

AValiação DOS PARâMETROS BIOQUÍMICOS DA PROLE DE MÃES SUBMETIDAS À DIETA HIPERLIPÍDICA SUPLEMENTADA COM ÔMEGA-3 DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Aline Maria Nunes de Lira Gomes Bloise (1); Debora Santos Alves (1); Laura Mata de Lima Silva (2); Reginaldo Luis da Rocha Junior (3); João Henrique da Costa Silva (4)

*Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica- Centro Acadêmico de Vitória- Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.
joao.hcsilva@ufpe.br*

Resumo: É observado com a transição nutricional, a prevalência das doenças crônicas não transmissíveis associadas à alimentação hipercalórica, gorduras trans, ácidos graxos saturados e ao consumo exacerbado de açúcar e sal, falta de atividade física e práticas não saudáveis relacionadas ao estilo de vida ocidental. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica materna sobre os parâmetros bioquímicos na prole de machos e se os mesmos são atenuados com a suplementação de ômega-3. Depois da confirmação da prenhez, ratas *Wistar* foram separadas e alocadas em três grupos: controle (dieta normolipídica, 19% de lipídios), HL (dieta hiperlipídica, 33% de lipídios) e HLW3 (dieta hiperlipídica, 33% de lipídios, suplementada com ômega-3) durante o período de gestação e lactação. Aos 21 dias, os ratos machos foram submetidos ao jejum para análises bioquímicas. Os resultados foram expressos em média \pm epm, com nível de significância $p < 0,05$. O grupo HLW3 apresentou menores valores de triglicerídeos e AST comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O valor de ALT foi elevado na prole HL em comparação ao controle e HLW3 ($p < 0,05$). Nossos achados sugerem que a suplementação com ômega-3, é capaz de atenuar algumas alterações bioquímicas, às quais estão presentes nas doenças cardiometabólicas.

Palavras-chave:

Dieta rica em gordura, hiperlipidemia, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, ácido α -linolênico.

Introdução

É observado com a transição nutricional, a prevalência principalmente entre a população madura e os idosos, das doenças crônicas não transmissíveis: diabetes mellitus, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, comorbidades associadas à alimentação hipercalórica, gorduras trans, ácidos graxos saturados, ao consumo exacerbado do açúcar e sal, álcool, fumo, falta de atividade física e outras práticas não saudáveis relacionadas ao estilo de vida ocidental (BATISTA FILHO; BATISTA, 2010). A Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD) destacou a relação entre as fases periconceptual, fetal e iniciais da vida e o desenvolvimento de obesidade e doenças cardiometabólicas na vida adulta (VICKERS, 2014).

Nos animais alimentados com dieta rica em gordura têm se observado o desenvolvimento de dislipidemia (TG elevado e colesterol total e / ou frações). Na prole de ratas que foram submetidas à dieta hiperlipídica durante gestação e lactação, foi observado alterações

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

metabólicas, tais como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e diminuição de HDL (lipoproteína de alta densidade) (VIDAL et al., 2016).

O alto consumo de dieta materna rica em gordura aumenta os níveis de ácidos graxos livres circulantes e induz a ativação de vias inflamatórias, aumentando o risco de inflamação crônica na prole (GRUBER *et al.*, 2015). É evidenciado que marcadores circulantes de inflamação sistêmica, tais como proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR-as), fator de necrose tumoral (TNF- α) e algumas interleucinas (IL-6, IL-1) são elevados em indivíduos com hiperlipidemia e se correlacionam com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (MICALEFF; GARG, 2008).

O consumo de uma dieta enriquecida com ômega-3 durante o período perinatal pelas mães foi associado com a redução da adiposidade e melhora a sensibilidade à insulina nos descendentes (KOROTKOVA et al, 2002; SARDINHA et al., 2013). Durante a gestação, o ômega-3 influencia a diminuição da produção e/ou supressão de citocinas inflamatórias, conhecendo-se que o mesmo grupo de enzimas são requeridas para a síntese de moléculas pró-inflamatórias a partir do ômega-6 e anti-inflamatórias a partir do ômega-3 (AKERELE;CHEEMA, 2016).

