

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

CAMYLE ROCHA DE CARVALHO GUEDINE

**Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação: alterações
metabólicas e comportamentais na prole de ratos *Wistar***

JOÃO PESSOA

2018

CAMYLA ROCHA DE CARVALHO GUEDINE

**Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação: alterações
fisiológicas e comportamentais na prole de ratos *Wistar***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus

Coorientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G924d Guedine, Camyla Rocha de Carvalho.

Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou
pós-lactação: alterações metabólicas e comportamentais
na prole de ratos Wistar / Camyla Rocha de Carvalho
Guedine. - João Pessoa, 2018.
120 f. : il.

Orientação: Liana Clébia de Moraes Pordeus Pordeus.
Coorientação: Sebastião de Sousa Almeida Almeida.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ansiedade. 2. aprendizagem. 3. dieta hipercalórica.
4. esteatose hepática. 5. memória. 6. obesidade. I.
Pordeus, Liana Clébia de Moraes Pordeus. II. Almeida,
Sebastião de Sousa Almeida. III. Título.

UFPB/BC

CAMYLA RÔCHA DE CARVALHÔ GUEDINE

**Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação: alterações
fisiológicas e comportamentais na prole de ratos *Wistar***

Tese aprovada em 30 / 11 /2018.

BANCA EXAMINADORA

Liana

**Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus - Programa de Pós-Graduação Em Ciências
da Nutrição/CCS/UFPB
Coordenadora da Banca Examinadora**

Sebastião

**Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia/
FFCLRP/USP
Coorientador**

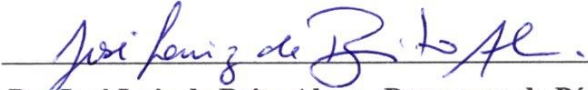
Tania Regina Riul

**Prof^a. Dr^a. Tania Regina Riul - Departamento de Nutrição/ FCBS/UFVJM
Examinador Titular Externo**

Telma Maria Braga Costa

**Prof^a. Dr^a. Telma Maria Braga Costa - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia/
FFCLRP/USP
Examinador Titular Externo**

**Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe - Departamento de Biologia Molecular –
DBM/CCEN/UFPB
Examinador Suplente Externo**


**Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição/ CCS/UFPB
Examinador Titular Interno**


**Prof^a. Dr^a. Jailane de Souza Aquino - Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição/ CCS/UFPB
Examinador Titular Interno**


**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães - Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Nutrição/ CCS/UFPB
Examinador Suplente Interno**

*A Deus, aos meus filhos, Arthur Rocha Guedine e Maria Clara Rocha Guedine,
esposos, Fernando Guedine,
pais, Filomena Rocha de Carvalho Dantas e José de Sousa Dantas,
e aos meus avôs, Maria das Neves Rocha e José Ronaldo de Carvalho (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Mãe Rainha** por suas presenças constantes em meus caminhos, me amparando e me dando forças para seguir em frente.

Aos meus filhos, **Arthur Rocha Guedine e Maria Clara Rocha Guedine**, e esposo **Fernando Lopes Moreira Guedine**, por aceitarem da melhor forma possível a minha ausência em muitos momentos, a eles meu amor incondicional.

A toda minha família, pelo amor, confiança e apoio, principalmente minha mãe e padrasto, **Filomena Rocha de Carvalho Dantas** e **José de Sousa Dantas**, meus avôs **Maria das Neves Rocha de Carvalho** e **José Ronaldo de Carvalho** (*in memoriam*), minhas tias **Ana Flávia Rocha de Carvalho Batista**, **Luciana Rocha de Carvalho Brasilino**, minhas primas **Marcella Rocha Brasilino** e **Myllena Rocha Brasilino**, meus sogros **Carlos Eduardo Moreira Guedine**, **Olga Maria Araújo Lopes Guedine**, e aos cunhados **Flávia Lopes Moreira Guedine de Figueiredo**, **Pedro Henrique de Figueiredo**, **Carlos Eduardo Moreira Guedine Júnior** e **Gabriella Ferreira Carvalho Guedine**.

À professora **Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus**, minha orientadora, por todo apoio, amizade, força e pelas lições de vida.

Ao meu coorientador professor **Dr. Sebastião de Sousa Almeida**, por ter me aceitado como sua aluna sem ao menos me conhecer, levarei esse dia de felicidade por toda minha vida. Obrigada pela disponibilidade, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo cuidado para que eu fosse acolhida da melhor forma possível em seu laboratório e pela ajuda dada sempre que necessário, a você minha admiração e respeito.

À professora **Dra. Tania Regina Riul**, pela ajuda em todos os processos deste trabalho, desde o projeto até a versão final, além da ajuda durante os experimentos, com certeza você foi uma das peças fundamentais para a sua realização.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição e Comportamento da Universidade de São Paulo (USP), **Tania Riul**, **Beatriz Oliveira**, **Nelly Okuda**, **Rodrigo Mazzei**, **Camila Lemos**, **Maria Fernanda Laus**, **Alessandra Engracia**, **Alessandra Junqueira**, **Gabriela Xavier**, **Pedro Patrício** pelo carinho, acolhimento e companheirismo, vocês foram essenciais durante minha estadia em Ribeirão Preto.

À professora **Dra. Telma Maria Braga Costa** pela disponibilidade do seu Laboratório de Análise e Tecnologia dos Alimentos na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) para realização das análises da composição centesimal dos alimentos, uma pessoa que serve de inspiração diária. Ao professor **Me. Márcio Henrique Gomes de Mello** pela ajuda com as

análises, servindo de alicerce. E aos amigos **Beatriz Coimbra, Gabriela Pap, Dalva Souza, Patrícia Fargnolli** pela ajuda, ensinamentos e pelas risadas diárias durante os experimentos.

Ao professor **Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior** pela parceria, a **Paula Payão**, técnica do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da USP, pelo auxílio com as análises bioquímicas, e aos técnicos do Biotério da Clínica Médica, **Maurício e Ronie**, pela ajuda no momento da eutanásia dos animais.

À professora **Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho** e a técnica **Deisy Mara da Silva**, ambas do Laboratório de Patologia Hepática da USP, pela ajuda com as análises patológicas dos órgãos dos animais.

A todos os professores da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelo aprendizado durante toda minha vida acadêmica, desde graduação até o doutorado, principalmente **Drs. Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade, Tereza Helena Cavalcanti de Vasconcelos, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, Sônia Cristina Pereira de Oliveira, Patrícia Vasconcelos Leitão Moreira, Jailane de Souza Aquino, Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna e Evandro de Souza Leite**.

