

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Nutrigenômica: Efeito de dietas contendo ácido linolênico na expressão gênica de receptores nucleares relacionados ao metabolismo lipídico

CAROLINA BESPALHOK JACOMETO

Pelotas, 2012

Carolina Bespalhok Jacometo

Nutrigenômica: Efeito de dietas contendo ácido linolênico na expressão gênica de receptores nucleares relacionados ao metabolismo lipídico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Melhoramento genético e reprodução animal).

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello
Co-orientadores: Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Dr. Eduardo Schmitt

Pelotas, 2012

Banca examinadora:

Ana Paula Nunes, Dra., Universidade Federal de Pelotas

Gilson Teles Boaventura, Dr., Universidade Federal Fluminense

Vinicius Farias Campos, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Cassio Cassal Brauner, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Nelson José Laurino Dionello, Dr., Universidade Federal de Pelotas
(Orientador)

Agradecimentos

Aos meu pais, Maria Neuza Bernalhok e Teodoro Jacometo, pelo apoio incondicional, suporte, incentivo, carinho e compreensão, não há palavras que consigam expressar toda a minha gratidão.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFPel, pela oportunidade de realizar o mestrado, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a CAPES pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Dr. Nelson Dionello, por ter me aceitado como sua orientada e pela sua colaboração durante todo o mestrado.

Aos meus co-orientadores, doutores Eduardo Schmitt e Luiz Pfeifer, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, cobranças, paciência durante meu mestrado, e pelo auxílio na discussão de ideias e resultados.

Ao Dr. Augusto Schneider, pelos ensinamentos das técnicas laboratoriais, pela paciência e disponibilidade em sanar minhas dúvidas.

Ao Dr. Marcio Nunes Corrêa, pela acolhida e orientações.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) da UFPel, colegas pós-graduandos e colaboradores, pelo auxílio na execução do projeto, especialmente à Francielle Bado e Fernanda Trindade, por toda a dedicação e comprometimento.

Ao Biotério Central – UFPel, pela concessão do espaço e animais para realização do trabalho, e aos funcionários por todo auxílio.

A Dra. Leonor Soares e ao M.V. Milton Amado, pelos ensinamentos e por abrir minha mente para a ciência, excluindo qualquer preconceito.

Ao Dr. Antônio Oliveira e Dr. Augusto Del Pino, responsáveis pelos laboratórios de Genômica e Fitomelhoramento e Bioquímica clínica, respectivamente, pela disponibilidade de pessoal, infra-estrutura e materiais para a condução das atividades.

Ao Diego, por tornar meus dias mais felizes, por toda a paciência, carinho, compreensão e companheirismo.

As minhas amigas de longe, Janaína, Nayara, Ana Paula e Karen, por toda torcida e amizade verdadeira.

Resumo

JACOMETO, Carolina Bespalhok. **Nutrigenômica: Efeito de dietas contendo ácido linolênico na expressão gênica de receptores nucleares relacionados ao metabolismo lipídico.** 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dietas contendo ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) exercem controle negativo sobre a lipogênese hepática e seus efeitos são observados ao nível transcricional. Os ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6, quando consumidos durante a gestação podem beneficiar a saúde materna e da prole. O receptor nuclear peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), quando ativado pelos AGPIs favorecem a atividade de genes lipolíticos. O liver X receptor α (LXR α) e sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) são receptores nucleares que ativam genes lipogênicos, e são reprimidos pelos AGPIs. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos de dietas, ricas em ômega-3 ou ômega-6, consumidas ao longo de três gerações, sobre parâmetros bioquímicos e o nível de expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo lipídico. Para este estudo foram utilizados ratas adultas, da linhagem Wistar/UFPel, compondo a geração fundadora, fêmeas que receberam ração com óleo de linhaça (Grupo OM, n=18) ou óleo de soja (Grupo CTL, n=18) durante toda a gestação. No desmame da F1 foram selecionadas 48 progênies fêmeas, então divididas em três grupos, fêmeas oriundas do Grupo OM, que continuaram a receber dieta com óleo de linhaça (Grupo OM/OM, n=16), fêmeas oriundas do Grupo OM, que passaram a receber dieta com óleo de soja (Grupo OM/CTL, n=16) e fêmeas oriundas do Grupo CTL, que continuaram a receber dieta com óleo de soja (Grupo CTL/CTL, n=16). No desmame da F2 foram selecionadas 16 progênies fêmeas de cada grupo que seguiram recebendo o mesmo tratamento (Grupo OM/OM/OM; Grupo OM/CTL/CTL e Grupo CTL/CTL/CTL). As fêmeas foram avaliadas no período pré parto (19 \pm 1 dias de gestação) e no pós-parto (21 dias após o parto). O perfil de ácidos graxo da dieta não afetou o consumo de ração e nem a taxa de prenhez (P>0,05), porém as fêmeas alimentadas com dieta rica em ômega-3 tiveram filhotes mais pesados (P=0,01). A dieta com alto nível de ômega-3 diminuiu os níveis séricos de triglicerídeos (P=0,04), e mantiveram constante os níveis de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs), enquanto animais alimentados com uma proporção maior de ômega-6 tiveram níveis flutuantes de AGNEs, e um notável aumento no período pós-parto da geração F2 (P=0,02). PPAR α , RXR α , LXR α and SREBP-1c foram regulados pelas dietas ao longo das gerações. No período pré-parto da geração F2, os animais alimentação com alto ômega-3 apresentaram uma menor expressão de LXR α (P<0,001), indicando sua efetividade em inibir a ação lipogênica. Nossos resultados indicam que os efeitos dos AGPIs no controle da lipólise e lipogênese é cumulativo ao longo das gerações e o ômega-3 exerce um controle mais efetivo.

Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados, lipogênese, lipólise, óleo de linhaça, multigeracional, rato.

Abstract

JACOMETO, Carolina Bespalhok. **Nutrigenomics: Effect of linolenic acid containing diets on gene expression of nuclear receptors related to lipid metabolism.** 2012. 47 f. Dissertation (Master). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are negative regulators of hepatic lipogenesis and their effects are at transcriptional levels. The essential fatty acids omega-3 and omega-6, consumed during pregnancy can benefit maternal and offspring health. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), when activated by PUFAs enhances lipolytic genes. Liver X receptor α (LXR α) and sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) are nuclear receptors that enhance lipogenic genes, and are repressed by PUFAs. The present study aimed to investigate the effects of diets, rich in omega-3 or omega-6, consumed throughout three generations, on biochemical parameters and the expression level of some genes related to lipid metabolism. For this study we used adult Wistar/UFPel rats, composing the founding generation, females that received diet with flaxseed oil (OM group, n=18) or soybean oil (CTL group, n=18) during pregnancy. At F1 weaning, 48 females offspring were selected and allocated in three groups, females from OM group, that continued receiving diet with flaxseed oil (OM/OM group, n=16), females from OM group, that started to receive diet with soybean oil (OM/CTL group, n=16) and females from CTL group, that continued receiving diet with soybean oil (CTL/CTL group, n=16). At F2 weaning, 16 females offspring of each group were selected and continued receiving the same diets (OM/OM/OM group, OM/CTL/CTL group and CTL/CTL/CTL group). The females were evaluated in the pre-partum (19 \pm 1 days of pregnancy) and at postpartum period (21 days after parturition). The dietary fatty acid profile did not affect the diet daily intake and the pregnancy rate ($P>0.05$), however, dams that received the diet rich in omega-3 had heaviest offspring ($P=0.01$). Diets with higher omega-3 level decreased triglycerides serum levels, and maintained constant the non-esterified fatty acids (NEFA) levels ($P=0.04$), while the animals fed with high proportion of omega-6 had fluctuant NEFA levels, and an outstanding increase in the postpartum period of F2 generation ($P=0.02$). PPAR α , RXR α , LXR α and SREBP-1c had been regulated by the diets throughout generations. In the pre-partum moment of F2 generation, the animals fed with high omega-3 had a lower expression of LXR α ($P=0.01$) indicating its effectiveness on inhibiting lipogenic action. Our results indicate that the PUFAs effect on the control of lipolysis and lipogenesis is cumulative throughout generations and the omega-3 exerts a better control.

Key words: Polyunsaturated fatty acids, lipogenesis, lipolysis, flaxseed oil, multigenerational, rat.

Sumário

1. Introdução Geral.....	8
2. Projeto Pesquisa	12
2.1 Caracterização do Problema.....	13
2.2 Objetivos e Metas	15
2.2.1 Objetivo geral	15
2.2.2 Objetivos específicos	15
2.3 Metodologia e Estratégia de ação	16
2.4 Resultados e Impactos esperados	19
2.5 Cronograma, Riscos e Dificuldades	20
2.6 Aspectos Éticos.....	21
2.7 Referências Bibliográficas	22
3. Relatório de Trabalho de Campo	23
3.1. Local e animais.....	23
3.2. Elaboração das dietas experimentais.....	23
3.3. Manejo dos animais	23
3.4. Coleta dos materiais biológicos.....	24
4. Artigo	25
5. Conclusão geral	43
6. Referências bibliográficas	44

1. Introdução Geral

O período gestacional, bem como o pós-parto recente, exercem uma grande influência no desenvolvimento e crescimento do feto, e posteriormente na saúde da prole. Gestantes que são superalimentadas ou passam por restrição alimentar estão predisponentes a gerar proles com transtornos metabólicos de relevante impacto na saúde pública humana e também na produção animal, como por exemplo diabetes e obesidade (SIMMONS 2011). O uso de modelos animais é essencial para pesquisas nesta área, principalmente roedores (VICKERS et al., 2000; CHURCH et al., 2008; DUNN and BALE, 2009; PALSDOTTIR et al., 2011) e pequenos ruminantes (HUSTED et al., 2008; ZHANG et al., 2010; SHARMA et al., 2011) são amplamente utilizados, devido a facilidade de manejo e rapidez nos resultados multigeracionais, mas também encontram-se trabalhos com outras espécies (FUNSTON et al., 2010a; FUNSTON et al., 2010b).

Recentemente os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) têm se destacado nas pesquisas, devido à grande influência no período de desenvolvimento fetal como fonte de energia, manutenção da fluidez, permeabilidade e conformação das membranas celulares e também como precursores de diversos compostos bioativos do sistema imune (HAGGARTY 2010). A quantidade e qualidade dos ácidos graxos consumidos pela mãe antes e durante o período de gestação e lactação podem induzir mudanças permanentes na expressão gênica e metabolismo da prole (WALTERLAND AND RACHED, 2006). Neste sentido, os AGPIs linoléico (18:2, ω -6) e α -linolênico (18:3, ω -3) se destacam. Estes são ácidos graxos essenciais, competem pelas mesmas enzimas, porém, apresentam funções diferenciadas (BRENNAN et al., 2009), ambos influenciam a expressão gênica, especialmente de genes relacionados ao metabolismo lipídico.

Investigações em um novo campo da genética molecular mostram que a relação de vários fatores ambientais, como o estilo de vida, a exposição a produtos tóxicos, o uso de certas drogas e alimentação desbalanceada influenciam os genes e sua expressão, através de interações químicas e físicas

com o DNA, com proteínas e grupos químicos (SKINNER 2008). Considerando a influência dos fatores ambientais sobre o genoma dos indivíduos, a ciência passou a estudar as mudanças na expressão dos genes que não ocorrem pela alteração da sequência de nucleotídeos no DNA, mas são herdáveis através da linha germinativa ao longo de gerações, podendo apresentar efeitos multigeracionais ou transgeracionais, sendo este estudo denominado de epigenética (SKINNER, 2011). A manipulação de dietas como uma ferramenta epigenética pode ser considerada uma nova vertente do melhoramento genético animal, pois é possível adaptar a prole, e também sucessivas gerações, a condições adversas e prevenir a ocorrência de certas doenças desde o ambiente uterino materno, através da reprogramação celular.

A regulação epigenética pode acontecer de diferentes formas, o mecanismo mais conhecido é a metilação de citosinas do DNA, seguido das modificações covalentes na região amino terminal das histonas (acetilação, ubiquitilação e fosforilação) e ação de pequenos RNAs interferentes (BURDGE and LILLYCROP, 2010). Na metilação do DNA, um grupo metil é adicionado ao carbono 5 da citosina em pares de dinucleotídeo CpG, localizados na região 5', próximas ao promotor, conhecidas como "ilhas CpG" (GOLDBERG et al., 2007). Em geral, a metilação das ilhas CpG está associada com o silenciamento gênico, enquanto sequências não metiladas estão associadas a atividade transcricional, este processo ocorre através de um grupo de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs) (BURDGE and LILLYCROP 2010), controlando o acesso da maquinaria de transcrição ou pelo recrutamento de proteínas ligantes ao grupamento metil (BARRES et al., 2011). O estabelecimento dos padrões epigenéticos durante o desenvolvimento fetal é fator crucial para a vida adulta, e é diretamente influenciado pelas condições ambientais (GUERRERO-BOSAGNA et al., 2011). Esses efeitos epigenéticos podem ser classificados como mutigeracionais, quando não há uma exposição direta ao fator ambiental, ou transgeracional, quando a transmissão entre gerações não envolve exposição direta (SKINNER 2008).

