



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO SOBRE PARÂMETROS FÍSICOS,
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE
RATOS**

JOÃO PESSOA – PB

2020

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO SOBRE PARÂMETROS FÍSICOS,
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DA PROLE DE
RATOS**

JOÃO PESSOA – PB

2020

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO SOBRE PARÂMETROS
FÍSICOS, BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DA
PROLE DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

JOÃO PESSOA – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

Q3e Queiroz, Michelly Pires.
Efeito do consumo materno de ácido linoleico conjugado sobre parâmetros físicos, bioquímicos e comportamentais da prole de ratos / Michelly Pires Queiroz. - João Pessoa, 2020.
89 f. : il.

Orientação: Juliana Késsia Barbosa Soares.
Coorientação: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Ácido linoleico. 2. Metabolismo. 3. Lipídios. 4. Neurodesenvolvimento. 5. Programação fetal. 6. Ansiedade. I. Soares, Juliana Késsia Barbosa. II. Queiroga, Rita de Cássia Ramos do Egypto. III. Título.

UFPB/BC CDU 547.395.4(043)

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO
SOBRE PARÂMETROS FÍSICOS, BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DA
PROLE DE RATOS**

Tese Aprovada em 26/03/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares – PPGCTA/CT/UFPB

Coordenadora da Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – PPGCTA/CT/UFPB

Examinador Interno



Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga – PPGCTA/CT/UFPB

Examinador Interno



Prof^a. Dr^a. Jailane de Souza Aquino – PPGCN/ CCS/UFPB

Examinador Externo

A handwritten signature in black ink on a light blue background. The signature is written in a cursive style and reads "Vanessa Bordin Viera".

Prof^a. Dr^a. Vanessa Bordin Viera – PPGCNBiotec/CES/UFCG
Examinador Externo

À Deus, a minha mãe e ao meu filho,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ser meu protetor e fiel guardião. Por nunca me deixar cair nos momentos mais turbulentos da vida. Oh Pai, serei eternamente grata por tudo.

A minha orientadora Juliana Késsia, por tudo que tem feito em minha vida desde a primeira orientação. Uma pessoa que sempre foi luz e que me trouxe a luz. Sou grata a Deus por tê-la colocado em minha vida. Muito obrigada por toda a paciência e dedicação.

A minha mãe Maria do Socorro, por toda dedicação, zelo e amor. Ela que sempre me apoiou em todas as decisões e foi o alicerce para todos os sonhos realizados até hoje.

Ao meu filho Luís Henrique, por ser esta criança tão maravilhosa que me preenche de um amor infinito. Por ele e para ele são todas as conquistas. Mamãe te ama!

Ao meu pai Aluízo, por todo amor e apoio.

Aos meus irmãos Alan e Alisson, por toda compreensão, por estarem sempre presente mesmo quando estou ausente.

A Martiniano Lima, por toda ajuda com o experimento e por ter se tornado este grande amigo.

A Jaciel, por todo empenho, ajuda e amor a todas as pesquisas realizadas no Laboratório de Nutrição experimental (LANEX)

A toda equipe LANEX, por toda ajuda nesta pesquisa. Somos uma família unida pela UFCG, e estaremos sempre juntos. Que Deus abençoe todos vocês.

A Prof^a Dra. Gerlane Guerra e Profa. Dra. Daline Araújo, pelas análises de antioxidantes nos tecidos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por toda dedicação ao ensino e pesquisa.

A banca examinadora Prof^a. Rita Queiroga, Prof^a Maria Elieidy Oliveira, Prof^a Jailane Aquino e Prof^a Vanessa Bordin, por avaliarem, corrigirem e enriquecerem este trabalho.

A todos os mestres que tive durante a vida, em especial aos meus queridos professores do curso de nutrição Juliana Késsia, Jailane Aquino, Elieidy Oliveira, Marília Frazão, Ana Paula Mendonça, Nilcimelly Donato, Jefferson Barros, Janaína Almeida, Carol Gondim, Poliana Palmeira e Vanille Pessoa. Vocês são os melhores.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiarem a pesquisa e pela bolsa de pós-graduação.

Aos meus familiares e amigos, por toda as palavras de encorajamento, por toda a torcida, paciência e amor.

As minhas amigas Digian e Elvira que foram tão presentes em momentos de alegria e luta durante o período de pós-graduação.

Aos meus colegas de trabalho da Faculdade Paraíso, por entenderem às minhas frequentes ausências.

Ao ex-presidente Luís Inácio Lula da Silva, por ser incentivador da educação brasileira nas classes mais pobres, de onde eu vim. Ao senhor todo o meu respeito e admiração.

“A educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”.

Paulo Freire

RESUMO

O tipo de gordura ofertada durante a gestação e lactação pode desencadear problemas como ansiedade, depressão e alterações metabólicas na prole ou proteger contra estas doenças. O Conjugated Linoleic Acid (CLA) é um grupo de isômeros conjugados do ácido linoleico e é conhecido por exercer funções benéficas no organismo. Porém pouco se sabe sobre a influência deste lipídio na dieta materna e nos filhotes. Sendo assim, o objetivo do estudo é avaliar a influência do CLA ofertado na fase de gestação e lactação em parâmetros físicos, bioquímicos e comportamentais da prole. Três grupos foram formados: controle (GC) - dieta sem CLA.; CLA1 - dieta contendo 1% de CLA.; e CLA3 - dieta contendo 3% de CLA. As dietas foram oferecidas às mães a partir do 7º dia de gestação até o final da lactação. Foram utilizados os seguintes testes comportamentais: Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (CA) e Caixa Claro-Escuro (CCE). Os níveis de malonaldeído (MDA) e glutathione foram medidos no cérebro da prole. Para avaliar as alterações metabólicas foi aferido peso corporal, murinometria, gordura corporal, análises bioquímicas, gordura e perfil de ácido graxos do fígado. Para análise dos dados foi utilizado o teste estatístico One way ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CLA1 e CLA3 apresentaram maior número de entradas nos braços abertos e tempo gasto na área central em LCE, translocaram e ambularam mais na área clara do LCE e realizaram maior tempo de rearing no CA em relação ao GC ($p \leq 0,05$). Além disso, observou-se maior concentração de glutathione e menor de MDA no tecido cerebral dos animais desses grupos, como também maior quantidade de gordura retroperitoneal e epididimal, colesterol total e High Density Lipoprotein cholesterol (HDL-c), quando comparados ao GC ($p \leq 0,05$). Em contrapartida, menor circunferência abdominal e menor valor de glicemia foram observados nestes grupos versus o GC ($p \leq 0,05$). Com relação ao perfil de ácidos graxos no fígado, CLA3 apresentou maior quantidade de MUFA versus GC e CLA1. Porém, neste grupo a quantidade PUFA da série n-3 e PUFA total foi menor quando comparado ao GC e menores valores de n-6 PUFA versus GC e CLA1 ($p \leq 0,05$). O conteúdo de CLA no fígado foi encontrado em quantidades insignificantes ($p \geq 0,05$). A ingestão materna de CLA nas duas concentrações, induziu uma diminuição nos parâmetros de ansiedade e peroxidação lipídica cerebral, como também melhorou perfil de ácidos graxos no fígado, aumentou níveis de HDL-c e Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG). O consumo de CLA em fases cruciais da vida é seguro e pode trazer benefícios para a prole. Os efeitos foram independentes da dose, porém testes com humanos devem ser realizados para confirmar os resultados.

Palavras-chave: Ansiedade; Metabolismo; Lipídios; Neurodesenvolvimento; Programação fetal.

ABSTRACT

The type of fat offered during pregnancy and lactation can trigger problems such as anxiety, depression and metabolic changes in the offspring or protect against these diseases. Conjugated Linoleic Acid (CLA) is a group of conjugated isomers of linoleic acid and is known to exert beneficial functions in the body. However, little is known about the influence of this lipid on the maternal diet and the offspring. Therefore, the objective of the study is to evaluate the influence of CLA offered during the gestation and lactation phase on physical, biochemical and behavioral parameters of the offspring. Three groups were formed: control (CG) - diet without CLA; CLA1 - diet containing 1% CLA; and CLA3 - diet containing 3% CLA. Diets were offered to mothers from the 7th day of pregnancy until the end of lactation. The following behavioral tests were used: Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF) and Light-Dark Box (LDB). The levels of malonaldehyde (MDA) and glutathione were measured in the offspring's brain. To assess metabolic changes, body weight, murinometry, body fat, biochemical analyzes, fat and fatty acid profile of the liver were measured. For data analysis, the Oneway ANOVA statistical test was used, followed by the Tukey test ($p \leq 0.05$). CLA1 and CLA3 presented a greater number of entries in the open arms and time spent in the central area in EPM, translocated and ambulated more in the clear area of the LDB and performed a longer rearing time in the OF compared to the CG ($p \leq 0.05$). In addition, a higher concentration of glutathione and lower MDA was observed in the brain tissue of animals from CLA1 and CLA3, as well as a greater amount of retroperitoneal and epididymal fat, total cholesterol and High Density Lipoprotein cholesterol (HDL-c), when compared to CG ($p \leq 0.05$). In contrast, lower waist circumference and lower blood glucose values were observed in these groups versus the CG ($p \leq 0.05$). Regarding the fatty acid profile in the liver, CLA3 showed a greater amount of MUFA versus GC and CLA1. However, in this group the amount of PUFA in the n-3 series and total PUFA was lower when compared to the GC and lower values of n-6 PUFA versus GC and CLA1 ($p \leq 0.05$). The CLA content in the liver was found in insignificant amounts ($p \geq 0.05$). Maternal intake of CLA at both concentrations induced a decrease in anxiety parameters and cerebral lipid peroxidation, as well as improved fatty acid profile in the liver, increased levels of HDL-c and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT). Consumption of CLA at crucial stages of life is safe and can benefit the offspring. The effects were independent of the dose, but tests on humans must be performed to confirm the results.

Key-words: Anxiety; Fetal programming; Lipids; Metabolism; Neurodevelopment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas do ácido linoleico, cis-9, trans-11 CLA e trans-10, cis-12 CLA....	20
Figura 2	Biossíntese do CLA.....	21
Figura 3	Desenho experimental.....	33
Figura 4	Labirinto em Cruz Elevado.....	34
Figura 5	Teste do Campo aberto.....	35
Figura 6	Teste de transição claro-escuro.....	36
Figura 7	Análise da concentração de glutathione e MDA nos tecidos.....	40

ARTIGO II

Figure 1	Experimental design. Time in days specifying the procedures that were performed with experimental groups, which received 1% and 3% CLA, and the control group.....	60
Figure 2	Body weight and feed intake of the offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG), or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1), or 3% (CLA3), during pregnancy and lactation.....	64
Figure 3	Murinometry of the offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation.....	65
Figure 4	Body fat of offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) of CLA during pregnancy and lactation.	66
Figure 5	Oral glucose tolerance test of offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation.....	67
Figure 6	Liver fat in offspring whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta controle e experimental	32
-----------------	---	----

ARTIGO II

Table 1	Composition of control and experimental diets.....	59
----------------	--	----

Table 2	CLA supplement fatty acid profiles.....	60
----------------	---	----

Table 3	Biochemical analyses of rat offspring whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation.	66
----------------	--	----

Table 4	Fatty acids (FA) and dimethyl acetals (DMA) composition (least square means $\pm$ standard error, expressed as g/kg of total FA + DMA) in liver tissue of offspring from dams fed control, CLA1 and CLA3 diets.....	68
----------------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Atuação do CLA nos sistemas biológicos.....	25
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLA	Conjugated Linoleic Acid
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
LOX	Lipoxigenase
COX	Cicloxigenase
AA	Ácido Araquidônico
DA	Doença de Alzheimer
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NQO1	NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
iNOS	Nitric Oxide Synthase
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
GPx	Glutathione peroxidase
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
γGCL	Glutamyl Cysteine Ligase
PGE₂	Prostaglandina E ₂
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
CES	Centro de Educação e Saúde
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
LABROM	Laboratório de Bromatologia
LAQA	Laboratório de Química dos Alimentos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
DPASA	Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar
EMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
DMA	Dimetilacetal
CT	Colesterol Total
TAG	Triglicerídeos
GSSG	Glutathione oxidada
GSH	Glutathione reduzida
DTNB	Ácido Ditiobisnitrobenzóico
MDA	Malonaldeído
HCL	Ácido Clorídrico
ANOVA	Análise de Variância
PGE2	Prostaglandina E2
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
nSTZ	Streptozotocin neonatal
IA	Índice de Adiposidade
IMC	Índice de Massa Corpórea
DCV	Doenças Cardiovasculares
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gama
PLIN2	Perilipins-2
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
NF-κB	Nuclear factor-kB
IL-1β	Interleucina-1 β
RE	Retículo Endoplasmático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 CLA E BIOSÍNTESE.....	20
2.1.1 Mecanismo para produção <i>Cis-9, trans-11 C18:2</i>	20
2.1.2 Fontes de CLA.....	22
2.1.3 Efeito biológico do CLA.....	23
2.2 LIPÍDIOS E SISTEMA NERVOSO.....	27
2.3 CLA, ESTRESSE OXIDATIVO E ANSIEDADE.....	28
2.4 CLA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 ANIMAIS E DIETA EXPERIMENTAIS.....	31
3.2 TESTE COMPORTAMENTAIS.....	33
3.2.1 Teste Labirinto em cruz elevado (LCE).....	33
3.2.2 Teste Campo aberto.....	34
3.2.3 Teste de transição claro-escuro.....	35
3.3 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG).....	37
3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	37
3.5 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA E GORDURA VISCERAL.....	37
3.6 AVALIAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA.....	38
3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E CÉREBRO.....	38
3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	39
3.9 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVOS.....	39
3.9.1 Concentração de Glutathione.....	39
3.9.2 Determinação do Conteúdo de Malonaldeído (MDA).....	40
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
REFERENCIAS.....	42
4 RESULTADOS.....	52
ARTIGO I - Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain.....	53
ARTIGO II – Maternal consumption of conjugated linoleic acid improves	

tolerance to glucose and HDL-cholesterol in the rat progeny.....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
APÊNDICES.....	82
ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são os componentes principais do sistema nervoso. As diversas células que o constituem, em especial o cérebro, são formadas por uma bicamada lipídica composta por ácidos graxos saturados e insaturados, colesterol e fosfolipídios (PINHEIRO et al., 2019; MATSUMATA; INADA; OSUMI, 2016). Por este motivo, os lipídios são fundamentais para o bom funcionamento deste órgão, como de todo organismo. Estudos vêm analisando a influência de dietas ricas em gorduras insaturadas e saturadas ofertadas a ratas no período de gestação (GE et al., 2013; JOFFRE et al., 2016) e lactação (ISHIKAWA et al., 2019; SABEN et al., 2014) com a finalidade de descobrirem os benefícios ou os malefícios que essas dietas podem ocasionar a mãe e a prole. Uma vez que, nestas fases da vida a oferta adequada de nutrientes essenciais é crucial para o bom desenvolvimento cerebral dos filhotes (MADORE et al., 2014; QUEIROZ et al., 2019).

O cérebro é um órgão particularmente suscetível ao estresse oxidativo, devido à sua alta taxa de consumo de oxigênio, grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, altos níveis de ferro e proporcionalmente baixa capacidade antioxidante (VELZEN et al., 2017). Para evitar que o estresse oxidativo aconteça é importante que haja um equilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) e as defesas antioxidantes do organismo. Dessa forma, o tipo de alimento consumido diariamente é um fator que pode proteger os tecidos deste problema, ou por outro lado torná-los mais suscetíveis. Estudos mostram a ação dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 de cadeia longa (AGPI), em particular, eicosapentaenoic acid (EPA) e o docosahexaenoic acid (DHA) contra o estresse oxidativo, possivelmente devido a sua capacidade antioxidante (GROTTO et al., 2011; WANG et al., 2016).

Além desses, outro ácido graxo que pode trazer benefício a saúde é o Conjugated Linoleic Acid (CLA). O CLA se refere a um grupo de isômeros do ácido linoleico que é produzido naturalmente através da biohidrogenação e isomerização por bactérias presentes no rúmen de diferentes animais, tais como vacas e cabras (BHATCHARYA et al., 2005). Uma das principais fontes de CLA é o leite e a carne de ruminantes (ERIKSEN; VEGARUD; LANGSRUD, 2008; QUEIROGA et al., 2007).

Este lipídio vem sendo estudado devido aos efeitos positivos que exerce em alguns tecidos. Pesquisa realizada com camundongos machos mostram que o CLA reduziu a gordura corporal e aumentou massa magra principalmente quando associada ao exercício físico. Além disso, houve diminuição de insulina e glicose sérica, tumor necrosis factor- α (TNF α) e interleucina-6 nos animais que consumiram CLA (BHATTACHARYA et al., 2005). Outro

estudo mostrou que o CLA combinado à atividade física reduz a acumulação de gordura corporal, mas não modifica a massa corporal magra em ratos Wistar machos e fêmeas (SALGADO et al., 2012).

A suplementação com CLA comercial isolados ou mistos tem mostrado diferentes efeitos nos níveis séricos das frações lipídicas (HERNANDÉZ-DÍAZ et al., 2010; KENEDY et al., 2010), e nos marcadores do estresse oxidativo e inflamação no músculo de ratos exercitados (GRAVES et al., 2005; RAHMAN et al., 2009; SANGHYUN; KIM, 2013). Estudos realizados com ratos mostram que os ácidos graxos essenciais podem reduzir os danos oxidativos no cérebro e em tecidos periféricos (TEIXEIRA et al., 2008; TEXEIRA et al., 2011). O estresse oxidativo também está relacionado com distúrbios de ansiedade (OLIVEIRA et al., 2007; SALIM et al., 2010).

Dados preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa com gordura de leite de cabra enriquecida com CLA, que foi ofertada a ratos na fase inicial da vida, demonstraram que os lipídios da dieta podem influenciar positivamente o desenvolvimento cerebral e as propriedades eletrofisiológicas (SOARES et al., 2012). A gordura de leite de cabra apresenta uma variedade de ácidos graxos incluindo os ácidos graxos essenciais e CLA, porém, foi detectado em um dos experimentos uma maior deposição do CLA no cérebro dos animais cujas mães receberam a dieta por um maior período de tempo (SOARES et al., 2012). Baseado no exposto, propõe-se avaliar se foi este ácido graxo, presente naturalmente no leite, é o responsável pelas alterações observadas ou se há a influência de outros ácidos graxos. Para tanto o CLA foi utilizado isoladamente a fim de comprovar estes efeitos.

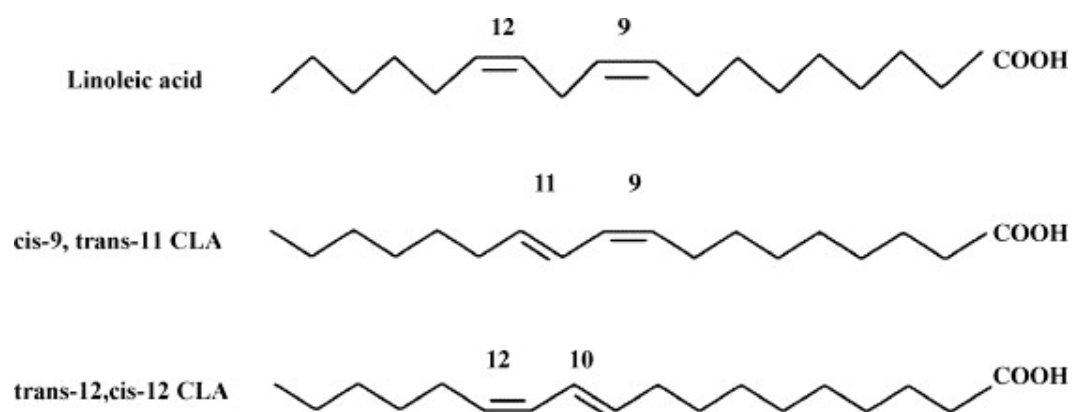
Adicionalmente, é conhecido na literatura que a adição de lipídios na dieta materna pode alterar a programação metabólica do feto induzindo alterações físicas e bioquímicas relacionadas a síndrome metabólica nos animais no período pós-natal (SEGOVIA et al., 2015; SOARES et al., 2012). Alguns autores chamam esse período como “crítico para o desenvolvimento”. A comprovação da ação do CLA nesta fase avaliando o metabolismo plasmático, o estresse oxidativo e a ansiedade na prole é inédito. Ademais, não há consenso sobre a dosagem ou quantidades ideais para atingir os resultados esperados e testar diferentes doses, como as que foram utilizadas no presente estudo poderão elucidar tais fatos. Neste sentido, os resultados obtidos na presente pesquisa irão auxiliar os profissionais de saúde a orientar com mais segurança gestantes e lactantes que buscam uma funcionalidade nos alimentos consumidos, porém sem comprometer a curto e longo prazo a saúde da prole. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do consumo materno de CLA ofertado durante gestação e lactação em parâmetros físicos, bioquímicos e comportamentais da prole.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO E BIOSSÍNTESE

O CLA compreende um grupo de isômeros posicionais e geométricos, formados a partir da biohidrogenação do ácido linoleico no rúmen dos animais, como também de forma endógena pela conversão do ácido vacênico (BASIRICÒ et al., 2017; BAUMAN et al., 2008). Os principais isômeros do CLA que são conhecidos pelas suas propriedades benéficas são *cis*-9, *trans*-11 C18:2 e *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (RENES et al., 2017) (Figura 1). Estudos relatam que o CLA pode ser produzido através de metabolismo microbiano em animais, interagindo com bactérias lácteas ou ruminais. A sua formação pode ser explicada pela conversão do ácido linoleico por bactérias ruminais e pela conversão de ácido vacênico na glândula mamária (HUR et al., 2017; RENES et al., 2017; SIEBER et al., 2004). Para tanto, a formação de CLA está intimamente relacionada com a quantidade de ácido linoleico e os tipos e quantidades de microrganismos presentes (HUR et al., 2017). Segundo Abd El-Salam et al. (2010) alguns probióticos também podem formar CLA a partir de ácido linoleico livre adicionado ao meio de cultura.