A todos os amigos, em especial **Jousianny Patrício da Silva, Lydiane Tavares Toscano, Luciana Tavares Toscano, Roberta de Araújo Gouveia, Érika Nóbrega, Claudenise Caldas da Silva Dantas, Naiara Cássia Luiz, Tamires Brigante, Solange Brigante, Heitor Bernardes** pelo companheirismo, sorrisos e horas de conversas agradáveis.

Às amigas de infância, **Marcela Maia Lúcio de Andrade, Livia Maia Resende, Myrna Maia Resende de Lúcio, Caroline Batista Nunes, Mariana Alves Brasileiro Lúcio, Tâmara Maia e Vanessa de Paula Guimarães**, pelo laço de amizade, amor e confiança.

Aos **animais** que tornaram possível a realização desta pesquisa, meu carinho e respeito.

E finalmente, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

**“Temos de fazer o melhor que podemos.
Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana.”
(Albert Einstein)**

RESUMO

GUEDINE, C.R.C. **Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação: alterações fisiológicas e comportamentais na prole de ratos Wistar**. 2018. 120 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2018.

Existem evidências de que dietas compostas por elevados níveis de energia, açúcares e lipídios contribuem para o desenvolvimento da obesidade, de diversas doenças crônico-degenerativas, além de alterações comportamentais e déficit cognitivo. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da exposição a dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais. Ratos *Wistar* machos (n=60) foram randomizados em quatro grupos: Controle (C), Cafeteria Lactação (CL), Cafeteria Pós-lactação (CP) e Cafeteria Total (CT). Ao atingir a maturidade sexual (70 dias) os animais foram submetidos aos testes comportamentais: Labirinto em Cruz Elevado (LCE), campo aberto, Labirinto Aquático de Morris (LAM), teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específico, e o teste para a memória de reconhecimento para objetos bidimensionais. Além disso, foram realizadas a avaliação dos parâmetros murinométricos e dos exames bioquímicos (glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos, proteínas totais, ureia, creatinina, bilirrubina, transaminases e estresse oxidativo). Foram mensurados o consumo e preferência alimentar, o peso dos órgãos e gordura abdominal, e realizada a avaliação histopatológica e bioquímica do fígado. Os dados da histopatologia do fígado foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado, enquanto os demais dados foram submetidos a ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). A dieta de cafeteria alterou os parâmetros murinométricos nos animais, com acúmulo de gordura, e maiores medidas de peso quando comparados ao grupo controle, principalmente ao fim do experimento. Os animais dos grupos CL e CT consumiram uma maior quantidade de dieta do que os grupos CP e C. O grupo CT apresentou maior consumo de calorias e de carboidratos do que os demais grupos. Os animais dos grupos CP e CT apresentaram maior consumo de lipídios do que os grupos C e CL, durante todas as semanas do experimento. O consumo proteico e de fibras foi menor nos grupos CP e CT do que o grupo C. Os alimentos fontes de carboidratos foram os preferidos, dentre eles, o cereal de milho (*snow flakes*) e o pão. Os níveis de triglicerídeos foram maiores no grupo CP do que nos outros grupos. Os níveis de malondialdeído (MDA) foram maiores nos grupos CP e CT do que CL e C. A dieta de cafeteria alterou a estrutura do fígado com a presença de esteatose hepática, e estresse oxidativo nesse tecido. Os animais dos grupos CP e CT apresentaram níveis mais elevados de ansiedade em comparação com os grupos C e CL. Não foram observadas diferenças significativas devido à dieta nos comportamentos locomotor e exploratório, na aprendizagem espacial e memória. Sendo assim, a dieta de cafeteria foi capaz de promover alterações sobre os parâmetros metabólicos e possui efeito ansiogênico na prole de ratos *Wistar*.

Palavras-chave: ansiedade; aprendizagem; dieta hipercalórica; esteatose hepática; memória; obesidade.

ABSTRACT

GUEDINE, C.R.C. **Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation: metabolic and behavioral changes in offspring of Wistar rats.** 2018. 120 f. Thesis (Doctorate) - Postgraduate Program in Nutrition Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 2018.

There is evidence that diets composed of high levels of energy, sugars and lipids contribute to the development of obesity, various chronic-degenerative diseases, as well as behavioral changes and cognitive deficits. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of exposure to cafeteria diet during lactation and / or post-lactation on physiological and behavioral parameters. Male Wistar rats (n = 60) were randomized into four groups: Control (C), Lactation Cafeteria (CL), Post-lactation Cafeteria (CP) and Total Cafeteria (CT). Upon reaching sexual maturity (70 days), the animals were submitted to behavioral tests: Elevated Plus Maze test (LCE), open field, Morris Water Maze (LAM), memory recognition test for objects related to location and specific context, and the recognition memory test for two-dimensional objects. In addition, the evaluation of murine parameters and biochemical parameters (glycemia, total cholesterol and fractions, triglycerides, total proteins, urea, creatinine, bilirubin, transaminases and oxidative stress) were performed. Consumption and food preference, organ weight and abdominal fat were measured, and histopathological and biochemical evaluation of the liver was performed. Liver histopathology data were submitted to the Chi-Square test, while the other data were submitted to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$). The cafeteria diet altered the nutrimental parameters in the animals, with accumulation of fat, and greater weight measures compared to the control group, mainly at the end of the experiment. The animals in the CL and CT groups consumed a greater amount of diet than the CP and C groups. The CT group presented higher calorie and carbohydrate consumption than the other groups. The animals of the CP and CT groups presented higher lipid consumption than the C and CL groups during all weeks of the experiment. Protein and fiber intake was lower in CP and CT than in group C. Carbohydrate sources were preferred, including corn flakes and bread. Triglyceride levels were higher in the CP group than in the other groups. MDA levels were higher in the CP and CT groups than CL and C. The cafeteria diet altered the liver structure with the presence of hepatic steatosis, and oxidative stress in that tissue. The animals of the CP and CT groups had higher levels of anxiety compared to the C and CL groups. No significant differences were observed due to diet in locomotor and exploratory behaviors, spatial learning and memory. Thus, the cafeteria diet was able to promote alterations on the metabolic parameters and has an anxiogenic effect in the offspring of Wistar rats.

Keywords: obesity; hypercaloric diet; hepatic steatosis; anxiety; learning; memory.

