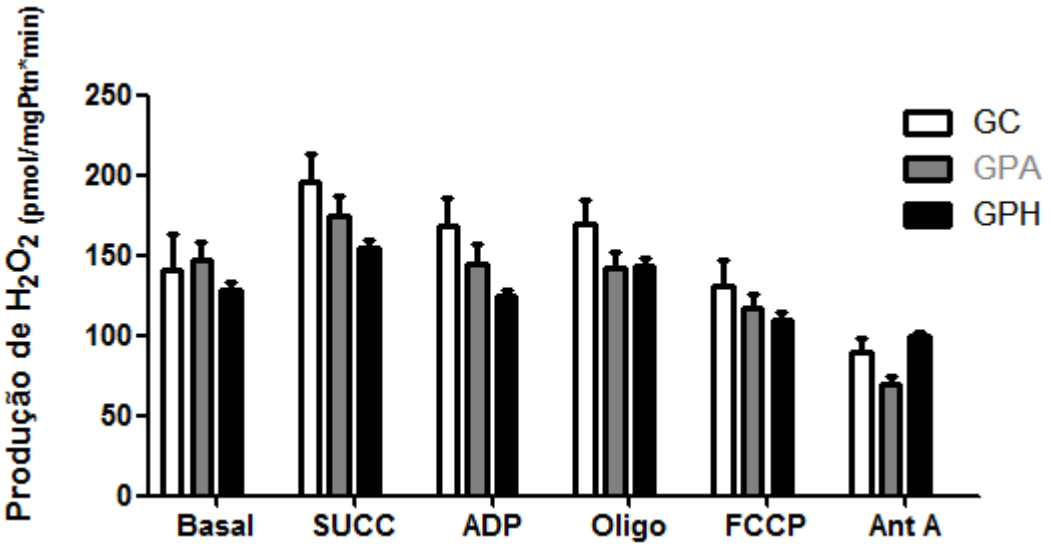

Figura 21 - Perfil do protocolo de adição de substratos para o Complexo II para produção de H_2O_2. Foi utilizado succcinato (succ) como substrato para o complexo II. Dados referentes aos camundongos machos aos 100 dias de vida alimentados com ração controle, desde o desmame, cujas mães consumiram dietas contendo diferentes fontes lipídicas durante o período de gestação e lactação. Valores expressos como média ± EPM. GC: grupo controle, n=7; GPA: grupo óleo de palma africana, n=8 e GPH: grupo óleo de palma híbrida, n=4.

7.0 Discussão

Sabe-se que a ingestão lipídica da mãe durante a gestação e lactação define o perfil de AG's que serão transferidos para o bebê tanto pela placenta quanto pelo leite materno e que esses lipídios exercem profundo impacto na modulação epigenética da prole (MENNITTI et al., 2015; SOSA-CASTILLO et al., 2017). Evidenciamos no presente estudo que o consumo materno de dietas com diferentes teores de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) ou poliinsaturados (AGPI) programam a prole de maneira distinta no que diz respeito ao fenótipo metabólico. As rações manipuladas, isoenergéticas e normolipídicas, diferiram entre si somente pelo tipo de gordura adicionada, refletindo, portanto, no perfil de ácidos graxos de cada dieta oferecida. No GC (dieta à base de óleo de soja), foi ofertada durante o período perinatal uma ração rica em AGPI, com a maior quantidade de ácido linoleico (LA) entre os grupos. No GPA (dieta à base de óleo de palma africana) a ração apresentou conteúdo superior de AGS, principalmente o palmítico, entre os três grupos. No GPH (dieta à base de óleo de palma híbrida), a ração continha uma quantidade de AGS estatisticamente intermediária quando comparada aos outros dois grupos e uma maior proporção de AGMI entre todos os grupos.

Nossos dados demonstram que em relação ao consumo pós-desmame, o GPA apresentou hiperfagia apenas nas duas primeiras semanas em relação aos grupos GC e GPH. Apesar dessa diferença não ter se mantido ao longo do período experimental, já foi demonstrado que o consumo de OP africana em uma dieta normolipídica durante o período perinatal é capaz de afetar a ingestão alimentar em resposta à administração central de insulina na prole quando adulta (BISPO et al., 2015).

A evolução ponderal dos filhotes machos durante a lactação e período pós-desmame não diferiu entre os três grupos experimentais. Nesse sentido, diversos estudos mostram que o consumo de dietas pareadas no teor lipídico total não são capazes de afetar a massa corporal dos animais, mesmo com diferenças na qualidade da fonte de gordura. O trabalho de Souza et al. (2012) verificou que não houve diferenças na evolução ponderal de ratos machos submetidos ao consumo de dietas normolipídicas, por 42 dias, contendo óleo de soja ou gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Ainda, Dos Santos et al. (2013) demonstraram que o consumo de dietas contendo óleo de soja, banha de porco, ou gordura vegetal hidrogenada, ambas contendo uma quantidade total de 7% de lipídios, não modificou a massa de camundongos machos ao final de 8 semanas.