Figura 1 – Estruturas do ácido linoleico, *cis*-9, *trans*-11 CLA e *trans*-10, *cis*-12 CLA.

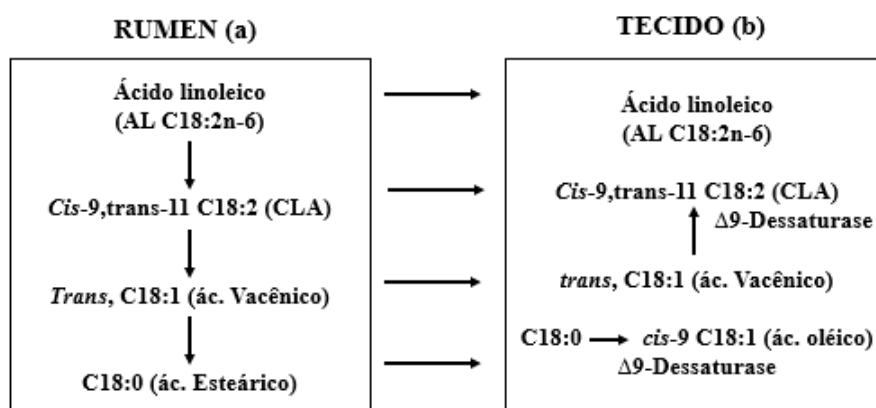


2.1.1 Mecanismo para produção *Cis*-9, *trans*-11 C18:2

Os lipídios passam por duas transformações importantes no rúmen de animais para gerar subprodutos. Na primeira transformação ocorre hidrólise das ligações dos ésteres por lipases microbianas, e na segunda à biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados. A isomerização da dupla ligação *cis*-12 representa o passo inicial durante biohidrogenação dos ácidos graxos

que contêm um sistema de dupla ligação *cis*-9, *cis*-12. A enzima responsável pela formação das ligações duplas conjugadas do *cis*-9, *cis*-12, bem como do ácido α - e γ -linolênico é a linoleate isomerase. Esta enzima é ligada à membrana celular bacteriana e demonstra uma exigência absoluta pelo substrato, um sistema dieno *cis*-12, *cis*-9 e um grupo carboxilo livre. A segunda reação é uma redução na qual *cis*-9, *trans*-11 CLA é convertido a *trans*-11 C 18:1 (ácido vacênico). A biohidrogenação do ácido linolênico é semelhante à biohidrogenação do linoleico, começando com uma isomerização seguida por uma sequência de reduções e finalizando com a formação do ácido esteárico. No rúmen a biohidrogenação do ácido α -linolênico produz *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 ácido octadecatrienóico conjugado como o produto de isomerização inicial predominante, e esta é seguida por redução da *cis*-duplas ligações. Consequentemente, *trans*-11 octadecenóico é formado, sendo um intermediário comum na biohidrogenação tanto do ácido α -linolênico como do ácido linoleico. Além disso, a biohidrogenação do γ -linolênico, ácido *cis*-6, *cis*-9, *cis*-12 do ácido octadecatrienóico, também resulta em formação de *trans*-11 C18:1 (HARFOOT; HAZELWOOD, 1988; VAN SOEST, 1994). Enquanto na síntese endógena de CLA ocorre a dessaturação do *trans*-11 C18:1 (ácido vacênico) pela enzima Δ 9-dessaturase, originando o *cis*-9, *trans*-11 CLA. O sistema de dessaturase é um complexo multienzimático que inclui NADH - citocromo b5 redutase, citocromo b5, acil-CoA sintetase, e a terminal Δ 9-dessaturase. Na Reação a Δ 9-dessaturase introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos. Estearoil-CoA e palmitoil-CoA são os principais substratos para Δ 9-dessaturase, e os produtos gerados nesta reação irão compor fosfolipídios e triglicérides, auxiliando em funções da membrana e na sua fluidez (BAUMAN et al., 1999; KHANAL; DHIMAN, 2004) (Figura 2).

Figura 2 - Biossíntese do CLA. a) Biossíntese do CLA no rúmen, b) Biossíntese do CLA no tecido.



Fonte: Adaptado de Bauman et al., (1999).

O CLA também pode ser produzido sinteticamente, por meio de hidrogenação parcial ou isomerização alcalina do ácido linoleico, a exemplo de óleos ricos em ácido linoleico (LIU et al., 2017). O produto formado é composto principalmente de *cis*-9, *trans*-11 C18:2, *trans*-10, *cis*- 12 C18:2, em uma proporção de 1:1. O CLA comercialmente disponível geralmente é produzido por este método (KOBÁ; YANAGITA, 2014). Este produto é consumido como suplemento alimentar, especialmente por praticantes de atividades física, devido seus efeitos na perda de massa gorda e ganho de massa magra, possivelmente por causar apoptose dos adipócitos (BARALDI et al., 2016).

2.1.2 Fontes de CLA

Este lipídio é naturalmente encontrado em produtos de origem animal, sendo os produtos de ruminantes as fontes mais ricas de CLA, incluindo o ácido ruminico. A carne desses animais é a fonte mais rica de isômeros de CLA na dieta humana, podendo também ser encontrado em produtos lácteos (ALFAIA et al., 2010; HUR et al., 2017), e produtos de aves de capoeira, frutos do mar e óleos vegetais (HUR; PARK; JOO, 2007; LEE et al., 2006).

O conteúdo de CLA no leite e produtos lácteos varia entre 0,68% e 0,12% da gordura total. Atualmente, a ingestão humana estimada de CLA de fontes alimentares é insuficiente para obter os efeitos potenciais contra câncer, aterosclerose e obesidade relatados em estudos com modelos animais. Tais efeitos exigiriam um consumo muito maior de leite e derivados do que a ingestão normal fornecida em uma dieta padrão. Consequentemente, vários métodos estão sendo explorados para aumentar o conteúdo desse composto em produtos lácteos fermentados, sendo uma alternativa o uso de culturas iniciadoras contendo cepas produtoras de CLA durante a fabricação (RENES et al., 2017).

Os isômeros do CLA são absorvidos e incorporados nos tecidos adiposos e fosfolipídios de membrana e a sua acumulação nos tecidos animais é dependente da quantidade ingerida na dieta e da frequência da ingestão (BANNI et al., 1995; HUR et al., 2007; HUR et al., 2017). Estudos mostram que a administração de CLA na dieta aumenta consideravelmente o conteúdo de isômeros nas carnes de animais (CORDERO et al., 2011; POULSON et al., 2004; SCHIAVON et al., 2011). Portanto, a melhor forma de aumentar a concentração de CLA nos tecidos animais pode ser aumentando o CLA na dieta e sua frequência na administração, entretanto esta alternativa pode encarecer o produto diminuindo a relação custo/benefício (HUR, 2017).

A dieta ofertada às vacas leiteiras é o principal fator que altera o conteúdo de CLA no

leite e, portanto, mudanças nas dietas podem permitir enriquecer o leite com CLA (SIURANA; CALSAMIGLIA, 2016). Griinari e Bauman (1999) propuseram que os efeitos da dieta pudessem ser agrupados em 2 categorias, dependendo do mecanismo de ação: (a) Fatores alimentares que aumentam os substratos lipídicos para a produção de CLA e ácido vacênico, incluindo principalmente gorduras vegetais ricas em ácidos linoleico e linolênico e pastagem (rica em ácido linolênico); (b) Fatores alimentares que afetam as bactérias envolvidas no processo de biohidrogenação ruminal, como óleos de peixe ou dietas com pouca fibra e alto concentrado; e (c) a combinação de ambas as estratégias.

O óleo de soja é uma boa opção para ser utilizado como precursor de CLA no rúmen pois apresenta alto conteúdo de isômeros de CLA (BAUMAN; GRIINARI, 2003). No geral, o óleo de cártamo é mais utilizado para a síntese de CLA por conter maior quantidade de ácido linoleico (cerca de 50-70%) que outros óleos vegetais (HUR, 2017). De acordo com Manso, Gallardo, Guerra-Rivas (2016) o tipo e a quantidade de gordura e a forragem em rações de ovelha são fatores importantes para serem considerados, a fim de produzir carne de carneiro e cordeiro com melhor perfil de ácidos graxos, dando origem a produtos de melhor qualidade, satisfazendo assim a necessidade do consumidor.

No entanto, a administração de CLA no rúmen como um sal de cálcio insolúvel em comparação com a administração de CLA como um ácido graxo livre pode potencialmente diminuir a biohidrogenação do CLA em ácido esteárico e pode ser uma estratégia adicional para aumentar o conteúdo de CLA dos tecidos e do leite (HUANG et al., 2009). Huang et al. (2009), encontraram que ovinos suplementados com 1% de sais de CLA tiveram aumento da porcentagem de CLA entrando no duodeno e um aumento subsequente na sua absorção. Os autores acreditam que o aumento do fluxo de CLA para o duodeno e um aumento subsequente na absorção intestinal de CLA devem levar ao aumento do CLA na carne e no leite dos ruminantes.

Os isômeros de CLA são produzidos industrialmente por isomerização alcalina conjugada de ácido linoleico a partir de óleo de cártamo ou girassol com a hidrólise total de triglicerídeos (TAG) (BERDEAUX et al., 1998).

2.1.3 Efeito biológico do CLA

O CLA foi encontrado em óleos comestíveis nos anos 30, porém sua função fisiológica só foi avaliada a partir da década de 1980, quando os trabalhadores descobriram que os extratos de carne bovina grelhada exerciam atividade antimutagênica, sendo o CLA o responsável por

este efeito (KOBAYASHI, YANAGITA, 2014; PARIZA; HARGRAVES, 1985). Atualmente, outros efeitos foram descobertos além da antimutagenicidade, como o papel protetor contra o câncer, doenças cardiovasculares, obesidade, osteoporose e em doenças imunes e inflamatórias. Sendo o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12, os isômeros responsáveis pelas atividades biológicas do CLA (KOBAYASHI; YANAGITA, 2014).

Os mecanismos pelos quais o CLA atua promovendo efeitos benéficos ainda não são totalmente conhecidos e por isso vêm sendo estudados. Um mecanismo subjacente proposto a estas atividades, é baseado em que o CLA pode ajudar na inflamação.

As respostas inflamatórias são necessárias para a sobrevivência diante o surgimento de um processo infeccioso. Porém, além da capacidade de se defender do invasor, o corpo humano deve ter a capacidade de encerrar a resposta inflamatória quando não houver mais infecção. O sistema imunológico deve ser dotado de mecanismos que lhe permitam responder com sensibilidade a um ambiente inflamatório e alcançar autolimitação (SUGIMOTO et al., 2016). Quando a inflamação persiste mesmo após a infecção, é conhecida como inflamação crônica e está associada ao desenvolvimento da síndrome metabólica (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

De acordo com Banni et al. (1999) e Jelińska et al., (2014), o CLA pode interferir na produção de eicosanoides, diminuindo o fornecimento de Ácido Araquidônico (AA) (20:4 n-6) como um substrato para as vias lipoxigenase (LOX) e cicloxigenase (COX), diminuindo assim a inflamação que está totalmente associada à obesidade.

Estudos *in vitro* e *in vivo* em vários modelos animais indicam que o CLA tem efeitos mediadores na produção de citocinas e prostaglandinas, o que pode influenciar a resposta inflamatória. Embora alguns estudos indiquem que o isômero *trans*-10, *cis*-12 pode ser mais anti-inflamatório em comparação com o isômero *cis*-9, *trans*-11, acredita-se que esse aspecto ainda precisa ser estabelecido tanto na linhagem celular quanto em estudos com animais. Os estudos de linha celular e animal são consistentes no que diz respeito ao efeito do CLA na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico. Está claramente estabelecido que o CLA diminui a PGE₂ e o óxido nítrico através da inibição da expressão da proteína COX-2 e nitric oxide synthase (iNOS) e do mRNA (BHATTACHARYA et al., 2006). Os principais efeitos dos CLA no organismo estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Atuação do CLA nos sistemas biológicos.

Título	Autor/Ano	Dosagem de CLA	Origem	Modelo animal	Principais resultados
Conjugated linoleic acid prevents age induced bone loss in mice by regulating both osteoblastogenesis and adipogenesis	Lin et al. (2017)	0,8 g/kg/ dia por gavagem	Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA)	Camundongos	Promove osteogênese e inibe a diferenciação de adipócitos <i>in vivo</i> .
Effects of whey protein and conjugated Linoleic acid on acrolein-induced cardiac oxidative stress, mitochondrial dysfunction and dyslipidemia in rats	Aydın; Şekeroğlu; Şekeroğlu, (2018)	200 mg/kg/dia por gavagem	Sigma-Aldrich (Steinem, Germany)	Ratos Sprague Dawley	Melhora do estresse oxidativo induzido pela acroleína e na disfunção mitocondrial no coração. Porém aumenta TG e VLDL
High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats	Chinnadurai et al. (2013)	Baixa quantidade de CLA (12.18 mg/g gordura) e alta quantidade (19.54 mg/g gordura)	Manteiga enriquecida com CLA produzida a partir de leite de búfala	Ratas Wistar	Aumenta as atividades de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase. Como também leva a diminuição de TG e lipoproteína de alta densidade
Impact of conjugated linoleic acid administered to rats prior and after carcinogenic agent on arachidonic and linoleic acid metabolites in serum and tumors	Jelinska et al. (2017)	1% (0,15 mL/dia) e 2% (0,30 mL/dia) por gavagem	Pharma-Nord, Dinamarca	Ratas Sprague Dawley	O CLA suplementado diariamente em ratos antes e após a administração de carcinógenos afetava as concentrações dos metabólitos do ácido

Influence of maternal diet enrichment with conjugated linoleic acids on lipoxygenase metabolites of polyunsaturated fatty acids in serum of their offspring with 7,12 dimethylbenz[a]anthracene induced mammary tumors	Bialek; Jelinska; Tokarz, (2015)	1% (0,15 mL/dia) por gavagem	Pharma-Nord, Dinamarca	Ratas Sprague Dawley	araquidônico e do ácido linoleico no soro de ratos e nos tumores induzidos. O CLA pode inibir o desenvolvimento de tumores mamários induzidos quimicamente em ratos fêmeas. A maior oferta de CLA na dieta das mães durante a gravidez e a amamentação não apenas causa sua incorporação nos tecidos das crianças, mas também exerce efeito promotor da saúde na vida adulta dos filhos.
Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice	Halade; Rahman; Fernandes, (2010)	1,5% de CLA Dieta AIN-93	Lipid Nutrition (Channahon, IL, EUA)	Camundongas	O isômero trans-10, cis-12 CLA e a combinação de trans-10, cis-12 e cis-9, trans-11 CLA reduzem a massa gorda, mas também causam a indução de esteatose hepática e resistência à insulina.
Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet	Furlan et al. (2013)	2% de CLA Dieta AIN-93	CLA Tonalin®	Ratos Sprague Dawley	Suplementos dietéticos com CLA, fitoesteróis ou sua combinação por 65 dias foram eficazes na redução de gordura corporal, tecido adiposo e consumo de ração.

2.2 LIPÍDIOS E SISTEMA NERVOSO

As duas classes de Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI) são α -linolênico (18:3 n-3) e α -linoleico (18:2 n-6), ambos estão envolvidos de forma direta em diversos processos metabólicos e fisiológicos do organismo humano, principalmente na gênese e desenvolvimento cerebral, além de atuarem como precursores dos AGPI, originando os AA (20:4 n-6), EPA (20:5 n-3) e DHA (22:6 n-3), sendo estes sintetizados no retículo endoplasmático liso, especialmente no fígado, através de biorreações de alongamento da cadeia de carbono e dessaturação (ANDRADE; CARMO, 2006).

Estes lipídios desempenham funções essenciais no cérebro, seja como moléculas estruturais ou como sinalizadores celular (CERMENATI et al., 2015). Os ácidos graxos n-3 e n-6 são fundamentais, tanto para a estrutura, como para as funções cerebrais. Estruturalmente, são os principais componentes das membranas neurais, constituindo 15-20% de sua massa seca. No início da vida, os ácidos graxos essenciais são fundamentais para auxiliar no crescimento e maturação cerebral. Durante o desenvolvimento pré-natal, o fornecimento adequado é muito importante, uma vez que a placenta duplica os níveis que circulam no plasma materno, e déficits graves podem levar à efeitos nocivos para a criança se ocorrerem durante períodos críticos de desenvolvimento (TANG et al., 2018).

O AA é crucial para o crescimento do cérebro, e sua deficiência está associada ao baixo peso ao nascer e circunferência cefálica reduzida. Enquanto o DHA é encontrado em membranas ativas, atuando nas sinapses e em fotorreceptores, seu fornecimento é essencial para um adequado desenvolvimento visual e cognitivo. O EPA está presente nos componentes sanguíneos, porém sua quantidade nos tecidos é pequena, já que é rapidamente utilizado na síntese de DHA ou eicosanoide (SALVATI et al, 2006).

Van et al. (2016) avaliaram a importância do DHA como transportador de drogas para doenças neurodegenerativas e encontraram melhora destas doenças quando associadas ao uso deste ácido graxo, sugerindo o DHA como uma alternativa para o tratamento de doenças neurodegenerativas existentes. Hosono et al. (2015), relatam que dieta a base de AA impediu a deposição de proteína β amiloide ($A\beta$) nos cérebros dos ratos. Esta proteína desempenha um papel importante no desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA).

Com relação a atuação do CLA no sistema nervoso, estudo verificou que o CLA atravessa a barreira hematoencefálica (FA et al., 2005), reduz angiogênese no cérebro de mamíferos (SIKORSKI; HEBERT; SWAIN, 2008) e protege células corticais contra elementos neurotóxicos *in vitro* (HUNT et al., 2010).

2.3 CLA, ESTRESSE OXIDATIVO E ANSIEDADE

A ansiedade é um problema que atinge grande parte da população, necessitando de atenção especial por ser considerada um sintoma de depressão em alguns casos. Uma das possíveis respostas para o aumento da depressão, e conseqüentemente, do sintoma da ansiedade é o estresse oxidativo no cérebro. De fato, muitos estudos encontraram evidências que comprovam tal questionamento (ERCAN et al., 2017; GUNEY et al., 2014; STEENKAMP et al., 2017; YAN et al., 2016).

Estruturas particularmente sensíveis ao estresse oxidativo são a amígdala e o hipocampo (WANG; MICHAELIS, 2010). O estresse oxidativo pode levar à alteração neuroendócrina na amígdala (SALIM, 2017). Como também, dano oxidativo no hipocampo pode interromper os circuitos neurais envolvidos na ansiedade e condicionamento do medo (HASSAN et al., 2014). Outros mecanismos propostos para explicar a relação entre ansiedade e estresse oxidativo incluem secreção prejudicada do Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (SALIM et al., 2011) e alterações patológicas na atividade do receptor de N-methyl-D-aspartate (NMDA), funcionamento mitocondrial e neurogênese (HAXAIRE et al., 2012; HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010; RAI et al., 2013).

As ERO's geradas pela Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) desempenham um papel central na aceleração do estresse oxidativo em sistemas biológicos. Quantidades fisiológicas de ERO são um requisito celular, no entanto, as ERO's não são completamente desintoxicadas e, portanto, têm o potencial de danificar lipídios, proteínas e DNA. Normalmente, a célula é protegida em virtude de um complexo sistema antioxidante, consistindo em sistemas enzimáticos e não enzimáticos, para manter a homeostase do organismo. Dentre os antioxidantes endógenos encontram-se o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que desempenham papéis importantes durante o processo, eliminando ERO's ou impedindo sua formação (ROMERO-SARMIENTO et al., 2012). Além das defesas antioxidantes endógenas, é possível encontrar na alimentação nutrientes que atuam como antioxidantes naturais, dentre eles estão a vitamina A, E, C, ácidos graxos essenciais, entre outros.

Uma hipótese para atuação dos ácidos graxos, especialmente do CLA, na resposta ao estresse oxidativo, pode estar relacionado à capacidade de ativar o Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) que age ativando genes citoprotetores. Em condições basais, Nrf2 é sequestrado no citosol por um homodímero Keap1, o que facilita a ubiquitinação e degradação proteossômica de Nrf2. Os indutores reagem com resíduos específicos de cisteína em Keap1,

levando ao lançamento da Nrf2, devido à sua translocação nuclear. No núcleo, Nrf2 em conjunto com pequenas proteínas se liga ao elemento de resposta antioxidante, ativando a expressão de uma bateria de genes citoprotetores, como NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferases e Glutamyl Cysteine Ligase (γ GCL) (LEE et al., 2003).

Pesquisas relacionando o efeito do CLA na ansiedade ainda são escassas. Soares et al., (2013) utilizaram o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e encontraram diminuição do sintoma de ansiedade em animais que receberam dieta a base de leite de cabra, rico em CLA durante a gestação. Basiricò et al., (2017), afirmam que o CLA diminuiu estresse oxidativo em glândula mamária de vacas, isso mostra o potencial efeito deste lipídio no combate ao estresse oxidativo, o que pode ser uma alternativa na melhora do sintoma de ansiedade, uma vez que os dois estão relacionados.