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1. Alimentos utilizados na dieta de cafeteria	37
--	----

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1. Composição centesimal dos alimentos que compõe a dieta de cafeteria e a dieta padrão oferecidas aos animais (g/100g)	70
--	----

Tabela 2. Peso dos ratos Wistar em cada grupo nutricional, do desmame até os 98 dias de vida	75
--	----

Tabela 3. Análise bioquímica do soro dos animais	78
--	----

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1. Parâmetros murinométricos avaliados ao fim do experimento (98 dias de vida dos animais).....	105
--	-----

Tabela 2. Valores médios do peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e bioquímica do fígado desses animais	106
---	-----

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA TESE

Quadro 1. Cardápios e tempo de administração de dietas de cafeteria administradas em diferentes grupos de pesquisas	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA TESE

Figura 1. Ração comercial.....	35
Figura 2. Alimentos ofertados na dieta de cafeteria	36
Figura 3. Esquema do desenho experimental do estudo.....	36
Figura 4. Aparato utilizado no teste do LAM.....	39
Figura 5. Aparato utilizado no teste do LCE	41
Figura 6. Arena quadrada utilizada no teste do campo aberto.....	43
Figura 7. Arena redonda utilizada no teste do campo aberto.	43
Figura 8. Aparatos utilizados para o teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos	44
Figura 9. Esquema do teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos	45
Figura 10. Aparato utilizado para o teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais.....	46
Figura 11. Esquema do teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais...	47

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1. Figura 1. Porcentagem de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B) no LCE. Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). *p<0,005 comparados aos grupos C e CL. **p<0,005 comparado aos grupos C, CL e CP.	70
Figura 2. Frequência de entradas nas porções dos braços abertos (A) e frequência de entrada no final dos braços abertos (B). Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). *p<0,005 comparados aos grupos C e CL. **p<0,0001 comparado as porções.....	73
Figura 3. Rearing (A) e Grooming (B) no teste do Campo Aberto. Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). *p<0,01 comparados aos grupos C e CL. **p<0,05 comparados aos grupos C e CL.	74
Figura 4. (A) Consumo calórico dos animais, (B) Consumo lipídico e (C) Consumo de carboidrato. Nos grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=12). *p<0,005 comparados ao grupo C. [#] p<0,005 comparados ao grupo CP. ^a p<0,005 comparado ao grupo CL.	76

Figura 5. (A) Consumo proteico (g) e (B) de fibras (g) dos animais. Nos grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=12). *p<0,005 comparados ao grupo C. ^ap<0,005 comparado ao grupo CL..... 77

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1. Histopatologia do tecido hepático do fígado, retratando os graus de esteatose hepática. Coloração com hematoxilina e com eosina (aumento de 10x).....107

Figura 2. Escore da esteatose hepática nos grupos C (n=08), CL (n=08), CP (n=08) e CT (n=08). *p<0,001 comparado aos grupos CP, CL e C.....107

Figura 3. (A) Índice de Reconhecimento (%) obtido no teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos. (B) Índice de Reconhecimento (%) obtido no teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais. Grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=11109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
C	Controle
CL	Cafeteria Lactação
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Cafeteria Pós-Lactação
CT	Cafeteria Total
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GSH	Glutathione reduzida
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HP	Ração altamente palatável adicionada com sacarose
IMC	Índice de Massa Corporal
IR-ROC	Índice de Reconhecimento de Contexto
IR I	Índice de Reconhecimento da imagem
IR I1	Índice de Reconhecimento da imagem 1
IR I3	Índice de Reconhecimento da imagem 3
LAM	Labirinto Aquático de Morris
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LFD	Dieta de baixo teor de gordura
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial de Saúde
Q1	Quadrante 1
Q2	Quadrante 2
Q3	Quadrante 3
Q4	Quadrante 4
SC	Ração padrão
SFD	Dieta rica em gordura saturada
SNC	Sistema Nervoso Central
TFD	Dieta rica em gordura trans
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
UNAERP	Universidade de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 EFEITOS DOS INSULTOS NUTRICIONAIS NA LACTAÇÃO	20
3.2 OBESIDADE	22
3.3 DIETA DE CAFETERIA	24
3.4 ANSIEDADE	27
3.5 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA	30
4 ABORDAGEM METODOLÓGICA	34
4.1 ANIMAIS	34
4.2 COMPOSIÇÃO DAS NINHADAS	34
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.4 ALOJAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	36
4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA DE CAFETERIA	38
4.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	38
4.6.1 Experimento 1 – Labirinto Aquático de Morris (LAM)	38
4.6.2 Experimento 2 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	40
4.6.3 Experimento 3 – Campo Aberto	42
4.6.4 Experimento 4 - Memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos	43
4.6.5 Experimento 5- Memória de reconhecimento para objetos bidimensionais	45
4.7 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA	47
4.7.1 Avaliação do peso corporal e consumo alimentar	47
4.7.2 Avaliação Murinométrica	48
4.7.3 Peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e avaliação bioquímica do fígado dos animais	48
4.7.4 Avaliação Bioquímica do soro sanguíneo	48
4.7.5 Histopatologia do fígado	49
4.8 MÉTODOS DE EUTANÁSIA	49
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50

REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	62
APÊNDICE A. Artigo 1	63
APÊNDICE B. Artigo 2	97
OUTROS RESULTADOS	117
ANEXO.....	119
ANEXO A. Certidão de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) ..	120

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade pode ser definida como uma doença em que o excesso de gordura acumulada pode atingir graus capazes de prejudicar a saúde, devido a consecutivos balanços energéticos positivos, onde a quantidade de energia ingerida é maior do que a quantidade de energia gasta, sendo um fator de risco para doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios musculoesqueléticos, e certos tipos de câncer (DIAS et al., 2017; WHO, 2017).

Em todo mundo, a prevalência de sobrepeso e obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam excesso de peso, sendo destes 650 milhões obesos. E a maioria da população mundial vive em países em que o excesso de peso e obesidade matam mais que o baixo peso, resultando em pelo menos 2,8 milhões de mortes a cada ano (WHO, 2009; WHO, 2017).

A obesidade é uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas sérias, que afeta praticamente todos os grupos etários e socioeconômicos. Os fatores determinantes e correlatos desse desequilíbrio são de natureza biológica, genética, ambiental e comportamental (GHOSH; BOUCHARD, 2017). Sendo a causa fundamental o aumento da ingestão de alimentos ricos em carboidratos e gordura, aliado a uma inatividade física (WHO, 2017).

