

## PERFIL OXIDATIVO HEPÁTICO DA PROLE DE MÃES SUBMETIDAS A UMA DIETA COM ÓLEO DE PALMA INTERESTERIFICADO EM PERÍODOS CRÍTICOS DO DESENVOLVIMENTO

**Palavras-Chave: GORDURA INTERESTERIFICADA, ESTRESSE OXIDATIVO, PROGRAMAÇÃO MATERNA.**

**Autores/as:**

**Luiza Martins Fernandez Malentachi, FCA- UNICAMP**

**Paloma Brasílio Villalta (Coorientadora), FCA-UNICAMP**

**Profª Drª Adriana Souza Torsoni (Orientadora), FCA - UNICAMP**

### **INTRODUÇÃO:**

A fase gestacional e de lactação são períodos em que o organismo está em desenvolvimento inicial e em modificações morfológicas e fisiológicas (BARKER, 1990; GLUCKMAN et al., 2008). Estudos epidemiológicos relacionam a exposição a fatores ambientais adversos durante esses períodos com alterações na expressão gênica, aumentando o risco de doenças crônicas ao longo da vida (BARKER, 1990; BATESON et al., 2004; GLUCKMAN et al., 2008; SILVEIRA et al., 2007). Essa relação se insere na área de conhecimento “Origem desenvolvimentista da saúde e doença” (DOHaD) (HANSON e GLUCKMAN, 2014; SILVEIRA et al., 2007), que investiga a causalidade das doenças crônicas, visando melhor compreensão e prevenção dessas condições.

O aumento do consumo de alimentos ultraprocessados e a inatividade física, têm levado ao excesso calórico e baixo gasto energético (WHO, 2021). Dietas hipercalóricas e hiperlipídicas durante a gestação afetam negativamente o metabolismo da prole,

causando aumento de peso, aumento do tecido adiposo e gordura hepática (ASHINO et al., 2012; MELO et al., 2014; FANTE et al., 2016; SIMINO et al., 2016). Em resposta às regulamentações, a indústria alimentícia tem adotado outras formas de manter as características físico-químicas dos alimentos ultraprocessados, como por exemplo, a utilização de gorduras interesterificadas como substituta da gordura trans (BISPO et al., 2015). Estudos sugerem que essas gorduras podem aumentar o estresse oxidativo e inflamação intestinal (Menta et al., 2022), prejudicar parâmetros metabólicos e a homeostase glicêmica (Miyamoto et al., 2020), e causar danos oxidativos no hipocampo (D'Avila et al., 2017).

O fígado é central em diversos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de macronutrientes, homeostase glicêmica, lipídios e colesterol e doenças hepáticas têm participação significativa no desenvolvimento de morbidades e nas taxas de mortalidade (TREFTS, GANNON e WASSERMAN, 2017). Um dos principais responsáveis por danos

hepáticos é o estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e sistemas de defesa antioxidante, resultando na progressão de doenças como esteato-hepatite não alcoólica, fibrose hepática e cirrose (FARZAEI et al., 2018; BARBOSA, 2010).

Contudo, além dos efeitos deletérios de uma dieta materna com grande quantidade de lipídeos sobre a saúde da prole, é importante destacar a qualidade dos lipídios dietéticos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil oxidativo hepático da prole de camundongos cujas mães consumiram dieta contendo óleo de palma interesterificado, e que foram desafiados com o mesmo tipo de gordura na vida adulta.

#### **METODOLOGIA:**

Camundongos Fêmeas (C57BL/6J) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/Brasil) foram alojados na proporção de dois animais por gaiola, mantidos em biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com ração e água *ad libitum* ao longo do estudo. Ao concluírem 5 semanas de vida, as fêmeas foram divididas em dois grupos experimentais e alimentadas com dieta contendo óleo de palma natural (P) ou óleo de palma interesterificado (I) durante quatro semanas. Após esse período foram colocadas para o acasalamento na proporção de 2:1 com machos da mesma idade que consumiram apenas dieta comercial. Após o acasalamento, as fêmeas foram alojadas individualmente e continuaram recebendo suas respectivas dietas durante toda a gestação e lactação. No dia do nascimento, a ninhada foi ajustada para 6