Trabalhos indicam que os AGPIs podem exercer efeitos regulatórios na expressão gênica, em nível hepático, em genes centralizadores do metabolismo lipídico e de carboidratos (JUMP 2008). Os principais receptores nucleares que mediam essas funções são os PPARs, RXRs, LXRs, SREBP-1c

e ChREBP (do inglês, peroxissome proliferator-activated receptors, retinoid X receptor, liver X receptor, sterol regulatory element binding protein-1c, e carbohydrate regulatory element binding protein, respectivamente) (JUMP et al., 2005).

PPARs são fatores de transcrição pertencentes à superfamília de receptores nucleares hormonais, apresentam-se em quatro isoformas (PPAR α , β , γ 1 e γ 2), sendo que no fígado o PPAR α é expresso mais abundantemente (PEGORIER et al., 2004), e quando ativado por AGPIs desencadeia a ativação de genes responsáveis pela β -oxidação de ácidos graxos (JUMP 2008). Para que seus genes alvo sejam ativados, é necessário que ocorra uma heterodimerização do PPAR com o RXR, para então se ligarem a uma região conhecida por PPRE (do inglês, peroxissome proliferator response element), e pela ação dos coativadores ou correpressores, iniciar ou impedir a transcrição gênica (KOTA et al., 2005).

RXR é membro da superfamília de receptores nucleares hormonais esteróides/tireóides que age como fator de transcrição principalmente nas funções de desenvolvimento, diferenciação, metabolismo e morte celular, e dentre as suas três isoformas (α , β e γ), a mais expressa no fígado é o RXR α (DAWSON et al., 2012).

LXRs pertencem à superfamília de receptores nucleares hormonais, e como os PPARs, formam heterodímeros com o RXR, desempenhando um papel crucial na regulação do metabolismo dos ácidos graxos, os LXRs ativam a expressão do SREBP-1c, um gene importante no processo de lipogênese (YOSHIKAWA et al., 2003). Há duas isoformas de LXR (α e β), sendo que no fígado o LXR α é a mais expressa, sendo ativado pela ligação de oxisteróis, e atuando na homeostase do colesterol (YOSHIKAWA et al., 2001).

SREBPs são proteínas de ligação sintetizadas na forma inativa, e sua ativação depende de clivagens proteolíticas, até a forma ativa, altamente expressa no fígado de humanos e roedores, a SREBP-1c (FOUFELLE and FERRE, 2002). SREBP-1c age sinergicamente com LXR α na regulação transcricional de enzimas lipogênicas e colesterogênicas (TAKEUCHI et al., 2010).

ChREBP é um fator de transcrição sensível à insulina, sendo responsável pela conversão hepática do excesso de carboidratos em lipídeos,

e é um dos genes alvos do LXR α (CHA and REPA, 2007). É considerado um fator de transcrição que regula genes lipolíticos e glicolíticos, através da glicose e AGPIs (DENTIN et al., 2006). Todos esses genes já mencionados sofrem influência dos AGPIs, ativando vias lipolíticas e inativando lipogênicas em nível hepático, entretanto há também outras formas de regulação, entre elas a ação dos co-repressores de receptores nucleares (NCoR). Eles interagem com os receptores nucleares livres, reprimindo a função transcricional (ABEDIN et al., 2009) e promovendo o silenciamento gênico.

2. Projeto Pesquisa

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Zootecnia
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Perfil de ácidos graxos na dieta: efeitos epigenéticos por marcadores moleculares e zootécnicos de três gerações

Carolina Bernalhok Jacometo – Mestranda
Nelson José Laurino Dionello – Orientador

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (Registro nº0976). Cadastro no COCEPE – 5.04.02.039

Pelotas, 2011

2.1 Caracterização do Problema

O estado nutricional de gestantes pode promover diferenças na remodelação e morfologia dos tecidos fetais, determinando mudanças em tipos de células especializadas, associadas a funções fisiológicas (Newnham et al., 2002). Recentemente, isto tem sido reconhecido como um importante mediador sobre a susceptibilidade de algumas doenças na prole (Langley-Evans, 2006), associadas a diferenças entre programação pré-natal e a realidade pós-natal (Newnham, et al. 2002). Os ácidos graxos são necessários para o desenvolvimento do feto como fonte de energia, para manutenção da fluidez, permeabilidade e conformação das membranas e como precursores de importantes compostos bioativos como as prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Todos os ácidos graxos podem fornecer energia, porém as funções estruturais e metabólicas requerem principalmente ácidos graxos poliinsaturados (Haggarty, 2010).

A subnutrição, ou excesso de nutrientes durante a vida fetal, pode induzir à diferenças no metabolismo de carboidratos e lipídios em animais e humanos (Guillemainm, et al., 2007). Husted et al. (2008) demonstraram que progênes de ovelhas expostas a baixos níveis energéticos ao final da gestação, tiveram alterações no desenvolvimento da célula pancreática e reduzida plasticidade na “down-regulation” e secreção de insulina em resposta a um desafio metabólico na fase adulta.

A base fisiológica para o início dessas doenças é a alteração da programação da expressão gênica durante os períodos críticos do desenvolvimento que irão iniciar uma cascata de efeitos na diferenciação celular que não manifesta anormalidades fisiológicas e resulta em doenças na vida adulta. Tóxicos (perturbadores endócrinos) e fatores ambientais (estado nutricional) podem conduzir a estas doenças na vida adulta. Estas doenças variam de tumores, problemas reprodutivos e transtornos metabólicos (obesidade, diabetes, etc). A grande maioria destas doenças vêm sendo estudadas com intuito de estabelecer seus mecanismos de ação. Embora há evidências de que estes compostos e fatores ambientais favoreçam a ocorrência de doenças na vida adulta, os mecanismos moleculares envolvidos no processo ainda não estão claros (Skinner, 2008).

Embora as células do corpo humano contenham a mesma sequência de DNA, a função e o fenótipo diferem (Reik, 2007). Isto implica em que, independentemente da programação genética, o fenótipo é regulado por outro fenômeno, chamado de Epigenética, definido como o estudo de mudanças no fenótipo ou na expressão gênica causadas por mecanismos que não alteram a sequência do DNA. Durante o desenvolvimento, células diferenciadas acumulam modificações epigenéticas, que podem ser removidas antes da divisão celular ou em poucas divisões, enquanto outras modificações podem

manter-se por diversas divisões. Estas alterações epigenéticas, depositadas no desenvolvimento inicial, são capazes de adaptar-se durante a vida à resposta aos estímulos intrínsecos e ambientais. Portanto, as alterações epigenéticas podem conduzir a diferentes fenótipos e doenças. A regulação epigenética controla a transcrição em três níveis: metilação do DNA, modificações das histonas e RNAs não codificantes. (Nelissen, et al.,2010).

Uma melhor compreensão sobre estes mecanismos têm avançado com o uso da PCR em tempo real e com o padrão de metilação do DNA, sugerindo novas formas de avaliação das relações entre programação epigenética e vias metabólicas ao longo da vida.

Em ratos, por exemplo, a restrição protéica intra-uterina modificou a expressão de 102 genes no hipotálamo e 36 genes no rim das proles (Langley-Evans, et al., 2005) evidenciando que a manipulação da dieta das gestantes, poderia ser utilizada como terapia preventiva para diminuir síndromes metabólicas nas gerações futuras. Nutrientes consumidos durante a gestação como o ácido graxo essencial ômega-3, têm demonstrado ser uma alternativa potencial para melhorar a saúde das progênes em animais e humanos (Yavin, et al., 2009). Uma alternativa tem sido a utilização de ratos e camundongos, como modelos in vivo, os quais permitem melhor acompanhamento e controle de diferentes fases da vida pré e pós-natal, facilitando testar hipóteses de causalidade em epidemiologia humana ou mesmo em ruminantes (Meyer, et al., 2009; Schwitzgebe, et al. , 2009).

Com base nessas evidências, nossa hipótese é que uma dieta rica em ácido graxo ômega-3 fornecida em sucessivas gerações pode alterar níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e reprodutivo em progênes de roedores, determinando uma melhora na resposta a desafios metabólicos.

2.2 Objetivos e Metas

2.2.1 Objetivo geral

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

2.2.2 Objetivos específicos

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

2.3 Metodologia e Estratégia de ação

Animais: Serão utilizados 48 ratos *Rattus norvegicus* – Wistar/UFPel, adultos com 60 dias de vida, sendo 12 machos e 36 fêmeas, sem doença prévia. No momento da admissão os animais serão distribuídos em dois grupos de peso uniforme e passarão a receber suas correspondentes dietas, iniciando o controle de consumo diário. Será realizado um período de adaptação de 30 dias, os animais ficarão alojados em gaiolas individuais, recebendo a correspondente ração e água *ad libitum*. Ao final do período de adaptação as fêmeas serão acasaladas com machos na proporção 3:1, por um período de nove dias. Após o acasalamento as fêmeas voltarão para suas gaiolas individuais e serão acompanhadas quanto ao peso semanal. Ao nascimento todas as gestantes e ninhadas serão pesadas. No final do período de amamentação serão escolhidas aleatoriamente 36 progênies fêmeas do grupo ômega, 18 progênies fêmeas e 18 machos do grupo controle da geração zero. Os selecionados irão compor a primeira geração, distribuída em três grupos: Grupo ômega (irão receber a mesma dieta de suas mães durante toda a vida), Grupo Ômega/Controle (filhos de mães da dieta ômega, que irão receber dieta controle), Grupo Controle (irão receber a mesma dieta de suas mães durante toda a vida). Ao atingirem a maturidade sexual, por volta de 60 dias, as fêmeas serão acasaladas com machos na proporção 3:1, por um período de nove dias. Após o acasalamento as fêmeas voltarão para suas gaiolas individuais e serão acompanhadas quanto ao peso semanal. Após o nascimento todas as gestantes e ninhadas serão pesadas. Ao final do período de amamentação serão escolhidas aleatoriamente 18 progênies fêmeas de cada grupo e 18 progênies machos do grupo controle da primeira geração. Os selecionados irão compor a segunda geração, distribuída em três grupos: Grupo ômega (continuarão a receber a dieta ômega durante toda a vida), Grupo Ômega/Controle/Controle (apenas as avós receberam dieta ômega, irão receber dieta controle, assim como suas mães), Grupo Controle (continuarão a receber a dieta controle durante toda a vida). Ao atingirem a maturidade sexual, por volta de 60 dias, as fêmeas serão acasaladas com machos na proporção 3:1, por um período de nove dias. Após o acasalamento as fêmeas voltarão para suas gaiolas individuais e serão acompanhadas quanto ao peso semanal. Após o nascimento todas as gestantes e ninhadas serão pesadas, e esta terceira geração será mantida até o final do período de amamentação (Tabela 1).

Dieta: Será fornecida uma ração pelletizada, sendo esta isoproteica e isoenergética entre os grupos, diferindo-se apenas quanto à fonte lipídica (grupo controle: óleo de soja; grupo tratamento ômega-3: óleo de linhaça). A ração e a água serão fornecidas *ad libitum* e a composição será baseada em:

amido de milho, caseína, maltodextrina, sacarose, óleo, fibra, mix mineral, mix vitamínico, L-cistina, bitartarato de colina e antioxidante, seguindo as recomendações da AIN-93.

Alojamento: Os animais serão mantidos em gaiolas individuais, com as seguintes características: medidas 40x50x20cm, produzida em polipropileno, com grades em arame de aço inox com polimento eletrostático e bebedouro de vidro com capacidade para 500 mL, rolha de borracha anti-ácida e bico de aço inoxidável. O ensaio biológico será desenvolvido nas dependências do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, em estufas de circulação de ar, com temperatura e umidade relativa de 20-22°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Coleta das amostras: No 20º dia de gestação, quatro fêmeas de cada grupo, e no 21º dia de lactação seis fêmeas lactantes e seis progênes de cada grupo serão eutanasiadas. Será realizada coleta de sangue total por punção intracardíaca, sendo os animais previamente anestesiados com pentobarbital (100mg/kg IP) conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004). Neste momento além do sangue, serão coletados nas eutanásias pré-parto: fígado, tecido adiposo e muscular, placenta e rim, e nas eutanásias pós-parto: fígado, tecido adiposo e muscular, útero, ovário e rim, sendo estes mantidos a -196°C congelados em nitrogênio líquido.