O consumo cada vez maior de dietas de cafeteria, rica em carboidrato simple, gordura saturada e *trans*, além de alto teor de sódio e baixo teor de fibras, por mulheres jovens em idade fértil e o aumento na prevalência da obesidade e suas complicações nessa faixa da população, principalmente durante a gestação e lactação, tem trazido à tona o questionamento sobre quais são os reflexos na saúde da prole causados por esse desequilíbrio no consumo de nutrientes na fase de desenvolvimento (OBEN et al., 2010).

Essa fase de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) em humanos é caracterizada por ser um processo prolongado que se inicia na terceira semana de gestação, com a diferenciação das células progenitoras neurais, e se estende pelo menos até o final da adolescência (STILES; JERNIGAN, 2010). Enquanto que em roedores ocorre um desenvolvimento pós-natal significativamente pronunciado, pois eles nascem com o SNC mais imaturo, comparado aos humanos, sendo necessários aproximadamente 21 dias para completar os estágios obrigatórios do desenvolvimento neural, com muitas conexões no hipocampo alcançando a maturidade ao final da segunda semana de vida pós-natal (LEVITT, 2003; RICE; BARONE, 2000; WATSON et al., 2006).

Estudos revelam uma estreita associação entre experiências em períodos iniciais da vida com alterações no comportamento na vida adulta, revelando a natureza sensível a determinantes ambientais das estruturas e vias neurobiológicas do cérebro em desenvolvimento (ANDA et al., 2006; SPENRATH; CLARKE; KUTCHER, 2011). Dentre os fatores ambientais que podem afetar esse sistema, destacam-se os fatores nutricionais, como a deficiência calórica-proteica, deficiência de micronutrientes e excesso de alimentos ricos em açúcares refinados, gorduras saturadas e *trans*, pobres em fibras, além de altos teores de sódio (AKASH; KRISHNAMURTHY; SHASHIKALA KRISHNAMURTHY, 2016; SCHWEIGERT; SOUZA; PERRY, 2009).

Dietas que promovem obesidade em animais são modelos mais apropriados para estudar as consequências dessa doença. Dentre essas manipulações pode-se citar principalmente a dieta de cafeteria (MULLER et al., 2010; SPEIGHT et al., 2017; WRIGHT et al., 2014). Diversas alterações fisiológicas são decorrentes da exposição a dieta de cafeteria, dentre as quais, podem-se destacar: o acúmulo de gordura subcutânea e visceral, hiperfagia, dislipidemias, esteatose hepática, intolerância à glicose, além do aumento da glicemia e da pressão arterial (CASTRO et al., 2015; GOMEZ-SMITH et al., 2016; MULLER et al., 2010; SAMPEY et al., 2011; SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009; WARNEKE et al., 2014).

O uso desse tipo de dieta também é capaz de promover alterações comportamentais, em relação a atividade exploratória e a ansiedade em roedores, porém os estudos mostram resultados controversos (ESTRELA et al., 2015; SOLLEIRO et al., 2017; WARNEKE et al., 2014; WRIGHT; LANGLEY-EVANS; VOIGT, 2011).

Em adição, estudos confirmam que a ingestão em longo prazo de dieta de cafeteria produz déficits cognitivos que envolve a atenção, aprendizagem e memória, especialmente em tarefas espaciais que exigem o hipocampo (DAVIDSON et al., 2007; REICHELTL et al., 2015).

Devido à escassez e controvérsia de estudos em que os animais ingeriram a dieta de cafeteria *ad libitum* durante as fases de lactação e/ou pós-lactação, com a avaliação das repercussões fisiológicas e comportamentais tardias, especificamente na ansiedade, aprendizagem e memória, esse trabalho busca evidenciar os efeitos causados pela exposição a esse tipo de dieta na prole de ratos *Wistar*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição a dieta de cafeteria durante os períodos de lactação e/ou pós-lactação sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais na prole de ratos *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição centesimal da dieta de cafeteria;
- Analisar o consumo alimentar, além das preferências alimentares;
- Avaliar os efeitos da exposição à uma dieta de cafeteria, durante a lactação e/ou pós-lactação, sobre os parâmetros comportamentais (ansiedade, aprendizagem e memória);
- Mensurar os parâmetros murinométricos, o peso dos órgãos e do tecido adiposo abdominal dos animais;
- Investigar parâmetros bioquímicos no soro e no fígado, além da avaliação histopatológica desse tecido após exposição a uma dieta de cafeteria.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EFEITOS DOS INSULTOS NUTRICIONAIS NA LACTAÇÃO

Os hábitos de vida materna são capazes de modular o fenótipo, o desenvolvimento e o comportamento da prole. Especificamente, eles podem alterar funções neurais, aspectos cognitivos e neuroendócrinos (CHAMPAGNE et al., 2008; PEÑA et al., 2014; MACCARI et al., 2014). Dentre os hábitos, pode-se destacar que o consumo de uma dieta inadequada durante e após o estágio gestacional resulta em modificações metabólicas no organismo da mãe e da prole (BAYOL et al., 2010).

Purcell et al. (2011) ao analisarem a composição do leite de ratas lactantes, após consumo de dieta hiperlipídica, observaram um aumento no conteúdo de gordura, proteína e teor calórico bruto, com diminuição no conteúdo de água, sem diferenças no conteúdo de açúcares. A maior ingestão do leite pela prole contribuiu para o aumento do peso e da adiposidade (PURCELL et al., 2011). Além disso, o consumo da dieta hiperlipídica durante o período perinatal foi identificado como fator de risco para indução de alterações epigenéticas, ou seja, modificações das funções genéticas que são herdadas, sem alterar a sequência do DNA na lactante e na prole (MAZZIO; SOLIMAN, 2014; VEL SZIC et al., 2015).

Esses dados demonstram a influência da dieta materna sobre a composição do leite ofertado a prole, mostrando que insultos nutricionais durante a lactação são capazes de trazer prejuízo à saúde da prole (COSTA-SILVA et al., 2015; WELLS, 2012). Este fenômeno, conhecido como plasticidade fenotípica e refere-se à capacidade de um organismo reagir a um ambiente interno e externo com alterações na forma, estado, fisiologia ou taxa de atividade, sem modificações genéticas (WEST-EBERHARD, 2005).

Dentre os insultos nutricionais na lactação podemos destacar a desnutrição e a supernutrição, onde a desnutrição pode ser entendida como a restrição de determinados nutrientes essenciais ao desenvolvimento, enquanto que a supernutrição é caracterizada pelo consumo excessivo de nutrientes além da capacidade de metabolização do organismo. Estudos propõem que doenças cardiometabólicas podem ser “programadas” por efeitos “adaptativos” da desnutrição e subnutrição durante fases iniciais de crescimento e desenvolvimento da fisiologia celular (ALFARADHI; OZANNE, 2011; BARKER; OSMOND, 1986; CHAVATTE-PALMER et al., 2016).