filhotes (sendo 3 fêmeas e 3 machos) por mãe. No 21º dia de vida, após o desmame, os filhotes foram separados em machos e fêmeas, e todos os grupos receberam dieta contendo Óleo de Palma Natural (com base na AIN-93G) até os 42 dias de vida. Depois disso, os filhotes foram subdivididos para o período de exposição ou reexposição à dieta contendo Óleo de Palma Interesterificado (com base na AIN-93M) na idade adulta, tornando-se, então, quatro grupos experimentais, de acordo com a dieta recebida pela mãe e a dieta recebida no período em questão (Dieta Mãe + Dieta Prole): PP (Óleo de Palma Natural + Óleo de Palma Natural); PI (Óleo de Palma Natural + Óleo de Palma Interesterificado); IP (Óleo de Palma Interesterificado + Óleo de Palma Natural); e II (Óleo de Palma Interesterificado + Óleo de Palma Interesterificado). Aos 98 dias de vida, foram eutanasiados para análises moleculares no fígado sobre o perfil oxidativo, infiltrado inflamatório, avaliação dos níveis de transcritos associados ao estresse oxidativo hepático e os níveis de transcritos de Sod1 e Sod 2, outros transcritos (Cat, GPx1, GPx3, GPx4) ainda precisam ser concluídos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), sob protocolo nº. 5764-1/2021.

#### **1. Dietas Experimentais**

Para a composição das dietas controle e hiperlipídica foi utilizado óleo de palma puro (100%). O óleo de palma foi produzido e refinado pela indústria Agropalma - SA. Para a composição da dieta interesterificada, foi utilizado óleo de palma randomizado via interesterificação química. As dietas foram preparadas de acordo com as recomendações

do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M e AIN-93G) (REEVES et al. 1993). As dietas normolipídicas conteram 10% da energia total advindos dos lipídios.

## **2. Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

Foram separados 100mg de tecido para serem homogeneizados em 1mL de tampão fosfato (50mM) gelado e, em seguida, armazenados no gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm e o sobre/infranadante coletado para o ensaio de ELISA em um comprimento de onda de 570nm. O cálculo da atividade enzimática foi calculado pela absorbância das amostras, sabendo que a absorbância do padrão é igual 1U de SOD, e que 1 unidade (U) de SOD é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol.

## **3. TBARS**

Para medida indireta da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, foram pesados 100mg do tecido (seco em papel filtro) em tubo eppendorff 2mL, utilizando tesoura e pinça, e o tecido foi mantido no gelo durante todo o experimento. Será acrescentado 1mL de PBS 1x para homogeneização no agitador por aproximadamente 1 minuto. As amostras foram centrifugadas por 10min. a 12000rpm. Em seguida 0,250mL do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorff 2,0mL. Para o ensaio de ELISA, foram adicionados 0,5mL da solução TBARS em todos os tubos, inclusive nos padrões e branco, que depois foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria fervente por 15 minutos, e, em seguida resfriados em água corrente fria. Foram adicionados 0,75mL de butanol em todos os tubos que foram passados

no vortex para homogeneização. As amostras foram centrifugadas em centrífuga de mesa a 6000 rpm por 10 minutos. Na placa de Elisa, foram acrescentados 200µL por poço do sobrenadante das amostras em duplicata, exceto o branco. A leitura de Elisa será a 530 ou 535nm. A dosagem de TBARS é expressa por: concentração de MDA/ concentração de proteína. A concentração de proteína do tecido é dosada pelo método de Lowry.

