

INFLUÊNCIA DA DIETA MATERNA COM ÓLEO DE PALMA INTERESTERIFICADO SOBRE O COMPORTAMENTO DA PROLE DE CAMUNDONGOS

Palavras-Chave: GORDURA INTERESTERIFICADA; PROGRAMAÇÃO METABÓLICA; COMPORTAMENTO

Autoras:

Helena Lima Viviani, FCA – UNICAMP

Paloma Brasilio Villalta (Coorientadora), FCA-UNICAMP

Gabriela Pandini Silote (Coorientadora) FCA-UNICAMP

Dr^a Adriana Souza Torsoni (Orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O consumo de alimentos ultraprocessados vem crescendo vertiginosamente em todo o Brasil e, com ele, o consumo de gorduras modificadas que conferem importantes propriedades a esses alimentos. Com a recente proibição da ANVISA sobre a utilização da gordura trans pela indústria, a gordura interesterificada tem ganhado espaço como alternativa. No entanto, dados recentes da literatura apontam para efeitos pouco benéficos do consumo desse tipo de gordura sobre parâmetros metabólicos em modelos experimentais animais. Estudos recentes indicam que a qualidade nutricional lipídica durante a gravidez e lactação possui impacto na programação metabólica da prole, porém sabe-se pouco em relação aos efeitos sobre o sistema nervoso central, em especial ao hipocampo e córtex, e as suas funções relacionadas à memória, aprendizagem e ansiedade. Nesse sentido, esse projeto visa avaliar o efeito do consumo materno de dieta contendo gordura interesterificada sobre o comportamento da prole de camundongos após desafio nutricional 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 12 horas, temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com ração e água *ad libitum* ao longo do estudo. Ao completarem cinco semanas de vida, as fêmeas foram divididas em dois grupos experimentais, de acordo com a dieta ofertada: Óleo de Palma (P) ou Óleo de Palma Interesterificado (I). Após o período de quatro semanas, as fêmeas foram colocadas para acasalamento na proporção de 2:1 com machos da mesma idade, alimentados com dieta P. Após o acasalamento, as fêmeas foram alojadas individualmente e continuaram recebendo suas respectivas dietas durante toda gestação e lactação (a dieta foi elaborada com base na AIN-93G). No dia do nascimento da prole, a ninhada foi ajustada para 6 filhotes (sendo 3 fêmeas e 3 machos) por mãe.

No 21^o dia de vida, os filhotes foram desmamados e subdivididos em quatro grupos experimentais de acordo com a dieta recebida pela mãe, e o desafio nutricional na idade adulta: 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) por mais oito semanas. Aos 80 dias de vida, a prole foi submetida a testes comportamentais de Reconhecimento de Novo Objeto (NOR), Teste de Campo Aberto (OFT), e

Labirinto em Cruz Elevado (EPM), cujas análises ainda se encontram em andamento. Aos 98 dias de vida, a prole foi eutanasiada, e foram coletados o córtex pré-frontal e hipocampo dorsal para análises de Western Blotting e RT-PCR, que também não foram concluídas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O teste de Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated plus maze*, EPM), foi utilizado para medir a frequência e tempo em que a prole fêmea (**Fig.1**) e macho (**Fig. 2**) permaneceu nos braços abertos ou fechados, com o intuito de inferir comportamento aversivo ou ansioso. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, sugerindo que as variáveis testadas não influenciaram o comportamento de ansiedade dos animais nas condições experimentais avaliadas.

