



Evaluación de parámetros somáticos, neurobiológicos y de la función reproductora en diversas etapas cronológicas de ratones con ingesta variable de ácidos grasos omega 3

Santiago Bianconi.

Tesis - Doctor en Medicina y Cirugía - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2017.

Aprobada: 2017

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Evaluación de parámetros somáticos, neurobiológicos y de la función reproductora en diversas etapas cronológicas de ratones con ingesta variable de ácidos grasos omega 3 by Santiago Bianconi is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.



**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS SOMÁTICOS,
NEUROBIOLÓGICOS Y DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA
EN DIVERSAS ETAPAS CRONOLÓGICAS DE RATONES CON
INGESTA VARIABLE DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3**

Tesis de Doctorado en Medicina y Cirugía

Médico SANTIAGO BIANCONI

Instituto de Fisiología

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba

INICSA (CONICET/FCM-UNC)

-2017-

Médico Santiago Bianconi

Directora:

Profesora Doctora Graciela STUTZ

Co-directora:

Doctora Valeria Paola CARLINI

Comisión Asesora:

Profesor Doctor Otilio Daniel ROSATO

Profesor Doctor Luis Santos SPITALE

RD 1678/2011 y 1342/2015

A mi familia, donde aprendí los valores fundamentales.

A mis amigos, por el afecto sincero y la complicidad.

A la música, por ser alimento para mi alma.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Ruiz, por su orientación y apoyo en los comienzos de esta etapa de mi vida académica.

A la directora de esta tesis, Dra. Graciela Stutz, por haber guiado el desarrollo de la misma con entusiasmo, experticia y gran calidad humana.

A la co-directora, Dra. Valeria Carlini, quien a través de sus conocimientos y capacidad de trabajo permitió ampliar los objetivos y alcances de la presente tesis.

A la Dra. María Emilia Santillán, integrante del equipo de estudio de los PUFA, por el asesoramiento científico, colaboración en los experimentos y revisión minuciosa del borrador final.

Al Dr. Helgi Schiöth, director de la Unidad de Farmacología Funcional del Departamento de Neurociencias de la Universidad de Uppsala (Suecia), quien me posibilitó una estancia de seis meses en su laboratorio, durante la cual se llevaron a cabo los experimentos de PCR.

A la Bióloga Giulia Maestri, integrante del equipo del Dr. Schiöth, por haberme enseñado la técnica de PCR y por facilitar mis tareas en el laboratorio de Farmacología Funcional.

A las Dras. Laura Vincenti, Carolina Martini y Eugenia Luque, quienes brindaron asesoramiento científico y/o han colaborado en los experimentos de calidad espermática y calidad ovocitaria.

A la Bióloga Verónica Cantarelli y a la Dra. Marina Ponzio, quienes colaboraron con las determinaciones hormonales del presente trabajo.

A quienes facilitaron por diferentes medios la preparación de la dieta purificada utilizada en los experimentos de la presente tesis; la Dra. María Eugenia Pasqualini (Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, FCM-UNC) y el Dr. Santiago Palma (Dpto. de Farmacia, FCQ-UNC).

Al Dr. Juan Manuel Busso (IIByT-CONICET/UNC) y a la Ingeniera Laura Alicia Gonzalez (Grupo Infostat, FCA-UNC), por brindar asesoramiento estadístico.

Al Dr. Nelson Rubén Grosso (Cátedra de Química Biológica, FCA-UNC), quien realizó las cromatografías gaseosas de los aceites empleados en las dietas experimentales.

A la Traductora de Inglés Virginia Fierro, por su aporte en la confección del resumen en inglés.

Finalmente, quiero agradecer a todo el equipo del Instituto de Fisiología Humana y de la Cátedra de Física Biomédica (FCM-UNC), por la calidez humana y el agradable clima de trabajo que construimos a diario.

El presente trabajo fue realizado con subsidios otorgados por
SECyT-UNC y CICyT-UNLaR.

**“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”**

(Artículo 30 del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; RHCD 313/07, RHCS 455/07)

Se deja CONSTANCIA que los experimentos cuyos resultados se incluyen en la presente Tesis Doctoral, fueron realizados en su mayor parte en el Laboratorio de Reproducción del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. La evaluación de expresión de genes, por su parte, fue llevada a cabo en el Laboratorio de Farmacología Funcional, Departamento de Neurociencias de la Universidad de Uppsala, Suecia.