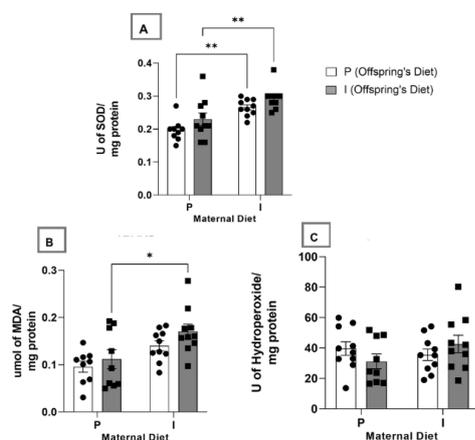
## **4. RT-qPCR**

Para determinação da quantidade de transcritos-alvo do estudo, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). As amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas em Trizol com “bead-raptor” com velocidade máxima por 30s e foram aguardados 5 minutos em temperatura ambiente para completar a dissociação do material. As amostras foram transferidas para eppendorfs com clorofórmio, homogeneizadas e após 3 minutos estas foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C, 10500 RPM. A fase aquosa será transferida para novos eppendorfs, onde foi adicionado o isopropanol e após descanso de 5 minutos à temperatura ambiente as amostras forma centrifugadas por 10 minutos a 4°C, 10500 RPM e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1mL de etanol 75% e centrifugado por 10 minutos a 4°C, 8400 RPM. O sobrenadante foi novamente descartado e foi adicionado 1mL de etanol 100%, o eppendorf foi centrifugado por mais 10 minutos, 4°C, 8400 RPM. Após o descarte do etanol, 30µL de água ultrapura foi adicionada e agitada até a dissolução total do pellet. As amostras foram armazenadas a -20°C por 24h para a quantificação do RNA total. A síntese de cDNA

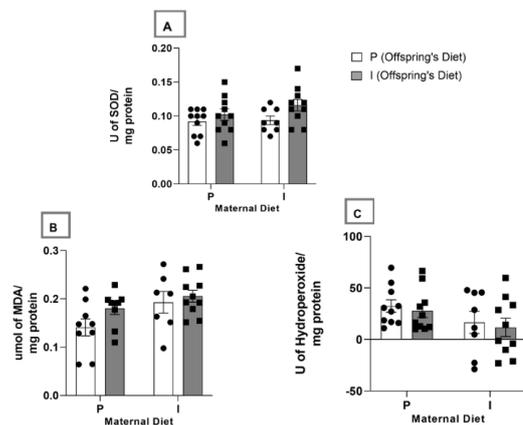
foi realizada com 3µg do total de RNA usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se primers dos genes alvos (Sod1, Sod2, Cat, GPx1, GPx3, GPx4) com o sistema TaqMan™ (AppliedBiosystems) e rplp0 como controle endógeno. Os dados foram expressos como valores relativos, determinados pelo método de comparação do threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), de acordo com a recomendação do fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nas análises de SOD (atividade da superóxido dismutase) (Fig. 1a) e TBARS (medida indireta da peroxidação lipídica) (Fig. 1b) notou-se uma diferença entre os grupos da prole fêmea, principalmente relacionados com a dieta proveniente da mãe e não associado com a exposição e reexposição da dieta da prole. Nas análises do hidroperóxido (Fig. 1c) não houve diferença entre os grupos em relação aos parâmetros analisados. Na prole macho não houve diferença significativa em nenhuma das análises (Figura 2).

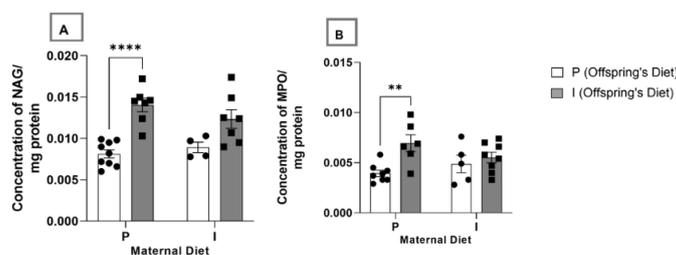


**Figura 1. Estresse Oxidativo da prole fêmea.** Avaliação de estresse oxidativo hepático da prole fêmea por análises de atividade da superóxido dismutase (SOD) (a), peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (b), e dosagem da concentração de hidroperóxidos (c). Dados apresentados como média ± SEM (n = 10). Two-way ANOVA com post-hoc de Tukey, \* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\*\* = p<0.001.

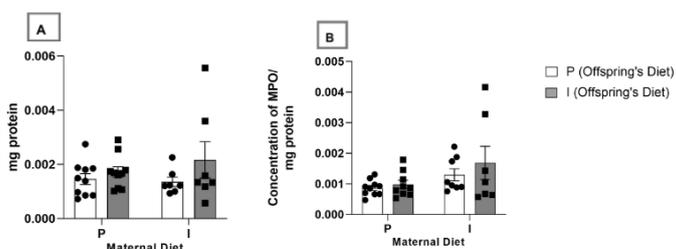


**Figura 2. Estresse Oxidativo da prole macho.** Avaliação de estresse oxidativo hepático da prole macho por análises de atividade da superóxido dismutase (SOD) (a), peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (b), e dosagem da concentração de hidroperóxidos (c). Dados apresentados como média ± SEM (n = 10). Two-way ANOVA com post-hoc de Tukey, \* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\*\* = p<0.001.