Estudo realizado por Romero-Sarmiento et al. (2012) mostram que o consumo de CLA foi capaz de reduzir os danos oxidativos no fígado, medidos pelo Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), GPx, SOD e CAT. Com esse mecanismo proposto, sugere-se que o CLA possa restringir a progressão da esteatose hepática. O CLA reduz a disponibilidade de Ácidos Graxos não Esterificados (AGNE), um substrato importante para a síntese de TAG no fígado, aumentando sua oxidação e provavelmente reduzindo o fluxo do plasma, com uma diminuição concomitante do acúmulo de gordura.

2.4 CLA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

A ingestão excessiva de nutrientes maternos pode induzir distúrbios metabólicos, incluindo obesidade, esteatose hepática, intolerância à glicose e inflamação na prole. O impacto prejudicial pode durar a vida toda, principalmente quando combinado com estressores adicionais na idade adulta (FU et al., 2020).

A relação entre dieta materna e alterações metabólicas na prole já vem sendo estudada. Fornes et al. (2020) utilizaram modelo animal com Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e induziram diabetes nos filhotes utilizando Streptozotocin neonatal (nSTZ), os autores avaliaram se as dietas maternas adicionadas de azeite de oliva em ratos que desenvolveram DMG, melhoram as deficiências metabólicas lipídicas nos fígados fetais. Os efeitos observados foram dependentes do sexo e claramente benéficos, especialmente nos fetos masculinos de ratos com DMG, uma vez que essa dieta evita o aumento do conteúdo lipídico e o aumento dos níveis de Perilipins-2 (PLIN2) e Peroxisome proliferator-activated receptor gama (PPAR- γ) em seus fígados, alterações que provavelmente favorecem o metabolismo lipídico nos filhos em

momentos posteriores da vida.

A programação metabólica também já vem sendo realizada com CLA. Na prole de ratos machos, o conteúdo de CLA materno mostrou um efeito de programação nas vias metabólicas lipídicas e levou a um efeito preventivo no acréscimo de TAG nos tecidos adiposo e hepático (LAVANDERA et al., 2017). Em pintos recém-nascidos, a ingestão materna de CLA reduziu o TAG do fígado e o conteúdo total de gordura da carcaça (CHERIAN et al., 2005). No entanto, o mecanismo regulador do CLA materno no metabolismo lipídico permanece incerto. Sugere-se que o CLA da dieta reduza o acúmulo de gordura corporal e module o metabolismo lipídico, o que poderia ter um efeito de programação no metabolismo lipídico da prole (LAVANDERA et al., 2017). Outro estudo demonstrou que o CLA eleva a taxa metabólica de gordura inibindo a síntese de ácidos graxos e/ou acelerando a oxidação e lipólise de ácidos graxos (OBSEN et al., 2012). O CLA materno também pode diminuir a síntese lipídica hepática via sinalização com AMPK (FU et al., 2020). Estudos relataram que o CLA reduziu o desenvolvimento de esteatose hepática e induziu a oxidação lipídica ativando o PPAR α , um fator de transcrição envolvido no metabolismo lipídico no fígado (LAVANDERA et al., 2017; YU et al., 2012).

A partir dos trabalhos supracitados, é possível observar que o mecanismo de ação do CLA vem sendo estudado em doenças metabólicas, como diabetes e dislipidemia, assim como seu efeito também na obesidade, com diminuição de massa gorda e aumento de massa magra, o que faz com que este lipídio seja bastante consumido como suplemento alimentar por praticantes de atividade física. O CLA também tem mostrado efeito positivo no combate ao estresse oxidativo. Porém a maioria dos estudos não foram realizados em fases iniciais da vida, como gestação e lactação. Outro fator importante é que não há estudos comprovando a influência deste lipídio no comportamento de ansiedade em animais que receberam a gordura no período crítico de desenvolvimento, que é quando ocorre a formação do sistema nervoso central. Os estudos citados anteriormente ofertam quantidades de CLA em torno de 1%, porém estudos com doses maiores não são encontrados na literatura. Nosso estudo testou doses de 1%, como a maioria, mas além disso, uma dose maior de 3% para avaliar se os efeitos seriam melhores, ou prejudicariam os animais. Todas essas diferenças acrescentadas ao estudo, justificam a importância do mesmo, uma vez que não há trabalhos neste sentido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo é do tipo experimental, não clínico, no qual houve manipulação artificial por parte do pesquisador, administrando-se uma intervenção e observando-se seu efeito sobre o desfecho (NEDEL; SILVEIRA, 2016). Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Bromatologia (LABROM), Nutrição Experimental (LANEX) - CES/UFCG, Química dos Alimentos (LAQA) – CT/UFPB e Farmacologia/UFRN.

3.1 ANIMAIS E DIETAS EXPERIMENTAIS

Os filhotes utilizados na pesquisa foram obtidos de ratas da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério de criação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com idade entre 90 e 120 dias e peso de 250 ± 50 g. Foram utilizadas 9 fêmeas primíparas (3 por grupo) para obtenção dos neonatos, sendo mantida uma fêmea para cada macho durante o acasalamento.

Após confirmação da prenhes, através de esfregaço vaginal, as ratas gestantes foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão: temperatura de 22 ± 1 °C, com ciclo claro-escuro (12:00 h início da fase clara às 6:00 h), umidade relativa de $55 \pm 10\%$, recebendo ração e água *ad libitum*.

Na primeira semana de gestação as ratas receberam ração comercial (Presense - Purina®, São Paulo, Brasil), sendo a dieta experimental ofertada a partir do sétimo dia de gestação, quando se inicia a formação do sistema nervoso do animal e durante toda lactação. Durante este período, o peso corporal e consumo de ração das ratas mães foram mensurados. Três grupos foram formados: Grupo Controle (GC) (n=11), recebendo a dieta experimental contendo óleo de soja.; Grupo CLA1 (n=13), o qual recebeu a dieta experimental contendo 1% de CLA e o CLA3 (n=12), contendo 3% de CLA, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (REEVES.; NIELSEN.; FAHEY, 1993) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição da dieta controle e experimental.

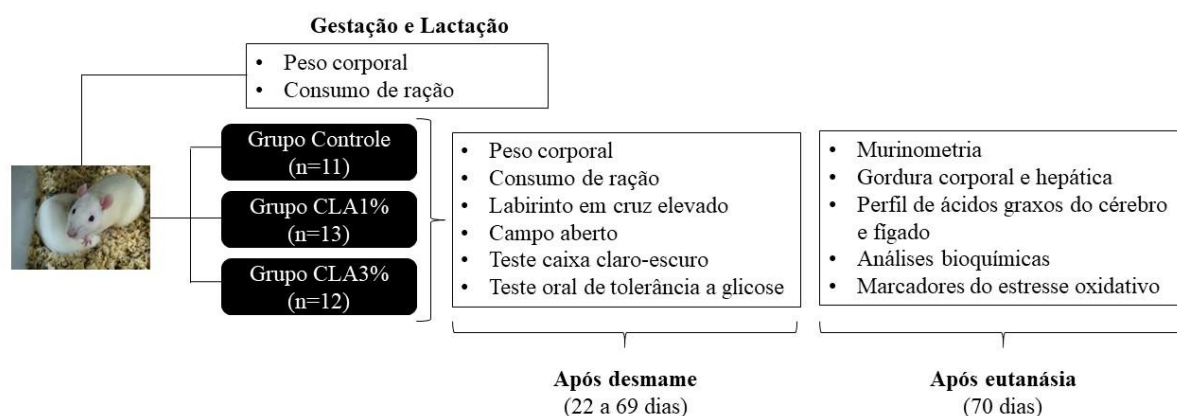
INGREDIENTES (g/kg)	DIETAS		
	GC	CLA1	CLA3
Amido de milho	530	520	500
Caseína	199,5	199,5	199,5
Sacarose	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70
Mix de isômeros de CLA	-	10	30
Fibra	50	50	50
Mix de mineral	35	35	35
Mix de vitamina	10	10	10
L-Cistina	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Total de calorias (kcal)	3,960	4,010	4,110

O mix de CLA utilizado foi da marca comercial Clarinol[®] Powder (Loders Croklaan, Roterdã, Holanda) contendo na composição *cis* - 9 *trans* - 11 (79,9%). A escolha da marca foi baseada em pesquisa que também utilizou esse mix de isômeros (BATTHACHARYA et al., 2005) e as dosagens de CLA foram determinadas a partir de estudos que utilizaram porcentagens semelhantes (BIALEK; JELINSKA, TOKARZ, 2015; FURLAN et al., 2013; HALADE; RAHMAN; FERNANDES, 2010; JELINSKA et al., 2017). Após o desmame, aos 21 dias de vida, os filhotes foram alojados em gaiola de polipropileno, sendo mantidos dois animais por gaiola, recebendo dieta comercial durante todo o experimento (Presense - Purina[®], São Paulo, Brasil). As ninhadas foram padronizadas em 6 filhotes e apenas os machos foram utilizados para obtenção dos dados. O peso corporal e o consumo de ração foram mensurados durante todo o experimento. A ingestão energética foi calculada como: (kcal / semana) = consumo alimentar médio (quantidade de dieta consumida durante toda a semana) x energia metabolizável da dieta (densidade energética da dieta) / 1000 (DINIZ et al., 2005).

Ao final da amamentação, as mães foram eutanasiadas por punção cardíaca. A pesquisa seguiu o protocolo experimental segundo as recomendações éticas do National Institute of

Health (Bethesda, USA, 2010) e a Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018, com relação aos cuidados com os animais. O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de laboratório da Universidade Federal da Paraíba n: 0407/13 (ANEXO A). A Figura 3 representa o desenho experimental do trabalho.

Figura 3. Desenho experimental



3.2 TESTES COMPOTAMENTAIS

3.2.1 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do LCE foi realizado conforme o descrito por Pellow e File (1986), onde o animal foi colocado no aparato que apresenta dois braços abertos medindo 50 cm x 10 cm cada, encontrando-se oposto uma ao outro e cruzados em ângulos retos por braços fechados (50 cm x 10 cm), com um quadrado central de 10 cm x 10 cm, elevando-se 50 cm do chão. A fabricação do aparato foi realizada pelos pesquisadores do grupo de pesquisa, conforme modelo da empresa San Diego Instruments (San Diego, EUA). O aparelho esteve localizado em uma sala de som atenuado, onde duas lâmpadas vermelhas de 60 W foram instaladas no telhado a uma altura de 2,5 m acima do labirinto.

Aos 35 dias de vida, os animais foram colocados, individualmente, na área central do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados e observados por 5 min. As sessões foram gravadas usando uma câmera Webcam da marca Multilaser, modelo Plug E Play 16Mp-wc045 (Extrema, Brasil), conectada a um computador. Os seguintes comportamentos foram

analisados no vídeo:

Tempo total gasto nos braços abertos; Tempo total gasto nos braços fechados; Número de entradas nos braços abertos; Número de entradas nos braços fechados; Tempo total gasto na área central. Estes parâmetros são utilizados para avaliar a ansiedade dos animais, pois quando o animal passa mais tempo em áreas que aparentam maior risco como os braços abertos e área central, há demonstração de menor ansiedade. O contrário acontece quando o animal se encontra nos braços fechados, quanto maior o tempo gasto nesse espaço maior o comportamento de ansiedade. Antes de cada troca de animal, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 10% e seguida seco com papel toalha (Figura 4).

Figura 4. Labirinto em Cruz Elevado

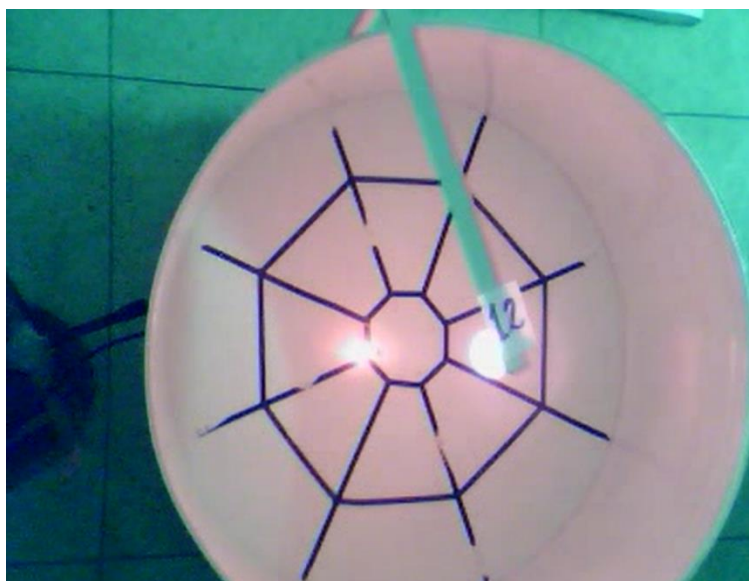


3.2.2 Teste do Campo aberto

O animal com 42 dias foi colocado no campo aberto, que consiste em uma arena circular metálica (de cor branca), delimitada por paredes brancas com a parte superior aberta. O piso da arena é dividido em 17 campos (com linhas pretas), sendo 3 círculos concêntricos que, por sua vez, são subdivididos em um total de 16 segmentos e um círculo central, conforme modelo da empresa San Diego Instruments (San Diego, EUA). O teste consistiu em colocar o animal no centro da arena circular do campo aberto para que o mesmo explorasse livremente o ambiente no tempo de 10 min.

Os parâmetros avaliados foram: atividade locomotora.; autolimpeza.; defecação; rearing. Os testes foram filmados por câmera Webcam da marca Multilaser, modelo Plug E Play 16Mp-wc045 (Extrema, Brasil), acoplada a um computador e em seguida avaliados. Após os testes de cada animal o aparato foi limpo com álcool a 10% (Figura 5).

Figura 5. Teste do Campo Aberto



3.2.3 Teste de transição claro-escuro

O teste consistiu em colocar o animal com 67 dias de vida em uma caixa contendo dois compartimentos: um claro e um escuro. A caixa de transição claro-escuro é feita de madeira, revestida de material impermeável, com dimensões totais de: 27 cm (A) x 45 cm (L) x 27 cm (C), que consiste em dois compartimentos, sendo o compartimento claro com dimensão maior (27 cm x 27 cm x 27 cm), e com o piso dividido em 9 quadrados (9 cm x 9 cm), e o compartimento escuro com menor dimensão (27 cm x 18 cm x 27 cm). Na divisória entre os dois compartimentos, há uma abertura central medindo 7 cm x 7 cm. Esta caixa possui ainda uma tampa superior, que é pintada de preto na extensão que cobre o compartimento escuro. O aparato foi fabricado pelos pesquisadores, conforme modelo da empresa San Diego Instruments (San Diego, EUA). Além disso, foi utilizada uma lâmpada para iluminar o compartimento claro, deixando o ambiente menos propício para o animal (Figura 6).

Durante o teste, o animal foi colocado no centro do compartimento claro com o focinho voltado para a entrada central. Uma câmera Webcam da marca Multilaser, modelo Plug E Play 16Mp-wc045 (Extrema, Brasil) foi posicionada para o compartimento claro, a fim de gravar a movimentação do animal nesse compartimento. Cada animal permaneceu 5 min na caixa. O

aparato foi limpo antes e depois de concluído o teste com álcool a 70° e papel higiênico e a cada troca de animal com álcool 10° e papel higiênico. Em seguida, os seguintes parâmetros para avaliar a ansiedade foram realizados:

- Latência para entrada no compartimento escuro – tempo que o animal gasta para entrar no compartimento escuro pela primeira vez; quanto mais tempo o animal leva para entrar no compartimento escuro, menor o comportamento de ansiedade.
- Número de transições entre os compartimentos claro e escuro – que deve ser considerado quando o animal atravessa para o compartimento com as quatro patas; quanto maior o número de transições, maior a exploração do local e menor a ansiedade.
- Tempo de permanência no compartimento claro – tempo gasto no compartimento claro; demonstra que o animal está menos ansioso.
- Tempo de permanência no compartimento escuro – que é medido subtraindo o tempo total do tempo de permanência no compartimento claro; quando o animal passa mais tempo no compartimento escuro acredita-se que sua ansiedade é maior, uma vez que este espaço permite maior segurança.
- Ambulação – quantidade de quadrantes que o animal ambula no compartimento claro; permite avaliar o nível de exploração e consequentemente redução da ansiedade.

Figura 6. Teste de transição claro-escuro



3.3 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG)

Um dia anterior à eutanásia, foi medido o teste oral de tolerância à glicose dos animais após 10 h de jejum. Para tanto, foi coletado o sangue no tempo zero (0), em seguida administrado a cada animal uma solução de 10% de glicose e novamente coletado o sangue nos tempos 30, 60 e 90 min. A glicemia foi analisada por glicosímetro AccuChek Active® (Roche, Alemanha) (SIEMELINK et al., 2002). A área sob a curva de glicose (AUC) foi calculada por aproximação trapezoidal dos níveis de glicose plasmática (GP). Os níveis de GP em x min foram definidos como GP (x), e PG-AUC foi calculado de acordo com Wolever et al. (1991).

$$= \frac{GP(0) + GP(30) \times 2 + GP(60) \times 3 + GP(90) \times 2}{4}$$

3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Ao atingirem 70 dias de vida e após jejum de seis horas, os animais da prole foram anestesiados com cloridrato de ketamina e xilasina (1 mg/kg de peso corporal), que correspondeu a uma dose de 50 mg/kg de peso de cloridrato de Ketamina e 20 mg/kg de peso de Cloridrato de xilasina, por via peritoneal. A eutanásia aconteceu por punção cardíaca e o sangue coletado foi utilizado para determinações bioquímicas. As fêmeas foram eutanasiadas ao final da lactação. O fígado e o cérebro foram divididos em porções, onde padronizou-se o lóbulo esquerdo do fígado para medir atividade antioxidante e o direito para análise do perfil de ácido graxo e gordura total. Já o cérebro, o hemisfério direito foi utilizado para análise do perfil de ácido graxo e o esquerdo para atividade antioxidante.

3.5 AVALIAÇÃO MURINOMÉTRICA E GORDURA VISCERAL

Após anestesia foram medidos: peso corporal, comprimento do corpo, circunferência abdominal e torácica e Índice de Massa Corporal (NOVELLI et al., 2007) da prole aos 70 dias (Figura 7). A gordura retroperitoneal, mesentérica e epididimal foram retiradas com auxílio de tesoura e bisturi após pequena incisão no tórax dos animais, em seguida foram pesadas (CINTI, 2005). O índice de adiposidade foi calculado pela razão: (*gordura corporal total* /

peso corporal final) $\times 100$.

3.6 AVALIAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA

O fígado foi retirado após eutanásia e 2 g do tecido foi pesado e colocado em becker de 100 mL, em seguida foram adicionados 30 mL de clorofórmio/metanol (2:1). A mistura foi homogeneizada por cerca de 2 min e despejada em funil posicionado em proveta de 50 mL para filtração em papel de filtro comum. Foi calculado e adicionado sulfato de sódio a 1,5% na amostra, agitado vigorosamente e deixado em repouso por alguns minutos para a separação das fases. A fase superior foi descartada e 5 mL foram retirados da fase inferior (clorofórmio e lipídios) e colocados em becker de 100 mL, previamente pesados e codificados. Os beckers foram colocados em estufa a 105 °C para evaporação do solvente. Em seguida foram novamente pesados para quantificação de ácidos graxos (FOLCH.; LESS.; SLOANE-STANLEY, 1957).

3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E CÉREBRO

Amostras do fígado e cérebros foram enviadas para o Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar (DPASA) na Universidade de Lisboa, Portugal, para análise de composição de ácidos graxos.

Os ácidos graxos do fígado foram analisados na forma de ésteres metílicos. Para a extração e metilação utilizou-se o método de transesterificação direta, em que se fez reagir 200 mg de fígado liofilizado com 3 mL de metóxido de sódio a 0,5 N em metanol durante 30 min a 50 °C seguida de reação com 2 mL de ácido clorídrico a 1,25 M em metanol durante 20 min a 80 °C. Os ácidos graxos foram extraídos com hexano e o extrato foi seco com sulfato de sódio anidro PA. No início da transesterificação adicionou-se 1 mg de C19:0 que foi utilizado como padrão interno. Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização de chama (GC-FID), utilizando-se um equipamento Shimadzu QP2010-plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SP-2560, 100 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,20 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Durante a análise o injetor e o detector foram mantidos a 220 °C e 250 °C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 mL/min e foi injetada 1 μ L de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50 °C (mantida durante 1 min), aumentou depois a 50 °C/min até aos 150 °C (mantida durante 20 min), aumentou a 1 °C/min até aos 190 °C (mantida durante 1

min) e finalmente aumentou-se a 2 °C/min até aos 220 °C onde foi mantida durante 30 min. A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação com padrões comerciais (FAME mix 37 components, Supelco Inc., Bellefont, PA, USA). Adicionalmente, foi feita a confirmação da identificação dos ácidos graxos por espectrometria de massa utilizando um equipamento Shimadzu GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão). As condições do GC foram semelhantes às utilizadas no GC-FID e as condições do MS foram: temperatura da fonte de ionização, 200 °C; temperatura da interface, 220 °C; energia de ionização, 70 e V.

3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue foi coletado por punção cardíaca com auxílio de uma seringa de 10 mL, colocado em tubos de ensaio e posteriormente centrifugado em centrífuga clínica 80-2B da marca Centribio® (República Popular, China), a 14.616 *xg* por 15 min. Após centrifugação, medidas de glicose ($\lambda=505$ nm), colesterol total (CT) ($\lambda=500$ nm), TAG ($\lambda=505$ nm) e HDL-colesterol ($\lambda=500$ nm) foram realizadas pelo método enzimático de Trinder (Labtest-Diagnosis, St. Louis, EUA), utilizando espectrofotômetro Bel Espectro S05 da marca Bel Photonics® (Milão, Itália).