Com relação à incorporação de AG's no tecido hepático dos animais aos 21 dias de vida, observamos resultados expressivamente variante entre os três grupos. Como esperado, o GC apresentou incorporação significativamente superior de AGPI, com maiores teores de LA, EPA e DHA em relação aos outros dois grupos. O GPH apresentou teores significativamente superiores de AGMI no tecido hepático dos animais ao desmame quando comparado aos animais do GPA e GC. Esse resultado se deve principalmente pela maior incorporação desse AG na dieta oferecida às mães dessa prole e também pelo perfil estereoespecífico das moléculas de TG desse lipídio. Já foi descrito que o híbrido de palma apresenta maiores teores de AGMI (especialmente AG oleico) e menores teores de AGS esterificados na posição sn-2 das moléculas de TG, quando comparado ao óleo de palma de origem africana (MOZZON et al., 2013), e, portanto, a absorção e consequente incorporação de AGMI seria mais facilitada pelo consumo de OP híbrida. O conteúdo total de AGS foi significativamente maior no GPA, em relação ao GC e GPH, assim como o conteúdo de ácido palmítico. Esse aumento também era esperado, devido a maior proporção desse tipo de AG na dieta à base de óleo de palma africana.

Quando avaliamos a adiposidade visceral dos animais pelo somatório dos compartimentos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico, constatamos que o GPA apresentou o maior acúmulo desse tecido quando comparado aos GC (+60%) e GPH (+34%), enquanto esses dois últimos grupos foram estatisticamente semelhantes. Na análise do volume de gordura subcutânea abdominal pela tomografia computadorizada, observamos que o GPA apresentou adiposidade superior ao GC (+124%), enquanto o GPH foi estatisticamente igual ao GC e GPA. Analisando em conjunto esses dois experimentos, constatamos que o consumo de OP africana durante o período perinatal é capaz de modular desfechos metabólicos desfavoráveis sobre a adiposidade, sendo esta diferença mais evidente quando comparada ao GC. Também é possível verificar que o aumento da adiposidade da prole se relaciona com o maior conteúdo total de AGS nas rações oferecidas durante o período perinatal.

Diversos trabalhos exemplificam os mecanismos de mudança de composição corporal em resposta a diferentes lipídios dietéticos. Em protocolo de programação metabólica, Priego et al. (2013) observaram que a suplementação materna com azeite de oliva, rico em ácido graxo oleico, do 14º dia de gestação ao 20º dia de lactação de ratas, foi capaz de aumentar na prole ao desmame os teores da proteína desacopladora UCP-1 no tecido adiposo marrom. Esse estudo propôs que o ácido oleico é capaz de prevenir o ganho de peso na prole por aumentar a capacidade termogênica dos animais. Estudos *in vitro* demonstram que adipócitos 3T3-L1 incubados com AGPI têm a expressão diminuída de genes relacionados com a adipogênese e maturação de adipócitos (como o PPAR-gamma e D9D/SCD1), assim como também

apresentam menor tamanho da gota lipídica presente no adipócito, quando comparado aos adipócitos incubados com AGS (MANICKAM; SINCLAIR; CAMERON-SMITH, 2010). Os AGPI também são capazes de atuar como reguladores transcricionais e ativar os PPAR's α e δ, que estão envolvidos na regulação do metabolismo lipídico. Esses fatores de transcrição estimulam a oxidação de AG's, colaborando assim, para diminuição do conteúdo de TG's intracelular (YADAV et al., 2013). O estudo de revisão de Krishnan e Cooper (2012) conclui que dietas com maior teor de gordura insaturada (mono ou poli) induzem a maior termogênese, oxidação lipídica e menor ganho de peso quando comparada a dietas ricas em gorduras saturadas. É constatado também que o ácido palmítico *in vitro* atua como molécula sinalizadora para o início da adipogênese, induzindo o início desse processo em pré-adipócitos clonais (AMRI; AILHAUD; GRIMALDI, 1994). Nesse sentido, já foi demonstrado que camundongos que consumiram dietas contendo OP africano durante o período perinatal tiveram quando adultos a morfologia do tecido adiposo alterada, com adipócitos do tecido epididimal e inguinal apresentando áreas significativamente maiores quando comparados ao grupo que consumiu dieta controle (óleo de soja) durante o mesmo período (MAGRI et al., 2015).

Em nosso estudo, verificamos também que a prole adulta do grupo que consumiu OP africana durante a gestação e lactação, além de ter apresentando a maior adiposidade no tecido adiposo epididimal, apresentou também menor incorporação de AGPI total (especialmente de LA) nesse tecido em relação ao controle. É descrito que os ácidos LA, EPA e DHA podem diminuir a produção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo, como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), IL-6 e IL-1, por agirem na sinalização intracelular, inibindo a via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB) (REN; CHUNG, 2007). Também já foi demonstrado que adipócitos 3T3-L1 incubados com ácido palmítico por 24 horas, tiveram um aumento de 70% na produção de TNF-α, enquanto os adipócitos encubados com AGPI não apresentaram efeitos na produção dessa citocina (BRADLEY; FISHER; MARATOS-FLIER, 2008). Assim sendo, como os animais do GPA tiveram menor teor de AGPI no tecido adiposo, estão possivelmente mais suscetíveis ao desenvolvimento de um estado inflamatório.