Variáveis zootécnicas: Os animais serão avaliados quanto ao ganho de peso semanal, quantificação da ocorrência de distúrbios na gestação, problemas no parto, número de progênes por fêmea, peso e ganho de peso da progênie, proporção macho:fêmea, entre outras variáveis que possam ser interessantes ao projeto.

Perfil metabólico: Serão avaliados os níveis de triglicerídeos, colesterol total, HDL e glicose através do método colorimétrico com Kits enzimáticos (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) conforme a metodologia indicada pelo fabricante. Para leitura destes testes será utilizado espectrofotômetro de luz visível (FEMTO 435®). A mensuração do perfil endócrino Insulina e Glucagon, será realizada através de Radioimunoensaio (Wilson et al., 1983; Purup et al., 1993).

Perfil de ácidos graxos: A análise do perfil de ácidos graxos da dieta será realizada no Laboratório de Cromatografia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFPel. Os lipídeos dos tecidos, fígado e tecido adiposo, serão extraídos através da técnica de Bligh-dyer (1959) e mensurados através de cromatografia gasosa no Laboratório de Bioquímica/UFPel.

Expressão gênica: A extração do RNA total será realizada pelo método Trizol (Invitrogen®), e a avaliação da expressão gênica será através da Real Time-PCR. As análises serão realizadas nos laboratórios do Centro de Biotecnologia/UFPel.

Serão investigadas as vias de atuação e níveis de expressão de grupos de genes envolvidos na lipogênese e adipogênese (CEBPA, CEBPB, KLF5, MLXIPL, THRSP, SREBF1e INSIG1), enzimas relacionadas com metabolismo de lipídeos (FASN, DGAT2, LPL, FABP4, LPIN1 e SCD), sinalizadores PPAR (PPARG, RXRA, ANGPTL4), fatores de crescimento (ANGPTL4, FGF21, FGFR1, FGFR2 e ADIPOR2), reações inflamatórias (ADIPOQ, IL6, IKBKE, LEP, NFKB1 e TBK1), oxidação de ácidos graxos (ACOX1, CPT1A, UCP2 e SREBF2), entre outros que possam trazer informações relevantes ao projeto.

Animais descartados: Os animais nascidos dos cruzamentos que não forem utilizados na geração seguinte do experimento serão doados a outros grupos de pesquisa que tenham interesse em utilizá-los ou serão doados para alimentação de serpentes.

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

Grupos	Machos	Fêmeas	Fêmeas sacrificadas pré-parto	Fêmeas sacrificadas pós-parto	Progênie fêmeas sacrificadas
Controle	12	18	4 (G0)	6 (G0)	6 (F1)
Ômega		18	4 (G0)	6 (G0)	6 (F1)
Controle	18	18	4 (F1)	6 (F1)	6 (F2)
Ômega		18	4 (F1)	6 (F1)	6 (F2)
Ômega/controle		18	4 (F1)	6 (F1)	6 (F2)
Controle	18	18	4 (F2)	6 (F2)	6 (F3)
Ômega		18	4 (F2)	6 (F2)	6 (F3)
Ômega/controle/controle		18	4 (F2)	6 (F2)	6 (F3)

2.4 Resultados e Impactos esperados

Este projeto tem como proposta pesquisa científica com fins de fomentar tecnologia na área de nutrifisiogenômica no país.

Fortalecer parcerias entre a Universidade Federal de Pelotas e University of Illinois at Urbana- Champaign e com isto alavancar novos projetos e intercâmbios de alunos e professores de pós-graduação.

Indicadores de Progresso ao final de cada 6 meses de projeto:

Espera-se publicar resumos em eventos da área descrevendo os resultados parciais obtidos no experimento.

Indicadores de resultados ao final do projeto:

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

Repercussão e/ou impactos dos resultados:

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

2.5 Cronograma, Riscos e Dificuldades

Descrição	2010		2011		2012
	1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre	1º semestre
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X
Aquisição de animais			X		
Administração da dieta			X		
Coleta das amostras			X		
Perfil metabólico			X		
Extração de RNA			X		
Confecção de cDNA			X	X	
Real-time PCR				X	
Padrão de metilação				X	
Análise dos resultados				X	X
Confecção de artigos				X	X

Riscos e dificuldades: Aspectos ligados a metodologia de execução da técnica de análise de incorporação de ácidos graxos, como integridade de amostras de RNA.

2.6 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos que serão realizados com os animais estarão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004).

Após o término do experimento, todos os procedimentos seguirão as normas de descarte de animais conforme preconização da legislação sanitária vigente, e os que não forem submetidos a eutanásia serão doados a outras pesquisas ou serão destinados para alimentação de serpentes.

2.7 Referências Bibliográficas

- Guillemain, G.; Filhoulaud, G.; Silva-Xavier, G.; Rutter, G.A.; Scharfmann, R. Glucose is necessary from embryonic pancreatic endocrine cell differentiation. **J Biological Chemistry**. v.282 p.15228–15237. 2007.
- Haggarty, P. Fatty acid supply to the human fetus. **Annu. Rev. Nutr.** v.30 p.237–255. 2010.
- Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**. v.447 p.425–432. 2007.
- Husted, S. M.; Nielsen, M.O.; Blanche, D.; Ingvarsen, K.L. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. **Domestic Animal Endocrinology**. v.34, p.419–431, 2008.
- Langley-Evans, S. C.; Bellinger, L.; McMullen, S. Animal models of programming: Early life influences on appetite and feeding behaviour. **Maternal and Child Nutrition**. v.1, p.142–148, 2005.
- Langley-Evans, S. C. Developmental programming of health and disease. **Proc Nutr Soc**. v.65 n.1, p.97–105, 2006.
- Meyer, U.; Feldon J.; Hossein Fatemi, S. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v.33 p.1061–1079, 2009.
- Nelissen, E.C.M.; van Montfoort, A.P.A.; Dumoulin, J.C.M.; Evers, J.L.H. Epigenetics and the placenta. **Human Reproduction Update**. v.0 p.1–23. 2010.
- Newnham, J. P.; Moss, T.J.M.; Nitsos, I.; Sloboda, D.M.; Challis, J.R.G. Nutrition and the early origins of adult disease. **Asia Pacific J Clin Nutr**. v.11 p.S537–S542 S537, 2002.
- Purup, S.; Sejrsen, k.; Foldager, J.; Akers, R.M. Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute in vitro proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. **Journal of Endocrinology**. v.139, p.19-26, 1993.
- Schwitzgebel, V.M.; Somm, E.; Klee, P. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.304 p.78–83. 2009.
- Skinner, M.K. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F2 or F3. **Reproductive Toxicology**, v25, p. 2-6, 2008.
- Yavin E.; Himovichi, E.; Eliam, R. Delayed cell migration in the developing rat brain following maternal Omega 3 alpha linolenic acid dietary deficiency. **Neuroscience**. v.162 p.1011–1022. 2009.
- Wilson, D.M. Somatomedins in adolescence: the effect of puberty on plasma levels of insulin like factors I and II. **Clinical Research**. v.31 p.61. 1983.

3. Relatório de Trabalho de Campo

3.1. Local e animais

O experimento foi realizado nas dependências do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, no período de outubro de 2010 a julho de 2011. Foram utilizados ratos adultos, machos e fêmeas, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do próprio biotério para compor a geração fundadora.

3.2. Elaboração das dietas experimentais

As dietas foram elaboradas de acordo com a AIN-93 (American Institute of Nutrition – rodent diets), para animais em crescimento, gestação e lactação. A dieta base da AIN-93 apresenta como fonte de energia óleo de soja. Estabeleceu-se como grupo controle os animais que receberam dieta formulada a base de óleo de soja, e grupo tratamento os animais que receberam dieta a base de óleo de linhaça.

Durante todo o período experimental, as dietas foram preparadas semanalmente, em um espaço cedido no Laboratório de Carnes e Carcaças do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. A cada preparo todos os ingredientes eram pesados separadamente em recipientes identificados, homogeneizados e à mistura seca era incorporado um gel a base de amido de milho e água, para dar consistência à ração. Os pellets de ração permaneciam por 24h em um estufa de circulação de ar, a $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ para secagem. As rações eram armazenadas em refrigeração, por no máximo cinco dias, para evitar a oxidação.

3.3. Manejo dos animais

A ração foi fornecida *ad libitum*, e o consumo individual era anotado diariamente.

A troca das caixas com maravalha e das mamadeiras com água era realizada duas vezes na semana, com ajuda dos funcionários do biotério.

Semanalmente, os animais eram pesados individualmente, e quando a fêmea estava amamentando, o peso dos filhotes era anotado coletivamente.

3.4. Coleta dos materiais biológicos

Nos momentos estabelecidos para as eutanásias, pré-parto (19-20 dias de gestação) e pós-parto (no momento do desmame), além do material coletado para este experimento, sangue e tecido hepático, outros tecidos foram coletados (Eutanásia pré-parto: tecido adiposo, muscular, rins, ovários e placenta; Eutanásia pós-parto: tecido adiposo, muscular, rins, ovários e útero – das mãe e filhas). Este material estocado será utilizado para pesquisas futuras que venham complementar os resultados obtidos com esta dissertação.

4. Artigo

Formatado segundo as normas da revista *Journal of Biological Chemistry*

Linoleic and α -Linolenic fatty acids consumption across three generations exert cumulative regulation on hepatic expression of nuclear receptors related to lipid metabolism*

Carolina B. Jacometo^{1,5}, Eduardo Schmitt^{2,5}, Luiz F. M. Pfeifer^{3,5}, Augusto Schneider^{2,5}, Marcio N. Corrêa^{2,5}, Francisco A. B. Del Pino^{4,5}, Francielle Bado², Fernanda T. da Rosa^{1,5}, Simone Halfen^{2,5}, Nelson J. L. Dionello¹

¹Department of Animal Science, Agronomy College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;

²Department of Veterinary Clinics, Veterinary College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;

³Brazilian Agricultural Research Corporation, EMBRAPA, BR 364 – Km 5,5, CEP 76815-800, Porto Velho, RO, Brazil;

⁴Department of Biochemistry, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil;

⁵Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Veterinary College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

*Running title: *Gene regulation by PUFAs across three generations*

To whom correspondence should be addressed: Carolina B. Jacometo, Department of Animal Science, Agronomy College, Federal University of Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil, Tel.: 55 53 3275 7136; E-mail: cbjacometo@gmail.com

Key words: PUFAs; PPAR- α ; LXR- α ; SREBP-1c

Background: The essential fatty acids omega-3 and omega-6 contribute for a health nutrition and have important functions on lipid metabolism at gene expression level.

Results: The dietary fatty acid profile influenced the metabolism, the diet with higher level of omega-3 decreased triglycerides and non-esterified fatty acids serum levels, and liver LXR α mRNA abundance.

Conclusion: Diets with high omega-3 levels can down regulate genes related to lipogenesis on the offspring.

Significance: The understanding of polyunsaturated fatty acids consumption effects throughout generations on liver gene expression regulation is important to elucidate the alterations caused by mother nutrition on offspring metabolism.

SUMMARY

Dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are negative regulators of hepatic lipogenesis at the transcriptional level. The essential fatty acids, omega-3 and omega-6, consumed during pregnancy can benefit maternal and offspring health. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), when activated by PUFAs enhances lipolytic genes. Liver X receptor α (LXR α) and sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) are nuclear receptors that enhance lipogenic genes, and are repressed by PUFAs. The present study aimed to investigate the effects of diets rich in omega-3 or omega-6, consumed throughout three generations, evaluating biochemical parameters and the hepatic expression level of some genes related to lipid metabolism. For this we used adult Wistar rats, evaluated in the pre-partum (19 \pm 1 days of pregnancy) and at postpartum period (21 days after parturition), in three consecutive generations. The diets with higher omega-3 level decreased triglycerides serum levels, and maintained a constant non-esterified fatty acids (NEFA) level, while the animals fed with high proportion of omega-6 had fluctuant NEFA levels, and a substantial increase of NEFA levels in the postpartum period of F2 generation. Expression of PPAR α , RXR α , LXR α and SREBP-1c was altered by the diets throughout the evaluated generations. In the pre-partum period in the F2 generation, the animals fed with high omega-3 had a lower expression of LXR α , indicating its action on inhibiting lipogenesis. Our results indicated that the PUFAs effect on the control of lipolysis and lipogenesis is cumulative throughout generations and the omega-3 exerts a better control of gene expression.