Modelo de dieta materna com exposição de uma dieta com restrição proteica ao animal durante a gestação e a lactação é um dos modelos mais estudado de plasticidade

fenotípica, acarretando em restrição no crescimento, redução assimétrica no crescimento dos órgãos, pressão arterial sistólica elevada, dislipidemias, aumento das concentrações plasmáticas de insulina em jejum, além de consequências irreversíveis na estrutura, neuroquímica e funcionamento do SNC, levando a alterações a longo prazo em parâmetros comportamentais e cognitivos, como atraso no aprendizado, déficit na memória e diminuição da ansiedade, devido ao aumento da proatividade da prole, através de uma “programação” materna para criar estratégias de enfrentamentos para futura situação de escassez de comida (BRAGA; FUKUDA; ALMEIDA, 2014; COSTA-SILVA et al., 2015; FIDALGO et al., 2013; LEANDRO et al., 2012; VALADARES et al., 2010; DE BRITO ALVES et al., 2014, DE BRITO ALVES et al., 2015; FERREIRA et al., 2015).

Por outro lado, a exposição a dietas capazes de induzir obesidade, como a dieta hiperlipídica, a dieta de cafeteria e a dieta ocidentalizada, quando administradas durante o período crítico de desenvolvimento do SNC, aumentam a disponibilidade de ácidos graxos saturados, que estimulam o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzem a ativação de vias inflamatórias nos descendentes (GRUBER et al., 2015). Essas dietas causam uma alteração no metabolismo da glicose, que resulta no aumento nas concentrações séricas de insulina (FAN et al., 2013), com elevação dos níveis de triglicerídeos séricos, estresse oxidativo, que resulta em resistência à insulina, distúrbios vasculares e hipertensão (ROBERTS; FRIAS; GROVE, 2015; VIDAL-SANTOS et al., 2017; WANG et al., 2010). Além do aumento da leptina, que resulta em um desequilíbrio no sistema autonômico, com superativação simpática (MACHLEIDT et al., 2013; KURAJOH et al., 2015; MANNA; JAIN, 2015) e sensibilidade reduzida dos neurônios vagais (DE LARTIGUE, 2016). Este distúrbio na sinalização vagal pode ativar vias orexígenas no SNC e causar hiperfagia, obesidade e doenças cardiometabólicas a longo prazo (DE LARTIGUE, 2016).

Em síntese, as exposições as dietas capazes de induzir a obesidade promovem alterações neuroendócrinas e contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas a longo prazo na prole e, além disso, a desnutrição materna ou a supernutrição contribuem para modificações epigenéticas na mãe e na prole, com predomínio da metilação do DNA, e consequentemente, alteração na expressão gênica durante o desenvolvimento e o crescimento (COSTA-SILVA; SIMÕES-ALVES; FERNANDES, 2016).

3.2 OBESIDADE

A obesidade pode ser conceituada como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo acarretando um comprometimento da saúde. O grau de excesso de gordura, sua distribuição e associação com as consequências para a saúde, pode variar entre os indivíduos obesos (DIAS et al., 2017; WHO, 2017).

Ela foi reconhecida enquanto doença em 1948, pela OMS. Desde então, dados demonstram um crescente aumento na sua prevalência, que apesar de historicamente acometer países industrializados, evidenciam seu crescimento em todo o mundo, sendo considerada uma epidemia global, e uma das principais causas no aumento de morbidade e mortalidade da população (LEOPOLDO et al., 2016; MITCHELL; SHAW, 2014; O'BRIEN; DIXON, 2002).

A OMS aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade de 28% em adultos e 47% em crianças entre 1980 e 2013. Estimativas recentes sugerem que há 2,1 bilhões de pessoas acometidas por essa pandemia mundial (NG et al., 2014), resultando em pelo menos 2,8 milhões de mortes a cada ano no mundo (WHO, 2009). No Brasil, dados recentes da pesquisa nacional intitulada: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizada pelo Ministério da Saúde, no ano de 2016, com 53.210 entrevistas com adultos com mais de 18 anos residentes nas capitais dos 26 estados e o Distrito Federal, revelou que mais da metade, ou seja, 53,8% da população adulta está acima do peso, sendo 18,9% obesos (BRASIL, 2017).

As principais causas dessa doença são uma maior suscetibilidade genética para o seu desenvolvimento (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004); mudanças nos padrões de alimentação e de atividade física (FERREIRA; WANDERLEY, 2010); além de variáveis ambientais, psicológicas (QUAIOTI; ALMEIDA, 2006), sociais e econômicas (SIROSKI et al., 2011).

O seu diagnóstico pode ser realizado a partir do Índice de Massa Corporal (IMC), um parâmetro estipulado pela OMS, que é obtido a partir da relação entre peso corpóreo (kg) e altura (m^2) do indivíduo. Por meio desse parâmetro, é considerado excesso de peso um IMC entre 25 e 29,9 kg/m^2 e obesidade um valor igual ou superior a 30 kg/m^2 (FERREIRA; WANDERLEY, 2010). No entanto, para interpretar o IMC deve-se ter cuidado, pois esta medida pode não corresponder ao mesmo nível de gordura em todas as populações e grupos étnicos e ser pouco informativa do estado de saúde, isto porque a relação entre o IMC e a gordura corporal varia de acordo com a constituição física e proporção corporal

(ANTIPATIS; GILL, 2001). Este critério utilizado de forma isolada não é válido para definir a obesidade em modelos experimentais, nesse caso a definição vem sendo realizada através da associação de critérios como a mensuração dos depósitos de gordura visceral e subcutânea, da gordura corporal total, do peso corporal, da gordura da carcaça e a avaliação murinométrica completa, que envolve, além do peso corporal e o IMC, o comprimento naso-anal, o Índice de Lee, e as circunferências torácica e abdominal dos animais (BAS DEL et al., 2015; BAYOL et al., 2010; BUCKLEY et al., 2005; JANG et al., 2003; NOVELLI et al., 2007; WOODS et al., 2003).

Alguns estudos sobre as consequências da obesidade em seres humanos estão nas fases iniciais e/ou apresentam limitações éticas. Por essas razões, os modelos animais são usados na tentativa de compreender os elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e suas implicações. De forma geral, pode-se dividir esses modelos em genéticos e induzidos.