Sabe-se ainda que a estearoil-CoA dessaturase (SCD-1) é uma enzima regulatória envolvida na lipogênese *de novo*, catalisando a dessaturação de AGS (palmítico [16:0]) em AGMI (palmitoleico [16:1]) principalmente no tecido adiposo e hepático (PATON; NTAMBI, 2009). O aumento da atividade dessa enzima é altamente relacionado com diversos distúrbios metabólicos, tais como a obesidade, aterosclerose, doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), resistência à insulina (RI) e alguns tipos de câncer (MIYAZAKI; NTAMBI, 2003; WARENSJÖ et al., 2009). Nesse sentido, já foi verificado que os animais *knockout* para o gene

SCD-1 apresentaram melhor perfil lipídico sérico, diminuição da lipogênese *de novo*, aumento da expressão de GLUT-4 em músculo esquelético, melhor tolerância à glicose e resistência ao ganho de peso mesmo com consumo de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (POUDYAL; BROWN, 2011). Quando calculamos o índice de dessaturação (16:1/16:0) para avaliar indiretamente a atividade dessa enzima no tecido adiposo, constatamos que o GPA apresentou valor estatisticamente superior ao grupo GC, enquanto o GPH apresentou este parâmetro estatisticamente igual aos demais grupos. Estes resultados sugerem que o consumo de dieta rica em AGS durante o período perinatal é capaz de aumentar a atividade da SCD-1 no tecido adiposo da prole quando adulta, predispondo a ocorrência de distúrbios metabólicos.

O tecido adiposo branco atua como um órgão endócrino secretando diversas proteínas relacionadas com a homeostase glicêmica e lipídica, metabolismo energético, modulação hormonal e função imune. A gordura visceral (epididimal, em roedores) é mais suscetível à lipólise, por possuir adipócitos com maior número de receptores β-adrenérgicos (WAJCHENBERG, 2013). Assim, a hipertrofia de adipócitos, já observada em animais que consumiram OP no período perinatal (MAGRI et al., 2015), traz graves desajustes metabólicos, especialmente em relação a RI. Verificamos em nosso trabalho que, aos 90 dias de vida, os grupos não apresentaram diferença significativa quando calculada a área sob a curva (AUC) no teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTIG). Entretanto, o GPA apresentou picos glicêmicos nos pontos 15’ e 30’ estatisticamente superiores ao GC e GPH, demonstrando que a intolerância à glicose tende a ser maior no GPA.

O acúmulo de gordura visceral libera na circulação uma grande quantidade de AGL, que se depositam em tecidos ectópicos. A lipotoxicidade resulta na geração de derivados de lipídios parcialmente metabolizados, como diacilgliceróis, ceramidas e cadeias longas de acil-coA, que por sua vez, levam a ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) (PESSIN; SALTIEL, 2000). A PKC possui atividade serina quinase, resultando na fosforilação em serina dos substratos do receptor de insulina (IRS), no declínio da interação entre IRS e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), e consequentemente, em defeitos na sinalização de insulina (SIVITZ; YOREK, 2011). As citocinas liberadas pelo tecido adiposo e por macrófagos infiltrados, secretadas em grande quantidade em indivíduos obesos, como IL-6, TNF-α e IL-1β, também exercem efeitos na patogênese da RI, por estimularem as proteínas serinas quinases c-jun N-terminal kinase (JNK) e Ikappa kinase (IKK-β), que também induzem a fosforilação inibitória das IRS’s em resíduos de serina. Essas proteínas com atividade serina quinase também são estimuladas por meio da ligação de AGL circulantes, especialmente os AGS, ao receptor de membrana denominado TLR-4 (SHI et al., 2006), que funcionam como mediadores de vias

inflamatórias em tecidos metabólicos. A ativação desse receptor estimula a atividade das proteínas JNK e IKK-β, que além de elevar a produção de citocinas inflamatórias, também dá início ao processo descrito anteriormente de falha na sinalização insulínica, levando a um "círculo vicioso".

Alguns estudos já demonstraram o efeito do consumo de diferentes gorduras durante o período perinatal e a resposta glicêmica na prole. Siemelink et al. (2002) observaram que ratas alimentadas com dietas hiperlipídicas contendo AGS ou AGMI, durante o período perinatal, apresentaram proles com diferentes perfis metabólicos. Os filhotes alimentados com AGMI apresentaram aos 3 meses de idade melhor resposta glicêmica ao teste oral de tolerância à glicose, comparado a aqueles alimentados com AGS. Sardinha et al. (2013) constataram que o consumo de AGPI (especificamente de AG n-3) em uma dieta normolipídica durante os 12 primeiros dias de gestação de ratas foi capaz de diminuir os picos glicêmicos no TTIG e de reduzir a glicemia e insulinemia séricas da prole adulta quando comparado ao grupo que consumiu OP africana durante o mesmo período. Estudos clínicos de intervenção dietética também corroboram esses efeitos dos AG sobre o perfil glicêmico. No estudo multicêntrico KANWU, 162 voluntários sem doenças crônicas, dos sexos feminino e masculino, com idade entre 30 e 65 anos e com IMC variando entre 22-32 Kg/m^2, receberam orientação para consumo de dietas isocalóricas por 3 meses que diferiram apenas no padrão de gordura. Foi demonstrado que a substituição na dieta de AGS por AGMI foi capaz de promover uma melhora na sensibilidade à insulina dos voluntários (VESSBY et al., 2001). Em recente trabalho de revisão, também se sugere que a suplementação ou maior consumo dietético de AGPI em gestantes estaria associada com efeitos benéficos na sensibilidade à insulina de seus filhos, como por exemplo, pela diminuição das concentrações sérias de insulina do cordão umbilical (VOORTMAN et al., 2015). Em estudos observacionais, foi constatada associação inversa entre as concentrações séricas de ácido gama-linolênico no cordão umbilical e valores de HOMA-IR nas crianças aos 7 anos de idade (RUMP et al., 2002).