3.9 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.9.1 Concentração de Glutathiona

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada pelo método descrito por Anderson (1985). Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido. As amostras foram congeladas com 1 mL de ácido tricloroacético e depois descongeladas e cortadas em pedaços menores com uma tesoura durante 15 seg em uma placa gelada. A suspensão resultante foi subsequentemente diluída até uma proporção final 1:20 (w/v) e homogeneizada durante 2 min com um homogeneizador automático de Potter e centrifugada a 2000 *xg* a 4 °C durante 5 min. Os sobrenadantes foram então centrifugados a 9000 *xg* a 4 °C durante 5 min. Posteriormente, foram utilizados para determinar a glutathiona total. A forma oxidada (GSSG) da oxidação total da Glutathiona reduzida (GSH) presente numa amostra ocorre através da sua incubação com ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). A GSSG que é gerada é reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH que é formado novamente se oxida, resultando em um ciclo contínuo, no qual a taxa de redução de DTNB é proporcional à

quantidade total de glutathiona (GSH + GSSG), com o consequente aumento da absorbância a 412 nm. Os resultados foram expressos como glutathiona nmol/g tecido (Figura 7).

3.9.2 Determinação do Conteúdo de Malonaldeído (MDA)

A determinação do conteúdo de MDA foi realizada pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990) no cérebro e fígado. As amostras foram suspensas em tampão Tris HCl 1:5 (w/v) e picadas com tesoura durante 15 seg em uma placa gelada. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 min com um homogeneizador automático de Potter e centrifugada a 2500 $\times g$ e 4 °C durante 10 min. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar o teor de MDA. O MDA é um produto final da peroxidação lipídica e é um parâmetro utilizado para quantificar o aumento dos radicais livres nos tecidos. Os resultados foram expressos como MDA nmol/g tecido (Figura 7).

Figura 7. Análise da concentração de glutathiona e MDA nos tecidos



3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média e erro padrão. O tamanho da amostra foi calculado por randomização e foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para a análise

dos dados foi aplicado o teste One way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, utilizando o programa – Sigma Stat 3.1. Systat Software, Inc., San José, CA, USA. A hipótese nula foi de 5%.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M.H.; EL-SHAFIE, K.; SHARAF, O.M.; EFFAT, B.A.; ASEM, F.; EL-AASAR, M. Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability to synthesis conjugated linoleic acid. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 62–69, 2010.
- ALFAIA, C. M.; ALVES, S. P.; LOPES, A. F.; FEMANDES, M. J. E.; COSTA, A. S. H.; FONTES, C. M. G. A.; CASTRO, M. L. F.; BESSA, R. J. B.; PRATES, J. A. M. Effect of cooking methods on fatty acid, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. **Meat Science**, v. 84, p.769–777, 2010.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista MN-Metabolica**, v. 8, p. 135-143, 2006.
- AYDIN, B.; ŞEKEROĞLUB, Z. A.; ŞEKEROĞLU, V. Effects of whey protein and conjugated linoleic acid on acrolein-induced cardiac oxidative stress, mitochondrial dysfunction and dyslipidemia in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 901–907, 2018.
- BANNI, S.; DAY, B.W.; EVANS, R.W.; CORONGIU, F. P.; LOMBARDI, B. Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed a choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 6, p. 281–289, 1995.
- BANNI, S.; ANGIONI, E.; CASU, V.; MELIS, M.P.; CARTA, G.; CORONGIU, F.P.; THOMPSON, H.; IP, C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.20, p. 1019–1024, 1999.
- BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999. Disponível em: <<http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/CLA.pdf>>. Acesso em: 11 de julho de 2015.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, n. 23, p. 203–227, 2003.
- BAUMAN, D. E.; J. W. I. PERFIELD, K. J. HARVATINE.; L. H. BAUMGARD. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 403–409, 2008.
- BARALDI, F. G.; VICENTINI, T. M.; TEODORO, B. G.; DALALIO, F. M.; DECHANDT, C. R. P.; PRADO, I. M. R.; CURTI, C.; CARDOSO, F. C.; UYEMURA, S. A.; ALBERICI, L. C. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 147–154, 2016.

BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; TRÖSCHER, A.; BERNABUCCI, U. Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2299-2309, 2017.

BERDEAUX, O.; VOINOT, L.; ANGIONI, E.; JUANEDA, P.; SEBEDIO GELÉIA, J. L. **Oil Chemists Society**, v. 75, p. 1749 – 1755, 1998.

BIAŁEK, A.; JELINSKA, M.; TOKARZ, A. Influence of maternal diet enrichment with conjugated linoleic acids on lipoxygenase metabolites of polyunsaturated fatty acids in serum of their offspring with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced mammary tumors. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 116–117, p. 10–18, 2015.

BHATTACHARYA, A.; RAHMAN, M. M.; SUN, D.; LAWRENCE, R.; MEJIA, W.; MCCARTER, R.; O'SHEA, M.; FERNANDES, G. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain, In body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1124–1130, 2005.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J., RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 789-810, 2006.

CERMENATI, G.; MITRO, N.; AUDANO, M.; MELCANGI, R. C.; CRESTANI, M.; FABIANI, E.; CARUSO, D. Lipids in the nervous system: From biochemistry and molecular biology to patho-physiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, 51–60, 2015.

CHERIAN, G., W. AI AND, AND M. P. GOEGER. Maternal dietary conjugated linoleic acid alters hepatic triacylglycerol and tissue fatty acids in hatched chicks. **Lipids**, v. 40, n. 2, p. 131–136, 2005.

CHINNADURAI, K.; KANWAL, H. K.; TYAGI, A. K.; STANTON, C.; ROSS, P. High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n.121, 2013.

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

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Dispõe sobre a Diretriz da Prática de Eutanásia do Concea, na forma do Anexo a esta Resolução Normativa. Resolução Normativa CONCEA nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

CORDERO, G.; ISABEL, B.; MORALES, J.; MENOYO, D.; PINEIRO, C.; LOPEZ-BOTE, C.J. Effect of dietary CLA administration on fatty acid composition and lipogenic and lipolytic enzyme activities in suckling and weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 164, p. 232–240, 2011.

DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; GALHARDI, M. C.; RODRIGUES, H. G.; EBAID, G. X.; BURNEIKO, R. C.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI, E. L B. Monosodium glutamate in

standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. **Nutrition**, v. 21, p. 749, 2005.

ERCAN, A. C.; BAHCECI, B.; POLAT, S.; CENKER, O. C.; BAHCECI, I.; KOROGU, A.; SAHIN, K.; HOCAOGLU, C. Oxidative status and prolidase activities in generalized anxiety disorder. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 25, p. 118–122, 2017.

ERIKSEN, E.K.; VEGARUD, G.E.; LANGSRUD, T.; Effect of milk proteins their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v.79, p. 29–37, 2008

ESTERBAUER, M.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonyldialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FA, M.; DIANA, D.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MELIS, M. P.; MURRU, E.; SOGOS, V.; BANNI, S. Incorporation and metabolism of c9, t11 and t10, c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1736, p.61 – 66, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 226, n.1, p.497-509, 1957.

FORNES, D.; RIBOT, D. G.; HEINECKE, F.; ROBERTI, S. L.; CAPOBIANCO, E.; JAWERBAUM, A. Maternal diets enriched in olive oil regulate lipid metabolism and levels of PPARs and their coactivators in the fetal liver in a rat model of gestational diabetes mellitus. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 78, p. 108334, 2020.

FU, C.; ZHANG, Y.; YAO, Q.; WEI, X.; SHI, T.; YAN, P.; LIU, X. Maternal conjugated linoleic acid alters hepatic lipid metabolism via the AMPK signaling pathway in chick embryos. **Poultry Science**, v. 99, p. 224–234, 2020.

FURLAN, C. P. B.; MARQUES, A. C.; MARINELI, R. S.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. **Food Research International**, v. 51, p. 429–435, 2013.

GE, J.; WANG, J.; XUE, D.; ZHU, Z.; CHEN, Z.; LI, X.; SU, D.; DU, J. Why does a high-fat diet induce preeclampsia-like symptoms in pregnant rats. **Neural regeneration research**, v. 8, n. 20, p. 1872, 2013.

GUNEY, E.; CEYLAN, M. F.; TEKTAS, A.; ALISIK, M.; ERGIN, M.; GOKER, Z.; DINC, G. S.; OZTURK, O.; KORKMAZ, A.; EKER, S.; KIZILGUN, M.; EREL, O. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 62–66, 2014.

GRAVES, E.; HITT, A.; PARIZA, M. W.; COOK, M. E.; MCCARTHY, D. O. Conjugated linoleic acid preserves gastrocnemius muscle mass in mice bearing the colon-26 adenocarcinoma. **Research in Nursing Health**, v. 28, n. 1, p. 48-55, 2005.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: YURAWECZ, M. P.; MOSSOBA, M. M.;

KRAMER, J. K. G.; PARIZA, M.W.; NELSON, G. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL, p.180–200, 1999.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL G. S. Mecanismos inflamatórios na obesidade. **Review of Immunology**, v. 29, p. 415 – 445, 2011.

GROTTO D.; VICENTINI J.; ANGELI, J. P. F.; LATORRACA, E. F.; MONTEIRO, P. A. P.; BARCELOS, G. R. M.; SOMACAL, S.; EMANUELLI, T.; BARBOSA JR, F. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 487–493, 2011.

HALADE, G. V.; RAHMAN, M. M.; FERNANDES, G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 332–337, 2010.

HARFOOT, C. G.; HAZELWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: P. N, HOBSON (ed.), **The rumen microbial ecosystem**, Elsevier, 1988. 527p.

HASSAN, W.; SILVA, C. E.; MOHAMMADZAI, I. U.; ROCHA, J.B., J, L. F. Association of oxidative stress to the genesis of anxiety: implications for possible therapeutic interventions. **Current Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 120–139, 2014.

HAXAIRE, C.; TURPIN, F. R.; POTIER, B.; KERVERN, M.; SINET, P. M., BARBANEL, G.; MOTHET, J. P.; DUTAR, P.; BILLARD, J. M. Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting D-serine-dependent NMDA receptor activation. **Aging Cell**, v. 11, p. 336–344, 2012.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, G.; ALEXANDER-AGUILERA, A.; ARZABA-VILLALBA, A.; SOTORODRÍGUEZ, I.; GARCÍA, G. Effect of conjugated linoleic acid on body fat, tumornecrosis factor alpha and resistin secretion in spontaneously hypertensive rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, p. 105–109, 2010.

HOSONO, T.; NISHITSUJI, K.; NAKAMURAA, T.; JUNG, C.; KONTANI, B.; TOKUDA, H.; KAWASHIMA, H.; KISO, Y.; SUZUKI, T.; MICHIKAWA, M. Arachidonic acid diet attenuates brain A β deposition in Tg2576 mice. **Brain Research**, v. 1 6 1 3, p. 9 2 – 9 9, 2015.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 261–275, 2010.

HUANG, Y., SCHOONMAKER, J. P.; OREN, S. L.; TRENKLE, A.; BEITZ, D. C. Calcium salts of CLA improve availability of dietary CLA. **Livestock Science**, v. 122, p. 1–7, 2009.

HUNT, W. T.; KAMBOJ, A.; ANDERSON, H. D.; ANDERSON, C. M. Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. **Journal of Neurochemistry**, v.115, p.123–130, 2010.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, v. 110, p. 221–229, 2007.

HUR, S. J.; KIMA, H. S.; BAHKB, Y. Y.; PARK, Y. Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. **Livestock Science**, v. 195, p. 105–111, 2017.

ISHIKAWA, H.; GUO, X.; SUGAWARA, S.; IWAGAKI, Y.; YAMAMOTO, K.; KONNO, A.; NISHIUUCHI, M.; TSUDUKI, T. Influence of Japanese diet consumption during pregnancy and lactation on lipid metabolism in offspring. **Nutrition**, v. 58, p. 69-76, 2019.

JELIŃSKA, M.; BIAŁEK, A.; MOJSKA, H.; GIELECINŚK, I.; TOKARZ, A. Effect of conjugated linoleic acid mixture supplemented daily after carcinogen application on linoleic and arachidonic acid metabolites in rat serum and induced tumours. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 2230–2236, 2014.

JELIŃSKA, M.; BIAŁEKA, A.; GIELECINŚKA, I.; MOJSKA, H.; TOKARZ, A. Impact of conjugated linoleic acid administered to rats prior and after carcinogenic agent on arachidonic and linoleic acid metabolites in serum and tumors. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 126, p. 1–8, 2017.

JOFFREA, C.; DINEL, A. L.; AUBERT, A.; FRESSANGE-MAZDA, C.; LE RUYET, P.; LAYÉ, S. Impact of *Lactobacillus fermentum* and dairy lipids in the maternal diet on the fatty acid composition of pups' brain and peripheral tissues. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 15, p. 24–34, 2016.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; SCHMIDT, S.; MANDRUP, S.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21 p. 171-179, 2010.

KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 8, p. 525-532, 2014.

KHANAL, R. C.; DHIMAN, T. R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. **Journal of Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 72-81, 2004.

LAVANDERA, J. C. D.; GERSTNER, J.; SAÍN, A. C.; FARIÑA, M. A.; GONZÁLEZ, C. A. BERNAL. Maternal conjugated linoleic acid modulates TAG metabolism in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v.118, n. 11, p. 906–913, 2017.

LEE, H. Y.; PARK, J. H.; SEOK, S. H.; BAEK, M. W.; KIM, D. J.; LEE, K. E.; PAEK, K. S.; LEE, Y.; PARK, J. H. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. **BBA Molecular Cell Biology L**, v. 1761, p.736–744, 2006.

LEE, J. M.; CALKINS, K. M. J.; CHAN, K.; KAN, Y. W.; JOHNSON, J. A. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 12029–12038, 2003.

LIU, S.; WANG, Z.; XUB, X.; DINGB, Y.; GUOB, Z. Production of conjugated linoleic acid- rich cottonseed oil bysupported Ru catalyzed isomerization. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 10–20, 2017.

LIN, G.; WANG, H.; DAI, J.; LI, X.; GUAN, M.; GAO, S.; DING, Q.; WANG, H.; FANG, H. Conjugated linoleic acid prevents age-induced bone loss in mice by regulating both osteoblastogenesis and adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, p. 813-820, 2017.

MADORE, C.; NADJAR, A.; DELPECH, J. C.; SERE, A.; AUBERT, A.; PORTAL, C.; JOFFRE, C.; LAYÉ, S. A deficiência nutricional de PUFA n-3 durante o período perinatal altera o sistema imunológico inato e o cérebro associados aos genes de plasticidade neuronal. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 13, p. 0889 – 1591, 2014.

MANSO, T.; GALLARDO, B.; GUERRA-RIVAS, C. Modifying milk and meat fat quality through feed changes. **Small Ruminant Research**, v. 142, p. 31–37, 2016.

MATSUMATA, M.; INADA, H.; OSUMI, N. Fatty acid binding proteins and the nervous system: Their impact on mental conditions. **Neuroscience Research**, v.102, p.47–55, 2016.

NEDEL, W. L.; SILVEIRA, F. Os diferentes delineamentos de pesquisa e suas particularidades na terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 28, n. 3, p. 256-260, 2016.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.X. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**. v.41, n.1, p.111-119, 2007.

OBSER, T.; FAERGEMAN, N. J.; CHUNG, S.; MARTINEZ, K.; GOBERN, S.; LOREAU, O.; WABITSCH, M.; MANDRUP, S.; MCINTOSH, M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, v.23, p. 580–590, 2012.

OLIVEIRA, M.R.; SILVESTREIN, R.B.; MELLO, E.; SOUZA, T.; MOREIRA, J.C. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. **Neurotoxicology**, n.6, p.1191–9, 2007.

PARIZA, M. W.; HARGRAVES, M. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a) anthracene. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 591–3, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

POULSON, C. S.; DHIMAN, T. R.; URE, A. L.; CORNFORTH, D.; OLSON, K.C. Conjugated linoleic acid content of beef from cattle fed diets containing high grain, CLA, or raised on forages. **Livestock Production Science**, v. 91, p.117–128, 2004.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R. G.; BISCOTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.430-437, 2007.

QUEIROZ, M. P.; LIMA, M. S.; MELO, M. F. F. T.; BERTOZZO, C. C. M. S.; ARAÚJO, D. F.; GUERRA, G. C. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOARES, J. K. B. Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain. **Journal of Affective Disorders**, v. 243, p. 75 – 82, 2019.

RAI, S.; KAMAT, P.K.; NATH, C.; SHUKLA, R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 254, p. 1–9, 2013.

RAHMAN, M. M.; HALADE, G. V.; EL JAMALI, A.; FERNANDES, G. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents age-associated skeletal muscle loss. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 4, p. 513-518, 2009.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN- 93. Purified diers for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition and hoe writing comitee on the reformulation of the American Institute of Nutrition (AIN) -76^a rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. p.1939-1951, 1993.

RENES, E.; LINARES, D. M.; GONZÁLEZ, L.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E.; STANTON, C. Study of the conjugated linoleic acid synthesis by Lactobacillus strains and by different co-cultures designed for this ability. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 74–80, 2017.

ROMERO-SARMIENTO, Y.; SOTO-RODRÍGUEZ, I.; ARZABA-VILLALBA, A.; GARCÍA, H. S.; ALEXANDER-AGUILERA, A. Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Functional Foods**, v. 4. P. 219-225, 2012.

SABEN, J. L.; BALES, E. S.; JACKMAN, M. R.; ORLICKY, D.; MACLEAN, P. S.; MCMANAMAN, J. L. Maternal obesity reduces milk lipid production in lactating mice by inhibiting acetyl-CoA carboxylase and impairing fatty acid synthesis. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e98066, 2014.

SALGADO, J. M.; FERREIRA, T. R. B.; DONADO-PESTANA, C. M.; ALMEIDA, O. C.; NEVES, A. M. R.; MANSI, D. N.; DIAS, C. T. S. Conjugated Linoleic Acid Combined with Physical Activity Reduces Body Fat Accumulation but Does Not Modify Lean Body Mass in Male and Female Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 4, p. 406-412, 2012.

SALIM, S.; SARRA, N. J.; TANEJA, M.; SAHA, K.; TEJADA-SIMON, M. V.; CHUGH, G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p.545–552, 2010.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA, M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; VU, A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. **Brain Research**, v.1404, p.63–71, 2011.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2016.

SALVATI, S.; ATTORRI, L.; BENEDETTO, R.; BIASE, A.; LEONARDI, F.

Polyunsaturated Fatty Acids and Neurological Diseases. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, p.1201-1211, 2006.

SANGHYUN.; KIM, K. The effects of exercise and conjugated linoleic acid intake on IGF-1 and pro-inflammatory cytokines in atrophied skeletal muscle of rats. **Integrative Medicine Research**, v. 2, n. 4, p. 166-173, 2013.

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

SCHIAVON, S.; DE MARCHI, M.; TAGLIAPIETRA, F.; BAILONI, L.; CECCHINATO, A.; BITTANTE, G. Effect of high or low protein ration combined or not with rumen protected conjugated linoleic acid (CLA) on meat CLA content and quality traits of double muscled Piemontese bulls. **Meat Science**, v. 89, p.133–142, 2011.

SEGOVIA, S. A.; VICKERS, M. H.; ZHANG, X. D.; GRAY, C.; REYNOLDS, C. M. Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalizes the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 1448–1457, 2015.

SIEBER, R.; COLLOMB, M.; AESCHLIMANN, A.; JELEN, P.; EYER, H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products-a review. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 1–15, 2004.

SIKORSKI, A. M.; HEBERT, N.; SWAIN, R. A. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain. **Brain Research**, v.40, p. 35 – 40, 2008.

SIURANA, A.; CALSAMIGLIA, S. A metaanalysis of feeding strategies to increase the contentof conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. **Animal Feed Science and Technology**, v. 217, p. 13–26, 2016.

SOARES, J. K. B.; MELO, A. P. R.; MEDEIROS, M. C.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BOMFIM, M. A. D.; SANTIAGO, E. C. A.; GUEDES, R. C. A. Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: Na elevated plus maze analysis. **Neuroscience Letter**, v. 552, p. 25–29, 2013.

SOARES, J. K. B.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; MEDEIROS, M. C.; QUEIROGA, R. C.R.E.; BOMFIM, M. A. D.; SOUZA, A. F. O.; NASCIMENTO, A. L. V. GUEDES, R. C. A. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1490–1495, 2012.

STEENKAMP, L. R.; HOUGH, C. M.; REUS, V. I.; JAIN, F. A.; EPEL, E. S.; JAMES, S. J.; MORFORD, A. E.; MELLON, S. H.; WOLKOWITZ, O. M.; LINDQVIST, D. Severity of anxiety– but not depression– is associated with oxidative stress in Major Depressive Disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, p. 193–200, 2017.

SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M.M. Inflammation resolution: what controls its onset? **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 160, 2016.

TANG, M.; ZHANG, M.; WANG, L.; LI, H.; CAI, H.; DANG, R.; JIANG, P.; LIU, Y.; XUE, Y.; WUA, Y. Maternal dietary of n-3 polyunsaturated fatty acids affects the neurogenesis and neurochemical in female rat at weaning. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 128, p. 11–20, 2018.