INTRODUCTION

The programming of health begins before birth and is influenced by maternal health and nutrition. Alterations in the structure and function of mother tissues during pregnancy can cause permanent changes in fetus metabolic status (1) leading to higher offspring susceptibility to some diseases (2). The mechanism by which a metabolic disorder or unbalanced nutrition during pregnancy may influence the gene expression and the phenotype of the offspring are more recently referred as epigenetic (3), providing an additional molecular mechanism to overcome traditional genetics in the regulation of development (4). These effects can be classified as multigenerational, when there is a direct exposure to the environmental factor, or as transgenerational, when the transmission between generations does not involve direct exposure (5).

Recently it has been proposed that some nutrients, like fatty acids, could have influence in the offspring development and health (6). They are the major source of energy, acting to control the fluidity, permeability and conformation of cellular membranes as serve as precursors of important bioactive compounds such as prostacyclins, prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. The polyunsaturated fatty acids (PUFA), in particular, are important for structural and metabolic functions (7). During pregnancy in mammals, PUFAs are required for embryo (8) and oocyte for development (9), cell growth (10) and differentiation (11). In this regard, studies have suggested the need for feeding different diet ratios of omega-6 (ω -6) and omega-3 (ω -3) during pregnancy (12-14). In Western human diets, the amount of omega-6 fatty acids is much higher than omega-3 fatty acids. As a consequence a large amount of eicosanoid metabolic products from arachidonic acid (AA) are formed, increasing their pro-inflammatory effects. On the other hand eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA),

derived from omega-3, have an anti-inflammatory effect, and this pro-inflammatory effect is at the base of many chronic diseases (15).

The maternal dietary fatty acids are capable of altering the epigenome, especially the essentials linoleic (LA; 18:2; ω -6) and α -linolenic (α -LA; 18:3; ω -3). For instance, offspring of dams fed with high-lard diet during pregnancy and lactation are more susceptible to metabolic syndromes, like dyslipidemia, increased blood pressure and adiposity (16), and this effect appears to be mediated by saturated fatty acids, since offspring of dams that consumed PUFAs do not develop these symptoms (17). There is consistent evidence that dietary fatty acids act directly at the epigenetic process and, although not a fatty acid, cholesterol is intimately related to fatty acid metabolism, and its action at epigenetic level indicate an inhibitory effect on DNA methyltransferases, a group of enzymes that act at DNA methylation (18). Since then several investigators have demonstrated the suppression of lipogenic liver enzymes by dietary PUFA, especially the ω -3 and ω -6 families (19).

A number of studies have demonstrated the potential of the n-3 family of PUFAs on regulation of key transcription factors controlling hepatic carbohydrate and lipid metabolism (20). The main targets for this fatty acids are the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α , β , γ 1 and γ 2), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), retinoid X receptor (RXR α), liver X receptor (LXR α) and carbohydrate regulatory element binding protein (ChREBP) (20,21). PPAR α is the most expressed PPARs isoform in the liver (22), and when activated by PUFA it enhances fatty acid oxidation (20). The modulation of gene transcription is due to the binding of the activated heterodimer PPAR/RXR to a specific DNA sequence, the peroxisome proliferator responsive element (PPRE) (23). While PUFAs promote PPARs activation, it suppresses SREBP-1c and ChREBP are suppressed, inhibiting lipogenesis (20). Oxysterols and long chain fatty acids are ligands for LXR (24), and this receptor regulates the expression of genes involved in hepatic bile acid synthesis, by their binding to the direct repeat 4 (DR4) regulatory element (LXRE) as heterodimer with RXR (22). These nuclear receptors regulate target genes and cell metabolism and their ability are closely linked to the corepressors activity (25). The nuclear corepressor receptor 1 (NCoR-1) is a member of this corepressor family and acts at chromatin condensation (26) and could be linked to PUFAs epigenetic effects.

However, apart from the confirmed dietary PUFAs effect on the regulation of lipolytic/lipogenic gene expression, the fatty acid profile and the ω -6: ω -3 ratio during pregnancy on the offspring metabolism have not been established yet. Based on these evidences, our objective was to evaluate the effects of diets rich in polyunsaturated fatty acid ω -3 and ω -6, provided in successive generations on the expression level of nuclear receptors involved in the lipid metabolism of rodents.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals, diets and experimental procedures

The experimental protocol was approved by the Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Pelotas (Rio Grande do Sul State, Brazil). Male and female Wistar rats, 8 weeks old, were obtained from Central Vivarium/UFPel. Animals were housed (individually) in a temperature- (21-23°C) and humidity-controlled (60-70%) room with 12:12h light-dark cycling (lights from 6 AM to 6 PM) and free access to a pelleted diet and water. The diets were elaborated in accordance with AIN-93G recommendations (AIN-93G for growth, pregnancy and lactation) (27) (Table 1). Food intake was recorded daily and body weight weekly.

The founder generation (G0) was composed of thirty-six females that were randomly assigned to one of two groups: (1) rats fed with a diet containing flaxseed oil (OM Group, n=18), and, (2) rats fed with diet containing soybean oil (CTL Group, n=18). During the experiment, the males received only the control diet. The animals were acclimatized to housing and diets for 30 days. Shortly thereafter, the females were mated in a male:female ratio of 1:3 for three days. After delivery, the dam and offspring weights were recorded. From the G0 offspring, female progenies were sorted at weaning (21 days) to compose the F1 generation divided into three groups: (1) females from the OM group that continued receiving the diet containing flaxseed oil (OM/OM, n=16); (2) females from OM group that began to receive a diet containing soybean oil (OM/CTL, n=16); and (3) females from the CTL group that continued to receive the diet containing soybean oil (CTL/CTL, n=16). Sixteen males were selected from the CTL group. The animals were fed the diets for 60 days and then were mated as described above. From the F1 offspring, female progenies were selected at weaning (21 days) to compose the F2 generation, and the diet groups were maintained: (1) OM/OM/OM, n=16; (2) OM/CTL/CTL, n=16; and (3) CTL/CTL/CTL, n=16. To generate the F3 generation we followed the same approach as above for F2 generation. A schematic design of the groups can be seen at Figure 1. All females were evaluated for the pregnancy rate, number of pups per litter and average weight at birth.

Diet analysis

Every week a portion of the diet was randomly sampled for chemical analyses and fatty acid profile. The fat was isolated by the Bligh Dyer Method (28) and a Gas Chromatograph (Shimadzu GC-2010) was used to provide the fatty acid composition.

Blood sample and biochemical analysis

Females were fasted for 12h overnight, and then they were anaesthetized and euthanized according to the protocol approved by the University Animal Care and Use Committee. Blood was collected by intracardiac puncture in clean and EDTA-FK containing tubes. The samples were collected for measurement of plasma concentration of glucose, triglycerides and non-esterified fatty acids (NEFA). Upon collection, samples were immediately stored in ice and centrifuged at 3000 x g for 15 min. Plasma was harvested and stored at -80°C until analyzed. The metabolites were analyzed using commercial biochemical assay kits, Glucose PAP Liquiform and Triglycerides (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil) in a visible light spectrophotometer (Biospectro SP 220), and NEFA (Wako USA, Richmond, USA) in a microplate reader (Thermo Plate Reader). All samples were analyzed in a single batch and intraassay coefficient of variation was below 10%.

Tissue collection, RNA isolation and qRT-PCR analyses

In the three generations (G0, F1 and F2) were euthanized four females per group in the prepartum (at late gestation, 19±1 days) and six female per group in the postpartum (at weaning, 21 days postpartum). Immediately after euthanasia the liver was collected and snap frozen in cryotubes and submerged in liquid nitrogen at -196°C. Total RNA was isolated from the liver samples using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was isolated and purified using RNeasy columns and on-column RNase-free DNase treatment (Qiagen, Germany), following manufacturer's protocol. Absence of RNA degradation was checked on a 1% Tris-borate-EDTA buffer/agarose gel analyzing 28S and 18S rRNA subunits, after electrophoresis in 80V during 1h30. The purity and concentration were measured with a UV Spectrophotometer (UV Mini 1240, Shimadzu). A_{260}/A_{280} ratio were used as an indicative of good RNA quality. Reverse transcription was carried out with 1 µg of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a 10 µL volume. The reaction was performed in a thermo

cycler (MyCycle™ Thermo Cycler, Bio Rad) using the following temperature program: 25°C for 10 min, 37°C for 120 minutes and 85°C for 5 minutes. The cDNA was then diluted to 5 ng/μL. Real-Time quantitative PCR using SYBR Green dye was used to evaluate PPARα, RXRα, LXRα, SREBP-1c, ChREBP and NCoR1 gene expression. Actin beta (ACTB), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 18S subunit ribosomal RNA (18S) were used as internal controls and the geometric mean calculated and used to normalize data. The primers sequences and references are shown (Table 2). qPCR was performed using 4 μL diluted cDNA combined with 6 μL of a mixture composed of 5 μL 1 x SYBR Green master mix (Applied Biosystems, CA), 0,4 μL each of 10 μM forward and reverse primers, and 0,2 μL DNase/RNase free water in MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, CA). Each sample was run in triplicate and a 6-point relative standard curve was generated using serial dilutions of cDNA prepared from liver samples to calculate efficiency of each primer pair. Each assay plate included a negative control in triplicate. The CV was below 10% for all the primer pairs used. The reactions were performed in an ABI Prism 7500-Fast instrument (Applied Biosystems, CA) using the following conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C (denaturation), 30 s at 60°C (annealing) and 30s at 72°C (extension), a final extension for 5 minutes followed for a melt curve stage (15 s at 95°C, 1 min at 60°C, 30 s at 95°C and 15 s at 60°C). mRNA abundance was calculated as $A=1/\text{Efficiency}^{\Delta CT}$, where $\Delta CT = \text{Sample CT} - \text{Geometric mean of the 3 housekeeping genes}$ (29).

Statistical analyses

The results are presented as means ± standard error of the mean (SEM). All the statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Data (mRNA expression) was log transformed prior to statistical analysis, as they did not have a normal distribution. The pregnancy rate was compared among groups and generations by Chi-square. Diet consumption, diet fatty acid profile, number and weight of pups by One-way ANOVA and Tukey Test. For biochemical parameters and mRNA expression the Mixed Models procedure was used, considering the effects of diet, moment (pre- and postpartum), generation, and its interactions. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. To the groups OM/CTL (F1) and OM/CTL/CTL (F2) the OM (G0) was taken as the founding generation, as they were derived from it.

RESULTS

All the evaluated genes showed below are in table 3.

The ω-3 and ω-6 fatty acids action on lipolytic genes – PPARα plays a major role in lipid metabolism and its action mode involves heterodimerization with RXR, leading to recruitment of specific coactivator proteins and dissociation of corepressors. The founding generation did not have a difference in PPARα expression, however, in the F1 generation a difference in PPARα between groups was observed in the pre-partum period, where the CTL/CTL group had a higher expression than the OM/CTL group ($P=0.0037$). Contrasting the pre- and postpartum period, the CTL/CTL group had a reduction of PPARα expression ($P=0.0321$). Considering all the groups, the F2 generation in the pre-partum period had a higher PPARα expression when compared to the postpartum period ($P=0.0320$) and the OM/OM/OM group had a significant reduction from pre- to postpartum period also ($P=0.0447$).

The RXRα is an essential member of the steroid/thyroid hormone superfamily of nuclear receptors. It functions as a transcription factor by binding to a responsive element in the genes promoter region. Its expression did not differ between groups in the generations, but across generations the groups expressed some differences. For instance, in the postpartum period

RXR α tended to have a higher expression in all groups (OM: P=0.0652; OM-CTL: P=0.0523; CTL: P=0.0503). In both, F1 and F2 generations the pre-partum expression was lower than post-partum (P=0.0364 and P=0.046, respectively).

PPAR α and RXR α : diet generation interaction – Across all the generations there were no significant differences in pre partum PPAR α expression, but we could see that the CTL group maintained almost a constant expression, while OM and OM/CTL had a decrease from G0 to F1, followed by an increase in the F2 generation (Figure 2A). In the postpartum period of G0, the CTL group had a tendency (P=0.07) for greater expression of PPAR α compared to F1. Across generations, the CTL group had a decrease on PPAR α expression from G0 to F1 (P=0.03), and the level was maintained from F1 to F2 (Figure 2B).

All the groups had a crescent RXR α expression along generations, in both the pre- and postpartum period. In general, the pre-partum period had higher RXR α mRNA abundance in the F2 (G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P=0.0002), with no difference from G0 to F1 generation, and the group differences were similar for OM (G0 – F2: P=0.001 and F1 – F2: P=0.03), OM/CTL (G0 – F2: P=0.008 and F1 – F2: P=0.02) and CTL group (G0 – F2: P=0.02 and F1 – F2: P=0.008) (Figure 2C). The postpartum expression had almost the same behavior, but differences between G0 and F1 were observed too (G0 – F1: P=0.01, G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P<0.0001), but the groups, individually, did not have differences from G0 to F1, just the CTL group showed a tendency (G0 – F1: P=0.06; G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P=0.008), and the other groups, OM (G0 – F2: P=0.0006 and F1 – F2: P=0.03) and OM/CTL (G0 – F2: P=0.0003 and F1 – F2: P=0.007) (Figure 2D).