Prof. Dra. Valeria P. CARLINI

Co-Directora

Prof. Dra. Graciela STUTZ

Directora

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Ácidos grasos: propiedades bioquímicas y nomenclatura	5
Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados en mamíferos	6
Fuentes alimentarias de ácidos grasos poliinsaturados	8
Digestión, absorción, transporte y metabolismo de ácidos grasos	10
Patrón occidental de consumo de grasas e ingesta recomendada de ácidos grasos poliinsaturados en humanos	10
Niveles adecuados de ácidos grasos poliinsaturados para estudios experimentales en ratón	11
Rol de los ácidos grasos poliinsaturados en la estructura y función de las membranas celulares	12
Sustancias biológicamente activas derivadas de los ácidos grasos poliinsaturados: eicosanoides y docosanoides	13
Modificación de la actividad nuclear mediada por lípidos	16
Fenómenos epigenéticos regulados por los ácidos grasos poliinsaturados	16
Rol de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 en el crecimiento y desarrollo temprano	17
Rol de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 en los trastornos afectivos y de ansiedad	19
Participación de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 en la memoria	20
Participación de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 en el proceso reproductivo	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Animales y dietas	26
Marcadores reproductivos relacionados con la gestación	29
Evaluación del desarrollo somático	30
Evaluación del desarrollo neurobiológico	31
Evaluación de la función reproductiva	32
Pruebas conductuales	35

Contenido	Página
Evaluación de los niveles hormonales plasmáticos	38
Evaluación de la expresión de genes	39
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	43
Efecto de dietas con dosis variables de PUFA ω 3 sobre:	
- marcadores reproductivos relacionados con la gestación	43
- evolución del peso y la longitud corporal de las crías durante la lactancia y la pubertad	44
- parámetros de desarrollo somático y neurobiológico de las crías	49
- parámetros reproductivos de las crías hembras	49
- parámetros reproductivos de las crías machos	51
- parámetros hormonales, conductuales y genéticos relacionados con la depresión y la ansiedad en las crías machos	53
- memoria no aversiva de las crías machos y hembras y la expresión de genes relacionados con la memoria en las crías machos	57
Comparación del alimento balanceado comercial y la dieta purificada control en las variables estudiadas	61
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
APÉNDICE	98
ABREVIATURAS	102

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos del organismo y participan en su fisiología a través de diferentes mecanismos. Son los principales componentes estructurales de las membranas celulares, regulando la composición y fluidez de las mismas y la actividad de sus proteínas. Además, se desempeñan como precursores y reguladores de la síntesis de sustancias biológicamente activas y tienen capacidad de modificar la expresión genética por mecanismos que incluyen los epigenéticos.

Estudios en humanos y animales dan cuenta de que la oferta alimentaria de PUFA omega (ω) 3, así como la relación $\omega 6/\omega 3$, son relevantes para el crecimiento-desarrollo fetal y postnatal a la vez que tienen repercusiones sobre la función cerebral y reproductiva. Sin embargo, algunos resultados son inconsistentes a la vez que existen áreas de vacancia al considerar los efectos sobre ciertas variables *in vivo* y los respectivos mecanismos involucrados.

En el presente trabajo estudiamos la influencia de la exposición a diferentes niveles dietéticos de PUFA $\omega 3$, desde la gestación hasta la adultez, sobre parámetros de desarrollo somático, neurobiológico y reproductivo. Tres grupos de ratones hembras albino *Swiss* -durante gestación y lactancia- y luego sus crías -desde destete hasta adultez- fueron alimentados con C (dieta purificada -DP- control, adecuada en $\omega 3$; 7% aceite de soja; $\omega 3$: 0,57%; $\omega 6/\omega 3$: 5,7), D (DP deficiente en $\omega 3$; 7% aceite de girasol; $\omega 3$: 0%; $\omega 6/\omega 3$: 0) o E (DP excesiva en $\omega 3$; 7% aceite mezcla: hígado de bacalao 60% + soja 40%; $\omega 3$: 1,25%; ácido eicosapentaenoico: 0,43%; ácido docosahexaenoico -DHA-: 0,32%; $\omega 6/\omega 3$: 1,29).

Los diferentes niveles de PUFA $\omega 3$ en la dieta materna no afectaron el peso al nacer ni otras variables relacionadas con la gestación. Sin embargo, la dieta E produjo menor peso y longitud corporal de las crías durante la lactancia, mientras que la D, solo menor longitud en este mismo período. A pesar de que las variaciones persistieron luego del destete, todos los grupos alcanzaron similar longitud al llegar a la adultez (día postnatal -DPN- 63). El peso corporal de E fue superior a D desde el DPN 49 al 56 en machos y hembras pero estas últimas presentaron peso similar en el DPN 63, mientras que la diferencia se mantuvo para los machos. Respecto a los indicadores de desarrollo, el porcentaje de crías con apertura palpebral positiva en el DPN 14 fue menor en E y se observó un retraso en el inicio de la pubertad en las hembras de este mismo grupo. La evaluación seminal en machos adultos demostró en D un mayor porcentaje de espermatozoides acodados (vs. C) y con ambos signos de inmadurez (vs. C y E).

