



INFLUÊNCIAS DO AZEITE DE OLIVA E DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O CUIDADO MATERNO E A EMOCIONALIDADE

EMILY DOS SANTOS GARCIA¹; ANA CAROLINE SILVA SILVEIRA²;
ALESSANDRA GONÇALVES MACHADO²; ARIADNI MESQUITA PERES²;
ANDRESSA ARAUJO TRINDADE²; RACHEL KROLOW³

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul – emily.sgarcia@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – carolline.silveira@hotmail.com;
agm.alessandra@gmail.com; agm.alessandra@gmail.com; andressa_araujotrindade@hotmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – krolowrachel@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O cuidado materno é um dos comportamentos mais importantes exercidos pelas mães com intuito de permitir a sobrevivência e o desenvolvimento dos filhotes (Bosch, 2011). Em ratos, o cuidado materno envolve a expressão consistente e coordenada de uma série de comportamentos, e dessa forma, variações nesses comportamentos podem ter impactos profundos no Sistema Nervoso Central e no desenvolvimento da prole (Nephew, 2013). Intervenções ambientais como a exposição a estressores e a nutrição das mães, durante a gestação e após o parto, podem influenciar na liberação hormonal, na neurogênese e no comportamento das ratas. O estresse da separação materna (SM) após o parto pode ocasionar na ruptura da ligação entre mãe e filhote, e assim pode induzir aumento da ansiedade e depressão nas mães e comprometer o bem-estar materno e a qualidade do cuidado desenvolvido por essas mães no período pós-natal. (Sung et al., 2010; Couto - Pereira et al, 2016).

Além de alterações comportamentais induzidas pelo estresse da SM, as ratas após o parto também sofrem modificações hormonais importantes que podem justificar o aumento da ansiedade e do comportamento depressivo nestes animais. Por exemplo, flutuações dos níveis séricos de hormônios peptídicos hipofisários (como a prolactina e ocitocina) e hormônios esteróides sexuais (estrogênios e progesterona), podem programar o fenótipo materno e contribuir para o surgimento do comportamento depressivo das mães.

Outra exposição ambiental que pode programar o metabolismo das mães é a nutrição durante a gestação. A nutrição materna exerce forte influência no desenvolvimento da prole, então mudanças sutis no ambiente intrauterino podem ter implicações a longo prazo. Ainda nas fases iniciais da gestação, a formação e função da placenta são diretamente influenciados por fatores nutricionais das mães. A placenta é um anexo embrionário que desempenha a função de fazer o intercâmbio de substâncias entre mãe e filho. É através dela que os fetos realizam as trocas gasosas, eliminam resíduos e recebem o aporte de nutrientes que necessitam durante o desenvolvimento. O estado nutricional das mães induz alterações epigenéticas na placenta, afetando os fenótipos dos fetos e dos filhos após o nascimento (Taniguchi et al, 2018). Rincel e colaboradores (2016), mostraram que o consumo materno de uma dieta com alto teor de lipídios preveniu totalmente os fenótipos de ansiedade dos filhos e das mães que sofreram separação materna, além de melhorar a qualidade do cuidado materno no período neonatal.



Outro estudo mostrou que uma dieta rica em lipídeos atenuou a ansiedade e o comportamento depressivo no pós-parto em mães que passaram por separação de sua ninhada durante a lactação (Manian and Morris, 2010). Diante disso, a ingestão de alimentos que desempenham um papel neuroprotetor pode ser de grande importância para a manutenção do comportamento materno. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do consumo de azeite de oliva (rico em ácido oleico) sobre o comportamento materno, a emocionalidade e o imunoconteúdo dos receptores de ocitocina no hipocampo dorsal de mães que foram separadas da prole.

2. METODOLOGIA

Após a aprovação no comitê de ética (CEUA/UFRGS 37804), 38 ratas *Wistar* no primeiro dia gestacional foram alocadas em dois grupos de acordo com a dieta: mães alimentadas com ração padrão + óleo de soja (SO) ou mães alimentadas com ração padrão + azeite de oliva (AO). As dietas foram calculadas de forma a serem isocalóricas e foram preparadas utilizando farelo da ração padrão fornecidas pelo biotério (Nuvilab®) acrescidas de 4% de OS ou AO.

Após o nascimento da prole, considerado dia pós-natal 0, os grupos foram subdivididos conforme o protocolo de separação materna em: Intacto OS; Intacto AO; SM + OS e SM + AO. Os grupos de animais que não passaram por nenhuma intervenção até o desmame são chamados de grupo intacto. O protocolo de SM ocorreu do dia pós-natal 1 ao 10, por um período de 3 horas por dia (ciclo claro). Durante esse período ocorreu a avaliação do comportamento materno. No desmame, dia pós-natal 21, os filhotes foram randomizados e separados por sexo, recebendo ração padrão do biotério e tendo o consumo e o peso corporal monitorados sendo utilizados em outro estudo. Após o desmame, a emocionalidade materna foi analisada pela tarefa do nado forçado e os níveis dos receptores de ocitocina foram medidos no hipocampo dorsal pela técnica de western blotting.