Could ω -3 and ω -6 reduce the lipogenic action exerted by SREBPs? – SREBPs are transcription factors that regulate enzymes responsible for the cholesterol, fatty acids and triglycerides synthesis. LXRs directly bind to SREBP-1c promoter as heterodimer with RXR, leading to transcriptional activation. A difference of SREBP-1c mRNA level between groups could be observed only postpartum in the at F1, where CTL/CTL group had a greater expression than the OM/OM group (P=0.0472). Comparing the pre- and postpartum period of this generation, just the OM/OM group had a significant decrease (P=0.0192). In the F2, a great increase could be seen in the postpartum period (P=0.0170).

The first difference observed in LXR α was in the F1 generation, where the pre-partum expression was lower than the postpartum period (P<0.0001). In the pre-partum period the OM/CTL group had a lower expression than the OM/OM group (P=0.0143) and the CTL/CTL group (P=0.0453). The three groups had a lower expression in the pre-partum period compared to postpartum (OM/OM: P=0.0172; OM/CTL: P<0.0001; CTL/CTL: P=0.0043). The difference between pre- and postpartum period observed in F1 generation was maintained in the F2 generation, where the pre-partum expression of LXR α was lower (P=0.0137). In the F2 pre-partum the OM/OM/OM group had a lower expression compared to the OM/CTL/CTL (P=0.0074) and CTL/CTL/CTL (P=0.0165), but it had a significant increase from pre- to postpartum (P=0.0044). The postpartum expression was always higher than in the pre-partum period (P=0.0013).

LXR α and SREBP-1c: diet generation interaction – LXR α presented a crescent behavior across generations, considering pre- and postpartum (G0 – F1: P=0.0004; G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P=0.0351). In the pre-partum period no differences could be observed between G0 and F1, but there was an increase from F1 to F2 (G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P<0.0001). Between the groups this tendency was followed by the groups CTL (G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P<0.0001) and OM/CTL (G0 – F2: P<0.0001 and F1 – F2: P<0.0001), but the OM group had a different behavior (G0 – F1: P=0.03 and G0 – F2: P=0.002, with no differences from F1 to F2) (Figure 2E). The postpartum period had differences between all the generation (G0 – F1:

$P < 0.0001$, G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P < 0.0001$), and so the groups, OM (G0 – F1: $P < 0.0001$, G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P = 0.018$), OM/CTL (G0 – F1: $P < 0.0001$, G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P = 0.0008$) and CTL (G0 – F1: $P < 0.0001$, G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P = 0.0018$) (Figure 2F).

Considering the pre- and postpartum period all the groups has a similar behavior in SREBP-1c mRNA abundance, no differences between G0 and F1 and an increase from F1 to F2, OM (G0 – F2: $P < 0.0001$ and from F1 - F2: $P < 0.0001$), OM/CTL (G0 – F2: $P = 0.003$ and F1 – F2: $P = 0.002$) and CTL group (G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P < 0.0001$). In the pre-partum period, the differences were only between generation in general (G0 – F2: $P = 0.005$ and F1 – F2: $P = 0.01$) (Figure 2G). In the postpartum, beyond the differences between generations in general (G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P < 0.0001$), the groups also had differences, OM (G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P < 0.0001$), OM/CTL (G0 – F2: $P = 0.0002$ and F1 – F2: $P < 0.0001$) and CTL (G0 – F2: $P < 0.0001$ and F1 – F2: $P < 0.0001$) (Figure 2H).

In this work we could not find an effect of dietary PUFAs on expression of ChREBP.

Mechanisms other than NCoR-1 acts at corepression activity – The ability of nuclear receptors to exert gene regulatory action is intimately controlled by the number of corepressors, including NCoR-1. In our study, the dietary polyunsaturated fatty acids exerted a weak effect, just throughout generations and moments, and no effect between groups. Only the CTL group was affected. There was a decrease on NCoR-1 expression from G0 to F1 ($P = 0.0269$) and from G0 to F2 ($P = 0.0009$). The founder generation had a higher expression at pre-partum period, compared to postpartum ($P = 0.0264$), and the level at pre-partum period was higher in the G0 than the F1 ($P = 0.0287$) and F2 ($P = 0.0018$).

The diet fatty acid profile did not affect consumption – The ratio $\omega 6/\omega 3$ was 0.4/1 in the OM diet and 13.6/1 in the CTL diet. Saturated and monosaturated fatty acids percentage were higher ($P < 0.05$) in the CTL diet, while the polyunsaturated fatty acids were higher ($P < 0.05$) in the OM diet. The α -linolenic acid was almost 13 times higher in the OM diet, as the linoleic acid was more than double in the CTL diet (Table 4). Every day the diet consumption was recorded, and we could confirm that the diet fatty acid profile did not affect the diet intake ($P > 0.05$). The mean daily intake for G0 (adaptation period until weaning) was 20.00 ± 0.99 g for OM group and 20.50 ± 0.96 g for CTL group; the F1 (from its weaning until the F2 weaning) was 16.14 ± 0.81 g for OM/OM group, 15.38 ± 0.83 g for OM/CTL group and 16.90 ± 0.74 g for CTL/CTL group; and the F2 (from its weaning until the F3 weaning) was 18.02 ± 0.99 g for OM/OM/OM group, 19.67 ± 0.68 g for OM/CTL/CTL group and 17.60 ± 0.94 g for CTL/CTL/CTL group.

Reproductive parameters were weakly affected by the diet fatty acid profile – The pregnancy rate was similar between the groups throughout the generations (G0, F1 and F2 – $P > 0.05$) and were in acceptable rates, ranging from 62.5 to 87.5%. There was no effect of the treatment on the number of pups per litter ($P > 0.05$), but in the F1 generation the pup mean weight at birth was higher in the OM/OM group (7.33 ± 0.21 g) than the CTL/CTL group (6.55 ± 0.13 g) ($P = 0.01$). Considering the CTL group throughout the generations, we can observe a reduction ($P = 0.01$) in the pup mean weight from G0 (7.39 ± 0.22 g) to F1 (6.55 ± 0.13 g), that was maintained in F2 (6.88 ± 0.41 g).

The n-3 fatty acid act in the serum levels of lipid metabolites – The blood biochemical analyses indicated that the fatty acid profile of the diet did not influence the homeostasis, as the glucose levels were similar in the groups, over the moments (pre and postpartum) and generations, and the animals were normoglycemic. In the G0 generation, triglyceride concentration was higher ($P = 0.02$) in the CTL group than the OM group in the pre-partum period, but no difference was observed between groups in the postpartum period. The omega-3 rich diet decreased triglycerides in the F2 postpartum period ($P = 0.04$) compared to the females that were receiving

the CTL diet. A generation effect was observed in the CTL group, there was a reduction comparing G0 to F1 ($P < 0.0001$) and G0 to F2 ($P = 0.02$), while the other groups maintained a constant levels. NEFA concentration was higher in the postpartum period, but there was no significant difference in the periods, only a tendency for higher postpartum NEFA was observed in the F1 ($P = 0.06$) and in the F2 generation ($P = 0.08$). Between groups the only observed difference was in the postpartum period in the F2 generation, where the CTL/CTL/CTL group had higher NEFA concentration than OM/OM/OM group ($P = 0.02$), which in turn had higher concentration than the OM/CTL/CTL group ($P = 0.005$). We must highlight that although differences were observed between generations, the animals that received the OM diet maintained a constant concentration of NEFA, while the CTL group had a decrease in concentration from G0 to F1 ($P = 0.04$) and increased from F1 to F2 ($P = 0.005$). These parameters are shown in table 5.

DISCUSSION

Over the last three decades, researches have focused investigations on the fatty acid metabolism, specially the polyunsaturated ones, exposing the benefits of its metabolites on normal health and chronic diseases, such as the regulation of lipid level (30,31), cardiovascular (32) and immune function (33). Through the combination of desaturations and chain elongations, the essential fatty acids can be converted, LA (18:2, ω -6) to arachidonic acid (AA, 20:4, ω -6), and α -LA acid (18:3, ω -3) to eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, ω -3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, ω -3). All fetal supply of ω -3 and ω -6 comes from the mother, crossing the placenta, either in the form of the essential fatty acid, or their long chain polyunsaturated fatty acids derivatives (34). The experimental diets offered to the animals from this study contained high amounts of polyunsaturated fatty acids, almost 50% in the CTL diet, and more than 60% in OM diet. The consumption was not affected by the fatty acid profile, in accordance with Rice and Corwin (35). The essential fatty acids offered through the diet were converted to other metabolites and incorporated in the liver, in different proportions, the OM group had more α -LA, EPA and DHA than the CTL group, while the animals that were receiving the CTL diet had higher concentrations of LA and AA (data not shown), indicating activity of desaturases and elongases. The experimental diets did not alter the plasma glucose concentration, in accordance with other recent studies and indicating that chronic feeding diets rich in polyunsaturated fatty acids do not alter the glucose metabolism and its plasma concentrations (36,37). It has already been shown that feeding animals with ω -3 and ω -6 diets is effective in lowering plasma triglycerides levels (38,39), as we observed in this experiment. Blood triglycerides concentration is diminished with PPAR α activation (40) thus, the greater PPAR α mRNA abundance partly explain the lower triglyceride in the pre-partum period, in the transition between G0 to F1 and F2 generations. The NEFA concentration was maintained at low levels, especially in the pre-partum period, in contrast with other studies which showed a twofold higher level (41). However, we must have a special attention to CTL group behavior, even though its diet was formulated in accordance to AIN-93 recommendations, even with soybean oil, this group seems to have diet regulation across generations, in all evaluated parameters. We can attribute this effect to the experimental control. The adult animals, that were selected to compose the G0 generation, were previously treated with a commercial diet, cared and allocated in groups, and after the experiment implantation they started to receive the experimental diets, were allocated individually and also received individual care.

About the reproductive parameters, we could observe that there were no differences in pregnancy rate between the groups and generations, leading to the hypothesis that the ratio between ω -6 and ω -

3 do not influence female fertility, concerning with a study which showed that diets containing flaxseed do not interfere on the reproductive performance (42). In our study, the pup mean weight of the F1 generation was higher in the group fed with omega-3 rich diet than the control group, fed with omega-6 rich diet, demonstrating an effect of maternal consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acid diet during pregnancy on the fetal and offspring growth and development. Analyzing the control group over subsequent generations, the pup mean weight reduction from G0 to F1, and its maintenance in F2, indicated that more attention should be given to the ω -6: ω -3 ratio during the perinatal period, specially to ω -3 excess and its deleterious effect (43). Again these results suggest the interference of maternal consumption on the offspring development.

Diet manipulation to prevent of metabolic disorders, especially adding polyunsaturated fatty acids as energy source, have been used for over 20 years, and these disorders have great importance for public human health, like type II diabetes and obesity (40). Nuclear receptors evaluated in this study are intimately linked with this, as they mediate lipid metabolism. The fatty acid metabolism process involves β -oxidation, which takes place in two specialized cell structures, mitochondria, which preferentially metabolize short and long chain fatty acids, and peroxisomes, which degrades long and very long chain fatty acids (44). The peroxisome proliferator-activated receptor α , is involved not only with fatty acid and triglyceride metabolism, but also in cell proliferation and inflammatory response (45). In the present study we could see upregulation of PPAR α via dietary PUFA, and the profile of those fatty acids seemed to alter mRNA abundance. Tanaka and colleagues (46) tested the effect of eicosapentaenoic acid in hepatic steatosis but did not find differences in PPAR α mRNA abundance, even though there was a reduction in hepatic triglycerides level, but *de novo* lipogenesis was suppressed by EPA administration in a PPAR α -dependent fashion. The differences observed between the pre-partum and postpartum periods in the F2 generation of the present study can be due the anabolic and catabolic states, storing energy to lactation period. These results are in accordance with NEFA measurements, with higher levels in the postpartum period. The Retinoid X Receptor α is intimately linked with PPAR α , since its heterodimerization is necessary to activate and to promote the binding to PPRE in target gene promoters, and its increase during the experimental period may been a response to PPAR α and also the LXR α increases.