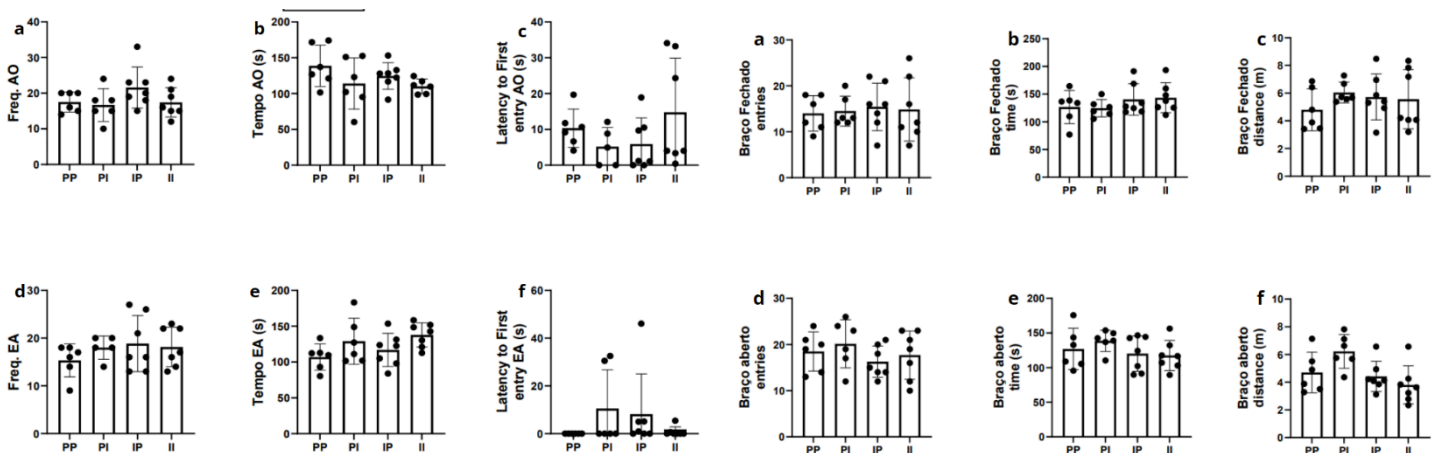


Figura 1. Labirinto em cruz elevado (Elevated plus-maze, EPM) da prole fêmea. Frequência no Braço Aberto (Freq. AO) (a); Tempo Braço Aberto (Tempo OA) (b); Latência para a primeira entrada no Braço Aberto (Latency to First entry AO) (c); Frequência no Braço Fechado (Freq EA)(d); Tempo Braço Fechado (Tempo EA) (e); Latência para a primeira entrada no Braço Fechado (Latency to First entry EA) (f). Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05.

Figura 2. Labirinto em cruz elevado (Elevated plus-maze, EPM) da prole macho. Entradas Braço Fechado(entries)(a); Tempo Braço Fechado (time) (b); Distância Braço Fechado (c); Entradas Braço Aberto(entries)(d); Tempo Braço Aberto (time) (e); Distância Braço Aberto (f); Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05

Em relação ao Teste do campo aberto (*Open field test*, OFT), para todos os parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças entre os grupos, sugerindo que a exposição às diferentes dietas não afetou o comportamento de exploração e ansiedade dos animais.

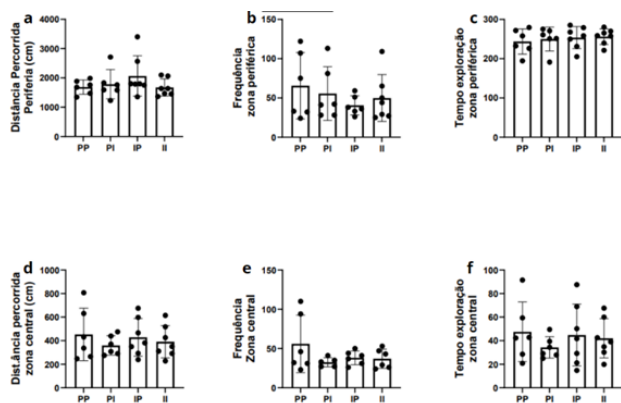


Figura 3. Teste do campo aberto (Open field test, OFT) da prole fêmea. Distância percorrida periferia (a); Frequência Zona Periférica (b); Tempo Exploração Zona Periférica (c); Distância Zona Central (d); Frequência Zona Central (e); Tempo de exploração Zona Central (f). Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05.

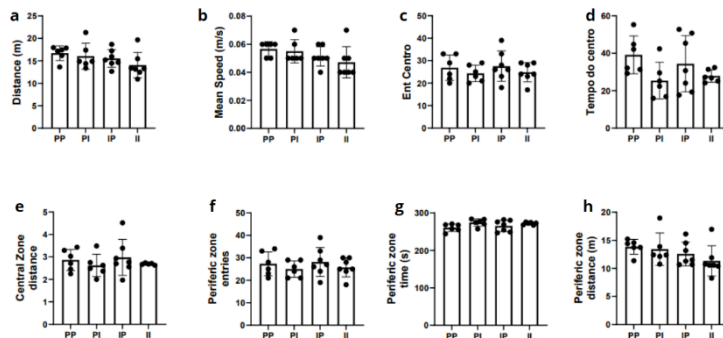


Figura 4. Teste do campo aberto (Open field test, OFT) da prole macho. Distance (Distância) (a), Mean Speed (Velocidade Média) (b), Enter in center (Entrada no Centro) (c), Time in center (Tempo do Centro) (d), Central Zone Distance (Distância na zona central) (e), Periferic Zone Entries (Entradas na Zona Periférica) (f), Periferic Zone time (Tempo na Zona Periférica) (g) e Periferic zone distance (Distância na Zona Periférica) (h). Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05.