Al considerar la influencia de los PUFA $\omega 3$ sobre la ansiedad y la actividad locomotora, los hallazgos más relevantes en el *plus maze* fueron un mayor porcentaje de entradas a los brazos abiertos (BA) y de tiempo de permanencia sobre los BA registrado en el grupo E vs. C. En el *open field*, D presentó aumento del número de cruces de líneas periféricas y del índice de locomoción y disminución del número de cruces de líneas centrales. Finalmente, en los estudios moleculares se

observó en el grupo D vs. C y E un mayor nivel del mensajero para arginina vasopresina (AVP) hipotalámica y de su receptor hipofisario AVPr1b y un menor nivel del gen para el receptor de glutamato ácido n-metil D-aspartico (NMDA) isoforma 1 en hipocampo. En esta última estructura, E respecto a C presentó mayor expresión del gen de la proteína que se une al elemento de respuesta al AMPc (CREB) isoforma 1a.

El exceso de metabolitos $\omega 3$ puede limitar la síntesis de ácido araquidónico (AA) reduciendo drásticamente el nivel de las prostaglandinas derivadas del mismo. El retraso en el crecimiento de E durante la lactancia puede ser explicado por este mecanismo, capaz de afectar el desarrollo de los ductos mamarios y por lo tanto, la cantidad y calidad de la leche ofrecida a las crías. Asimismo, ha sido demostrado que el AA es necesario para el desarrollo del tejido adiposo y el crecimiento tisular. Además, la exposición intrauterina a niveles excesivos de $\omega 3$ puede alterar el reflejo de succión de las crías por mecanismos neurotóxicos. Otras alteraciones atribuibles al exceso de PUFA $\omega 3$ y la deficiencia relativa de AA, son el retraso en la apertura bpalpebral de la camada y en el inicio de la pubertad en las hembras. La recuperación del crecimiento de las crías luego del destete y la ausencia de diferencias en los parámetros reproductivos al llegar a la adultez, sugiere la presencia de mecanismos compensatorios. El mayor recuento de espermatozoides inmaduros en D podría deberse a la ausencia de los efectos que los $\omega 3$ tienen sobre la maduración de las membranas y/o a alteraciones en el estado redox que limitan la formación de puentes disulfuro. En lo que a la respuesta conductual de ansiedad se refiere, el exceso de PUFA $\omega 3$ provoca un comportamiento ansiolítico en el *plus maze*. Los niveles de PUFA $\omega 3$ modifican selectivamente la función del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Los niveles de expresión de los genes de AVP y su receptor AVPr1b fueron superiores en D vs. C y E, sugiriendo que el déficit de $\omega 3$ induce una conducta de tipo depresiva, especialmente la asociada con hiperactividad, resultados que son reforzados por la prueba conductual de *open field*, en la que D muestra una conducta hiperlocomotora y una respuesta de tipo ansiosa. Sin embargo, la expresión central del gen para hormona liberadora de corticotropina (CRH) y sus receptores CRH 1 y 2, así como las concentraciones hormonales de corticosterona plasmática no mostraron variaciones entre los grupos.

Por otra parte, numerosos estudios han reportado que los niveles de PUFA $\omega 3$ tienen efecto sobre la memoria. Nuestros hallazgos permiten postular a NMDA1 y CREB1a como posibles intermediarios a través de los cuales esta familia de PUFA de la dieta modulan la neuroplasticidad y la expresión conductual de la memoria, dado que NMDA es un receptor de membrana que participa en la activación de la cascada de señales estudiada y CREB, un factor de transcripción nuclear cuyo aumento mejora la adquisición y persistencia de la memoria a largo plazo dependiente de hipocampo.

SUMMARY

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are widely distributed in the body tissues and participate in their physiology through different mechanisms. They are the main structural components of cell membranes, regulating their composition, fluidity and the activity of membrane-associated proteins. They are also precursors for, and regulators of, the synthesis of biologically active substances and can modify epigenetic processes and genetic expression.