More than ten years ago the complex LXR – RXR was identified as an activator of the SREBP-1c gene promoter (47), and that the PUFAs suppressed its activity by inhibition of liver LXR binding to LXR response elements (LXREs) (48). The sequence of these studies showed the existence of an interrelationship between PPARs, SREBP-1c and LXR. *In vitro* and *in vivo* experiments proved that PPARs suppress SREBP-1c promoter activity through LXREs, PPAR agonists enhance repression of SREBP-1c promoter activity, PPARs inhibit LXR α /RXR binding to LXRE of SREBP-1c promoter and that PPAR α activation represses LXR agonist induced SREBP-1c expression (49). In the present study, just the CTL group decreased PPAR α mRNA abundance in the postpartum period from G0 to F1 and F2, the other groups maintained their expression levels. On the other hand, SREBP-1c levels increased, in all experimental groups, from G0 to F1 and F2, a similar behavior can be observed in LXR α abundance, concerning with that previous studies, showing the regulation of SREBP-1c throughout LXR α stimuli, RXR α mRNA abundance levels also increased during the generations, in higher level than LXR α , it can be due its activation of PPAR α and heterodimerization with LXR α . As the levels of PPAR α did not increase significantly, and SREBP-1c did not decreased with a high polyunsaturated diet we can suggest the existence of a post-transcriptional regulatory mechanism controlling its lipolytic and lipogenic function, may be through proteolytic

processing and autoloop regulatory circuit (50). However, special attention must be given to the “cumulative effect” of the diet rich in ω -3, in the pre-partum of F2 generation, LXR α levels were lower than the other groups, and PPAR α was highly expressed, this situation provides support to propose that a diet rich in ω -3 is more efficient to enhance lipolysis and inhibit lipogenesis than a diet rich in ω -6 fatty acids.

As the experimental diets had the same carbohydrates levels, the ChREBP mRNA was not affected and expressed in a very low level. The control of nuclear receptor activity must be regulated via other effects besides NCoR-1, its expression level was almost constant. DNA methylation is the major epigenetic modification that controls gene expression in physiologic and pathologic states (51). It must be the next step of this study, and might answer the control throughout generations that could not be explained by the gene expression profile. Another future possibility will be to evaluate some target genes, regulated by these nuclear receptors, specially the enzymes that participate in fatty acid metabolism. The dietary PUFAs may act in the “end” of the process, or controlling the activity of the nuclear receptors, nor in its abundance. There are evidences that depletion of ω -3 deregulates the desaturases function (52), and as cited before, its excess is harmful too (43).

One of the best-studied epigenetic modification is DNA methylation, particularly CpGs islands hyper- and hypomethylation (53), and hypermethylation is related to gene silencing. As reviewed by Holness and colleagues, the nutrients can cause acute and long-term modifications at the gene expression level, and lead to epigenetic modifications (54). It has already been proven that dietary protein restriction for pregnant rats causes hypermethylation of PPAR α promoter region of the offspring (55), and also in the LXR α promoter in a mouse model (56). We can suggest that these polyunsaturated containing diets could promote epigenetic alterations in the genes related to lipid metabolism. This phenomenon must be evaluated, so the observed changes in mRNA abundance in this study will be clearly understood.

In conclusion, feeding animals with PUFAs make possible to control the relationship between lipogenesis and lipolysis. There are clearly evidences of cumulative effects throughout generations, especially of a diet rich in ω -3 fatty acids, up and down regulating the genes related to lipid metabolism. Special attention must be given to the fatty acid profile and proportion of essential fatty acids, an unbalanced diet can promote enzyme competitions and mask the beneficial PUFAs effect on health.

REFERENCES

1. Newnham, J. P., Moss, T. J., Nitsos, I., Sloboda, D. M., and Challis, J. R. (2002) *Asia Pac J Clin Nutr* **11 Suppl 3**, S537-542
2. Langley-Evans, S. C. (2006) *Proc Nutr Soc* **65**, 97-105
3. Simmons, R. (2011) *Proc Nutr Soc* **70**, 73-81
4. Skinner, M. K. (2011) *Birth Defects Res C Embryo Today* **93**, 51-55
5. Skinner, M. K. (2008) *Reprod Toxicol* **25**, 2-6
6. Cetin, I., Alvino, G., and Cardellicchio, M. (2009) *J Physiol* **587**, 3441-3451
7. Haggarty, P. (2010) *Annu Rev Nutr* **30**, 237-255
8. Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., and Bhattacharya, S. (2006) *Hum Reprod* **21**, 766-773
9. Matorras, R., Ruiz, J. I., Mendoza, R., Ruiz, N., Sanjurjo, P., and Rodriguez-Escudero, F. J. (1998) *Hum Reprod* **13**, 2227-2230
10. Sellmayer, A., Danesch, U., and Weber, P. C. (1996) *Lipids* **31 Suppl**, S37-40
11. Ding, S. T., McNeel, R. L., and Mersmann, H. J. (2002) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**, 352-357
12. Simopoulos, A. P. (2002) *Biomed Pharmacother* **56**, 365-379

13. Simopoulos, A. P., Leaf, A., and Salem, N., Jr. (1999) *J Am Coll Nutr* **18**, 487-489
14. Kris-Etherton, P. M., Taylor, D. S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R. L., Zhao, G., and Etherton, T. D. (2000) *Am J Clin Nutr* **71**, 179S-188S
15. Simopoulos, A. P. (2008) *Asia Pac J Clin Nutr* **17 Suppl 1**, 131-134
16. Walterland, R. A., Rached, M. T. (2006) *Scand Jour of Food and Nutr* **50**, 21-26.
17. Siemelink, M., Verhoef, A., Dormans, J. A., Span, P. N., and Piersma, A. H. (2002) *Diabetologia* **45**, 1397-1403
18. Zaina, S., Dossing, K. B., Lindholm, M. W., and Lund, G. (2005) *Curr Opin Lipidol* **16**, 549-553
19. Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A. H., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Shionoiri, F., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., and Yamada, N. (1999) *J Biol Chem* **274**, 35840-35844
20. Jump, D. B. (2008) *Curr Opin Lipidol* **19**, 242-247
21. Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., and Demeure, O. (2005) *J Nutr* **135**, 2503-2506
22. Pegorier, J. P., Le May, C., and Girard, J. (2004) *J Nutr* **134**, 2444S-2449S
23. Olefsky, J. M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 36863-36864
24. Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R. A., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6027-6032
25. Battaglia, S., Maguire, O., Thorne, J. L., Hornung, L. B., Doig, C. L., Liu, S., Sucheston, L. E., Bianchi, A., Khanim, F. L., Gommersall, L. M., Coulter, H. S., Rakha, S., Giddings, I., O'Neill, L. P., Cooper, C. S., McCabe, C. J., Bunce, C. M., and Campbell, M. J. (2010) *Carcinogenesis* **31**, 1650-1660
26. Malik, I. A., Baumgartner, B. G., Naz, N., Sheikh, N., Moriconi, F., and Ramadori, G. (2010) *Cell Tissue Res* **342**, 261-272
27. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr. (1993) *J Nutr* **123**, 1939-1951
28. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917
29. Bionaz, M., Thering, B. J., and Loor, J. J. (2011) *Br J Nutr*, 1-13
30. Harris, W. S., Hustvedt, B. E., Hagen, E., Green, M. H., Lu, G., and Drevon, C. A. (1997) *J Lipid Res* **38**, 503-515
31. Mori, T. A., Burke, V., Puddey, I. B., Watts, G. F., O'Neal, D. N., Best, J. D., and Beilin, L. J. (2000) *Am J Clin Nutr* **71**, 1085-1094
32. Adkins, Y., and Kelley, D. S. (2010) *J Nutr Biochem* **21**, 781-792
33. Bakker, G. C., van Erk, M. J., Pellis, L., Wopereis, S., Rubingh, C. M., Cnubben, N. H., Kooistra, T., van Ommen, B., and Hendriks, H. F. (2010) *Am J Clin Nutr* **91**, 1044-1059
34. Herrera, E. (2002) *Placenta* **23 Suppl A**, S9-19
35. Rice, H. B., and Corwin, R. L. (2002) *Physiol Behav* **75**, 611-619
36. Mellouk, Z., Hachimi Idrissi, T., Louchami, K., Hupkens, E., Sener, A., Yahia, D. A., and Malaisse, W. J. (2012) *Int J Mol Med* **29**, 113-118
37. de Assis, A. M., Rech, A., Longoni, A., Rotta, L. N., Denardin, C. C., Pasquali, M. A., Souza, D. O., Perry, M. L., and Moreira, J. C. (2012) *Mol Cell Biochem* **361**, 151-160
38. Harris, W. S. (1989) *J Lipid Res* **30**, 785-807
39. Rustan, A. C., Christiansen, E. N., and Drevon, C. A. (1992) *Biochem J* **283 (Pt 2)**, 333-339
40. Kota, B. P., Huang, T. H., and Roufogalis, B. D. (2005) *Pharmacol Res* **51**, 85-94
41. Holness, M. J., Changani, K. K., and Sugden, M. C. (1991) *Biochem J* **280 (Pt 2)**, 549-552
42. Leal Soares, L., Ferreira Medeiros de Franca Cardozo, L., Andrade Troina, A., De Fonte Ramos, C., Guzman-Silva, M. A., and Teles Boaventura, G. (2010) *Nutr Hosp* **25**, 437-442
43. Church, M. W., Jen, K. L., Dowhan, L. M., Adams, B. R., and Hotra, J. W. (2008) *Neurotoxicol Teratol* **30**, 107-117
44. Moczulski, D., Majak, I., and Mamczur, D. (2009) *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **63**, 266-277
45. Gonzalez, F. J., and Shah, Y. M. (2008) *Toxicology* **246**, 2-8

46. Tanaka, N., Zhang, X., Sugiyama, E., Kono, H., Horiuchi, A., Nakajima, T., Kanbe, H., Tanaka, E., Gonzalez, F. J., and Aoyama, T. (2010) *Biochem Pharmacol* **80**, 1601-1612
47. Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 2991-3000
48. Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Osuga, J., Gotoda, T., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2002) *J Biol Chem* **277**, 1705-1711
49. Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Sekiya, M., Takahashi, A., Hasty, A. H., Sato, R., Sone, H., Osuga, J., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2003) *Mol Endocrinol* **17**, 1240-1254
50. Takeuchi, Y., Yahagi, N., Izumida, Y., Nishi, M., Kubota, M., Teraoka, Y., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Sekiya, M., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Gotoda, T., Ishibashi, S., Itaka, K., Kataoka, K., Nagai, R., Yamada, N., Kadowaki, T., and Shimano, H. (2010) *J Biol Chem* **285**, 11681-11691
51. Barres, R., and Zierath, J. R. (2011) *Am J Clin Nutr* **93**, 897S-900
52. Hofacer, R., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Magrisso, I. J., Benoit, S. C., and McNamara, R. K. (2011) *Nutr Res* **31**, 715-722
53. LeBaron, M. J., Rasoulpour, R. J., Klapacz, J., Ellis-Hutchings, R. G., Hollnagel, H. M., and Gollapudi, B. B. (2010) *Mutat Res* **705**, 83-95
54. Holness, M. J., Caton, P. W., and Sugden, M. C. (2010) *Nutrition* **26**, 491-501
55. Lillycrop, K. A., Phillips, E. S., Torrens, C., Hanson, M. A., Jackson, A. A., and Burdge, G. C. (2008) *Br J Nutr* **100**, 278-282
56. van Straten, E. M., Bloks, V. W., Huijkman, N. C., Baller, J. F., van Meer, H., Lutjohann, D., Kuipers, F., and Plosch, T. (2010) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R275-282
57. Somm, E., Schwitzgebel, V. M., Toulotte, A., Cederroth, C. R., Combescure, C., Nef, S., Aubert, M. L., and Huppi, P. S. (2009) *Environ Health Perspect* **117**, 1549-1555
58. Gillio-Meina, C., Phang, S. H., Mather, J. P., Knight, B. S., and Kennedy, T. G. (2009) *Reproduction* **137**, 537-552
59. Cha, J. Y., and Repa, J. J. (2007) *J Biol Chem* **282**, 743-751
60. Bonefeld, B. E., Elfving, B., and Wegener, G. (2008) *Synapse* **62**, 302-309
61. Nelissen, K., Smeets, K., Mulder, M., Hendriks, J. J., and Ameloot, M. (2010) *J Neurosci Methods* **187**, 78-83

TABLE 1
Experimental diets composition
 Ingredient composition of the experimental diets

Ingredient	AIN-93G (g/Kg diet)	
	OM	CTL
Cornstarch	407.153	397.486
Casein	200	200
Dextrinized cornstarch	132	132
Sucrose	100	100
Soybean oil	0	70
Flaxseed oil	60.333	0
Fiber	50	50
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitratarte	2.500	2.500
Tert-Butylhydroquinone	0.014	0.014

TABLE 2
Primers used for qRT-PCR
 Primers sequence, source and accession number at NCBI site