O terceiro teste comportamental realizado foi o teste de Reconhecimento de Novo Objeto (*Novel Object Recognition Test*, NOR), onde observou-se uma tendência na prole de machos IP de explorar menos o novo objeto, em comparação com a prole PP (Fig.5d), sugerindo comprometimento na memória de reconhecimento em descendentes de fêmeas alimentadas com dieta contendo gordura interesterificada, mas que tiveram a dieta substituída por óleo de palma.

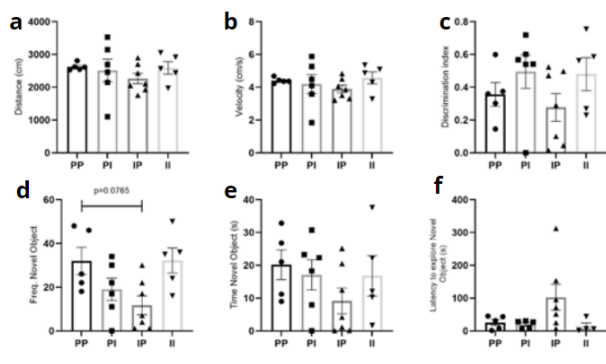


Figura 5. Reconhecimento de Novo Objeto (NOR) da prole macho. Distância (Distance) (a), Velocidade (Velocity) (b), índice de discriminação (Discrimination index) (c), Frequência novo objeto (Freq. Novel Object) (d), Tempo Novo Objeto (Time Novel Object) (e); Latência para explorar novo objeto (Latency to explore novel object) (f). Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05.

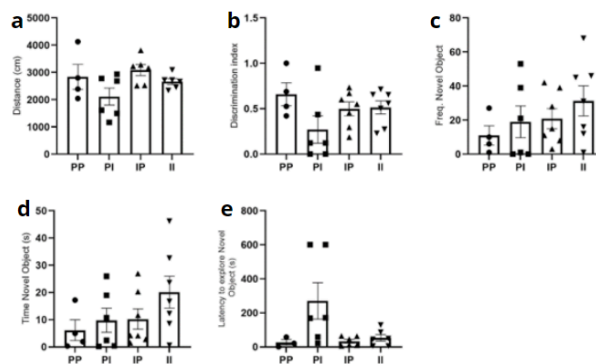


Figura 6. Reconhecimento de Novo Objeto (NOR) da prole fêmea. Distância (Distance) (a), índice de discriminação (Discrimination index) (b), Frequência novo objeto (Freq. Novel Object) (c), Tempo Novo Objeto (Time Novel Object) (d); Latência para explorar novo objeto (Latency to explore novel object) (e). Dados apresentados como média ± SEM (n = 6). One-way ANOVA, * = p<0.05.

Os dados de Western Blot para DNMT3a (**Fig.7**) demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (PI,IP,II) de proles fêmeas, quando comparados prole à PP, sugerindo uma possível variação no conteúdo dessa proteína em resposta exposição ao óleo de palma interesterificado, tanto durante o desenvolvimento, quanto na vida adulta. Em contraste, essa diferença não foi observada nos machos, o que pode indicar uma regulação distinta de DNMT3a entre machos e fêmeas.

Os resultados de Western Blot para BDNF (**Fig.8**) não mostraram diferenças estatisticamente significativas, tanto entre os grupos, quanto entre machos e fêmeas.

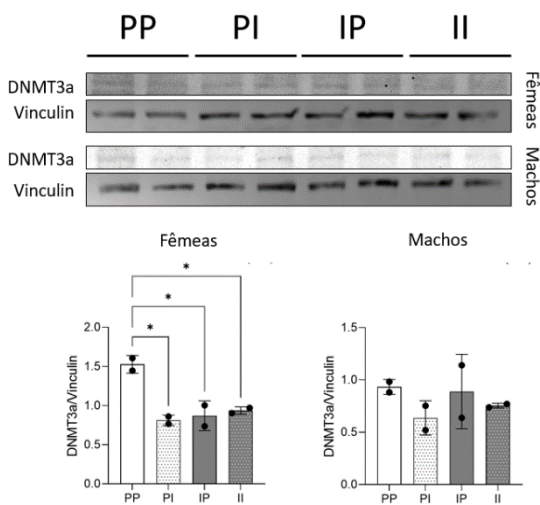


Figura 7. Western Blotting de DNMT3a no córtex Pré-frontal da prole fêmea e macho dos grupos PP,PI,IP e II. Vinculina foi utilizada como controle endógeno. Dados expressos como média ± DP (n = 2). One-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni com * = p<0.05.