Os animais de laboratórios manipulados geneticamente têm sido utilizados, dentre eles os camundongos com mutação do gene para leptina, *ob/ob*, e no gene para receptor de leptina, *db/db*, que desenvolvem obesidade precocemente e apresentam infertilidade, diminuição do gasto calórico e do crescimento linear (TARTAGLIA et al., 1995; ZHANG et al., 1994). Os com alterações no gene da carboxipeptidase desenvolvem infertilidade, hiperfagia, hiperproinsulinemia e aumento do peso corporal (NAGGERT et al., 1995). Os da linhagem *Tubby* apresentam obesidade e resistência à insulina (KLEYN et al., 1996), e os *Agouti* se caracterizam pelo excesso de peso, diabetes tipo 2 e hiperleptinemia (BULTMAN; MICHAUD; WOYCHIK, 1992). Em relação aos ratos, temos a linhagem *Zucker* (*fa/fa*) que apresenta hiperfagia, hiperlipidemia, hiperinsulinemia (OANA et al., 2005).

Dentre os modelos experimentais induzidos no período perinatal, destacam-se o modelo de diminuição do número de filhotes da ninhada, o que resulta em uma ninhada hipernutrida (HABBOUT et al., 2011) e o da administração de glutamato monossódico, que causa uma lesão no núcleo ventromedial hipotalâmico, núcleo responsável pela saciedade, o que acarreta uma hiperfagia, com aparecimento da obesidade neuroendócrina (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Embora essas alterações genéticas acarretem a obesidade em animais, não são comuns em humanos, sendo o consumo de dietas altamente energéticas e a diminuição do gasto energético os principais fatores que levam a atual epidemia de obesidade mundial (ASTRUP et al., 1994; CARROLL; VOISEY; DAAL, 2004; WOODS et al., 2003).

Por isso, dietas hipercalóricas que promovem a obesidade em animais são modelos mais apropriados para estudar as suas consequências em qualquer fase da vida, dentre elas

principalmente a dieta hiperlipídica, a dieta ocidentalizada e a dieta de cafeteria. A dieta hiperlipídica é uma dieta composta por alto teor de gordura, geralmente acrescida por uma fonte desse nutriente, como banha de porco ou óleo de soja, enquanto que a dieta ocidentalizada e a dieta de cafeteria são caracterizadas por altos níveis de gorduras saturadas, sódio, açúcares simples e baixos níveis de fibras. O que difere uma da outra é que a dieta ocidentalizada é uma dieta preparada com adição de cada nutriente sendo a única fonte de alimento, enquanto que a dieta de cafeteria vários alimentos são fornecidos na forma in natura associado à dieta padrão para roedores (BAS DEL et al., 2015; CASTRO et al., 2015; LEFFA et al., 2015; MINA et al., 2014; MULLER et al., 2010; SCOARIS, 2009; SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009; VIDAL-SANTOS et al., 2017).

3.3 DIETA DE CAFETERIA

O termo dieta de cafeteria foi originalmente usado para denotar uma alimentação para ratos formada por alimentos ocidentalizados (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Sendo altamente palatável, com elevado teor de sódio, carboidratos simples e gorduras, principalmente gorduras saturadas e/ou *trans*, além do baixo teor de proteínas, fibras alimentares e micronutrientes (BAYOL et al., 2010). Esse tipo de dieta faz com que os animais substituam gradativamente a dieta padrão por ela, por conter alimentos como banha, bacon, castanhas, leite condensado, refrigerantes, chocolates, amendoins e outras guloseimas (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2014; DE SCHEPPER et al., 2000).

Existe uma grande variabilidade na composição desse tipo de dieta, pois a quantidade e o tipo de alimentos, o tempo que esses alimentos são ofertados durante o experimento, a quantidade consumida de cada item alimentar pelo animal, dentre outros fatores, são diferentes para os variados procedimentos utilizados pelos grupos de pesquisa (Quadro 1) (SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009).

Ela é caracterizada por ser o equivalente mais próximo da dieta de alimentos ultraprocessados humanos, pois fornece aos animais alimentos com uma variedade nutricional variada, com alta densidade energética e altamente saborosos, espelhando os principais aspectos obesogênicos da dieta humana (RAYNOR; EPSTEIN, 2001).

Diversas são as comorbidades decorrentes do consumo desse tipo de dieta, dentre as quais podem-se destacar: a obesidade, a síndrome metabólica, dislipidemias, esteatose hepática, estado pré-diabético, diabetes gestacional, hipertensão, alguns tipos de câncer, entre outras (BRUNETTI et al., 2010; CASTELL-AUVÍ et al., 2012; GOMEZ-SMITH et al., 2016;

HOLEMANS et al., 2004; PONS et al., 2017; SAMPEY et al., 2011; SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009; WARNEKE et al., 2014). A dieta de cafeteria também é capaz de causar alterações no SNC, dentre elas um aumento na susceptibilidade a danos celulares no hipocampo, devido à diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), expresso em todas as regiões do cérebro, onde desempenha efeitos na neuroproteção, plasticidade sináptica, comportamento alimentar e metabolismo energético (MACEDO et al., 2015). Além disso, essa dieta acarreta alterações comportamentais, como déficits cognitivo, aumento do comportamento preditivo de depressão e da atividade ansiogênica (ESTRELA et al., 2015; ROSSETI et al., 2014).

Quadro 1. Cardápios e tempo de administração de dietas de cafeteria administradas em diferentes grupos de pesquisas

Referências	Animais	Idade dos animais/peso dos animais	Alimentos consumidos	Duração
BAYOL et al., 2010	Ratos <i>Wistar</i> (prole-macho)	Gestação, lactação e/ou pós desmame até o final da adolescência	Dieta padrão adicionada com biscoito, marshmallows, chocolate, donuts, muffins, chips de batata, queijo, barra de caramelo e chocolate. <i>Ad libitum</i>	10 semanas
BRUNETTI et al., 2010	Ratos <i>Wistar</i> (machos)	3 meses	Dieta padrão adicionada com chips de batata, queijo parmesão, torras de avelã, biscoitos, pedaços de manteiga salgada e de chocolate amargo. <i>Ad libitum</i>	15 dias
CASTELL-AUVÍ et al., 2012	Ratos <i>Wistar</i> (fêmeas)	160–175g	Dieta padrão adicionada com bacon (15-20g), doces (1/2), pão com patê (1), queijo (1-2g), cenouras (3g), leite com açúcar (50ml) Dieta padrão - <i>Ad libitum</i> Dieta de cafeteria – quantidade de cada alimento por rato	17 semanas
ESTRELA et al.,	Ratos	Estágio final	Dieta de cafeteria	114 dias