Gene	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Source	Accession No.
PPAR α	TGGAGTCCACGCATGTGAAG	CGCCAGCTTTAGCCGAATAG	(60)	NM_01319.1
RXR α	GGACACCAAACATTTCTGCC	GATGTGCTTGGTGAAGGA	(61)	NM_012805.2
LXR α	AGGAGTGTCGACTTCGCAA	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT	(62)	NM_031627.2
SREBP1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGAAGTCACTGT	(62)	XM_213329.5
NCor1	AGTCGCTACAGCCCAGAGTC	CTCCTCTCTGGGGATTTTCC	(26)	XM_577103.3
ChREBP	AGAACCACGATATCACACACATCT	CAGGGTGTGCAATCCTAGCTTAA	(62)	NM_133552.1
ACTB	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	(63)	NM_031144.2
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCTGTTGCTGTA	(64)	NM_017008.3
18S	ACGGACCAGAGCGAAAGCAT	TGTC AATCTGTCCGTGTCC	(63)	

TABLE 3
Evaluated genes

mRNA levels of PPAR α , RXR α , LXR α , SREBP-1c, ChREBP and NCoR-1, at pre- and postpartum moment in the three evaluated generations,

Generation	Period	Group	PPAR α	RXR α	LXR α	SREBP-1c	ChREBP	NCoR-1
G0	Pre	OM	0.6540±0.1512	0.0907±0.0129 [●]	0.1353±0.0049 [●]	0.3046±0.0152 [●]	0.0301±0.0034	2.5544±1.2231
		CTL	0.6232±0.1585	0.1465±0.0758 [●]	0.1451±0.0136 [●]	0.3254±0.0225 [●]	0.0227±0.0077	1.6751±0.3281 [●]
	Pos	OM	0.5332±0.1277	0.2023±0.0675 [◆]	0.1569±0.0122 [◆]	0.2995±0.0295 [◆]	0.0433±0.0171	1.4976±0.2168
		CTL	0.7869±0.1134 [◆]	0.1218±0.0205 [◆]	0.1576±0.0171 [◆]	0.3318±0.0420 [◆]	0.0546±0.0089	1.3053±0.0286 ⁺
F1	Pre	OM/OM	0.4084±0.0309 ^{AB}	0.2476±0.1374 ^{*++●}	0.2001±0.0310 ^{*Ab++●●}	0.3599±0.0190 ^{a+●}	0.0224±0.0107	1.2602±0.0163
		OM/CTL	0.3049±0.0099 ^B	0.0913±0.0162 [*]	0.1185±0.0084 ^{*Bb+●}	0.2707±0.0205 ⁺	0.0247±0.0041	1.3334±0.0125
		CTL/CTL	0.6751±0.1271 ^{Aa}	0.0865±0.0064 ^{*●}	0.1824±0.0304 ^{*Ab++●}	0.3278±0.0484 [●]	0.0075±0.0050	1.2955±0.0320 ^{++●●}
	Pos	OM/OM	0.4203±0.0309	0.3186±0.1032 ^{***◆}	0.2846±0.0086 ^{**a++◆◆}	0.1896±0.0099 ^{Bb+◆◆}	0.0114±0.0067	1.1842±0.0102
		OM/CTL	0.4392±0.0186	0.3289±0.0987 ^{**}	0.2998±0.0179 ^{**a+◆}	0.3099±0.0769 ^{AB+◆}	0.0120±0.0056	1.3938±0.2027
		CTL/CTL	0.4644±0.0894 ^{b◆◆}	0.3385±0.1134 ^{**+◆}	0.2732±0.0177 ^{**a++◆◆}	0.3207±0.0395 ^{A+◆}	0.0182±0.0045	1.2162±0.0115 ⁺⁺
F2	Pre	OM/OM/OM	0.7438±0.1518 ^{*a}	0.5307±0.0495 ^{***●●}	0.2358±0.0099 ^{*Bb+++●●}	0.5106±0.1397 ^{*b++●●}	0.0223±0.0136	1.1808±0.0234
		OM/CTL/CTL	0.4476±0.1514 [*]	0.4990±0.1469 [*]	0.4049±0.0565 ^{*A++●●}	0.5334±0.1323 ⁺⁺⁺	0.0309±0.0226	1.4166±0.2579
		CTL/CTL/CTL	0.6261±0.1626 [*]	0.4650±0.1367 ^{***●●}	0.3807±0.0513 ^{*A+++●●}	0.5537±0.1240 ^{***●●}	0.0421±0.0142	1.1625±0.0210 ^{++●●}
	Pos	OM/OM/OM	0.3968±0.1252 ^{**b}	0.6454±0.0089 ^{****◆◆}	0.4212±0.0592 ^{**a+◆◆◆}	0.7385±0.0169 ^{**a++◆◆◆}	0.0690±0.0177	1.5811±0.2670
		OM/CTL/CTL	0.3294±0.0154 ^{**}	0.6712±0.0193 ^{**}	0.4548±0.0139 ^{****◆◆}	0.5922±0.0537 ^{***◆◆◆}	0.0674±0.0214	1.3052±0.1500
		CTL/CTL/CTL	0.4235±0.0988 ^{**◆◆}	0.6249±0.0398 ^{**++◆◆}	0.4028±0.0254 ^{**+++◆◆◆}	0.7393±0.0214 ^{**++◆◆}	0.0465±0.0211	1.1419±0.0079 ⁺⁺

The comparisons are in the column between lines, upcase (A-B) indicate differences between groups in a moment, lowercase letter (a-b) indicate differences of a group between moments, * Indicates differences between moments, in generation, + Indicates differences of a group between generations, ● Indicate difference of a group in the prepartum moment between generations, ◆ Indicate difference of a group in the postpartum moment between generations.

TABLE 4**Fatty acid profile of the experimental diets**

Fatty acid composition in the diets was analyzed by gas chromatography (Percentage of each fatty acid)

Fatty Acids	Diets	
	OM (flaxseed oil)	CTL (soybean oil)
ω -6: ω -3 ratio	0.4/1 ^b	13.6/1 ^a
Polyunsaturated	61.11 \pm 0.742 ^a	49.52 \pm 0.791 ^b
Linoleic (C _{18:2})	17.75 \pm 1.180 ^b	45.99 \pm 0.540 ^a
α -linolenic (C _{18:3})	43.26 \pm 1.849 ^a	3.39 \pm 0.384 ^b
Eicosadienoic (C _{20:2})	0.04 \pm 0.005 ^b	0.07 \pm 0.013 ^a
Eicosatrienoic (C _{20:3})	0.04 \pm 0.003	0.04 \pm 0.010
Eicosapentaenoic (C _{20:5})	0.02 \pm 0.011	0.03 \pm 0.021
Monounsaturated	20.68 \pm 0.486 ^b	27.74 \pm 0.582 ^a
Palmitoleic (C _{16:1})	0.18 \pm 0.003 ^a	0.16 \pm 0.004 ^b
Cis-10-Heptadecanoic (C _{17:1})	0.03 \pm 0.006	0.04 \pm 0.006
Oleic (C _{18:1})	20.33 \pm 0.477 ^b	27.14 \pm 0.571 ^a
Eicosenoic (C _{20:1})	0.14 \pm 0.022 ^b	0.41 \pm 0.061 ^a
Saturated	14.87 \pm 0.299 ^b	17.83 \pm 0.298 ^a
Caproic (C _{6:0})	0.08 \pm 0.054	0.03 \pm 0.009
Caprylic (C _{8:0})	0.04 \pm 0.015	0.02 \pm 0.003
Capric (C _{10:0})	0.06 \pm 0.002 ^a	0.05 \pm 0.002 ^b
Lauric (C _{12:0})	0.06 \pm 0.002 ^a	0.05 \pm 0.002 ^b
Myristic (C _{14:0})	0.37 \pm 0.006 ^a	0.33 \pm 0.010 ^b
Pentadecanoate (C _{15:0})	0.08 \pm 0.001 ^a	0.06 \pm 0.001 ^b
Palmitic (C _{16:0})	7.69 \pm 0.185 ^b	11.00 \pm 0.060 ^a
Heptadecanoic (C _{17:0})	0.10 \pm 0.001 ^b	0.11 \pm 0.001 ^a
Stearic (C _{18:0})	5.58 \pm 0.123 ^a	4.57 \pm 0.162 ^b
Arachidic (C _{20:0})	0.4 \pm 0.105 ^b	0.80 \pm 0.256 ^a
Behenic (C _{22:0})	0.24 \pm 0.017 ^b	0.56 \pm 0.012 ^a
Tricosanoic (C _{23:0})	0.05 \pm 0.002 ^b	0.06 \pm 0.007 ^a
Lignoceric (C _{24:0})	0.12 \pm 0.015	0.16 \pm 0.024
Heneicosenoic (C _{21:0})	0.01 \pm 0.002 ^b	0.03 \pm 0.003 ^a

a-b Indicates significant differences of fatty acid proportion between diets (P<0.05).

TABLE 5**Biochemical analyses**

Concentration of glucose (mmol/L), TAG (mmol/L) and NEFA (mmol/L) in blood serum

Generation	Moment	Group	Glucose	TAG	NEFA
G0	Pre	OM	114.89±13.13	112.76±12.34 ^B	.
		CTL	145.23±14.49	295.89±4.49 ^A	.
	Pos	OM	129.15±9.47	71.75±7.03	0.325±0.021
		CTL	138.75±8.63	80.21±13.39	0.343±0.031
F1	Pre	OM/OM	123.51±7.97 ^{AB}	85.07±31.30	0.236±0.028 ^b
		OM/CTL	148.98±1.94 ^A	139.87±32.41	0.193±0.025
		CTL/CTL	103.89±9.34 ^B	94.45±24.66	0.259±0.032
	Pos	OM/OM	128.68±2.98	49.89±16.02	0.327±0.025 ^a
		OM/CTL	119.96±2.34	89.04±21.79	0.268±0.026
		CTL/CTL	130.85±10.98	60.41±11.78	0.258±0.035
F2	Pre	OM/OM/OM	120.34±3.65	97.65±29.43	0.272±0.029
		OM/CTL/CTL	106.06±11.22	79.53±21.38	0.260±0.012
		CTL/CTL/CTL	141.33±25.38	153.94±52.10	0.311±0.023 ^b
	Pos	OM/OM/OM	141.054±4.51 ^{AB}	57.93±8.56 ^B	0.329±0.035 ^B
		OM/CTL/CTL	166.83±12.11 ^A	86.80±11.60 ^{AB}	0.220±0.007 ^C
		CTL/CTL/CTL	124.18±4.43 ^B	109.25±16.01 ^A	0.417±0.034 ^{Aa}

Uppercase indicates difference between groups in a moment and lowercase indicates difference of a group between moments (P<0.05).

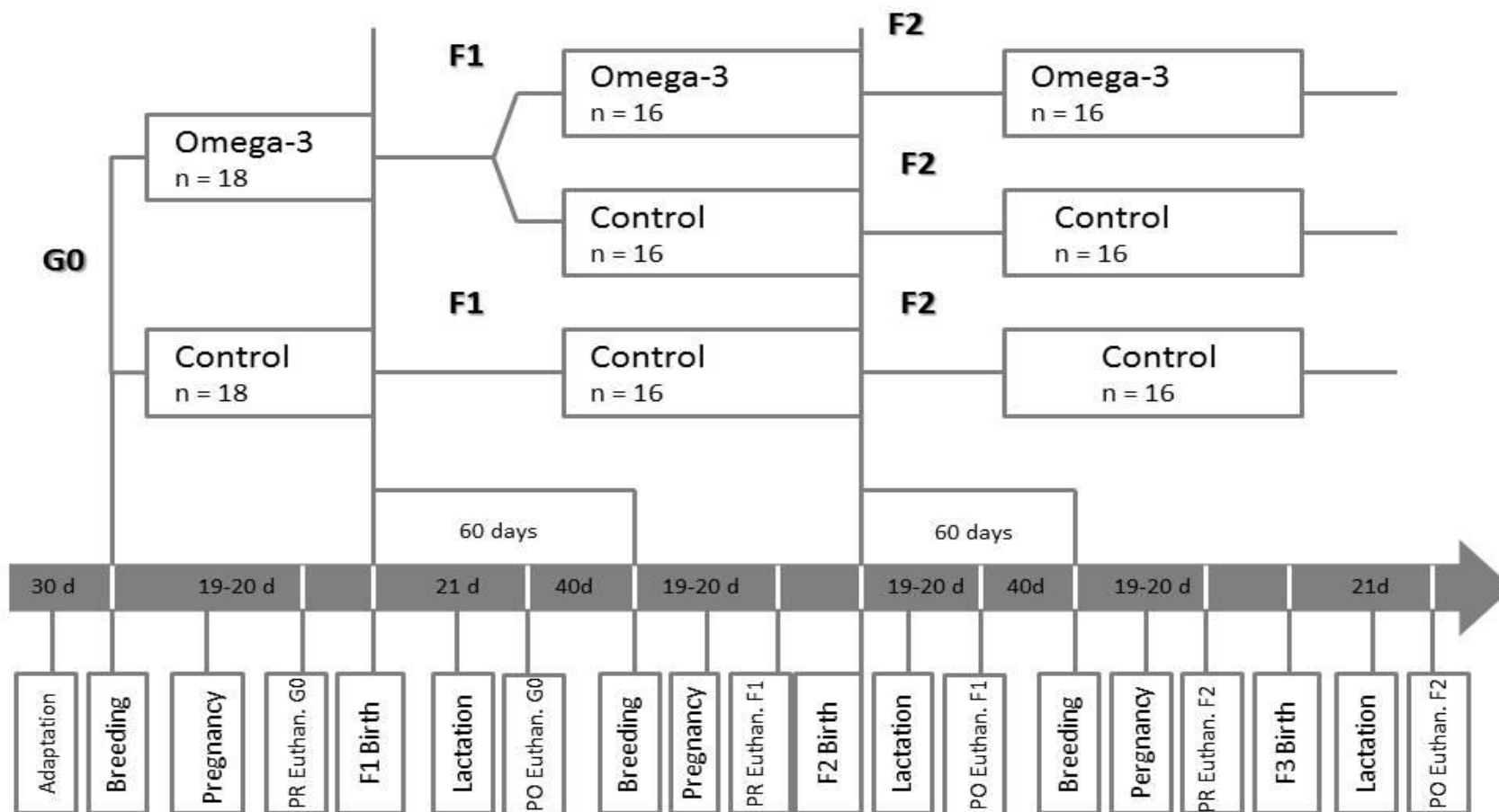


Figure 1. Schematical design about the formation of the groups and all the experimental procedures in a chronological line.