No presente trabalho, verificamos ainda que aos 100 dias de vida, o GPA apresentou maior acúmulo hepático de AGS (especialmente ácido esteárico) em relação aos grupos GC e GPH. É interessante constatar que essa maior incorporação de AGS no GPA se manteve desde o desmame até a idade adulta, mesmo com consumo de dieta controle após os 21 dias de vida. Quando avaliamos o índice de dessaturação (16:1/16:0), não observamos diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, a maior incorporação de AGS pelo GPA pode trazer implicações moleculares importantes.

É bem evidenciado pela literatura que o maior acúmulo de AGS no tecido hepático é relacionado com estresse no retículo endoplasmático, aumento da atividade da caspase-9 e apoptose do hepatócito tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*, atuando dessa maneira como um gatilho no desenvolvimento da DHGNA (ALKHOURI; DIXON; FELDSTEIN, 2009). Além disso, é constatado que os AGS são potentes ativadores do receptor de membrana TLR-4. A ativação desse receptor promove a estimulação da via NF-KB, a expressão de genes pró-inflamatórios e a consequente liberação de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF-α), induzindo um estado inflamatório hepático e aumentando o potencial evolutivo da DHGNA para estados inflamatórios fibrosantes, como a cirrose (MALHI; GORES, 2008). O TNF-α também induz a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e ao inchamento dessa organela, ocasionando apoptose de mitocôndrias de hepatócitos e contribuindo desta maneira para o agravo da DHGNA (HIGUCHI; PROSKE; YEH, 1998; BASARANOGLU; BASARANOGLU; SENTÜRK, 2013).

A literatura demonstra que a gordura abdominal é uma importante fonte de AGL, pela maior taxa de lipólise nesse tecido. A maior deposição de AGL pelos hepatócitos na forma de moléculas de TG´s também colabora para a progressão da DHGNA. Desta maneira, embora não tenha sido avaliado a presença de esteatose por experimentos adequados (histologia, estereologia, morfometria, ressonância magnética) é possível supor que o grupo que consumiu óleo de palma africana durante a gestação e lactação esteja mais suscetível ao desenvolvimento dessa desordem quando adultos pelos fatores citados anteriormente (maior incorporação de AGS no fígado e maior adiposidade visceral). Seria interessante dessa maneira, a continuidade dessas análises em experimentos futuros.

Na disfunção mitocondrial hepática, a cadeia transportadora de elétrons funciona de maneira alterada, contribuindo para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fosforilação oxidativa. O excesso de EROs pode causar mutações no DNAmit, aumentar a produção de produtos da peroxidação lipídica e levar à menor capacidade de β-oxidação, que favorece o acúmulo de AG’s na forma de TG’s e formação de pequenas gotículas de gordura no citosol dos hepatócitos (WEY et al., 2008). Por isso, buscamos avaliar a funcionalidade das mitocôndrias hepáticas na idade adulta, caracterizando individualmente os complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons quanto ao consumo de oxigênio frente à diferentes substratos, e quanto à produção de peróxido de hidrogênio.

Na análise da função mitocondrial hepática pela avaliação do consumo de O_2, utilizando PMG e Succinato como substratos para os complexos I e II, respectivamente, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros calculados. Buscamos

avaliar outro parâmetro de adaptação mitocondrial, a produção de H_2O_2, onde nesta organela cerca de 2% a 5% de todo o oxigênio consumido é desviado para a produção de EROs. Novamente, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Embora a incorporação de AGS (predominantemente ácido esteárico) no fígado tenha sido maior no GPA em relação aos outros dois grupos, essa diferenciação no perfil de AG não interferiu na capacidade funcional da mitocôndria. Estudos vêm demonstrando que os efeitos do ácido esteárico sobre a síntese de colesterol e aumento de LDL-c são neutros, quando comparado a outros ácidos graxos saturados que provocam maiores distúrbios no metabolismo de lipídios, como o palmítico, láurico e mirístico (MICHA; MOZAFFARIAN, 2010). É possível que esse efeito se reflita na ausência de distúrbios à nível mitocondrial, embora sejam necessários mais estudos para esclarecer essa questão.

Apesar dos efeitos sobre a adiposidade, incorporação de AG e picos glicêmicos terem sidos modulados negativamente no grupo GPA, concluímos que nesse modelo experimental, o consumo de dietas normolipídicas durante o período perinatal contendo óleo de soja, OP africana ou hibrida, não foi capaz de afetar a capacidade respiratória, tampouco a produção de peróxido de hidrogênio no tecido hepático na idade adulta. Na literatura, poucos estudos verificaram a influência da qualidade lipídica em dietas normolipídicas sobre a função mitocondrial hepática. De Velasco et al. (2017) verificaram que em modelo experimental de programação, os animais que consumiram gordura *trans* e interesterificada durante a gestação e lactação tiveram quando adultos a bioenergética mitocondrial hepática afetada em pontos específicos, quando comparado aos animais que consumiram óleo de palma e óleo de soja durante o mesmo período. O grupo que consumiu gordura *trans* obteve parâmetros respiratórios mitocondriais significativamente menores em relação aos demais grupos, enquanto o grupo que consumiu gordura interesterificada obteve produção de peróxido de hidrogênio significativamente maior na adição de succinato, quando comparado ao grupo controle (óleo de soja). Também em modelos experimentais, foi demonstrado que o consumo de dieta hiperlipídica durante o período perinatal promove disfunção mitocondrial hepática na prole, com alteração da atividade da cadeia respiratória de elétrons nos complexos I, II, III e IV, diminuição do conteúdo de enzimas antioxidantes e declínio do DNA mitocondrial (BRUCE et al., 2009; ZHANG et al., 2011; ALFARADHI et al., 2014) Estes achados foram fortemente associados com a ocorrência de lipotoxicidade hepática, DHGNA, RI, e aumento de adiposidade dos filhotes na idade adulta.