TEIXEIRA, A.M.; TREVIZOL, F.; COLPO, G.; GARCIA, S. C. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, n.88, p.465– 472, 2008.

TEIXEIRA, A.M.; PASE, C.S.; BOUFLEUR, N.; ROVERSI, K.; BARCELOS, R. C.; BENVEGNÚ, D. M.; SEGAT, H. J.; DIAS, V. T.; RECKZIEGEL, P.; TREVIZOL, F.; DOLCI, G. S.; CARVALHO, N. R.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B.; EMANUELLI, T.; BÜRGER, M. E. Exercise affects memory acquisition, anxiety-like symptoms and activity of membrane-bound enzyme in brain of rats fed with different dietary fats: impairments of *trans* fat. **Neuroscience**, n.195, p.80–88, 2011.

VAN, A. L.; SAKAYORI, N.; HACHEM, M.; BELKOUCH, M.; PICQ, M.; LAGARDE, M.; OSUMI, N.; BERNOUD-HUBAC, N. Mechanisms of DHA transport to the brain and potential therapy to neurodegenerative disease. **Biochimie**, v. 130, p.163-167, 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: CORNELL UNIVERSITY, 1994, 476p.

VELZEN, L. S. V.; MADELIEFWIJDEVELD.; BLACK, C.N.; TOL, M. J. V.; NIC J. A., VAN DER WEE.; N. J. A. V. D., VELTMAN, D. J., PENNINX, B. W. J. H.; SCHMAAL, L. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. *Prog Neuro psycho pharmacol*. **Biology Psychiatry**, v. 76, p.140–144, 2017.

WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, 2010

WANG, D.; ZHANG, L.; WEN, .M; DU, L.; GAO, X.; XUE, C.; XU, J.; WANG, Y. Enhanced neuroprotective effect of DHA and EPA-enriched phospholipids against 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced oxidative stress in mice brain. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 385–396, 2016.

WOLEVER, T. M.; JENKINS, D. J.; JENKINS, A. L.; JOSSE, R. G. The glycemic index: methodology and clinical implications. **The American Journal of Nutrition**, v. 54, p. 846, 1991.

YAN, B.; GUO, J.; LIU, X.; LI, J.; YANG, XU.; MA, P.; WU, Y. Oxidative stress mediates dibutyl ph thalate induced anxiety-like behavior in Kunming mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 45–51, 2016.

YU, J.; YU, B.; JIANG, H.; CHEN, D. Conjugated linoleic acid induces hepatic expression of fibroblast growth factor 21 through PPAR- α . **British Journal of Nutrition**, v.107, p. 461–465, 2012.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão apresentados em forma de dois Artigos Científicos originais que foram submetidos a periódicos de alto fator de impacto.

ARTIGO I: Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain.

(Publicado no periódico: Journal of Affective Disorders. Fator de impacto: 4.084 - Qualis A2)

ARTIGO II: Maternal consumption of conjugated linoleic acid improves tolerance to glucose and HDL-cholesterol in the rat progeny.

(Submetido ao periódico: Food & Function. Fator de impacto: 4.171 - Qualis A1)

ARTIGO I

MATERNAL SUPPLEMENTATION WITH CONJUGATED LINOLEIC ACID
REDUCE ANXIETY AND LIPID PEROXIDATION IN THE OFFSPRING BRAIN.

(Publicado no periódico: Journal of Affective Disorders. **Fator de impacto:** 4.084 - **Qualis**
A2)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Affective Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jad

Research paper

Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain



Michelly Pires Queiroz^{a,*}, Martiniano da Silva Lima^b, Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo^b, Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo^b, Daline Fernandes de Araújo^d, Gerlane Coelho Bernardo Guerra^d, Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga^{a,c}, Juliana Késsia Barbosa Soares^{a,b}

^a Program of Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa, PB 58051-065, Brazil

^b Laboratory of Experimental Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Campina Grande, Cuité, CG, Brazil

^c Laboratory of Biotechnology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^d Department of Biofísica and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Gestation and lactation

Omega 3

Polyunsaturated fatty acids

Antioxidants

ABSTRACT

Background: Maternal consumption of fatty acids can alter neuronal membrane function, synaptic connections, and protect the brain from alterations caused by disturbances such as lipid peroxidation and anxiety in the offspring. We aimed to investigate how the maternal consumption of conjugated linoleic acid (CLA) interferes in anxiety behavior of the offspring and cerebral lipid peroxidation.

Methods: Three groups were formed: control (CG) - diet without CLA; CLA1 - diet containing 1% of CLA; and CLA3 - diet containing 3% of CLA. These diets were offered to the mothers from the 7th day of gestation until the end of lactation. The following behavioral tests were used: Elevated plus maze (EPM), Open Field (OF) and Light-dark Box (LDB). Levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione were measured in the offspring's brains. Data were analyzed by ANOVA followed by the Holm-Sidak post-test or the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

Results: CLA1 and CLA3 showed higher number of entries in the open arms and time spent in the central area in EPM, they translocated and ambulated more in the clear area of the LDB and presented more rearing in the OF compared to CG ($p < 0.05$); moreover, they presented higher concentration of glutathione and lower MDA in brain tissue ($p < 0.05$).

Limitations: We evaluated the effect of maternal consumption of CLA on anxiety and lipid peroxidation in rats' offspring, but a similar study should be performed in humans.

Conclusions: Maternal intake of CLA induced a decrease in the parameters of anxiety and cerebral lipid peroxidation in the offspring.

1. Introduction

The maternal diet during pregnancy alters the development of the offspring's brain and their subsequent behavior. The formation of the nervous system occurs during gestation and lactation. This phase is known as the "critical period of development". During this period, the processes of neurogenesis, gliogenesis, cell migration and differentiation, myelinogenesis, formation of synapses, as well as the synthesis and the release of neurotransmitters occur (Madore et al., 2014).

the maternal diet are driven to the maternal liver and are easily transferred to the placenta, involving fatty acid transport and binding proteins. During pregnancy, the fetus can desaturate and elongate essential fatty acids. However, for this to occur, it is necessary that the fatty acids must be supplied in the diet. (Herrera, 2002; Hanebutt et al., 2008).

A lipid composition of neuronal membranes influences a subjective perception. Emotional behavior is substantially regulated by the membrane barrier and synaptic connection yield, and it may cause

ARTIGO II

MATERNAL CONSUMPTION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IMPROVES
TOLERANCE TO GLUCOSE AND HDL-CHOLESTEROL IN THE RAT PROGENY
(**Submetido ao periódico:** Food & Function. **Fator de impacto:** 4.171 - **Qualis A1**)

MATERNAL CONSUMPTION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IMPROVES TOLERANCE TO GLUCOSE AND HDL-CHOLESTEROL IN THE RAT PROGENY

Michelly Pires Queiroz^{a*}; Martiniano da Silva Lima^b; Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo^b; Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga^{ac}; Rui José Branquinho Bessa^d; Susana Paula Almeida Alves^d; Juliana Késsia Barbosa Soares^{ab}

^aProgram of Food Science and Technology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil;

^bLaboratory of Experimental Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Campina Grande, Cuité, CG, Brazil;

^cLaboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil;

^dCentre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

*corresponding author: queiroz_m.p@hotmail.com. Food Science and Technology Program, Federal University of Paraiba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58051-085.

Abstract

Our study evaluates the impacts of maternal consumption of different levels of CLA during pregnancy and lactation on physical and metabolic changes in the rat progeny. Three groups were formed: control (CG) - diet without CLA; CLA1 - diet containing 1% CLA; and CLA3 - diet containing 3% CLA. Murinometry, body fat collection, biochemical analysis, glycemic curves, liver fat, and fatty acid profiles of the liver were performed. The data were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey test ($p < 0.05$). The CLA3 group presented highest body weight, feed intake and BMI ($p < 0.05$). The retroperitoneal fat, epididymal fat, and body fat index were higher in the CLA1 and CLA3 groups ($p < 0.05$) but no difference was observed for mesenteric fat. Yet in contrast, the experimental groups presented lower abdominal circumference and glycemic curves when compared to the CG ($p < 0.05$). CLA1 and CLA3 groups presented higher values of total cholesterol and HDL-cholesterol ($p < 0.05$), yet no difference was found in serum triglycerides or LDL. The CLA3 group presented less n-3, n-6, total PUFA, and arachidonic acid in liver fat ($p < 0.05$). The CLA1 and CLA3 groups were higher in total MUFA in the liver fat. In conclusion, CLA when consumed during gestation and lactation increased: tolerance to glucose, HDL, and the body fat index in the offspring. Only the CLA3 group presented reduced total PUFA, n-3, n-6 and arachidonic acid in the offspring's liver.

Keywords: Fetal development; Gestation and lactation; Maternal nutrition; Lipids

1. INTRODUCTION

During pregnancy, inappropriate lifestyle habits can negatively influence fetal development, and it is well known that malnutrition and excessive weight gain are associated with adverse pregnancy outcomes¹. During the critical period of development (embryonic and fetal phase), excessive maternal body weight gain is a major contributor to increases in obstetric complications; including pre-eclampsia, gestational diabetes mellitus (GDM), large or small fetuses given gestational age, the need for cesarean sections, and premature iatrogenic deliveries². Of these factors, altered fetal growth most often influences the individual's health in later periods of life³. Maternal exposure to a specific metabolic stimulus during critical periods of development is defined as “programming” because it influences metabolic change in the offspring during life. Maternal diet is an important factor capable of inducing such alterations^{4,5}. The quality and quantity of the maternal diet influences the accumulation of gestational body fat, with consequences for the propensity or prevention of metabolic change in the offspring during adulthood⁶.

Linoleic (n-6) and Linolenic (n-3) fatty acids are considered essential, and because they are not endogenously synthesized⁷, need to be offered during the maternal diet for adequate maternal and fetal supply. A maternal diet with adequate amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including (n-6) and (n-3) is able to modulate the lipid profile of the offspring during fetal programming^{8,9}. In contrast, excessive maternal consumption of saturated fatty acids (SFA) or industrial trans isomers during the critical phase of fetal development has harmful consequences for the liver and adipose tissue which are associated with an increased risk of long-term insulin resistance or type 2 diabetes in the offspring⁵.

Conjugated linoleic acid (CLA), is a fatty acid that has been investigated for its beneficial health effects^{10,11}. CLA is composed of a heterogeneous mixture of isomers of linoleic acid, commonly found in milk and dairy products¹² but it can also be produced synthetically^{13,14}. The two most abundant isomers of CLA, *trans-10 cis-12* and *cis-9 trans-11* have been associated with modulation of fat mass, and anti-inflammatory effect in rodents¹⁵. In the present study, a commercial mixture of CLA containing about 80% *trans-10 cis-12* and *cis-9 trans-11* isomers was used as a lipid source for the maternal diet^{16,17}.

Studies have used CLA in models of fetal programming, proving its effect in the critical period of development, and with benefits for the health of the offspring. Lavandera et al¹⁸. investigated the effects of maternal consumption of CLA on fat deposits and risk of chronic disease in the offspring, demonstrating the programming effects of CLA on lipid metabolism

that induced a preventive effect on triacylglycerol (TAG) accumulation in the adipose tissue and livers of male rat offspring. Maternal CLA supplementation has also improved the lipid profile and normalized pubertal onset in the offspring of mothers fed a high-fat diet¹⁵ and the negative effects of a maternal high fat diet on the development of skeletal muscle in rat progeny¹⁹. A recent study has demonstrated that maternal CLA supplementation decreases saturated fatty acids and improves levels of eicosapentaenoic fatty acid in the cardiac tissue of rats offspring¹¹.

Thus, with this research we aimed to evaluate the impacts of maternal consumption (during pregnancy and lactation) of differing dietary levels of CLA (containing the *trans*-10 *cis*-12 and *cis*-9 *trans*-11 isomers) on the physical and biochemical parameters of the progeny.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ANIMALS AND DIET

Primiparous rats (n = 9, three females for each group) aged 90 to 120 days and weighing 250 ± 50 g were used to obtain the pups (n = 36). During mating, one female was kept for each male. After confirmation of pregnancy by vaginal smear, the rats were housed in individual polypropylene cages under standard conditions: temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, with a 12-hour light-dark cycle (start of light at 6:00 am), humidity at $\pm 65\%$, and feed and water *ad libitum*.

During the first week of gestation, the rats received commercial feed (Presença - Purina®, São Paulo, Brazil). From the 7th day of gestation and during all lactation (21 days after pup's birth) the animals received an experimental diet. Three groups were formed: Control group (CG) (n = 11) receiving an experimental diet containing soybean oil; the CLA1 group (n = 13) receiving an experimental diet containing 1% CLA; and the CLA3 group (n = 12) receiving an experimental diet containing 3% CLA. The CG received only soybean oil, a source of essential fatty acids, as a lipid source, as recommended by the American Institute of Nutrition for rodents¹⁰. The diet chosen was for growing animals (AIN-93G). The CLA1 and CLA3 groups received 7% soybean oil as did the CG, the difference was the addition of CLA in different concentrations to the experimental diets as shown in Table 1. The amount of cornstarch in the CLA1 and CLA3 diets was thus reduced. The diets were offered to the animals in pellets. The CLA mixture used was Clarinol® Powder (Loders Crockland), mixed into the feed. Clarinol® Powder, shown in Table 2 is a commercial composition mix of CLA and fatty acids.

After birth, the pups were housed in cages with their mothers. Weaning was carried out

at 21 days, and the mothers were then euthanized by cardiac puncture. The litters were standardized into 6 pups each. Several litters receiving the same treatment were used until reaching the largest number of animals per group. Only male pups were used. The pups were housed in polypropylene cages (two animals per cage), and fed a commercial diet throughout the experiment (Presence - Purina®, São Paulo, Brazil). Body weight and feed consumption were checked at 35, 49, and 63 days of life.

Based on food and caloric intake, energy intake was calculated as: (kcal/week) = mean food consumption (Amount of diet consumed during all week) x dietary metabolizable energy (energy density of the diet)/1000 ²⁰.

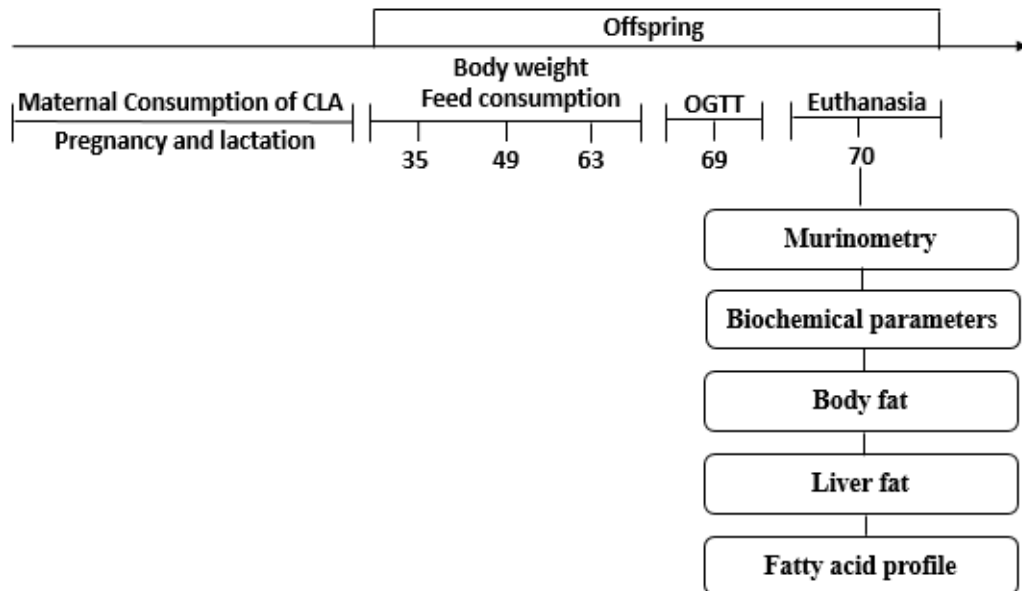
The research followed the ethical recommendations of the experimental protocol of the National Institute of Health (Bethesda, USA) for animal care, and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal da Paraíba No: 0407/13.2.1. The experimental design of the study is shown in Figure 1.

Table 1 - Composition of control and experimental diets.

Ingredients (g/Kg)	Diets		
	CG	CLA1	CLA3
Cornstarch	530	520	500
Casein	199.5	199.5	199.5
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
CLA mix isomers	-	10	30
Fiber	50	50	50
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
L-Cysteine	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Total energy (Joules)	16.568,6	16.777,8	17.196,2

Table 2 - CLA supplement fatty acid profiles

	Nomenclature	(%)
C14:0	Tetradecanoic acid	0.1±0.0
C16:0	Pentadecanoic acid	4.3±0.0
C18:0	Octadecanoic acid	1.4±0.0
C18:1n9c	9-Octadecanoic acid	10.7±0.1
C18:1c11	11-Octadecanoic acid	0.6±0.0
C18:2n-6	9,12-Octadecadienoic acid	1.0±0.0
C20:0 _	Eicosanoic acid	0.2±0.0
C22:0 _	Docosanoic acid	0.2±0.0
CLA-c9t11	Conjugated linoleic acid	39.2±0.1
CLA- t10c12	Conjugated linoleic acid	38.3±0.1
Other CLA types		4.0±0.1

**Figure 1.** Experimental design. Time in days specifying the procedures that were performed with experimental groups, which received 1% and 3% CLA, and the control group.

2.2 ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST (OGTT)

One day before euthanasia, after 10 h of fasting, capillary blood was collected from the animal's tail through a small incision. After fasting blood collection (0'), the animals received a solution containing 10% glucose, and blood was collected at 30', 60' and 90'²¹. Glucose analysis was performed using an Accu-Chek Active® glucometer, Roche, Germany.

The glucose area under the curve (AUC) was calculated by trapezoidal approximation of plasma glucose (PG) levels. PG levels at x min were defined as PG (x), and PG-AUC was calculated as follows²².

$$=PG(0) + PG(30) \times 2 + PG(60) \times 3 + PG(90) \times 2$$

4

2.3 MURINOMETRY

At 70 days of age, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride and xylazine (1000 mg/kg body weight) and measurements were taken. The animals were weighed using a Balmak® scale, São Paulo, Brazil. Length, thoracic circumference, and abdominal circumference were measured using a tape measure. Body weight and length were used to calculate the Body Mass Index (BMI)²³.

2.4 BIOCHEMICAL ANALYSES

Blood was collected by cardiac puncture with the aid of a 10 mL syringe, placed in test tubes, and later centrifuged in a Centribio® centrifuge at 14.616 g for 15 min. After centrifugation, measurements of glucose ($\lambda = 505$ nm), total cholesterol (TC) ($\lambda = 500$ nm), triglyceride (TAG) ($\lambda = 505$ nm), and HDL-cholesterol ($\lambda = 500$ nm) were performed by enzymatic method - Trinder (Labtest-Diagnosis, St. Louis, USA), using a Bel Photonics® spectrophotometer, Milano, Italy.

2.5 BODY FAT COLLECTION

An incision was made from the animal's thorax to abdomen with the aid of scissors and

forceps. After opening, the mesenteric, epididymal and retroperitoneal fats were removed with the aid of a scalpel, and then weighed. The body fat percentage (BFP) was calculated by the ratio: (total body fat/final body weight) x 100.

2.6 TOTAL LIVER FAT

The animal's livers were collected after euthanasia. The Folch et al.²⁴ methodology was used for liver fat quantification.

2.7 ANALYSIS OF HEPATIC FAT AND FATTY ACID PROFILE

Fatty acids in the liver were analyzed by gas chromatography as methyl ester derivatives prepared by a one-step transesterification procedure²⁵. The detailed procedure is described by Alves et al.²⁶ Briefly, about 200 mg of the freeze-dried liver was reacted with 3 mL of sodium methoxide 0.5N in methanol for 30 minutes at 50°C followed by reaction with hydrochloric acid 1.25M in methanol for 20 minutes at 80°C. Fatty acid methyl esters were extracted with hexane and the extract dried over anhydrous sodium sulfate. The methyl nonadecanoate (19:0) was used as an internal standard (1 mg), and was added before transesterification. The fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) using a Shimadzu GC 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SP-2560 (100 m × 0.25 mm, 0.20 µm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA) capillary column. The chromatographic conditions were as follows: injector and detector temperatures were set to 220°C and 250°C, respectively; helium was used as the carrier gas at a 1 mL/min constant flow; the initial oven temperature of 50°C was held for 1 min, and increased by 50°C/min to 150°C, and held for 20 min, then increased by 1°C/min to 190°C, and then increased by 2°C/min to 220°C and held for 30 min. Commercial standard mixtures (FAME mix 37 components from Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) were also run on the GC-FID for the identification of the fatty acid methyl esters by comparing peak retention times of both standards and samples. CLA mixtures for GC were prepared as described in Alves and Bessa²⁷ using commercial individual standards of CLA *cis*-9, *trans*-11 and CLA *trans*-10, *cis*-12 from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, USA). However, because GC-FID does not unequivocally allow identification of fatty acid methyl esters, a few samples were also run on an electron impact mass spectrometer (GC-MS QP2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) for confirmation. The chromatographic column used on the GC-MS, as well as the injector and oven conditions were similar to those used on the

GC-FID, and the MS conditions were as follows: ion source temperature, 200°C; interface temperature, 220°C; ionization energy, 70 eV.