2015	<i>Wistar</i> (fêmeas)	da puberdade (45 dias)	composta por 39 alimentos, dentre eles: bacon, salame, bolo de chocolate, chocolate, biscoito, mortadela, salsicha, bolachas, além da adição de água com sacarose (concentração de 300g/L) e refrigerante tipo cola. <i>Ad libitum</i>	
GOMEZ-SMITH et al., 2016	Sprague-Dawley (machos)	3 semanas	Cereal, biscoito oreo, biscoito de baunilha, biscoito com gotas de chocolate, manteiga de amendoim, chips de batata, bacon, salsicha, salgado de tortilha sabor queijo. <i>Ad libitum</i>	4 meses
HOLEMANS et al., 2004	Ratos <i>Wistar</i> (fêmeas)	63 dias	Dieta semissólida contendo 33% de dieta padrão, 33% de leite condensado, 7% de sacarose e 27% de água. <i>Ad libitum</i>	4 semanas
PONS et al., 2017	Ratos <i>Wistar</i> (machos)	6 semanas	Bacon (10-12g), salsicha (8-12g), biscoito com patê (12-15g), biscoito com queijo (10-12g), bolinho (4-5g), cenoura (8-10g), leite com açúcar (220g/L; 50ml). <i>Ad libitum</i>	12 semanas
PINI et al., 2017	Ratos <i>Wistar</i> (machos)	Lactação e pós-lactação	Dieta de cafeteria contendo 28 alimentos, dentre eles: torrada, bolacha maisena, bolacha trakina, chocolate branco e preto, marshmallow, queijo mussarela, prato e reino, bolo recheado de chocolate, amendoim, cereal de milho, pão, bacon, salame, mortadela, entre outros. Oferta: 1 hora por dia	98 dias

SAMPEY et al., 2011	Ratos <i>Wistar</i> (machos)	7-8 semanas (~200g)	Bolo de chocolate, bala de fruta, salgado de tortilha sabor queijo, biscoito de manteiga de amendoim, biscoitos, salsicha, biscoito de manteiga, queijo cheddar, bolo de casamento, carne de porco, calabresa. <i>Ad libitum</i>	10–15 semanas
SHAFAT; MURRAY; RUMSEY, 2009	Sprague- Dawley (machos)	200-250g	Banana, castanha, biscoito com gotas de chocolate, queijo cheddar, salgados, chocolate, manteiga de amendoim, batatas, salame, marshmallows, entre outros. <i>Ad libitum</i>	43 dias
WARNEKE et al., 2014	Sprague- Dawley (machos e fêmeas)	6 semanas ou 12 meses	Bolo, biscoito, chocolate, pão, macarrão cozido, salsicha e queijo. <i>Ad libitum</i>	6 semanas

Fonte: próprio autor.

3.4 ANSIEDADE

Os sintomas da ansiedade podem fazer parte de uma reação fisiológica normal, pois existe um nível de ansiedade basal com função adaptativa, levando o indivíduo a evitar danos físicos ou psicológicos (HETEM, 2004). Entretanto, quando essa reação é persistente em situações cotidianas, em que não existe nenhum risco ou ameaça, é caracterizada como uma desordem, e tem impacto social negativo (GROSS; HEN, 2004).

A causa principal da ansiedade pode ser atribuída à antecipação de um perigo, sem presença de uma ameaça real, ou se a mesma existe, a intensidade da emoção é considerada desproporcional (LADER, 1981; VIANA, 2010).

Em geral, os transtornos de ansiedade em humanos são baseados na ativação inapropriada de reações de defesa, em decorrência da avaliação errônea de riscos potenciais. A ansiedade pode ser caracterizada como estado emocional desagradável, acompanhado por sentimento de insegurança, apreensão, além de um conjunto de modificações fisiológicas e comportamentais (BRAGA et al., 2010; NUTT, 1990). Esse distúrbio pode surgir em

decorrência de muitos fatores que incluem deficiência alimentar, desequilíbrio hormonal, doenças, experiências traumáticas, maus hábitos, estresse, envelhecimento e fatores genéticos (ALRAMADHAN et al., 2012). E aparece associada a outras doenças, como depressão, fadiga crônica e doenças cardiorrespiratórias correlacionadas com um risco aumentado de morbidade e mortalidade (CULPEPPER, 2009; GUREJE, 2008).

As desordens que abrangem o transtorno da ansiedade foram classificadas, de acordo com a sintomatologia e resposta ao tratamento farmacológico, em transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, transtorno obsessivo compulsivo, fobia social, fobia simples e transtorno de estresse pós-traumático (DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS, 2013).

Nos animais, esses sintomas podem ser observados por meio da inibição do comportamento exploratório, comportamento de congelamento e avaliação de risco, aumento da frequência cardíaca, da excreção urinária e defecação, além da elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona (PALANZA, 2001). Estudos pré-clínicos demonstraram que os estados de ansiedade teriam relação com mecanismo de defesa dos animais, mediante estímulos ameaçadores ou situações de perigo. Este comportamento de defesa envolve o sistema cerebral de defesa e o sistema de inibição comportamental (GRAEFF; HETEM, 2004).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é o aparelho mais utilizado para avaliação da ansiedade em estudos experimentais com roedores. Este modelo baseia-se na preferência dos animais por locais fechados em detrimento de espaços abertos. O primeiro a descrever esta preferência do animal foi o estudo de Montgomery em 1955, e na década de 1980 foi proposta a utilização dessa característica para avaliar a ansiedade padronizando-se o modelo por meio da administração de fármacos ansiolíticos e ansiogênicos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985). Um aumento no tempo de permanência do animal nos braços abertos em relação aos fechados é observado quando administrado drogas ansiolíticas, enquanto que o contrário é notado nos animais tratados com drogas ansiogênicas (HOGG, 1996; MORATO; BRANDÃO, 1997).

Estudos realizados em animais têm demonstrado que a obesidade materna e o consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação aumentam a vulnerabilidade para transtornos mentais ou comportamentais nos descendentes (SPEIGHT et al., 2017; SULLIVAN; NOUSEN; CHAMLOU, 2014).