Para investigar possíveis processos de inflamação, acrescentamos no projeto uma avaliação sobre infiltrado inflamatório pela quantificação de macrófagos (Fig. 3a) e neutrófilos (Fig. 3b) no fígado da prole fêmea e macho, e nesse caso observou-se uma diferença relacionada com a dieta de exposição e reexposição da prole, mais uma vez apenas nas fêmeas (Fig. 3 e 4).



**Figura 3. Infiltrado Inflamatório da prole fêmea.** Avaliação de infiltrado inflamatório pela quantificação de macrófagos (A) e neutrófilos (B) no fígado da prole fêmea. Dados apresentados como média ± SEM (n = 10). Two-way ANOVA com post-hoc de Tukey, \* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\*\* = p<0.001.



**Figura 4. Infiltrado Inflamatório da prole macho.** Avaliação de infiltrado inflamatório pela quantificação de macrófagos (A) e neutrófilos (B) no fígado da prole macho. Dados apresentados como média ± SEM (n = 10). Two-way ANOVA com post-hoc de Tukey, \* = p<0.05, \*\* = p<0.01, \*\*\*\* = p<0.001.

Quanto aos transcritos envolvidos com estresse oxidativo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos níveis de Sod1 (Fig. 5a) ou Sod2 (Fig. 5b)

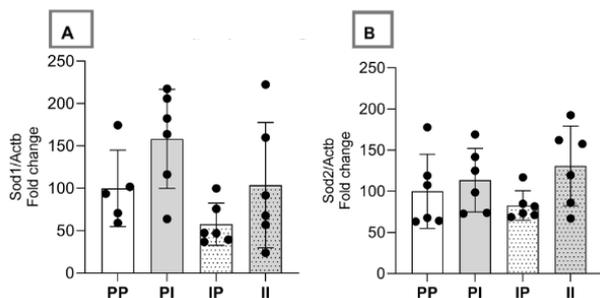


Figura 5. Níveis de transcritos envolvidos com estresse oxidativo no fígado da prole fêmea. Avaliação por qRT-PCR dos níveis de Sod1 (a) e Sod2 (b) no fígado da prole fêmea e normalizados com o controle endógeno Actb. Dados expressos como média  $\pm$  SEM (n = 4-6). Two-way ANOVA com post-hoc de Tukey com \* =  $p \leq 0.05$ .

Em conclusão, nossos resultados sugerem um aumento de estresse oxidativo hepático apenas na prole fêmea de mães que consumiram dieta com óleo de palma interesterificado nas fases críticas do desenvolvimento, independente da dieta oferecida na fase adulta. Entretanto, um aumento do infiltrado inflamatório só foi observado na prole fêmea cujas mães receberam dieta contendo óleo de palma natural, mas que foram desafiadas na vida adulta à dieta contendo óleo de palma interesterificado. Todavia, ainda são necessárias análises complementares para a melhor compreensão das alterações encontradas.

## BIBLIOGRAFIA

ASHINO, N. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 341–348, 2012.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARKER, D. The fetal and infant origins of adult disease: The womb may be more important than the

home. **British Medical Journal**, v. 301, p. 1111, 1990.

BATESON, P. et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, p. 419–421, 2004.

FERRARI, Elenice A. et al. Plasticidade neural: relações com o comportamento e abordagens experimentais. **Psicologia: teoria e pesquisa**, v. 17, p. 187-194, 2001.

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

D'AVILA, L. F. et al. Toxicological aspects of interesterified fat: Brain damages in rats. **Toxicology Letters**, v. 276, n. March, p. 122–128, 2017.

GLUCKMAN, P. D. et al. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. **N Engl J Med**, v. 359, p. 61–73, Jul. 2008.

HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1027-1076, 2014.

MENTA, P.L.R. et al. Interesterified palm oil increases intestinal permeability, promotes bacterial translocation, alters inflammatory parameters and tight-junction protein gene expression in Swiss mice. **Food Research International**, v. 151, p. 110897, 2022.

MIYAMOTO, J. et al. Interesterified palm oil impairs glucose homeostasis and induces deleterious effects in liver of Swiss mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 112, 2020.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN D.H. The liver. **Curr Biol**, v. 27, n. 21, p. R1147-R1151, 2017.

WHO. **World Health Statistics 2021**. WHO World Health Organization, 2021.