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

The sample size was calculated by randomization and the Shapiro-Wilk normality test was used. Analysis of variance (ANOVA) was applied for data analysis and Tukey's test was performed as a post-test. Data from the analysis were expressed as mean and standard error. Values were considered significant with $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1 BODY WEIGHT AND FEED CONSUMPTION

The data presented no differences in the maternal body weight at the beginning (CG: $228\text{g} \pm 23.5$; CLA1: $219\text{g} \pm 13$; CLA3: $237\text{g} \pm 19$) and end of gestation (CG: $325\text{g} \pm 68$; CLA1: $332\text{g} \pm 30$; CLA3: $348\text{g} \pm 13$). During lactation, the initial (CG: $259\text{g} \pm 13$; CLA1: $248\text{g} \pm 29$; CLA3: $260\text{g} \pm 11$) and final (CG: $238\text{g} \pm 24$; CLA1: $233\text{g} \pm 14$; CLA3: $251\text{g} \pm 34$) maternal body weights were similar. Maternal food consumption during pregnancy and lactation presented no difference."

The CLA3 group presented higher body weights ($136\text{g} \pm 2$; $232\text{g} \pm 5$; $294\text{g} \pm 6$) and feed consumption ($118\text{g} \pm 1$; $180\text{g} \pm 6$; $188\text{g} \pm 2$) as compared to the CG ($125\text{g} \pm 3$; $199\text{g} \pm 9$; $265\text{g} \pm 10$) ($95\text{g} \pm 4$; $128\text{g} \pm 6$; $174\text{g} \pm 4$), during all weeks of the experiment ($p \leq 0.05$). The CLA1 group presented greater body weights when compared to the CG at days 49 ($226\text{g} \pm 4$ vs. $199\text{g} \pm 9$) and 63 ($287\text{g} \pm 7$ vs. $265\text{g} \pm 10$) and higher feed consumption at day 49 when compared to the CG (169 ± 15 vs. 128 ± 6), as shown in the Figure 2A/2B ($p \leq 0.05$).

When analyzing energy intake, the CLA3 groups presented higher values when compared to the CG and CLA1 group on days 35 ($486\text{ Kcal/day} \pm 3$ vs. $374\text{ Kcal/day} \pm 16$ and $422\text{ Kcal/day} \pm 19$), and 63 ($771\text{ Kcal/day} \pm 10$ vs. $687\text{ Kcal/day} \pm 16$ and 708 ± 19), and when compared only to CG on day 49 ($738\text{ Kcal/day} \pm 25.6$ vs. $507\text{ Kcal/day} \pm 22$) ($p \leq 0.05$). For the CLA1 group, on day 49, energy intake was higher than CG ($678\text{ Kcal/day} \pm 62$ vs. $507\text{ Kcal/day} \pm 22$) ($p \leq 0.05$) (Figure 2C).

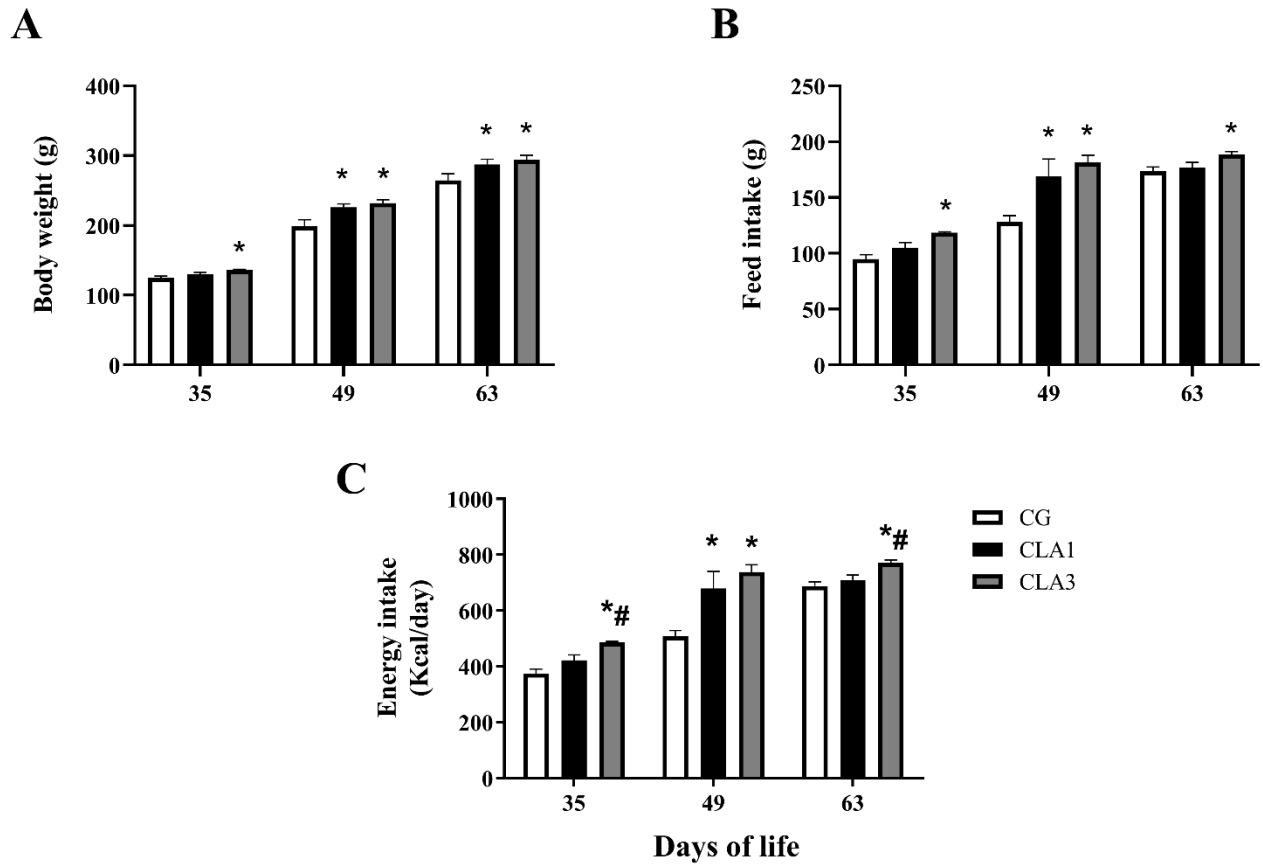


Figure 2. Body weight and feed intake of the offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG), or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1), or 3% (CLA3), during pregnancy and lactation. (A) Body weight; (B) Feed intake; (C) Energy intake. Values are expressed as means and standard error. The statistical test applied was One Way ANOVA, plus Tukey's test; $p < 0.05$; *versus CG group, #versus CLA1 group.

3.2 MURINOMETRY

The abdominal circumference measured lower in the CLA1 and CLA3 groups as compared to the CG ($14.7 \text{ cm} \pm 0.2$ and $15.4 \text{ cm} \pm 0.1$ vs. $16 \text{ cm} \pm 0.3$) Figure 3A ($p \leq 0.05$). The BMI and thoracic circumference increased significantly in the CLA3 group versus the CG ($0.69 \text{ g/cm}^2 \pm 0$ and $13.4 \text{ cm} \pm 0.1$ vs. $0.60 \text{ g/cm}^2 \pm 0$ and $12.2 \text{ cm} \pm 0.1$) Figure 3D/B ($p \leq 0.05$).

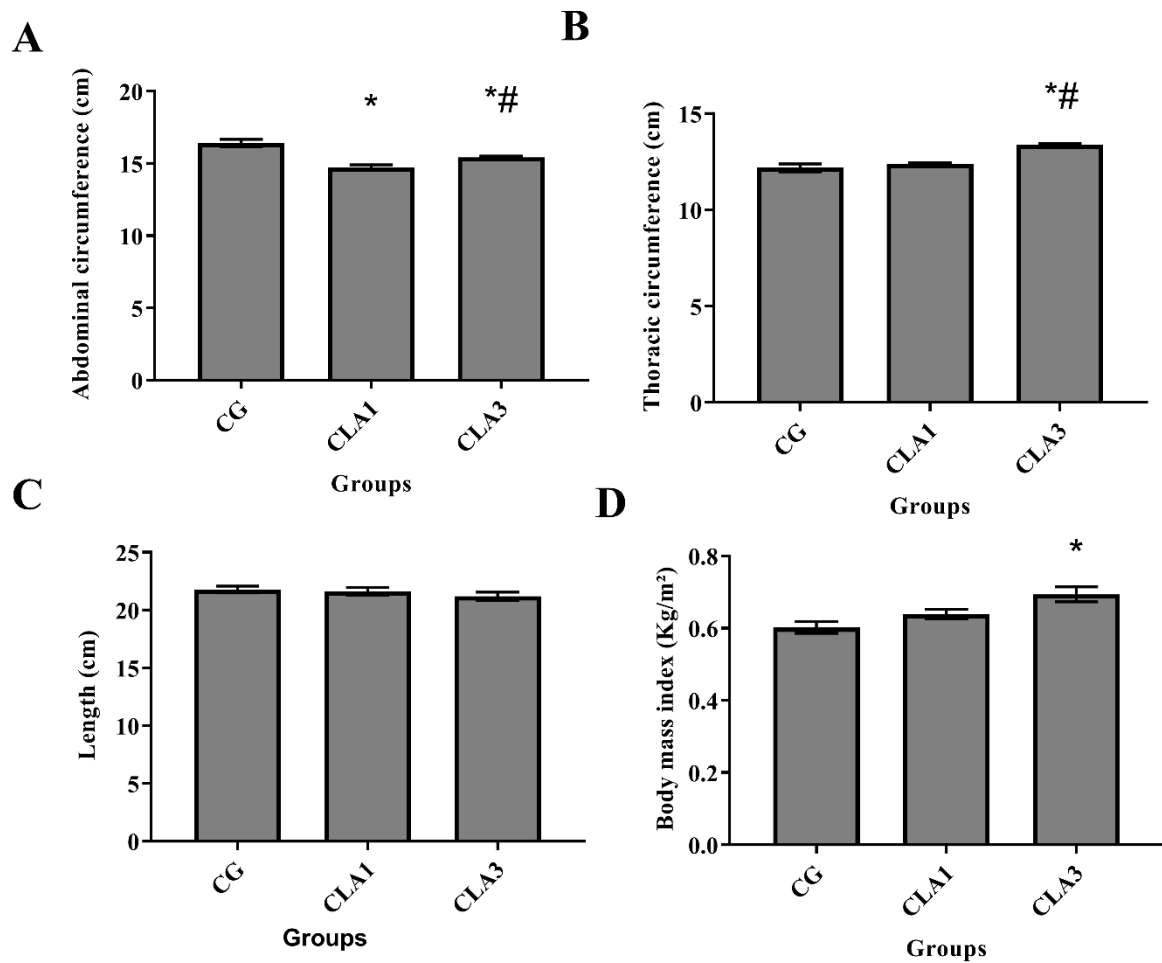


Figure 3. Murinometry of the offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation. (A) abdominal circumference; (B) Thoracic circumference; (C) Length; (D) Body Mass Index (BMI). Values are expressed as means and standard error. The statistical test applied was One Way ANOVA, plus Tukey's test; $p < 0.05$; *versus control group. #versus CLA1 group.

3.3 BIOCHEMICAL PARAMETERS

The CLA1 and CLA3 groups presented higher values for TC and high density lipoprotein (HDL-cholesterol) as compared to the CG ($p \leq 0.05$). The TAG value did not differ between the experimental and CG ($p \geq 0.05$) (Table 3).

Table 3. Biochemical analyses of rat offspring whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation. Asterisks indicate values from the experimental groups that are significantly higher than the corresponding control values ($p < 0.05$; ANOVA One Way plus Tukey test).

Groups	Total cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)
CG	51.2±1.8	36.7±1.7	16.5±2.6	25.4±4.7
CLA1	72.0±6.0*	37.0±1.0	39.6±4.0*	28.8±2.9
CLA3	69.0±3.0*	37.0±2.0	37.3±4.0*	26.6±3.1

3.4 BODY FAT

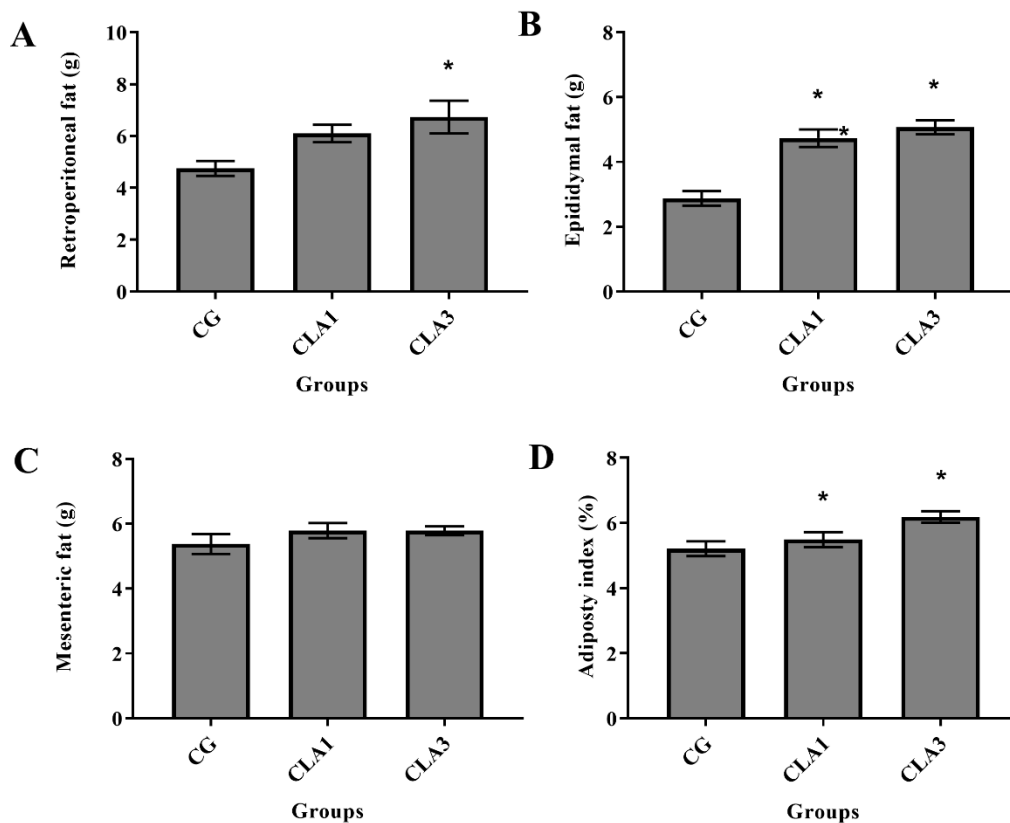


Figure 4. Body fat of offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) of CLA during pregnancy and lactation. (A) Mesenteric fat; (B) Retroperitoneal fat; (C) Epididymal fat; (D) Body fat index. Values are expressed as means and standard error. The statistical test applied was One Way ANOVA, plus Tukey's test; $p < 0.05$; *Versus control group.

The amount of retroperitoneal and epididymal fat increased significantly in the CLA1 and CLA3 groups versus the CG (Figure 4B and 4C). The body fat index of the CLA1 and CLA3 groups was also higher when compared to the CG (Figure 4D) ($p \leq 0.05$). The amount of mesenteric fat did not differ statistically between the groups ($p \geq 0.05$) (Figure 4A).

3.5 ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST

In Figure 5A/B, the blood glucose curve and the glucose AUC are shown. It is possible to observe lower blood glucose values in the CLA1 and CLA3 groups as compared to the CG, at 30' and at 60'. At 90', a lower blood glucose value was recorded for the CLA1 group versus the CG and CLA3 group ($p \leq 0.05$). In figure 5B, the glucose AUC was lower in the CLA1 and CLA3 groups versus the CG ($p \leq 0.05$).

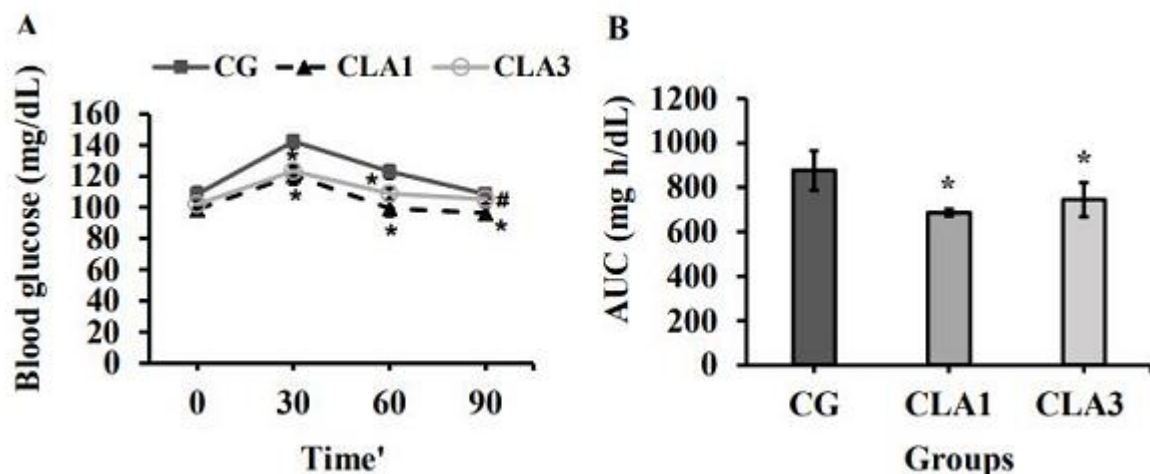


Figure 5. Oral glucose tolerance test of offspring rats whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation. (A) Blood glucose curve; (B) Glucose area under the curve (AUC). Values are expressed as means and standard error (One Way ANOVA, Tukey's test). *Versus control group #Versus CLA1 group.

3.6 TOTAL LIVER FAT

The CLA1 group presented higher total liver fat than the CG (4.6 ± 0.1 vs. 4.0 ± 0.1) ($p \leq 0.05$) (Figure 6).

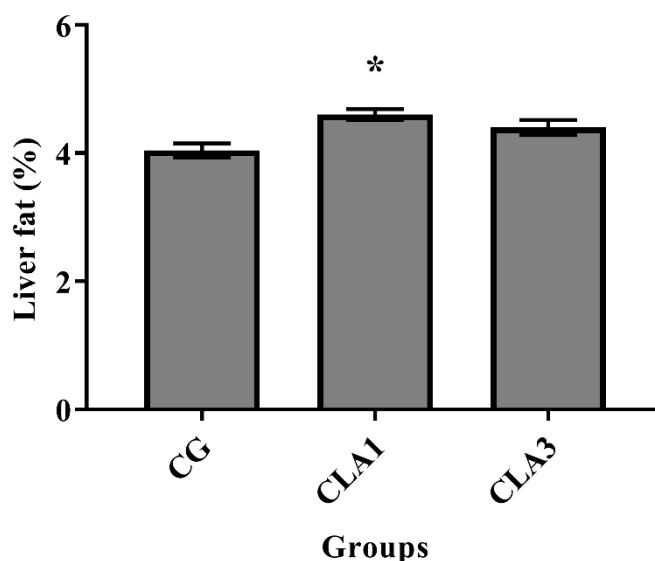


Figure 6. Liver fat in offspring whose mothers (female rats) received a control diet (CG) or an experimental conjugated linoleic acid (CLA) diet containing 1% (CLA1) or 3% (CLA3) during pregnancy and lactation. Values are expressed as means and standard error (One Way ANOVA, Tukey's test). * Versus control group.

3.7 FATTY ACID PROFILE

Table 4 presents the amounts of fatty acids in the livers of animals treated with the CLA and control diets. We note that the CLA1 and CLA3 groups presented higher *cis*-MUFA levels than the CG ($p \leq 0.05$). On the other hand, the CLA3 group presented less n-3 series total PUFA and arachidonic acid (20:4) when compared to the CG, and lower values of n-6 PUFA versus both the CG and the CLA1 group ($p \leq 0.05$). CLA were not detected in the liver.

Table 4. Fatty acids (FA) and dimethyl acetal (DMA) composition (least square means $\pm$ standard error, expressed as g/kg of total FA + DMA) in liver tissue of offspring from dams fed control, CLA1, and CLA3 diets.