Como limitações do presente trabalho, destacamos a ausência de dosagem sérica de glicose e insulina para o cálculo do HOMA-IR, além da dosagem sérica e em tecidos de

citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF-α. O cálculo do HOMA-IR seria importante para esclarecer de forma mais robusta a homeostase glicêmica da prole adulta, já que demonstramos que o GPA teve uma tendência de apresentar a resposta glicêmica mais elevada no TTIG. A dosagem de citocinas inflamatórias no tecido adiposo, hepático e no plasma poderia fornecer dados adicionais acerca de mecanismos de sinalização insulínica e perfil inflamatório dos animais, que por sua vez, está diretamente relacionado com a adiposidade. Também ressaltamos a ausência de análise do conteúdo total de gordura hepática da prole. Esta análise seria interessante para corroborar a tendência do GPA em apresentar esteatose, por conta da maior adiposidade visceral desses animais, e estabelecer possíveis relações entre a maior incorporação de AGS hepático e o conteúdo total de gordura nesse tecido.

Nesse estudo evidenciamos de maneira inédita os efeitos do consumo de OP híbrida em um protocolo experimental de programação metabólica, promovendo, portanto, maiores esclarecimentos acerca do papel dos lipídios dietéticos em fases críticas do desenvolvimento. Em trabalhos clínicos, é possível constatar que a suplementação à curto prazo dessa fonte lipídica é capaz de modular respostas metabólicas favoráveis, semelhantes à suplementação com azeite de oliva (LUCCI et al., 2016; PACETTI et al., 2016; OJEDA et al., 2016). Ressaltamos, contudo, que são necessários maiores estudos que demonstrem os efeitos do consumo de OP híbrida sobre a saúde, levando assim, a evidências mais claras sobre a sua ingestão e repercussão sobre o metabolismo.

8.0 Conclusão

Analisando os dados em conjunto, verificamos que diferentes padrões de ingestão lipídica são capazes de interferir permanentemente no desenvolvimento metabólico da prole, com os AG's atuando como importantes nutrientes regulatórios no campo na nutrigenômica.

Assim concluímos que:

1. O consumo materno de grandes quantidades de AGS, como o palmítico, apesar de não ter modificado a massa corporal da prole, levou a maior acúmulo de adiposidade visceral e subcutânea, quando comparado as proles cujas mães consumiram dieta contendo menor teor de AGS e maior proporção de AGMI e AGPI.

2. O GPA apresentou o maior valor no índice de dessaturação 16:1/16:0 no tecido adiposo epididimal. Valores aumentados desse índice sugerem forte associação com distúrbios metabólicos, como alta lipogênese e resistência à insulina.

3. A prole exposta ao consumo de OP africana durante o período perinatal apresentou de forma permanente, desde o desmame até a idade adulta, uma maior incorporação de AGS no tecido hepático, quando comparado ao GC e GPH, sugerindo maior predisposição para a ocorrência de DHGNA.

4. No modelo experimental de programação metabólica utilizado no presente trabalho, o consumo pelas mães de dietas normolipídicas contendo óleo de soja, OP africana ou OP híbrida não foi capaz de afetar a capacidade funcional das mitocôndrias hepáticas na prole adulta.

5. A substituição do OP africana pelo OP híbrida na indústria de alimentos pode ser benéfica na prevenção de distúrbios metabólicos associados à alta ingestão de AGS.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n. 360 de 23 de dezembro de 2003: Aprova Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União, 2003.

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, 2006.

ALFARADHI, M.Z. et al. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.307, n.1, p.2634, 2014.

ALKHOURI, N.; DIXON, L.J.; FELDSTEIN, A.E. Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, v.3, n.4, p.445-451, 2010.

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

AMRI, E.Z.; AILHAUD, G.; GRIMALDI, P.A. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. J Lipid Res, v.35, n.5, p.930-937, 1994.

ASHINO, N.G. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. J Nutr Biochem, v.23, n.4, p.341-348, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE SEMENTES (ABRATES). Produtores poderão plantar sementes do híbrido de dendê BRS Manicoré. Disponível em: <http://www.abrates.org.br/imprensa/noticias/103-produtores-poderao-plantar-sementes-do-hibrido-de-dende-brs-manicore-para-dende> Acesso em: 08 de janeiro de 2016.

AUGER, C. et al. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. Front Cell Dev Biol, v.3, p.40, 2015.

BARKER, D.J. The fetal and infant origins of disease. Eur J Clin Invest, v.25, n.7, p.457-463, 1995.

BASARANOGLU, M.; BASARANOGLU, G.; SENTÜRK, H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". World J Gastroenterol, v.19, n.8, p.1158-1165, 2013.

BELOSLUDTSEV, K.N. et al. Ca(2+)-dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study. Biochim Biophys Acta, v.1838, n.10, p.2600-2606, 2014.

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.