Estudos têm evidenciado que a ingestão de ácidos graxos ômega-3 tem ação anti-inflamatória (INOUE, 2017), reduzindo a síntese de derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E2, tromboxano A2, prostaciclina e leucotrieno B4 (KHATIB, 2016) e de mediadores inflamatórios de plasma circulantes: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e PCR (OLLIVER et al., 2016).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa podem regular o metabolismo de lipídios através de sua ligação à PPARs (receptor ativado por proliferador de peroxissomas), dentre eles o PPAR- α , melhorando a expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (SONI et al., 2015). Os PPARs regulam a expressão de genes críticos para o metabolismo de lipídios, a oxidação dos ácidos graxos, o desenvolvimento dos adipócitos e metabolismo das lipoproteínas. A expressão de PPAR por meio dos PUFAs é acompanhada de supressão de SREBP (proteína reguladora de ligação ao elemento esterol), inibindo a lipogênese com redução na expressão de ácido graxo sintetase (*fatty acid synthase*, FAS) e acetil CoA carboxilase (*acetyl CoA carboxylase*, ACC), e conseqüentemente diminuição nos

níveis séricos de ácidos graxos, triacilgliceróis e VLDL (KHAIRE et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar na prole de machos de ratas que foram submetidas à dieta hiperlipídica e hiperlipídica suplementada com ômega-3 durante a gestação e lactação, os efeitos sobre o perfil bioquímico logo após o desmame (aos 21 dias de vida). Dessa forma, este trabalho torna-se importante pela necessidade de investigar se a suplementação de ômega 3 associada à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, pode atenuar na prole os danos ocasionados pela dieta hiperlipídica sobre o perfil bioquímico, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na vida adulta. Pode, assim, nosso trabalho sugerir métodos não farmacológicos para a prevenção, atenuação ou reversão de quadros patológicos ocasionados pelo excesso do consumo de lipídios na dieta.

Metodologia

Animais

No primeiro dia de gestação até o 21º dia de lactação, as ratas albinas da linhagem *Wistar* primíparas (n=13) foram colocadas em gaiolas individuais e foram alocadas com água e ração *ad libitum*: grupo dieta controle, hiperlipídica (HL) e hiperlipídica suplementada com ômega 3 (HLW3). A determinação da prenhez foi realizada a partir da observação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. A temperatura e a umidade foram mantidas dentro dos limites de 23-24 °C e 55% a 65%, respectivamente, com 12h de claro/escuro.

Manipulação nutricional

Para a manipulação nutricional foram utilizadas as seguintes dietas: grupo Controle recebeu uma dieta padrão cuja composição estava de acordo com o preconizado pelo *American Institute of Nutrition* para formulação da dieta experimental AIN-93 (REEVES et al., 1993), com 18-19% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 61% dos carboidratos; o grupo HL recebeu uma dieta hiperlipídica adaptada de Ferro Cavalcante et al. (2013), com 33% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 47% dos carboidratos; e o grupo HLW3 recebeu uma dieta hiperlipídica suplementada com ômega 3 com 33% da energia proveniente das gorduras, 20% das proteínas e 47% dos carboidratos. A dieta padrão fornece em torno de 3.5 quilocalorias por grama e as dietas hiperlipídicas 4,5 quilocalorias por grama. Além disso, as dietas hiperlipídicas apresentam maior teor de ácidos graxos saturados. A prole das ratas foi reduzida a oito filhotes por ninhada.

Análise bioquímica do soro

Os ratos machos aos 21 dias de vida foram submetidos ao jejum de 12 horas (overnight) e, em seguida, anestesiados com isoflurano inalatório para coleta de amostras de sangue, através do rompimento do plexo retro orbital. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3500 RPM por 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi transferido para um tubo Eppendorf e armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas por meio do equipamento Analisador Bioquímico Automático (versão 4). Foram analisados a glicemia de jejum, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), a razão AST/ALT e colesterol total.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média±epm. A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste *ANOVA one-way* (tendo como fator a dieta) e pós teste de *bonferroni* ou *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunns* quando variáveis não-paramétricas. Foi utilizado o *GraphPad Prism*, versão 6, para as análises. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Aos 21 dias de vida (tabela 1), não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de albumina (Controle: $4,01 \pm 0,03$, $n=17$, HL: $4,15 \pm 0,06$, $n=12$, HLW3: $4,11 \pm 0,02$ g/dL, $n=17$; $p=0,05$), proteínas totais (Controle: $5,18 \pm 0,02$, $n=17$, HL: $5,16 \pm 0,12$, $n=8$, HLW3: $5,25 \pm 0,014$ g/dL, $n=14$; $p=0,667$) e colesterol total (Controle: $116 \pm 5,60$, $n=17$, HL: $114,9 \pm 4,51$, $n=12$, HLW3: $116,8 \pm 2,73$ mg/dL, $n=16$; $p=0,521$) entre os grupos. Os animais que receberam dieta hiperlipídica suplementada com HLW3 apresentaram redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Controle: $153,8 \pm 10,57$, $n=17$, HL: $128 \pm 10,13$, $n=12$, HLW3: $112,6 \pm 6,03$ mg/dL, $n=17$; $p=0,005$), transaminase hepática AST (Controle: $173,4 \pm 10,09$, $n=15$, HL: $137,9 \pm 15,39$, $n=7$, HLW3: $132,8 \pm 5,21$ U/L, $n=15$; $p=0,003$), na razão AST/ALT (Controle: $10,59 \pm 0,93$, $n=15$, HL: $5,96 \pm 0,97$, $n=7$, HLW3: $7,918 \pm 0,46$ U/L, $n=15$; $p=0,0028$) bem como um aumento dos níveis de glicose de jejum (Controle: $96,7 \pm 4,42$, $n=17$, HL: $110,5 \pm 4,72$, $n=12$, HLW3: $118,4 \pm 1,98$ mg/dL, $n=15$; $p=0,0007$) quando comparados ao controle, não sendo encontrada diferença em relação ao grupo HL. No entanto, apenas o grupo HL apresentou aumento dos níveis séricos de