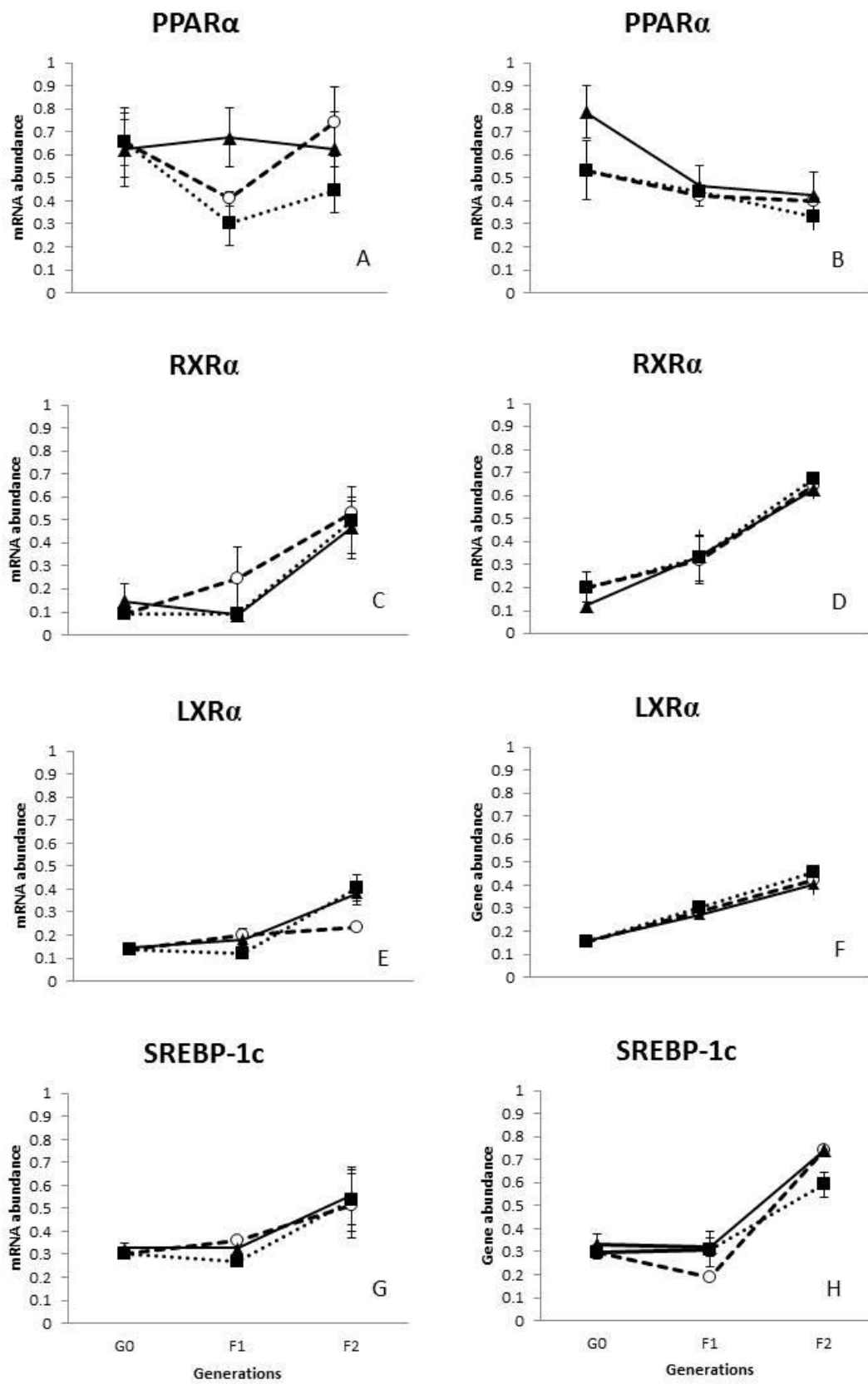


Figure 2. Pre-partum mRNA abundance of (A) PPAR α , (C) RXR α , (E) LXR α and (G) SREBP-1c. Postpartum mRNA abundance of (B) PPAR α , (D) RXR α , (F) LXR α and (H) SREBP-1c. The groups are indicated as: OM (- -○- -), OM/CTL (···■···) and CTL (- -▲- -).

5. Conclusão geral

Em conclusão, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados têm a capacidade de controlar a relação entre lipólise e lipogênese. Existe um efeito cumulativo ao longo de gerações, especialmente de uma dieta rica em ômega-3, sobre a regulação de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Especial atenção deve ser dada ao perfil de ácidos graxos e a proporção entre os ácidos graxos essenciais, pois dietas desbalanceadas podem conduzir a alterações enzimáticas e inibir os efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados na saúde.

6. Referências bibliográficas

ABEDIN, S. A., THORNE, J. L., BATTAGLIA, S., MAGUIRE, O., HORNUNG, L. B., DOHERTY, A. P., MILLS, I. G., CAMPBELL, M. J. Elevated NCOR1 disrupts a network of dietary-sensing nuclear receptors in bladder cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 30(3), p. 449-456. 2009.

BARRES, R., ZIERATH, J. R. DNA methylation in metabolic disorders. **Am J Clin Nutr**, v. 93(4), p. 897S-900. 2011.

BRENNA, J. T., SALEM, N., JR., SINCLAIR, A. J., CUNNANE, S. C. alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 80(2-3), p. 85-91. 2009.

BURDGE, G. C., LILLYCROP, K. A. Bridging the gap between epigenetics research and nutritional public health interventions. **Genome Med**, v. 2(11), p. 80. 2010.

CHA, J. Y., REPA, J. J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. **J Biol Chem**, v. 282(1), p. 743-751. 2007.

CHURCH, M. W., JEN, K. L., DOWHAN, L. M., ADAMS, B. R., HOTRA, J. W. Excess and deficient omega-3 fatty acid during pregnancy and lactation cause impaired neural transmission in rat pups. **Neurotoxicol Teratol**, v. 30(2), p. 107-117. 2008.

DAWSON, M. I., XIA, Z. The retinoid X receptors and their ligands. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821(1), p. 21-56. 2012.

DENTIN, R., DENECHAUD, P. D., BENHAMED, F., GIRARD, J., POSTIC, C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. **J Nutr**, v. 136(5), p. 1145-1149. 2006.

DUNN, G. A., BALE, T. L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, v. 150(11), p. 4999-5009. 2009.

FOUFELLE, F., FERRE, P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. **Biochem J**, v. 366(Pt 2), p. 377-391. 2002.

FUNSTON, R. N., LARSON, D. M., VONNAHME, K. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. **J Anim Sci**, v. 88(13 Suppl), p. E205-215. 2010a.

FUNSTON, R. N., MARTIN, J. L., ADAMS, D. C., LARSON, D. M. Winter grazing system and supplementation of beef cows during late gestation influence heifer progeny. **J Anim Sci**, v. 88(12), p. 4094-4101. 2010b.

GOLDBERG, A. D., ALLIS, C. D., BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128(4), p. 635-638. 2007.

GUERRERO-BOSAGNA, C., SKINNER, M. K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. **Mol Cell Endocrinol**, v., p. 2011.

HAGGARTY, P. Fatty acid supply to the human fetus. **Annu Rev Nutr**, v. 30, p. 237-255. 2010.

HUSTED, S. M., NIELSEN, M. O., BLACHE, D., INGVAERTSEN, K. L. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. **Domest Anim Endocrinol**, v. 34(4), p. 419-431. 2008.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Curr Opin Lipidol**, v. 19(3), p. 242-247. 2008.

JUMP, D. B., BOTOLIN, D., WANG, Y., XU, J., CHRISTIAN, B., DEMEURE, O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **J Nutr**, v. 135(11), p. 2503-2506. 2005.

KOTA, B. P., HUANG, T. H., ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol Res**, v. 51(2), p. 85-94. 2005.

PALSDOTTIR, V., OLSSON, B., BOREN, J., STRANDVIK, B., GABRIELSSON, B. G. Postnatal essential fatty acid deficiency in mice affects lipoproteins, hepatic lipids,

fatty acids and mRNA expression. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85(3-4), p. 179-188. 2011.

PEGORIER, J. P., LE MAY, C., GIRARD, J. Control of gene expression by fatty acids. **J Nutr**, v. 134(9), p. 2444S-2449S. 2004.

SHARMA, R. K., BLAIR, H. T., JENKINSON, C. M., KENYON, P. R., COCKREM, J. F., PARKINSON, T. J. Uterine environment as a regulator of birth weight and body dimensions of newborn lambs. **J Anim Sci**, v., p. 2011.

SIMMONS, R. Epigenetics and maternal nutrition: nature v. nurture. **Proc Nutr Soc**, v. 70(1), p. 73-81. 2011.

SKINNER, M. K. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. **Reprod Toxicol**, v. 25(1), p. 2-6. 2008.

SKINNER, M. K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. **Epigenetics**, v. 6(7), p. 838-842. 2011.

TAKEUCHI, Y., YAHAGI, N., IZUMIDA, Y., NISHI, M., KUBOTA, M., TERAOKA, Y., YAMAMOTO, T., MATSUZAKA, T., NAKAGAWA, Y., SEKIYA, M., IIZUKA, Y., OHASHI, K., OSUGA, J., GOTODA, T., ISHIBASHI, S., ITAKA, K., KATAOKA, K., NAGAI, R., YAMADA, N., KADOWAKI, T., SHIMANO, H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. **J Biol Chem**, v. 285(15), p. 11681-11691. 2010.

VICKERS, M. H., BREIER, B. H., CUTFIELD, W. S., HOFMAN, P. L., GLUCKMAN, P. D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279(1), p. E83-87. 2000.

YOSHIKAWA, T., IDE, T., SHIMANO, H., YAHAGI, N., AMEMIYA-KUDO, M., MATSUZAKA, T., YATOH, S., KITAMINE, T., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., SEKIYA, M., TAKAHASHI, A., HASTY, A. H., SATO, R., SONE, H., OSUGA, J., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. **Mol Endocrinol**, v. 17(7), p. 1240-1254. 2003.

YOSHIKAWA, T., SHIMANO, H., AMEMIYA-KUDO, M., YAHAGI, N., HASTY, A. H., MATSUZAKA, T., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., IIZUKA, Y., OHASHI, K.,

OSUGA, J., HARADA, K., GOTODA, T., KIMURA, S., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. **Mol Cell Biol**, v. 21(9), p. 2991-3000. 2001.

ZHANG, S., RATTANATRAY, L., MACLAUGHLIN, S. M., CROPLEY, J. E., SUTER, C. M., MOLLOY, L., KLEEMANN, D., WALKER, S. K., MUHLHAUSLER, B. S., MORRISON, J. L., MCMILLEN, I. C. Periconceptual undernutrition in normal and overweight ewes leads to increased adrenal growth and epigenetic changes in adrenal IGF2/H19 gene in offspring. **FASEB J**, v. 24(8), p. 2772-2782. 2010.