		CG	CLA1	CLA3	P value
n ¹		6	4	4	
FA	Nomenclature				
C14:0	Tetradecanoic acid	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.484
C15:0	Pentadecanoic acid	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.041
C16:0	Hexadecanoic acid	21.1 $\pm$ 1.6	19.8 $\pm$ 2.9	22.3 $\pm$ 0.9	0.490
C17:0	Heptadecanoic acid	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1*#	0.004
C18:0	Octadecanoic acid	23.6 $\pm$ 1.3	23.9 $\pm$ 1.7	23.8 $\pm$ 1.6	0.984
C20:0	Eicosanoic acid	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.757
SFA ²		45.8 $\pm$ 1.0	44.8 $\pm$ 4.1	47.5 $\pm$ 1.6	0.796
C16:1c7	7-Hexadecenoic acid	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.976

C16:1c9	9-Hexadecenoic acid	1.1±0.3	1.3±0.2	1.5±0.2	0.511
C17:1c9	9-Heptadecenoic acid	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0*#	0.002
C18:1t6t7t8	t6-t8-Octadecenoic acid	ND	ND	ND	
C18:1t16c14	t16,14-Octadecenoic acid	ND	ND	ND	
C18:1t9	t9-Octadecenoic acid	ND	0.1±0.0	0.1±0.0	
C18:1t10	t10-Octadecenoic acid	ND	ND	ND	
C18:1t11	t11-Octadecenoic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.951
C18:1t12	t12-Octadecenoic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.473
C18:1c9	9-Octadecenoic acid	5.9±1.0	8.1±0.9*	10.1±1.0* #	0.036
C18:1c11	11-Octadecenoic acid	2.4±0.1	2.6±0.2	3.6±0.4*#	0.003
C18:1c13	13-Octadecenoic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.043
C18:1c15	15-Octadecenoic acid	ND	ND	ND	
C20:1 ³	Eicosanoic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.006
<i>cis</i> -MUFA ⁴		10.2±1.2	12.9±1.1*	16.3±1.4* #	0.001
<i>trans</i> -MUFA ⁴		0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.778
C18:2n-6	Octadienoic acid	15.6±0.2	16.5±0.8	14.9±1.1	0.382
C18:3n-6	Octadecatrienoic acid	0.2±0.0	0.3±0.1	0.2±0.0	0.619
C20:2n-6	Eicosadienoic acid	0.4±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.552
C20:3n-6	Eicosatrienoic acid	1.1±0.1	1.2±0.3	0.8±0.1	0.343
C20:4n-6	Eicosatetraenoic acid	22±1.7	19.5±2.9	16.3±1.8*	0.043
C22:5n-6	Docosapentaenoic acid	0.2±0.0	0.3±0.2	0.1±0.0	0.747
PUFA ⁵ n-6		39.5±1.7	38.2±2.6	32.6±2.4* #	0.014
C20:5n-3	Eicosapentaenoic acid	0.3±0.0	0.3±0.1	0.1±0.0	0.045
C22:5n-3	Docosapentaenoic acid	0.6±0.1	0.7±0.3	0.4±0.1	0.499
C22:6n-3	Docosahexaenoic acid	2.7±0.2	2.0±0.5	2.0±0.5	0.355
PUFA ⁶ n-3		3.6±0.3	3.0±0.8	2.5±0.6*	0.035
C20:3 ³	Eicosatrienoic acid	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0*#	0.027
C20:3n-9	Eicosatrienoic acid	0.1±0.0	0.1±0.2	0.1±0.0	0.701
Total PUFA		43.7±1.8	41.8±3.7	35.6±2.9*	0.025
DMA					
C16:0	Palmitic acid	0.2±0.0	0.1±0.0*	0.1±0.0*	0.001
C18:0	Stearic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.374
C18:1c9	9-Octadecenoic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.002
Total DMA		0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.367

¹ Number of samples

² Sum of saturated fatty acids

³ Double bond position not determined

⁴ Sum of *cis* monounsaturated fatty acids

⁵ Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids

⁶ Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids

*Versus control group. #Versus CLA1

4. DISCUSSION

In the present study, we evaluated the effect of maternal consumption during pregnancy and lactation of different levels of CLA on the rat progeny to assess the effect of this fat on the pups' physical and biochemical parameters, and seeking to reveal the possible influence of this lipid on metabolic changes during adulthood.

Many factors can cause undesirable events in the health of progeny, among these are unbalanced maternal nutrition, exposure to environmental insults, and infection or stress may occur during fetal development. The gestational period is a phase of life that requires great attention and care²⁸. Suboptimal intrauterine conditions during critical periods of development lead to changes in tissue structure and function which can have long-term consequences for both the offspring's physiology, and susceptibility to disease¹³. For these reasons, studies on fetal programming and metabolic changes in the offspring have become increasingly frequent^{28,29,30}.

Body weight and stored fat influence health and well-being throughout life. With excessive weight, the body can undergo inflammatory processes and diseases may arise. In our study, the body weight of rat pups treated with 1% and 3% of CLA was greater than the CG for most of the experiment. The results reveal that this group also generally consumed a greater amount of feed with consequently higher energy intake as compared to the CG (fig. 1B and 1C). As can be seen in Table 1, the energy density of the CLA1 and CLA3 ration was higher than that of the CG. Hypercaloric diets can reduce food consumption by increasing the satiety mechanism³¹. However, the amount of CLA inserted into the CLA3 diet was insufficient to increase satiety in either the rat mothers who were directly fed this diet, or their offspring.

Research³² investigating body weights immediately after weaning, of rat pups whose mothers were supplemented during pregnancy and lactation (with CLA, CLA + a high fat diet, or a high fat diet without CLA) found higher body weights for the rat pups whose mothers were treated with the high fat diet as compared to the CG and the groups receiving CLA. The offspring that received a control diet (without CLA) after weaning where the mothers had been treated with 1% CLA before mating presented lower body weights in adulthood as compared to the CG¹⁸. Further research has treated rats during gestation and lactation with dietary sources of CLA. The animals were born with similar body weights, but a higher body weight was observed in the pups treated with the experimental diet, until 28 days of life³³. The levels of CLA used in the Lavandera et al.¹⁸ investigation were similar to the present study (1% of CLA in a mix containing approximately 40% of the main isomers).

On the other hand, goat's milk fat, as used by Soares et al.³³ contains 1.2% CLA, which is more similar to the amount of CLA used in the present research (1% and 3%). When we tripled that amount, (3%), and not only did the animals' body weight increase, but also the BMI and thoracic circumference.

In the present research, abdominal circumferences were smaller in the groups treated with CLA. However, mesenteric fat which is located around the abdominal visceral presented no difference. Excess visceral fat in humans is associated with insulin resistance and can be identified through abdominal circumference^{34,35}.

According to Park et al.³⁶, CLA activates several mechanisms that influence reduction in body fat and may increase both energy expenditure and β -oxidation of fatty acids, modulating the metabolism of adipocytes, adipokines and cytokines. CLA can also reduce body fat by increasing energy expenditure through increased oxygen consumption.

In the present work, only mesenteric fat presented no difference. Both retroperitoneal and epididymal fat increased in animals treated with CLA. What appears to have happened is that maternal consumption of CLA does increase the body fat index in the offspring of rats, however, the deposition does not happen in the abdominal region.

Studies treating female rats with 1% CLA before mating and during gestation and lactation have observed the effects of this consumption on both female¹⁵ and male³² offspring. Testing included CG and high fat groups (HF) whether consuming CLA or not. Maternal consumption of CLA did not alter retroperitoneal fat or offspring body weight in the group receiving the normolipidic diet. However, the HF maternal feed (with CLA) reversed various damages caused by the high fat diet in the progeny's health¹⁵. The studies did not inform which CLA isomers were offered, and the CG received 10% fat and a HF diet of 45%. In our research, we treated the animals with 7% lipids plus 1% or 3% of CLA. These studies demonstrate that the quantity of CLA offered in the maternal diet during gestation and lactation can alter the nutritional status of the pups.

A result contrary to our study was observed for female rats treated with CLA before mating, which caused a reduction in epididymal fat in the offspring. The authors did not measure mesenteric fat¹⁸. Inhibition of stearyl-CoA desaturase by CLA may in part contribute to fat mass reduction. CLA is also known to reduce the mass of adipose tissue and cell numbers by increasing apoptosis in pre-adipocytes and adipocytes^{36,37}. It has been suggested that the effect of CLA on adipocytes may be linked to an interaction with the γ receptor activated peroxisome proliferator (PPAR- γ), where CLA acts to reduce PPAR- γ expression. These nuclear receptors control lipid metabolism in adipose tissue and regulate adipocyte

differentiation, proliferation, and lipogenesis^{36,38}. Although these studies^{36,37} were not performed with rats during pregnancy and lactation, it remains as a mechanism that can explain such findings.

In our study, blood lipids were quantified, and the results revealed that the CLA1 and CLA3 groups presented higher TC than the CG, as well as higher HDL-cholesterol values. It is believed that this increase in HDL-cholesterol in the blood of the animals, also influenced the TC increase. HDL-cholesterol, in particular, has been identified as a marker of a restorative process, because it removes harmful cholesterol from blood vessels. Higher levels of this lipoprotein are desirable for optimal cardiovascular health³⁹. Certain studies reveal the influence of CLA on cardiovascular disease. Kritchevsky et al.⁴⁰ demonstrated that rabbits fed with *cis*-9, *trans*-11 or *trans*-10, *cis*-12 exhibited reduced severity in atheromatous lesions. A study using hamsters fed with cholesterol showed that *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 promote reduced risk factors for cardiovascular diseases (CVD)⁴¹. In mice, *cis*-9, *trans*-11 prevented, while *trans*-10, *cis*-12 promoted development of atherosclerosis⁴². According to Nicod et al.⁴³, *cis*-9, *trans*-11-CLA induces intestinal uptake of free and esterified cholesterol which might partially explain the purported beneficial effects of animal *trans*-fatty acids on CVD.

Studies evaluating the influence of diet for increasing or decreasing HDL-cholesterol were also found. Aydin et al.⁴⁴, evaluated CLA, whey protein, isolated acrolein, acrolein with CLA, and acrolein with whey protein as administered, revealing that the CLA group alone presented higher HDL-cholesterol values and lower LDL-cholesterol as compared to the acrolein receiving group. However, it was also possible to observe higher values of TG and VLDL-cholesterol in the CLA group. Lavandera et al.¹⁸ treated female rats before mating and their offspring after weaning with a control (C) or CLA (1%) diet. Both groups receiving CLA before weaning (CLA/C and CLA/CLA) presented elevated serum TAG levels and a reduction of lipoprotein lipase activity (for the male offspring). When the mothers and the offspring were treated with CLA (CLA/CLA) liver TAG were decreased. However the CLA/C group presented normal TAG levels and a decrease in lipogenesis. This finding is similar to the present work, where serum TAG levels and LDL were unaltered, and only HDL-cholesterol was increased in the CLA1 and CLA3 groups.

While some studies defend the importance of CLA in decreasing blood lipids^{34,35}, others reveal the opposite^{45,46}. The inconsistent results concerning CLA and lipid profile might arise from a combination factors such as a difference in isomer composition, the CLA dosage, the duration of feeding, the species of experimental animal, and its physiological age and genotype⁴⁷.

One possible explanation for the increase in HDL-cholesterol caused by CLA is that the lipid has the ability to regulate gene expression, and is both a potent ligand and activator of the PPAR- γ group of nuclear receptors that regulate the expression of genes involved in synthesis of HDL-cholesterol; in the liver, the intestines, in adipogenesis, and during inflammation⁴⁸. CLA isomers were shown to be ligands for human PPAR α ; with a rank of order by potency of *cis*-9, *trans*-11 > *trans*-10, *cis*-12 > *trans*-9, *trans*-11⁴⁹. Maternal consumption of CLA during early life can prevent inflammation and mammary carcinogenesis in the offspring^{10,11}. Increased inflammation can predict late development of insulin resistance⁵⁰.

In the present study, the CLA1 and CLA3 groups presented an increase in glucose tolerance when evaluated at different times. Postprandial glycemic response can be used to assess whether ingestion of a given product results in a slow or rapid increase in blood glucose concentration and becomes important when considering the relationship between high blood glucose concentrations and increased risk for type II diabetes⁵¹.

Decreased insulin sensitivity was observed in the male offspring of rats supplemented with a high-fat diet (HF), but in the group that received a HF diet together with CLA, insulin sensitivity increased³². Moloney et al.⁵² also found an antidiabetic effect with a decrease in inflammatory markers in adipose tissue in mice treated with *cis*-9, *trans*-11. Insulin resistance is strongly associated with meta-inflammation and has been shown to be mediated by pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF α)^{32,53}.

TNF- α is a pleiotropic cytokine that causes disturbances in metabolism and mitochondrial biogenesis. The cytokine increases the expression of pro-inflammatory cytokines and consequently insulin resistance. However, unsaturated fatty acids, such CLA, modulate the inflammatory effect of TNF- α . This cytokine is also known to decrease the expression of peroxisome proliferator-activated receptor 1-alpha (PGC1- α), whereas CLA increases the expression of PGC1- α in various types of cells. PGC1- α is necessary to increase the capacity of mitochondrial antioxidant enzymes⁵⁴.

According to Huang et al.⁵⁵, white adipose tissue plays an essential role in maintaining metabolic homeostasis. Dysfunctions in this tissue can lead to stress in the endoplasmic reticulum (ER). The ER is a membranous network within the cell that serves as a compartment for folding, assembling, modifying, and controlling the quality of proteins. ER stress leads to metabolic disorders, including insulin resistance and lipid accumulation, and leads to type II diabetes.

When assessing the animals' livers, the CLA1 group presented a higher amount of liver

fat than the CG. A contrary result was found by Segovia et al.³², treating mothers after weaning and during gestation and lactation with CLA. The authors did not observe higher fat in the offsprings' livers. Lavandera et al.¹⁸ when treating female rats after mating with 1% CLA, also observed no alterations in hepatic TAG in the offspring. The results found by Clement et al.⁵⁶ corroborate our study. In their research, rats were fed a diet enriched with *trans*-10, *cis*-12 CLA for 4 weeks, which caused lipoatrophy, hyperinsulinemia, and hepatic steatosis. However, diets enriched with *cis*-9, *trans*-11 CLA and linoleic acid presented no significant effects. In our research, a mix of CLA with different isomers was used, which makes it impossible to associate the effect with an isolated isomer, as was also done in the research mentioned. Rodrigues et al.⁵⁷ treated rats after lactation with a diet based on soybean oil, coconut oil, or goat's milk fat (which is a source of CLA) and observed that all groups upon histological analysis presented fat globules. However, in the CG, which received soybean oil, and in the group which received goat's milk fat (a CLA source), the liver fat varied from mild to moderate. Yet in the group that received coconut oil, the fat varied from moderate to severe. Moreira et al.⁵⁸ observed that rats fed a 1% CLA diet presented increased liver weights and fat content without colitis, yet no liver changes were observed in the rats with colitis. During colitis, CLA-induced liver disease was prevented. One possible way in which CLA might cause liver steatosis would be a transfer of fatty acids (derived from adipose tissue) to hepatocytes, another is through activation of genes that regulate liver lipid metabolism⁵⁹. In the liver, CLA has been found to trigger ectopic production of PPAR- γ , a lipid-binding adipocyte protein, and fatty acid transporter RNA, and induce expression of binding protein for sterol regulatory element 1 and fatty acid synthesis genes⁵⁶.

When we analyzed the fatty acid composition in the liver, it was observed that the CLA isomers were not found. They were likely metabolized and accumulated in other tissues. However, maternal consumption of CLA altered the liver fatty acids in the offspring. Monounsaturated fatty acids were found in greater quantities in the CLA1 and CLA3 groups as compared to the CG. However, the livers of the animals in CLA3 presented lower n-3 and n-6 series polyunsaturated fatty acid values. According to Park et al.³⁶ *trans*-10, *cis*-12 CLA is the isomer responsible for modification of insaturation levels in tissues of animals fed with a CLA mixture, decreasing $\Delta 9$ desaturation of stearic acid by inhibiting the action of stearoyl -CoA desaturase, which is responsible for catalyzing reactions that insert double bonds during the formation of unsaturated fatty acids. Our data also showed that the CLA3 group presented smaller amounts of arachidonic acid (AA 20:4) in the liver as compared to the other groups. The authors measured AA metabolite in the progeny of animals treated during early life with

1% CLA. They concluded that the reduction of AA is because maternal CLA consumption reaches the offspring through the breast milk and induces competition for enzymes responsible for metabolism of this fatty acid in serum and hepatic microsomes^{10,60,11}. A previous study performed by our group also identified significant amounts of CLA in the breast milk and brains of pups whose mothers had been treated with 1% and 3% CLA during gestation and lactation¹⁷. Our findings detected a significant reduction in MUFA, PUFA, and AA in the offspring of rats treated with 3% CLA. This did not occur for rats treated with 1% CLA (except MUFA). Thus, higher doses of CLA may interfere with the composition of hepatic fatty acids, despite not interfering with the amount of liver fat.

Male Wistar rats were fed for a period of 6 days with a diet containing 150 mg of CLA isomers, and later the fatty acid profiles of the organs were analyzed. Incorporation of the isomers into the tissues was found to be low, less than 1.4%. The level of incorporation by tissue type (from highest to lowest) was as follows: adipose tissue, gastrocnemius, liver, kidneys, and the brain⁶¹. Apparently, with the exception of adipose tissue, accumulation of CLA in body tissues is low. Yamasaki et al.⁶² found that after ingesting 2% CLA in the diet, its contents in white adipose tissue was almost 5 times greater than in the liver. Maternal consumption of a HF plus CLA (1%) diet reverses skeletal muscle atrophy and inflammation when induced by a HF diet in the offspring¹⁹. In our study, we did not treat the animals with a HF diet, and fatty acids were not quantified in adipose tissue. Tissues with a high phospholipid contents (liver, heart, skeletal muscle, and kidneys) presented low levels of incorporated CLA. CLA is mainly incorporated in TAG⁶¹. The authors mentioned did not treat mothers during pregnancy and lactation, but offered the CLA to the mothers before mating. Most of the research cited performed maternal supplementation with 1% CLA, and no research cited used 3% CLA as used in the present work. Lavandera et al.¹⁸ found CLA only in serum, epididymal white adipose tissue, and the liver when offspring receive CLA after weaning. However, they did not supplement female rats with CLA during gestation and lactation as in the present work. In a previous study¹⁷ we found CLA in the breast milk and brain tissue, however in the present work, no CLA was found in the offsprings' livers. On the other hand, the composition of liver fat was altered for the CLA3 group. These findings strongly suggest that the period of treatment (before or during pregnancy and lactation), and the amount of CLA offered to mother rats, may well alter fetal programming.

5. CONCLUSION

Maternal treatment with differing concentrations of CLA during gestation and lactation, for certain parameters analyzed reveal similar effects, such as increases in HDL-cholesterol and tolerance to glucose, while leaving LDL-cholesterol unchanged. In addition, despite both treatments having induced an increase in the body fat index; the treatments did not modulate mesenteric fat which is related to an increased risk for cardiovascular disease. However, maternal treatment with 3% CLA did induce both higher feed intake and BMI, yet without increasing liver fat, this while reducing total PUFA, n-3, n-6, and arachidonic acid in the offsprings' livers. In conclusion, a selected amount of CLA, when consumed during gestation and lactation may well promote different effects in the rat progeny.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

1. A. Hruby, F. B. Hu, The epidemiology of obesity: a big picture, *Pharmacoeconomics*, 2015, **33**, 673.
2. J. F. Mission, N. E. Marshall, A. B. Caughey, Pregnancy risks associated with obesity, *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2015, **42**, 335.
3. I. W. Johnsson, B. Haglund, F. Ahlsson, J. Gustafsson, A high birth weight is associated with increased risk of type 2 diabetes and obesity, *Pediatr. Obes.*, 2015, **10**, 77.
4. M. Agosti, F. Tandoi, L. Morlacchi, A. Bossi, Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life, *La Pediatr. Med. Chir.*, 2017, **39**, 57.
5. L. V. Mennitti, J. L. Oliveira, C. A. Moraes, D. Estadella, L. M. Oyama, C. M. Oller do Nascimento, L. P. Pisani, Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 99.
6. E. Herrera, I. López-Soldado, M. Limones, E. Amusquivar, M. P. Ramos, Experimental models for studying perinatal lipid metabolism. Longterm effects of perinatal undernutrition, *Adv Exp Med Biol.*, 2005, **569**, 95.
7. E. Herrera, H. Ortega-Senovilla, Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development, *Clin. Lipidol.*, 2010, **5**, 899.
8. M.D. Niculescu, D. S. Lupu, C. N. Craciunescu, Perinatal manipulation of alpha-linolenic

- acid intake induces epigenetic changes in maternal and offspring livers, *FASEB J.*, 2013, **27**, 350.
9. D. S. Lupu, C. L. Cheatham, K. D. Corbin, M. D. Niculescu, Genetic and epigenetic transgenerational implications related to omega-3 fatty acids. Part I: Maternal FADS2 genotype and DNA methylation correlate with polyunsaturated fatty acid status in toddlers: An exploratory analysis, *Nutr. Res.*, 2015, **35**, 939.
 10. A. Białek, A. Stawarska, A. Tokarz, K. Czuba, A. Konarska, M. Mazurkiewicz, I. Stanimirova, Enrichment of maternal diet with conjugated linoleic acids influences desaturases activity and fatty acids profile in livers and hepatic microsomes of the offspring with 7,12 dimethylbenz[a]anthracene- induces mammary tumors, *Acta Pol. Pharm.*, 2014, **71**, 747.
 11. M. Białek, A. Białek, M. Czauderna, Maternal and Early Postnatal Diet Supplemented with Conjugated Linoleic Acid Isomers Affect Lipid Profile in Hearts of Offspring Rats with Mammary Tumors, *Animals*, 2020, **10**, 1.
 12. S. Banni, Conjugated linoleic acid metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.*, 2002, **13**, 261.
 13. R. C. Khanal, T. R. Dhiman, Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): a review, *J. Nutr.*, 2004, **3**, 72.
 14. M. Jelińska, A. Białek, I. Gielecińska, H. Mojska, A. Tokarz, Impact of conjugated linoleic acid administered to rats prior and after carcinogenic agent on arachidonic and linoleic acid metabolites in serum and tumors. Prostaglandins *Leukot Essent Fatty Acids*, 2017, **126**, 1.
 15. C. M. Reynolds, S. A. Segovia, X. D. Zhang, C. Gray, M. H. Vickers, Conjugated Linoleic Acid Supplementation during pregnancy and lactation reduces maternal high fat diet induced programming of early onset puberty and hyperlipidemia in female rat offspring, *Biol. Reprod.*, 2015, **92**, 1.
 16. M. P. Queiroz, M. S. Lima, M. F. F. T. Melo, C. C. M. S. Bertozzo, D. F. Araújo, G. C. B. Guerra, R. C. R. E. Queiroga, J. K. B. Soares, Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain, *J. Affect. Disord.*, 2019, **243**, 75.
 17. M. P. Queiroz, M. S. Lima, M. Q. Barbosa, M. F. F. T. Melo, C. C. M. S. Bertozzo, M. E. G. Oliveira, R. J. B. Bessa, S. P. A. Alves, M. I. A. Souza, R. C. R. E. Queiroga, J. K. B. Soares, Effect of conjugated linoleic acid on memory and reflex maturation in rats treated during early life, *Front. Neurosci.*, 2019, **13**, 370.
 18. J. Lavandera, C. D. Gerstner, J. Saín, A. C. Fariña, M. A. González, C. A. Bernal, Maternal conjugated linoleic acid modulates TAG metabolism in adult rat offspring, *Br. j. nutr.*, 2017, **118**, 906.
 19. C. A. Pileggi, S. A. Segovia, J. F. Markworth, C. Gray, X. D. Zhang, A. M. Milan, C. J. Mitchell, M. P. G. Barnett, N. C. Roy, M. H. Vickers, C. M. Reynold, D. Cameron-Smith, Maternal conjugated linoleic acid supplementation reverses high-fat diet-induced skeletal muscle atrophy and inflammation in adult male rat offspring, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2016, **310**, 432.
 20. Y. S. Diniz, L. A. Faine, C. M. Galhardi, H. G. Rodrigues, G. X. Ebaid, R. C. Burneiko, A. C. Cicogna, E. L. B. Novelli, Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats, *Nutrition*, 2005, **21**, 749.
 21. M. Siemelink, A. Verhoef, J. A. M. A. Dormans, P. N. Span, A. H. Piersma, Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the Offspring, *Diabetologia*, 2002, **45**, 1397.
 22. T. M. Wolever, D. J. Jenkins, A. L. Jenkins, R. G. Josse, The glycemic index: methodology and clinical implications, *Am J Clin Nutr.*, 1991, **54**, 846.
 23. E. L. Novelli, Y. S. Diniz, C. M. Galhardi, G. M. Ebaid, H. G. Rodrigues, F. Mani, A. A.