transaminase hepática ALT (Controle: 16,29±0,86, n=17, HL: 28,37±2,77, n=12, HLW3: 17,33±0,88 U/L, n=15; p<0,0001) em relação aos demais grupos.

Tabela 1. Perfil bioquímico em jejum aos 21 dias de vida da prole de machos cujas mães foram submetidas às dietas controle, hiperlipídica e hiperlipídica suplementada com ômega-3 durante a gestação e lactação.

Idade/ Variáveis	Grupo			P
	Controle	HL	HLW3	
21 dias de vida				
Albumina (g/dL)	4,01±0,03	4,15 ±0,06	4,11± 0,02 ^S	0,0503
Proteínas totais (g/dL)	5,18 ±0,02 ^S	5,16± 0,12	5,25± 0,04	0,6679
Colesterol (mg/dL)	116,0 ± 5,6 ^S	114,9 ±4,5	116,8 ±2,7	0,5217
Triglicerídeos (mg/dL)	153,8 ±10,6 ^a	128,0 ±10,1 ^{a,b}	112,6 ±6,03 ^b	0,0058**
VLDL (mg/dL)	30,75±2,11 ^a	25,61±2,02 ^{a,b}	22,53±1,20 ^b	0,0058**
Glicose (mg/dL)	96,7 ±4,42 ^a	110,5 ±4,72 ^{a,b}	118,4 ±1,98 ^b	0,0007**
ALT	16,29 ±0,86 ^a	28,37 ±2,77 ^b	17,33 ±0,88 ^{a,c}	<0,0001***
AST	173,4 ±10,1 ^a	137,9 ±15,4 ^{sb}	132,8±5,2 ^{b,c}	0,0037**
AST/ALT	10,59± 0,93 ^a	5,96± 0,97 ^b	7,91± 0,46 ^{b,c}	0,0028**

Os ratos foram submetidos durante a gestação e lactação a uma dieta controle (18% de lipídios) ou dieta hiperlipídica, HL, com 33% de lipídios ou hiperlipídica suplementada com ômega-3 com 3,5% de óleo de linhaça, HLW3, de acordo com o grupo experimental. Os valores foram expressos em média ± EPM. As médias com letras iguais na mesma linha mostram que não houve diferença estatística após a aplicação de ANOVA One-Way e pós-teste de *Bonferroni* quando os valores das variáveis apresentaram distribuição normal ou Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de *Dunns* quando os valores das variáveis não apresentaram distribuição normal, os quais estão indicados pelo símbolo \$ (* p< 0,05, ** p< 0,01 e *** p<0,0001: N= 12-17).

A redução na prole das mães HLW3 dos níveis de triglicérides em comparação ao grupo controle pode ser justificada por estudos que demonstram a ação dos ácidos graxos (ômega-3) atuando na redução dos níveis de triglicerídeos, colesterol total e fração de LDL-c (ZULKAFI; WADDELL; MARK, 2013). Visto que a hipertrigliceridemia eleva o risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose. Alguns mecanismos dos efeitos do ômega-3 são sugeridos para explicar sua ação hipolipemiante, como redução da lipogênese hepática por inibição da SREBP (proteína reguladora de ligação ao elemento esterol) e diminuição na expressão de enzimas que atuam na síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicerídeos; inibição de enzimas chaves na produção hepática de triglicérido como a ácido fosfatídico fosfatase e diacilglicerol aciltransferase e, aumento na expressão de lipase lipoproteica para captação de triglicerídeos a partir de lipoproteínas circulantes: VLDL e quilomícrons (BACKES et al., 2016).