BISPO, K.P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. J Physiol Sci, v.65, n.1, p.131-138, 2015.

BOARI, A.J. Estudos Realizados Sobre o Amarelecimento Fatal do Dendezeiro (Elaeis guineensis Jacq.) no Brasil. Belém, PA. Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 66p.

BOOTMAN, M.D.; HOLMES, A.M.; RODERICK, H.L. Calcium Signalling and Regulation of Cell Function. Els, 2006.

BRADLEY, R.L.; FISHER, F.F.; MARATOS-FLIER, E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. Obesity (Silver Spring), v.16, n.5, p.938-944, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Decreto n° 7172, de 7 de maio de 2010. Aprova o zoneamento agroecológico da cultura da palma de óleo e dispõe sobre o estabelecimento pelo Conselho Monetário Nacional de normas referentes às operações de financiamento ao segmento da palma de óleo, nos termos do zoneamento. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de maio de 2010.

BRASIL.VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO (VIGITEL) Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUCE, K.D. et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. Hepatology, v.50, n.6, p.17961808, 2009.

CADENA, T. et al. Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of Elaeis guineensis, Elaeis oleifera, and the interspecific hybrid O×G (E. oleifera × E. guineensis). J Sci Food Agric, v.93, n.3, p.674-680, 2013.

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

CHEN, B.K. et al. Multi-Country analysis of palm oil consumption and cardiovascular disease mortality for countries at different stages of economic development: 1980-1997. Global Health, v.16, n.1, p.7-45, 2011.

CHINNERY, P.F. et al. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? Lancet, v.360, n.9342, p.1323-1325, 2002.

CIVITARESE, A.E.; SMITH, S.R.; RAVUSSIN, E. Diet, energy metabolism and mitochondrial biogenesis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.10, n.6, p.679-687, 2007.

COSTA, R.A. et al. The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species. J Bioenerg Biomembr, v.43, n.1, p.25-29, 2011.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R. BRS Manicoré: Híbrido Interespecífico entre o Caiaué e o Dendezeiro Africano Recomendado para Áreas de Incidência de Amarelecimento-Fatal. Manaus, AM. Comunicado Técnico, 2010.

CURI, R. et al. Entendendo a gordura – os ácidos graxos. 1ª edição. São Paulo:Editora Manole, 2001. 598p.

DAS, U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. Biotechnol J, v.1, n.4, p.420-439, 2006.

DAUMERIE, C.M.; WOOLLETT, L.A.; DIETSCHY, J.M. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.22, p.10797-10801, 1992.

DE VELASCO, P.C. et al. Maternal intake of trans -unsaturated or interesterified fatty acids during pregnancy and lactation modifies mitochondrial bioenergetics in the liver of adult offspring in mice. Br J Nutr, v.118, n.1, p.41-52, 2017.

DESAI, M. et al. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. Am J Obstet Gynecol, v.211, n.3, p. 237.e1-237.e13, 2014.

DOS SANTOS, B. et al. Effects of a Diet Enriched with Polyunsaturated, Saturated, or Trans Fatty Acids on Cytokine Content in the Liver, White Adipose Tissue, and Skeletal Muscle of Adult Mice. Mediators Inflamm, v.1, n.1, 594958, 2013

DUCHEN, M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. Mol Aspects Med, v.25, n.4, p.365-451, 2004.

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.

FERNANDEZ, M.L.; WEST, K.L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. J Nutr, v.135, n.9, p.2075-2078, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT: production oilcrops. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E > Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; SCORRANO, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured filroblasts. Nature protocols, v.2, n.2, p.287-295; 2007.

GAMBERT, S.; RICQUIER, D. Mitochondrial thermogenesis and obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.10, n.6, p.664-670, 2007.

GENOVA, M.L. et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. Ann N Y Acad Sci, v.1011, n.1, p.86-100, 2004.

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

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BEEDLE, A.S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. Am J Hum Biol, v.19, n.1, p.1-19, 2007.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal programming and adult health. Public Health Nutr, v.4, n.2B, p.611-624, 2001.

GRIFFITHS, P.S. et al. Maternal high-fat hypercaloric diet during pregnancy results in persistent metabolic and respiratory abnormalities in offspring. Pediatr Res, v.79, n.2, p.278-286, 2016.

HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. Br J Nutr, v.104, s.1:21-25, 2010.

HAYES, K.C.; PRONCZUK, A. Replacing trans fat: the argument for palm oil with a cautionary note on interesterification. J Am Coll Nutr, v.23, n.3, p.253s-284s, 2010.

HERRERA, E. et al. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. Horm Res, v.3, n.1, p.59-64, 2006.

HERRERA, E.; ORTEGA-SENOVILLA, H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. Curr Pharm Biotechnol, v.15, n.1, p.24-31, 2014.

HIGUCHI, M.; PROSKE, R.J.; YEH, E.T. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. Oncogene, v.17, n.19, p.2515-2524, 1998.

HIRABARA, S.M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. J Cell Physiol, v.222, n.1, p.187194, 2010.

HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature, v.420, n.6913, p.333-336, 2002.

HODSON, L. et al. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. Eur J Clin Nutr, v.5, n.10, p.908-915, 2001.

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, 2009.

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, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009: Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE COLONIZAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA (INCRA). Governo Federal lança Programa de Produção Sustentável de Óleo de Palma. Disponível em: < http://www.incra.gov.br/governo-federal-lanca-programa-de-producao-sustentavel-de-oleo-de-palma>. Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

JONES, H.N. et al. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. FASEB J, v.21, n.1, p.271-278, 2009.