As observações do comportamento materno ocorreram simultaneamente com o protocolo de intervenção neonatal (PN1 até PN10). A partir do primeiro dia pós-natal (PN1) até o décimo dia (PN10) as ninhadas foram observadas na própria sala de alojamento do Biotério sem qualquer tipo de perturbação. As observações ocorreram 5 vezes ao dia, correspondendo a três sessões no ciclo claro (10h, 13h e 17h30) e duas durante o ciclo escuro (06h e 20h). Cada sessão foi de 72 minutos e durante este período, a cada três minutos, o observador registrou em uma planilha os comportamentos exibidos pelas mães, totalizando 25 registros por sessão (125 observações por dia para cada mãe). Os comportamentos observados foram: comportamento de lambear, amamentação em cada uma das 3 posturas (mãe com o dorso pouco arqueado, bem arqueado ou amamentando de lado/de costas), também foi avaliado a ausência ou presença da mãe no ninho (não amamentando), a recolhida de filhotes, construção do ninho e a frequência com que as mães se alimentam ou bebem água. A partir dessas observações foi possível verificar o escore de inconsistência comportamental, que variou entre 0 e 1. Quanto mais alto o escore, maior a fragmentação e inconsistência do comportamento materno. Foram consideradas transições entre os seguintes comportamentos: (1) amamentação, variações entre as diferentes posturas de amamentação não serão consideradas



devido ao risco de obter um resultado falso positivo, (2) comportamento de lambar, (3) recolhida de filhotes, (4) construção do ninho, (5) mãe no ninho, (6) mãe fora do ninho, (7) mãe se alimentando ou bebendo água.

A tarefa do nado forçado foi realizada em duas etapas. Na primeira exposição os animais foram colocados durante 15 minutos em um cilindro (20 x 70 cm, com água a $25 \pm 2^\circ\text{C}$) sem área de escape, assim o animal é forçado a nadar para tentar fugir. A segunda exposição ocorreu 24h após a primeira e com tempo máximo de 5 minutos. Ao final do experimento as ratas foram secas com toalhas e recolocadas nas caixas-moradia. Em ambas as sessões os parâmetros avaliados foram: (1) tempo de nado, (2) latência para o primeiro episódio de imobilidade e (3) tempo de imobilidade.

Para a realização das análises bioquímicas, as amostras de hipocampo dorsal foram homogeneizadas em tampão de lise (4% SDS, 2,1 mM EDTA, 50 mM Tris) e foram retiradas alíquotas para a dosagem de proteínas. Essas proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato de transferência semi-seco (Bio-RadTrans-Blot SD). Após 1h de incubação a 4°C em solução bloqueadora com leite em pó 5% e 0,1% Tween-20 em Tampão Tris-Salino as membranas foram incubadas com anticorpo primário (anti-receptor de ocitocina) diluído na mesma solução bloqueadora. Subsequentemente, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, os quais reconhecem como antígenos os anticorpos primários. A imunorreatividade das bandas foi revelada por um kit amplificador de quimioluminescência (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Life Sciences) e detectada utilizando um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences). As imagens de *imunoblot* foram analisadas com o *software* Optiquant (Packard Instrument) (Kurien e Scofield, 2006; Gibbons, 2014).

Os resultados foram analisados pelo programa SPSS Statistics 22.0 e representados em gráficos através do programa Prisma 5. Os dados paramétricos com distribuição normal foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (dieta e separação materna). Os valores foram representados através de média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os níveis de significância foram aceitos como diferentes quando o valor de p for menor ou igual a 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anova de duas vias mostrou que a separação materna induziu o aumento inconsistente das frequências de lambidas e amamentação arqueada ($P < 0,05$), reduziu o imunoconteúdo dos receptores de ocitocina ($P < 0,03$) e induziu comportamento depressivo nas mães ($P < 0,05$). A dieta AO preveniu o aumento da amamentação arqueada induzido pela separação materna ($P < 0,05$) e aumentou a frequência de lambidas nos filhotes ($P < 0,05$).



4. CONCLUSÕES

O consumo de azeite de oliva aumentou o cuidado materno de forma consistente. Já a separação materna prejudicou o cuidado materno e a emocionalidade das mães. Esses efeitos podem estar relacionados com a redução dos receptores de ocitocina no hipocampo dorsal das mães. Apoio: CNPq/FAPERGS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSCH, OJ; POHL, TT; NEUMANN, ID; YOUNG, LJ. *Abandoned prairie vole mothers show normal maternal care but altered emotionality: Potential influence of the brain corticotropin-releasing factor system.* **Behavioral Brain Research**, v. 341, p. 114 - 121, 2018.

NEPHEW, B; MURGATROYD, C. *The role of maternal care in shaping CNS function.* **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 371 - 378, dezembro, 2013.

SUNG, YA; SHIN, MS; CHO, S; BAIK, HH; JIN, BK; CHANG, HK; LEE, EK; KIM, CJ. *Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus.* **Neuroscience**, v. 470, p. 86 - 90, fevereiro, 2010.

COUTO-PEREIRA, NS; FERREIRA, CF; LAMPERT, C; ARCEGO, DM; TONIAZZO, A; BERNARDI, JR; DA SILVA, DC; VON POSER TOIGO, E; DIEHL, LA; KROLOW, R; SILVEIRA, PP; DALMAZ, C. *Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion.* **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 55, p. 72–81, outubro, 2016.

TANIGUCHI, K; KAWAI, T; HATA, K. *Placental development and nutritional environment.* **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1012, p. 63 - 73, 2018.

RINCEL, M; LÉPINAY, AL; DELAGE, P; FIORAMONTI, J; THÉODOROU, VS; LAYÉ, S; DARNAUDÉRY, M. *Maternal high-fat diet prevents developmental programming by early-life stress.* **Translational Psychiatry**, v. 6, e966, novembro, 2016.

MANIAM, J; MORRIS, MJ. *Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subject to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet.* **Behavioral Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 72 - 79, março, 2010.