No entanto, a glicose em jejum aumentada nesses animais aos 21 dias, demonstra que mesmo com a suplementação de ômega-3 pode ser encontrado ainda um prejuízo no metabolismo da glicose causado pela dieta hiperlipídica (HUANG et al., 2017). A dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação pode levar a um quadro de hiperglicemia e intolerância à glicose, sem alteração morfológica do pâncreas. Mas o período de lactação possibilita às células beta uma capacidade compensatória e, as ilhotas podem ser remodeladas para corrigir insultos prévios. Foi verificado que animais expostos à dieta hiperlipídica durante a gestação puderam ter seu perfil glicêmico alterado após mudança para dieta com baixo teor de gorduras no período pós natal, sugerindo que as células beta são dinâmicas e a fase da vida interfere no turnover das mesmas (CERF; LOUW, 2014).

Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram níveis elevados de ALT e os que receberam dieta hiperlipídica suplementada com ômega-3 tiveram melhores níveis de transaminases. É observado que a ingestão de dieta hiperlipídica rica em gorduras saturadas aumenta a expressão gênica de Scd1 e Fads2 que sinalizam vias adipogênicas no fígado, ao contrário dos ácidos graxos ômega-3 (LEIKIN-FRENKEL et al., 2015), além disso pode induzir e/ou agravar lesão hepática com subsequente elevação nos níveis plasmáticos de transaminases (TAIN et al., 2017; KAI et al., 2017). O consumo de ômega 3 reduz os níveis de transaminases, essencialmente de ALT em indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (HE et al., 2016; YU; YUAN; WANG, 2017).

Conclusão

Desta forma, nossos achados sugerem que a suplementação com ômega-3 é capaz de atenuar algumas alterações bioquímicas, ALT e triglicerídeos plasmáticos, as quais estão presentes nas doenças cardiovasculares e metabólicas.

Referências

AKERELE, O.A.; CHEEMA, S.K. A balance of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, v. 30, p. 1-11, 2016.

BACKES, J. et al. The clinical relevance of omega 3 fatty acids in the management of

Hypertriglyceridemia. *Lipids in Health and Disease*, v. 15, n.118, 2016.

BATISTA FILHO, M.; BATISTA, L.V. Transição alimentar/nutricional ou mutação antropológica? *Cienc. Cult*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 26-30, 2010.

CERF, M.E; LOUW, J. Islet cell response to high fat programming in neonate, weanling and adolescent wistar rats. *J Pancreas*, v 15, n. 3, p. 228-236. 2014.

FERRO CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids*, v. 48, n.11, p. 1157-1168, 2013.

GRUBER, L. et al. Maternal High-fat Diet Accelerates Development of Crohn's Disease-like Ileitis in TNF DELTAARE/WT Offspring. *Inflamm.Bowel Dis*, v 21, p. 2016–2025. 2015.

HE, X-X.et al. Effectiveness of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE*, v. 11, n. 10. 2016.

HUANG,Y. et al. Maternal high-fat diet impairs glucose metabolism, β -cell function and proliferation in the second generation of offspring rats. *Nutrition & Metabolism*, v.14, n.67.2017.

INOUE, T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2017

KAI, M.et al.A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research* , v. 212, p. 22-32. 2017.

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

KHATIB, S. A. Title: Reducing the burden of obesity-associated cancers with anti-inflammatory long-chain omega-3 polyunsaturated

fatty acids. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2016.

KOLETZKO, B.; CETIN, I.; BRENNAN, T. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *British Journal of Nutrition*, p 1-5. 2007.

KOROTKOVA, M.; GABRIELSSON, B.; LONN, M.; HANSON, L.A.; STRANDVIK, B. Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to α -linolenic acid in the maternal diet. *Journal of Lipid Research*, v.43, p.1743-1749. 2002.

LEIKIN-FRENKEL, A. et al. Maternal Diet Enriched with α -Linolenic or Saturated Fatty Acids Differentially Regulates Gene Expression in the Liver of Mouse Offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.8, p.185-194. 2015.

MICALLEF, M. A.; GARG, M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*, v. 204, p. 476-482. 2008.

OLLIVER, M., et al. Erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with biomarkers of inflammation in older Australians. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, v. 5, p. 61-69. 2016.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FABEY, G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of The American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. American Institute of Nutrition. 1993.

SARDINHA, F.L.C.; FERNANDES, F.S.; CARMO, M.G.T.; HERRERA, E. Sex-dependent nutritional programming: fish oil intake during early pregnancy in rats reduces age-dependent insulin resistance in male, but not female, offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, v. 304, p. 313-320. 2013.

TAIN, Y.L. et al. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. *Nutrients*, v. 9, n. 357.2017.

VICKERS, M. H. Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. *Nutrients*, v. 6, p. 2165-2178. 2014.

VIDAL-SANTOS, R. et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*.p.1-10. 2016.

YU, L.; YUAN, M; WANG, L. The effect of omega-3 unsaturated fatty acids on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Pak J Med Sci*, v.33, n. 4, p; 1022-1028. 2017.