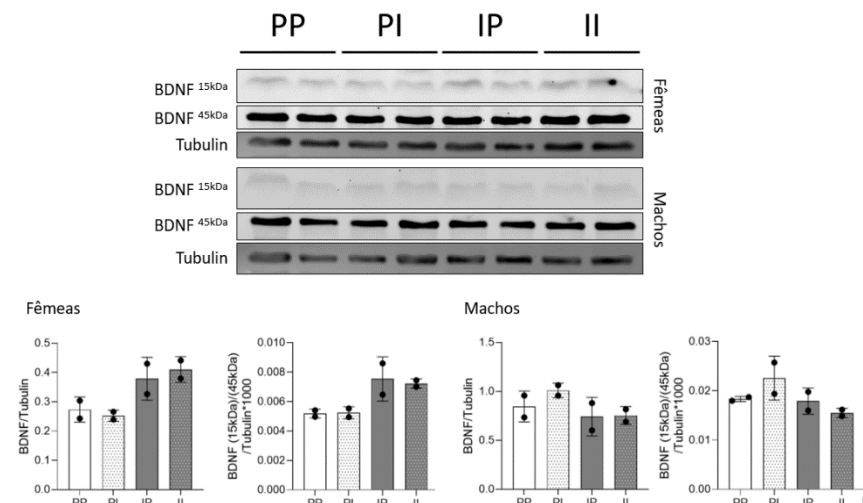


Figura 8. Western Blotting de BDNF^{15kDa} e BDNF^{45kDa} no córtex Pré-frontal da prole fêmea e macho dos grupos PP,PI,IP e II. Tubulina foi utilizada como controle endógeno. Dados expressos como média ± DP (n = 2). One-way ANOVA com post-hoc de Bonferroni com * = p<0.05.

CONCLUSÕES:

Os resultados sugerem que a exposição da prole à gordura interesterificada, tanto durante o desenvolvimento, quanto na vida adulta, não foi capaz de alterar parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, aprendizado ou memória. Entretanto, análises moleculares preliminares sugerem uma possível alteração de uma proteína importante para cognição na prole fêmea que apresentou algum contato com a gordura interesterificada durante a vida, seja na fase intrauterina ou na fase adulta. Todavia, ainda são necessárias análises mais aprofundadas para a melhor compreensão dessas possíveis alterações.

BIBLIOGRAFIA:

BANNERMAN, D. M. et al.. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 181–192, 2014.

BARKER, D.J., OSMOND, C., LAW C.M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **J Epidemiol Community Health**, v. 43, n. 3, p. 237-40, 1989.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

CHANG, H. et al. Increased central dopaminergic activity might be involved in the behavioral abnormality of cuprizone exposure mice. **Behav Brain Res**, v. 331, p. 143-150, 2017.

CRAWLEY, J. N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 809–818, 2008.

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.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nat Protoc**, v. 8, n. 12, p. 2531-2537, 2013.

LUEPTOW, L.M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **J Vis Exp**, (126):55718, 2017.

Mapa da obesidade. **ABESO**, 2019. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. Acesso em: 25, abr 2023

MIYAMOTO, Josiane Érica. Ingestão de gordura de palma interesterificada altera parâmetros metabólicos e a homeostasia de glicose em camundongos da linhagem Swiss. 2017. **1 recurso online** (78 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Limeira, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1635584>.

REBOLA, N.; CARTA, M.; MULLE, C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. **Nat Rev Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 208-220, 2017.

SAFI-STIBLER, S; GABORY, A. Epigenetics and the Developmental Origins of Health and Disease: Parental environment signalling to the epigenome, critical time windows and sculpting the adult phenotype. **Semin Cell Dev Biol**, v. 97, p. 72-180, 2020.

SALES, A.J. et al.. Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 6, p. 1711-1721, 2011.

SILVEIRA, P. P. et al. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494–504, 2007.