- Fernandes, A. C. Cicogna, J. L. Novelli Filho, Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats, *Lab. Anim.*, 2007, **41**, 111.
24. J. Folch, M. Lees, S. G. H. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 497.
 25. W. W. Christie, X. Han, Preparation of Derivatives of Fatty Acids, *Lipid Analysis* (Fourth edition), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. 145.
 26. S.P. Alves, K. Raundrup, A. Cabo, R. J. B. Bessa, A. M. Almeida, Fatty acid composition of muscle, adipose tissue and liver from Muskoxen (*Ovibos moschatus*) living in West Greenland, *Plos One*, 2015, **10**, 0145241.
 27. S. P. Alves, R. J. B. Bessa, Comparison of two gas-liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat, *J. Chromatogr. A.*, 2009, **1216**, 5130.
 28. J. Fisch, V. Feistauer, A. C. Moura, A. O. Silva, V. Bollis, M. Porawski, S. Almeida, R. P. Guedes, A. G. Barschak, M. Giovenardi, Maternal feeding associated to post-weaning diet affects metabolic and behavioral parameters in female offspring, *Physiol. Behav.*, 2019, **204**, 162.
 29. H. Xu, Q. Fu, Y. Zhou, C. Xue, P. Olson, E. C. Lynch, K. K. Zhang, C. Wu, P. Murano, L. Zhang, L. Xie, A long-term maternal diet intervention is necessary to avoid the obesogenic effect of maternal high-fat diet in the offspring, *J. Nutr. Biochem.*, 2018, **62**, 210.
 30. H. Ishikawa, X. Guo, S. Sugawara, Y. Iwagaki, K. Yamamoto, A. Konno, M. Nishiuchi, T. Tsuduki, Influence of Japanese diet consumption during pregnancy and lactation on lipid metabolism in offspring. *Nutrition*, 2019, **58**, 69.
 31. F. A. Duca, Y. Sakar, M. Covasa, The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity, *J Nutr Biochem.*, 2013, **24**, 1663.
 32. S. A. Segovia, M. H. Vickers, X. D. Zhang, C. Gray, C. M. Reynolds, Maternal supplementation with conjugated linoleic acid in the setting of diet-induced obesity normalises the inflammatory phenotype in mothers and reverses metabolic dysfunction and impaired insulin sensitivity in offspring, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 1448.
 33. J. K. B. Soares, A. P. Rocha-de-Melo, M. C. Medeiros, R. C. R. E. Queiroga, M. A. D. Bomfim, A. F. O. Souza, A. L. V. Nascimento, R. C. A. Guedes, Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012, **1820**, 1490.
 34. G. T. Ko, L. Kin-Hung, S. Wing-Yee, P. C. Tong, R. C. Ma, R. Ozaki, A. P. Kong, Y. Chun-Yip, X. Yang, H. Chung-Shun, W. C. Chu, J. C. Chan, Cutoff values for central obesity in Chinese based on mesenteric fat thickness, *Clin. Nutr.*, 2009, **28**, 679.
 35. R. L. R. Novais, A. C. C. Café, A. A. Morais, W. C. Bila, G. D. S. Santos, C. A. O. Lopes, V. S. Belo, M. C. C. Romano, J. A. Lamounier, Intra-abdominal fat measurement by ultrasonography: association with anthropometry and metabolic syndrome in adolescents, *J. Pediatr.*, 2019, **95**, 342.
 36. Y. Park, M. W. Pariza, Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA), *Food Res. Int.*, 2007, **40**, 311.
 37. K. M. Hargrave, B. J. Meyer, C. Li, M. J. Azain, C. A. Baile, J. L. Miner, Influence of dietary conjugated linoleic Acid and fat source on body fat and apoptosis in mice, *Obes. Res.*, 2004, **12**, 1435.
 38. F. M. Gregoire, C. M. Smas, H. S. Sul, Understanding Adipocyte Differentiation, *Physiol. Rev.*, 1998, **78**, 783.
 39. F. M. Sacks, M. K. Jensen, From High-Density Lipoprotein Cholesterol to Measurements of Function: Prospects for the Development of Tests for High-Density Lipoprotein Functionality in Cardiovascular Disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2018, **38**, 487.
 40. D. Kritchevsky, S. A. Tepper, S. Wright, S. K. Czarnecki, T. A. Wilson, Nicolosi R. J,

- Conjugated effects of the linoleic acid isomer on atherosclerosis: lesion growth and regression, *Lipids*, 2004, **39**, 611.
41. S. K. Gebauer, J. M. Chardigny, M. U. Jakobsen, B. Lamarche, A. L. Lock, S. D. Procto, D. J. Baer, Effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and cancer: a comprehensive review of epidemiological, clinical and mechanistic studies, *Adv Nutr.*, 2011, **2**, 332.
 42. J. M. Arbones-Mainar, M. A. Navarro, M. A. Guzman, C. Arnal, J. C. Surra, S. Acin, Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E. *Atherosclerosis*, 2006, **189**, 318.
 43. N. Nicod, R. S. Parker, E. Giordano, V. Maestro, A. Davalos, F. Visioli, Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on HDL functionality associated with reverse cholesterol transport, *J Nutr Biochem.*, 2015, **26**, 165.
 44. B. Aydin, Z. A. Şekeroğlu, V. Şekeroğlu, Effects of whey protein and conjugated linoleic acid on acrolein-induced cardiac oxidative stress, mitochondrial dysfunction and dyslipidemia in rats, *Biomed. Pharmacother.*, 2018, **107**, 901.
 45. S. Basu, U. Riserus, A. Turpeinen, B. Vessby, Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity, *Clin Sci.*, 2000, **99**, 511.
 46. Y. S. Diniz, P. P. Santos, H. B. Assalin, G. A. Souza, K. K. R. Rocha, G. M. X. Ebaid, F. R. F. Seiva, J. F. Amauchi, V. B. José Luiz, J. L. V. B. Novelli Filho, E. L. B. Novelli, Conjugated linoleic acid and cardiac health: Oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, **579**, 318.
 47. M. Plourde, C. Jew, S. C. Cunnane, P. J. Jones, Conjugated linoleic acids: why the discrepancy between animal and human studies?, *Nutr. Rev.*, 2008, **66**, 415.
 48. M. A. Belury, S. Y. Moya-Camarena, M. Lu, L. Shi, L. M. Leesnitzer, S. G. Blanchard, Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ), *Nutr. Res.*, 2002, **22**, 817.
 49. S. Y. Moya-Camarena, V. J. P. Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer, M. A. Belury, Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR alpha, *J Lipid Res.*, 1999, **40**, 1426.
 50. P. Dandona, A. Aljada, A. Bandyopadhyay, Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes, *Trends Immunol.*, 2004, **25**, 4.
 51. S. Bellmann, M. Minekus, P. Sanders, S. Bosgra, R. Havenaar, Human glycemic response curves after intake of carbohydrate foods are accurately predicted by combining in vitro gastrointestinal digestion with in silico kinetic modeling, *Clin. Nutr. Exp.*, 2018, **17**, 8.
 52. F. Moloney, S. Toomey, E. Noone, A. Nugent, B. Allan, C. E. Loscher, H. M. Roche, Antidiabetic effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue, *Diabetes*, 2007, **56**, 574.
 53. A. Festa, R. D'Agostinho Jr, G. Howard, L. Mykkanen, R. P. Tracy, S. M. Haffne, Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS), *Circulation*, 2000, **102**, 42.
 54. I. Mohammadi, A. H. Mahdavi, F. Rabiee, M. H. N. Esfahani, K. Ghaedi, Positive effects of conjugated linoleic acid (CLA) on the PGC1- α expression under the inflammatory conditions induced by TNF- α in the C2C12 cell line, *Gene*. 2020, **735**, 144394.
 55. Y. Huang, Y. Li, Q. Liu, J. Zhang, Z. Zhang, T. Wu, Q. Tang, C. Huang, R. Li, J. Zhou, G. Zhang, Y. Zhao, H. Huang, J. He, Telmisartan attenuates obesity-induced insulin resistance via suppression of AMPK mediated ER stress. (No prelo), 2020.
 56. L. Clément, H. Poirier, I. Niot, V. Bocher, M. Guerre-Millo, S. Krief, B. Staels, P. Besnard, Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and

- fatty liver in the mouse, *J. Lipid Res*, 2002, **43**, 1400.
57. R. Rodrigues, J. Soares, H. Garcia, C. Nascimento, M. Medeiros, M. Bomfim, M. C. Medeiros, R. Queiroga, Goat Milk Fat Naturally Enriched with Conjugated Linoleic Acid Increased Lipoproteins and Reduced Triacylglycerol in Rats, *Molecules*, 2014, **19**, 3820.
 58. T. G. Moreira, A. C. Gomes-Santos, L. S. Horta, M. C. Goncalves, A. F. Santiago J. G. Lauar, D. S. Reis, A. B. Castro-Junior, L. Lemos, M. Guimarães, E. C. Aguilar, A. Pap, J. F. Amarale, J. I. Alvarez-Leite, D. C. Cara, R. M. Rezende, L. Nagy, A. M.C Faria, T.U. Maioli, Consumption of conjugated linoleic acid (CLA)-supplemented diet during colitis development ameliorates gut inflammation without causing steatosis in mice, *J. Nutr. Biochem.*, 2018, **57**, 238.
 59. M. S. Ashwell, R. P. Ceddia, R. L. House, J. P. Cassady, E. J. Eisen, T. E. Eling, j. B. Collins, S. F. Grissom, J. Odle, *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid alters hepatic gene expression in a polygenic obese line of mice displaying hepatic lipidosis, *J. Nutr. Biochem.*, 2010, **21**, 848.
 60. A. Bialek, A. Tokarz, A. Dudek, W. Kazimierska, W. Bielecki, *Lipids Health Dis.*, 2010, **9**, 126.
 61. C. Alasnier, O. Berdeaux, J. M. Chardigny, J. L. Sébédio, Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols, *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **13**, 337.
 62. M. Yamasaki, S MA, K. H. Mishima, G. Kimura, M. Sasaki, M. Kasai, H. Tachibana, K. Yamada, Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological alteration in rat liver tissues, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 6367.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo materno de CLA nas duas concentrações testadas durante a gestação e lactação promoveu um efeito ansiolítico na prole, pois os grupos experimentais apresentaram maior número de entradas nos braços abertos e tempo gasto na área central em LCE, translocaram e deambularam mais na área clara da caixa claro-escuro e apresentaram maior número de rearing no OF, e este efeito foi correlacionado com o efeito antioxidante observado nos cérebros desses animais, uma vez que os animais tratados com CLA tiveram diminuição do MDA e aumento da glutathione. Este lipídio também promoveu melhora metabólica, uma vez que diminuiu a curva glicêmica, aumentou HDL-colesterol no sangue e maiores quantidades de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados no fígado. Por outro lado, o CLA aumentou o peso corporal, IMC, índice de adiposidade, gordura epididimal, retroperitoneal, e maior quantidade de gordura no fígado, porém não aumentou gordura mesentérica e diminuiu a circunferência abdominal. Até o momento, o impacto de uma dieta materna contendo o mix comercial de CLA na prole em desenvolvimento ainda não era conhecido, porém os efeitos ainda são controversos. Por este motivo mais pesquisas acerca do CLA devem ser realizadas, principalmente avaliando os efeitos em humanos e a ação dos isômeros separadamente, uma vez que o *cis-9 trans-11* CLA e o *cis-10 trans-12* CLA, parecem exercer efeitos diferentes no organismo.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo - Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain

Journal of Affective Disorders 243 (2019) 75–82



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Affective Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jad



Research paper

Maternal supplementation with conjugated linoleic acid reduce anxiety and lipid peroxidation in the offspring brain

Michelly Pires Queiroz^{a,*}, Martiniano da Silva Lima^b, Marília Ferreira Frazão Tavares de Melo^b, Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo^b, Daline Fernandes de Araújo^d, Gerlane Coelho Bernardo Guerra^d, Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga^{a,c}, Juliana Késsia Barbosa Soares^{a,b}

^a Program of Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa, PB 55051-900, Brazil

^b Laboratory of Experimental Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Campina Grande, Cuiti, CE, Brazil

^c Laboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^d Department of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Gestation and lactation
Omega-3
Polyunsaturated fatty acids
Antioxidants

ABSTRACT

Background: Maternal consumption of fatty acids can alter neuronal membrane function, synaptic connections, and protect the brain from alterations caused by disturbances such as lipid peroxidation and anxiety in the offspring. We aimed to investigate how the maternal consumption of conjugated linoleic acid (CLA) interferes in anxiety behavior of the offspring and cerebral lipid peroxidation.

Methods: Three groups were formed: control (CG) - diet without CLA; CLA1 - diet containing 1% of CLA; and CLA3 - diet containing 3% of CLA. These diets were offered to the mothers from the 7th day of gestation until the end of lactation. The following behavioral tests were used: Elevated plus maze (EPM), Open Field (OF) and Light-dark Box (LDB). Levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione were measured in the offspring's brains. Data were analyzed by ANOVA followed by the Holm-Sidak post test or the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

Results: CLA1 and CLA3 showed higher number of entries in the open arms and time spent in the central area in EPM; they translocated and ambulated more in the clear area of the LDB and presented more rearing in the OF compared to CG ($p < 0.05$); moreover, they presented higher concentration of glutathione and lower MDA in brain tissue ($p < 0.05$).

Conclusion: We evaluated the effect of maternal consumption of CLA on anxiety and lipid peroxidation in rats' offspring, but a similar study should be performed in humans.

Conclusions: Maternal intake of CLA induced a decrease in the parameters of anxiety and cerebral lipid peroxidation in the offspring.

1. Introduction

The maternal diet during pregnancy alters the development of the offspring's brain and their subsequent behavior. The formation of the nervous system occurs during gestation and lactation. This phase is known as the "critical period of development". During this period, the processes of neurogenesis, gliogenesis, cell migration and differentiation, myelination, formation of synapses, as well as the synthesis and the release of neurotransmitters occur (Madore et al., 2014).

Maternal consumption of lipids in the diet may determine the type of fatty acid that will accumulate in the offspring's brain tissue (Vetander et al., 2012; Innis, 2014). This occurs because the lipids from

the maternal diet are driven to the maternal liver and are easily transferred to the placenta, involving fatty acid transport and binding proteins. During pregnancy, the fetus can desaturate and elongate essential fatty acids. However, for this to occur, it is necessary that the fatty acids must be supplied in the diet (Gomes, 2002; Husebult et al., 2008).

A lipid composition of neuronal membranes influences a subjective perception. Emotional behavior is substantially regulated by the membrane barrier and synaptic connection yield, and it may cause anxiety disorder (Müller et al., 2015). Neural maturation during the critical period is a more sensitive phase for the development of anxiety-triggering circuits (Leonardo and Hen, 2008).

* Corresponding author.

E-mail addresses: queiroz_m.p@hotmail.com (M.P. Queiroz), mqqueiroz@outlook.com.br (R.d.C.R.d.E. Queiroga).

<https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.09.020>

Received 18 November 2017; Received in revised form 9 August 2018; Accepted 10 September 2018

Available online 11 September 2018

0165-0277/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão de aprovação do Comissão de Ética no uso de animais de laboratório.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CBiotec
Centro de Biotecnologia
UFPB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 4 de novembro de 2013.
CEUA Nº 0407/13

Ilmo(a). **Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga**
Departamento **Nutrição - CCS - UFPB**

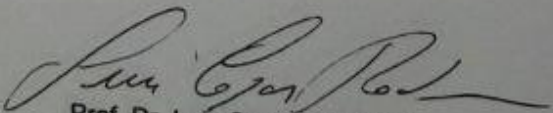
Orientando(a): **Raphaela Araújo Veloso Rodrigues, (Outros (Justificar))**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **01/11/2013** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Efeitos de diferentes tipos de óleos sobre o desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas durante a gestação e o aleitamento.**

Com previsão de empregar **15 Ratas Wistar** **- ANIMAIS EXTERNOS**
AO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **01/11/2013 a 01/07/2014**

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

ANEXO B – Comprovante de tradução do Artigo I




English Consulting Brazil

March 11th, 2018

To Whom It May Concern,

This is to declare that I, Christopher James Quinn, a professional Native Canadian English teacher, editor, and translator for English Consulting Brazil, have reviewed and edited the article entitled "Maternal consumption of conjugated linoleic acid (CLA) interferes in anxiety behavior of the offspring and cerebral oxidative stress" for structure, grammar, punctuation, spelling, word choice, and readability.

Isto é para declarar que eu, Christopher James Quinn, um professor, editor e tradutor profissional de inglês canadense nativo, revisou e editou o artigo intitulado "maternal consumption of conjugated linoleic acid (CLA) interferes in anxiety behavior of the offspring and cerebral oxidative stress" para estrutura, gramática, pontuação, ortografia, escolha de palavras e legibilidade.

If you have any questions, concerns, or doubts regarding the review/editing, please contact me at: englishconsultingbrazil@gmail.com.

Se você tiver dúvidas ou preocupações sobre a revisão/editação, entre em contato comigo no seguinte email: englishconsultingbrazil@gmail.com.

Thank you and kind regards,
Obrigado e melhores cumprimentos,



Christopher J. Quinn
Teacher, Editor, Portuguese to English Translator, English Consultant
ECB – English Consulting Brazil
Natal, RN, Brazil

ECB – English Consulting Brazil
CNPJ: 15.156.534/0001-89
Natal – RN

ANEXO C – Comprovante de tradução do Artigo II

Declaration of Translation and/or Corrections

David Peter Harding - U.S.A. - American Citizen
Independent Native American English Author and Translator
Pharmacist - Born in California, USA
E-mail kawaii@yahoo.com - Tel: 055-083-99332-1042



800+ published articles and abstracts to English from Portuguese in all areas.
Averaging 84 full translations per year.

PUBLICATIONS AS AUTHOR - Royal Society of Chemistry - Analytical Methods; Great Britain, Trends in Analytical Chemistry - U.S.A., A.C.T.A., (The Netherlands), Talanta (Oxford).

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/6842007229568011>

ORCID: David Harding: <https://orcid.org/0000-0003-3684-6262>

Physics online at Academia.edu - Current Papers and Talks: <https://ufph.academia.edu/KawaiiHi>

Manuscript Areas Verified

Language & Grammar and Punctuation

1. Sentence construction, English word choice, clarity, parallel structure, tone, voice, redundancy - Subject-verb agreement, article usage, spellings, tense, prepositions, pronouns and determiners, adverbs and adjectives, relative clauses - Commas, colon, semicolons, dashes, quotation marks, apostrophes.

Style and Consistency, Clarity and coherence

2. Writing Style, Logical Flow - Ensuring logical flow between sentences and paragraphs - Eliminate repetitive and redundant content - Ensure clear unambiguous statements

Figures and Tables

3. Technical word choice - Subject-specific nomenclature - Appropriate units of measurement, symbols, and variables

ANEXO C – Comprovante de tradução do Artigo II**Translated Document**

Supplemented CLA during pregnancy and lactation in primiparous rats

(Partial Translation)

David Peter Harding

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David Peter Harding", is written over a horizontal line. Below the signature, there is a small, illegible mark.

Date: 02 / 06 / 2020 :
Month/ Day / Year

ANEXO D – Comprovante de submissão do Artigo II

18/02/2020

ScholarOne Manuscripts



Food & Function



Home



Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Food & Function

Manuscript ID

FO-ART-02-2020-000410

Title

MATERNAL CONSUMPTION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) IMPROVES TOLERANCE TO GLUCOSE AND HDL-CHOLESTEROL IN PROLE

Authors

Queiroz, Michelly
Lima, Martiniano
DE MELLO, MARÍLIA
Queiroga, Rita
Barbosa, Juliana

Date Submitted

18-Feb-2020