JOSS-MOORE, L.A.; LANE, R.H. Epigenetics and the developmental origins of disease: the key to unlocking the door of personalized medicine. Epigenomics, v.4, n.5, p.471-473, 2012.

JUNG, U.J.; CHOI, M.S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci, v.15, n.4, p.6184-6223, 2014.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature, v.444, n.7121, p.840-846, 2006.

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 (Lond), v.4, n.1, p.16, 2001.

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, 2005.

KIM, J.; WEI, Y.; SOWERS, J.R. Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. Circ Res, v.102, n.4, p.401-414, 2008.

KIRKINEZOS, I.G.; MORAES, C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin Cell Dev Biol, v.12, n.6, p.449-457, 2001.

KOCHIKUZHYIL, B.M.; DEVI, K.; FATTEPUR, S.R. Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. Indian J Pharmacol, v.42, n.3, p.142-145, 2010.

KOLETZKO, B. et al. Physiological aspects of human milk lipids. Early Hum Dev, v.65, p.s3-s18, 2001.

KONG, J.Y.; RABKIN, S.W. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. Biochim Biophys Acta, v.1485, n.1, p.45-55, 2000.

KRISHNAN, S.; COOPER, J.A. Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. Eur J Nutr, v.53, n.3, p.691-710, 2014.

LAUGERETTE, F. et al. Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.302, n.3, p.e374-386, 2012.

LEE, J.Y.; CARR, T.P. Dietary fatty acids regulate acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. J Nutr, v.134, n.12, p.3239-3244, 2004.

LENAZ, G. et al. Complex I function in mitochondrial supercomplexes. Biochim Biophys Acta, v.1857, n.7, p.991-1000, 2016.

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, 2007.

LISBOA, P.C. et al. Postnatal overnutrition programs the thyroid hormone metabolism and function in adulthood. J Endocrinol, v.226, n.3, p.219-226, 2015.

LOPES, R.; CUNHA, R.N.V.; RESENDE, M.D.V. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. Pesq agropec bras, v.47, n.10, p.1496-1503, 2012.

LOWRY O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, p.265-75, 1951.

LUCCI, P. et al. Palm oil and cardiovascular disease: a randomized trial of the effects of hybrid palm oil supplementation on human plasma lipid patterns. Food Funct, v.7, n.1, p.347-354, 2016.

LUCCI, P. et al. Phytonutrient concentration and unsaturation of glycerides predict optimal harvest time for Elaeis oleifera × E. guineensis palm oil hybrids. Eur J Lipid Sci Tech, v.117, n.7, p.1027-1036, 2015.

MAGRI, T.P.R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. Clin Nutr, v.34, n.5, p.904-910, 2015.

MALHI, H.; GORES, G.J. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis, v.28, n.4, p.360-369, 2008.

MANCICI, A. et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. Molecules, v.20, n.9, p.17339-17361, 2015.

MANICKAM, E.; SINCLAIR, A.J.; CAMERON-SMITH D.Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. Lipids Health Dis, v.9, p.57, 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, 2006.

MASLOVA, E. et al. Maternal intake of fat in pregnancy and offspring metabolic health – A prospective study with 20 years of follow-up. Clin Nutr, v.35, n.2, p.475-483, 2016.

MENNITTI, L.V. et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. J Nutr Biochem, v.26, n.2, p.99-111, 2015.

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

MISAN, V. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat during the perinatal period produces changes in the brain fatty acids profile and increases leukocyte-endothelial interactions in the cerebral microcirculation from the male offspring in adult life. Brain Res, v.1616, p.123-133, 2015.

MOZZON, M. et al. Crude palm oil from interspecific hybrid Elaeis oleifera×Elaeis guineensis: fatty acid regiodistribution and molecular species of glycerides. Food Chem, v.141, n.1, p.245-252, 2013.

MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. Prog Lipid Res, v.44, n.6, p.430-448, 2005.

NEWSHOLME, P. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. J Physiol, v.583 (Pt 1), p.9-24, 2007.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet, v.384, n.9945, p.766 - 781, 2014.

NTAMBI, J.M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res, v.43, n.2, p.91-104, 2004.

OJEDA, M. et al. Hybrid palm oil (Elaeis oleifera × Elaeis guineensis) supplementation improves plasma antioxidant capacity in humans. Eur J Lip Sci Technol, v.119, n.2, 2016.

ORRENIUS, S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. Drug Metab Rev, v.39, n.2-3, p.443-455, 2007.

PACETTI, D. et al. Changes in the Fatty Acid Profile and Phospholipid Molecular Species Composition of Human Erythrocyte Membranes after Hybrid Palm and Extra Virgin Olive Oil Supplementation. J. Agric. Food Chem, v.64, n.1, p.5499-5507, 2016.

PERINI, J.A.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, 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, 2000.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry. OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibres from small biopisies of human muscle. Methods Mol Biol, v.810, p.25-58; 2012.

POUDYAL, H.; BROWN, L.Stearoyl-CoA desaturase: a vital checkpoint in the development and progression of obesity. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, v.11, n.3, p.217-231, 2011.

PRIEGO, T. et al. Maternal Dietary Fat Affects Milk Fatty Acid Profile and Impacts on Weight Gain and Thermogenic Capacity of Suckling Rats. Lipids, v.48, n.5, p.481-495, 2013.