Studies in humans and other animals show that the dietary consumption of omega (ω) 3 PUFA, as well as the ω 6/ ω 3 ratio, is important for the fetal and postnatal growth and development, with impact on the brain and reproductive function. However, some results are inconsistent and there are areas of vacancy when considering their effects on certain in vivo variables and the respective involved mechanisms.

In the present work, we studied the influence of exposure to different dietary levels of ω 3 PUFA, from gestation to adulthood, on parameters related to somatic, neurobiological and reproductive development. Three groups of female albino Swiss mice -during gestation and lactation- and then their offspring -from weaning to adulthood- were fed with C (control purified diet -PD-, adequate in ω 3; 7% of soybean oil; ω 3: 0.57%; ω 6/ ω 3: 5.7), D (ω 3 deficient PD; 7% of sunflower oil; ω 3: 0%; ω 6/ ω 3: 0%) or E (ω 3 excessive PD; 7% of blend oil: 60% cod-liver + soybean 40%; ω 3: 1.25%; eicosapentaenoic acid: 0.43%; docosahexaenoic acid -DHA-: 0.32%; ω 6/ ω 3: 1.29).

The different levels of ω 3 PUFA in the dams' diet did not affect maternal and birthing outcomes. However, E diet produced a reduction in the offspring body weight and length during lactation, while D diet only reduced the length in the same period. After weaning (postnatal day (PND) 21), D and E offspring were shorter than C offspring. Despite these variations, all groups reached equal length at adulthood (PND63). From PND49 to PND56, E animals weighed more than D animals, but this difference disappeared for E female pups on PND63. Regarding development, the percentage of eye opening on PND14 was lower in E pups than C and D pups. Puberty onset was significantly delayed in E female offspring. Seminal evaluation in adult male offspring showed a greater percentage of bending sperm and with both signs of sperm immaturity (bending and cytoplasmic droplet) in the D group.

Considering the influence of ω 3 PUFA on anxiety and locomotion, the most relevant findings in the plus maze were a higher percentage of entries to open arms (OA) and time spent on the OA in E group vs. C group. In the open field test, animals exposed to D diet presented an increase of the peripheral line crossing number and locomotion index and a decrease of the central line crossing number. Finally, in molecular studies, a higher gene expression of the hypothalamic arginine vasopressin (AVP) and its pituitary receptor AVPr1b and a lower gene expression of the hippocampal glutamate N-methyl D-aspartate (NMDA) isoform 1 were observed in D offspring vs. C

and E offspring. In hippocampus, E animals presented a greater gene expression of the AMPc element binding protein (CREB) isoform 1a than C animals.

The excess of ω 3 metabolites can limit arachidonic acid (AA) synthesis, reducing the level of eicosanoid metabolic products from this PUFA. The delay in the growth of E during lactation can be explained by this mechanism, able to affect the development of mammary ducts and therefore, the quantity and quality of the milk offered to the pups. It has also been demonstrated that AA is necessary for adipose tissue development and general tissue growth. In addition, intrauterine exposure to excessive levels of ω 3 PUFA may alter the pups' suckling reflex by neurotoxic mechanisms. Other alterations attributable to the ω 3 PUFA excess and the relative deficiency of AA are the delay in eye opening of the litter and the onset of puberty in females. The E pup growth recovery after weaning and the absence of differences in reproductive parameters when reaching adulthood suggest the existence of compensatory mechanisms. The greater percentage of immature sperm in the ω 3 PUFA deficient group could be attributed to alterations in membrane maturation and/or to a redox imbalance that limits protein disulfide bridge events to complete the sperm shaping. Regarding anxiety behavioral response, the ω 3 PUFA excess provokes an anxiolytic-like behavior in the elevated plus maze. The ω 3 PUFA levels selectively modified the function of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. The higher expression of AVP genes and its receptor AVPr1b in D suggests that ω 3 PUFA deficiency induces a depressive behavior, especially associated with hyperactivity, results that are reinforced by the open field behavioral test, in which D shows a hyperlocomotor behavior and an anxiogenic-like behavior. However, the central expression of the gene for adrenocorticotrophic releasing hormone (CRH) and their receptors CRH 1 and 2, as well as plasma corticosterone concentrations did not show variations between groups.

Finally, numerous studies have reported that dietary ω 3 PUFA levels have effects on memory. Our findings allow applying NMDA1 and CREB1a as possible intermediaries through which this family of dietary PUFA modulates neuroplasticity and the memory behavioral expression, because NMDA is a membrane receptor that is involved in the activation of the molecular cascade of memory and CREB, a nuclear transcription factor that improves the acquisition and persistence of the hippocampus-dependent long-term memory.