RAMALHO-FILHO, A. et al. Zoneamento Agroecológico, Produção e Manejo para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. Rio de Janeiro, RJ. Embrapa solos, 2010. 266p.

RATNAYAKE, W.M.; GALLI, C.Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. Ann Nutr Metab, v.55, n.1-3, p.8-43, 2009.

RAVELLI, G.P.; STEIN, Z.A.; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. N Engl J Med, v.295, n.7, p.349-353, 1976.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet, v.2, n.1, p.21-32, 2001.

REN, J.; CHUNG SH. Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode ofaction through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitricoxide synthase gene expression via NF-kB and mitogen-activated protein kinasepathways. J Agric Food Chem, v.55, n.13, p.5073–5080, 2007

RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr, v.23, n.4, p.447-456, 2004.

RIOS, S.A. et al. Recursos genéticos de palma de óleo (Elaeis guineenses Jacq.) e Caiaué (Elaeis oleífera (H.B.K.) Cortés). Manaus, AM. Embrapa Amazônia Ocidental, 2012. 39p.

RISÉRUS, U.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. Prog Lipid Res, v.48, n.1, p.44-51, 2009.

RODRÍGUEZ, J.C. et al. Effects of the Fruit Ripening Stage on Antioxidant Capacity, Total Phenolics, and Polyphenolic Composition of Crude Palm Oil from Interspecific Hybrid Elaeis oleifera × Elaeis guineensis. J Agric Food Chem., v.64, n.4, p.852-859, 2016.

RUMP, P. et al. Components of the insulin resistance syndrome in seven-year-old children: relations with birth weight and the polyunsaturated fatty acid content of umbilical cord plasma phospholipids. Diabetologia, v.45, n.1, p.349-355, 2002.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.

SANTOS, R.D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. Arq Bras Card, v.100, n.1, p.1-40, 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, 2013.

SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D.J.; SANZ, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. Front Physiol, v.27, n.8, p.428, 2017.

SHERRATT, H.S. Mitochondria: structure and function. Rev Neurol (Paris), v.147, n.6-7, p.417-430, 1991.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. J Clin Invest, v.116, n.11, p.3015-3025, 2006.

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, 2002.

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, 2005.

SILVA, M.S. et al. Increased exposure to sodium during pregnancy and lactation changes basal and induced behavioral and neuroendocrine responses in adult male offspring. Physiol Rep, v.5, n.6, p.e13210, 2017.

SIVITZ, W.I.; YOREK, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal, v.12, n.4, p.537-577, 2011.

SOSA-CASTILLO, E. et al. Genomics of lactation: Role of nutrigenomics and nutrigenetics in the fatty acid composition of human milk. Br J Nutr, v.118, n.3, p.161-168, 2017.

SOUZA, A.S. et al. Effects of a normolipidic diet containing trans fatty acids during perinatal period on the growth, hippocampus fatty acid profile, and memory of young rats according to sex. Nutrition, v.28, n.4, p.458-464, 2012.

STEPIEN, K.M. et al. Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders. J Clin Med, v.19, n.6, p.E71, 2017.

SUN, Y. et al. Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials. J Nutr, v.145, n.7, p.1549-1558, 2015.

SZYMAŃSKI, J. et al. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. Int J Mol Sci, v.18, n.7, p.E1576, 2017.

TSUDUKI, T. et al. High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), v.59, n.5, p.384-392, 2013.

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, n.1, p.54-62, 2006.

VESSBY, B. et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. Diabetologia, v.44, n.3, p.312-319, 2001.

VOORTMAN, T. et al. Effects of polyunsaturated fatty acid intake and status during pregnancy, lactation, and early childhood on cardiometabolic health: A systematic review. Prog Lipid Res, v.59, p.67-87, 2015.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev, v.21, n.6, p.697-738, 2000.

WANG, T.Y. et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. Eur J Clin Invest, v.43, n.11, p.1203-1223, 2013.

WARENSJÖ, E. et al. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. Lipids Health Dis, v.8, n.1, p.37, 2009.

WEI, Y.H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. Proc Soc Exp Biol Med, v.217, n.1, p.53-63, 1998.

WHITELAW, N.C.; WHITELAW, E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. Hum Mol Genet, n.2, p.131-137, 2006.

WONG, R.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. Mit Bio Met Prot, v.810, p.235-242, 2012.

XAVIER, H.T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Card, v.101, n.4, p.1-36, 2013.

YADAV, A. et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. Clin Chim Acta, v.417, p.80-84, 2013.

YANG, K.F. et al. Maternal high-fat diet programs Wnt genes through histone modification in the liver of neonatal rats. J Mol Endocrino, v.49, n.2, p.107–1, 2012.

YANG, Z.; HUFFMAN, S.L. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. Matern Child Nutr, v.9, n.1, p.105119, 2013.

ZALESIN, K.C. et al. Impact of obesity on cardiovascular disease. Med Clin North Am., v.95, n.5, p.919-937, 2011.

ZHANG, X. et al. A maternal high-fat diet represses the expression of antioxidant defense genes and induces the cellular senescence pathway in the liver of male offspring rats. J Nutr, v.141, n.7, p.12541259, 2011.

ANEXO A- Aprovação da comissão de ética com uso de animais (CEUA)

CCS UFRJ

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. [illegible] DE [illegible]
REG. [illegible]
ICB-U[illegible]

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