A obesidade está bem caracterizada como uma condição inflamatória sistêmica associada com perturbações cognitivas, sugerindo uma ligação entre os dois. Com o objetivo

de investigar a influência da obesidade e da ingestão materna de dieta rica em gordura saturada e *trans* no hipocampo da prole, ratas foram alimentadas com uma dieta rica em gordura saturada (SFD), uma dieta rica em gordura *trans* (TFD), ou uma dieta de baixo teor de gordura (LFD) por 4 semanas antes do acasalamento, e permaneceram na mesma dieta durante a gravidez e lactação. A exposição às dietas SFD/TFD aumentou significativamente o peso corporal das ratas-mães e filhotes em relação ao grupo controle. Marcadores de ativação da microglia foram aumentados no hipocampo de filhotes SFD/TFD no momento do nascimento. Ao desmame e na idade adulta, expressão citocina pró-inflamatória foi notavelmente aumentada na periferia e no hipocampo nos grupos TFD/SFD quando comparados ao grupo controle. E ainda, foram observadas mudanças nos comportamentos de ansiedade e aprendizagem espacial nos grupos SFD/TFD. Estes efeitos foram todos observados na idade adulta, mesmo depois que os filhotes foram colocados em ração padrão após o desmame, sugerindo que estes resultados foram programados no início da vida (BILBO; TSANG, 2010).

Souza et al. (2007) investigaram o efeito de uma dieta altamente palatável com adição de sacarose na composição da gordura corporal, no comportamento de ansiedade, utilizando o campo aberto e caixa claro-escuro, além de avaliar o estresse oxidativo no cérebro. Ratos machos *Wistar* (n=20) receberam duas dietas diferentes durante quatro meses: ração padrão (SC) e ração altamente palatável acrescida com sacarose (HP). Em relação ao ganho de peso, não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Porém, a gordura visceral e epididimal no grupo HP foi maior que o grupo SC, indicando que a dieta adicionada com sacarose aumenta a gordura corporal. Além disso, após 4 meses ofertando a dieta HP foi possível observar uma diminuição na tolerância à glicose, associada ao aumento de triglicerídeos no fígado, sendo parâmetros indiretos para demonstrar a resistência insulínica. Em relação aos parâmetros comportamentais o grupo HP gastou menos tempo no compartimento de luz e teve um comportamento de avaliação de risco menor ($p < 0,05$), mas não foram observadas diferenças no teste do campo aberto. Sendo assim, os autores concluíram que o consumo de uma dieta altamente palatável com sacarose conduz a um fenótipo obeso, capaz de aumentar a oxidação de proteínas no córtex frontal e induzir o comportamento de ansiedade em ratos.

Alguns autores (IZQUIERDO, 2011; KALUEFF, 2007) relatam que animais estressados podem apresentar dificuldades de aprendizagem e déficits de memória. Sendo assim, alterações nos índices de ansiedade em animais obesos poderiam estar diretamente

relacionadas a alterações no desempenho destes animais em tarefas de aprendizagem e memória.

3.5 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

A aprendizagem e a memória são meios pelos quais o ambiente exerce influência no comportamento animal. Esses conceitos estão relacionados entre si, pois a aprendizagem representa a aquisição de um conhecimento novo, enquanto a memória se refere à persistência da aprendizagem em um momento posterior, sendo assim, a memória é uma consequência da aprendizagem (IZQUIERDO, 2011).

O Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi estabelecido pela primeira vez pelo neurocientista Richard G. Morris em 1981, a fim de testar a aprendizagem dependente do hipocampo, incluindo a aquisição da memória espacial de curto e longo prazo (MORRIS, 1981).

A memória pode ser entendida como a capacidade de registrar, manter e evocar as experiências e fatos ocorridos, pode ser dividida de forma genérica em: memória cognitiva, memória genética, memória imunológica e memória cultural. A memória cognitiva é composta por três fases, a fase de registro onde ocorre o início da fixação do conteúdo, nessa fase é importante o estado geral do organismo e o nível de consciência do mesmo, a fase de conservação, onde o conteúdo é retido, que depende da sua repetição ou a sua associação com outros elementos, e a fase de evocação, onde o conteúdo aprendido é lembrado (IZQUIERDO, 2011).

Ela possui um componente temporal, podendo ser dividida em memória imediata ou de curtíssimo prazo, cuja duração é medida em segundos até 1 a 3 minutos, quando se é capaz de lembrar o que alguém disse, mesmo não prestando muita atenção ao que está sendo dito, memória recente ou de curta duração, que é associada à retenção por minutos até 3 a 6 horas, por exemplo, ao lembrar um telefone que nos foi dado por uma pessoa no momento que está sendo feita a ligação, ou ainda, a memória remota ou de longa duração, medida em meses ou anos, quando se é capaz de lembrar um evento da infância (GAZZANIGA; IVRY; MANGUN, 1998; IZQUIERDO, 2011).

De acordo com caráter consciente ou não consciente do processamento do conteúdo mnêmico, pode-se classificar a memória em explícita, que podem ser conscientemente evocadas e relatadas através da linguagem (memória declarativa), como por exemplo: acontecimentos, conceitos, imagens visuais, e a memória implícita, que não podem ser

evocadas de modo consciente, nem podem ser descritas verbalmente (memória não-declarativa), como os processos de condicionamento, habituação e todos os aprendizados de tarefas motoras (BUDSON, 2009; IZQUIERDO, 2011).

Enquanto que, de acordo com as estruturas cerebrais envolvidas, divide-se a memória em quatro principais tipos: memória de trabalho, que consiste na combinação da habilidade de atenção e da memória imediata, onde as regiões corticais pré-frontais estão envolvidas; memória episódica, que refere-se à recordação consciente de fatos reais, ocorridos em um determinado contexto, com mecanismos que envolvem às regiões da face medial dos lobos temporais, particularmente o hipocampo e os córtices entorrinal e perrinal; memória semântica, que corresponde ao registro e retenção de conteúdos em função dos significados, através da nomeação e categorização, que depende de forma estreita das regiões inferiores e laterais dos lobos temporais, além da memória de procedimento, caracterizada por ser uma memória automática, geralmente inconsciente, onde as principais áreas envolvidas são a área motora suplementar (lobos frontais), os gânglios da base e o cerebelo (BUDSON; PRICE, 2005; IZQUIERDO, 2011; MATTHEWS, 2015).

Um exemplo bastante estudado de memória episódica é a memória de reconhecimento, caracterizada por um processo neural onde o sujeito está consciente de que um estímulo foi previamente encontrado, tornando o reconhecimento uma característica comportamental desse processo (MANNS et al., 2003; STECKLER et al., 1998). Este tipo de memória requer que características específicas de um determinado evento sejam identificadas, detalhadas e comparadas com as memórias de características previamente vivenciadas (STECKLER et al., 1998).

A memória de reconhecimento abrange dois componentes: o episódico, que consiste na habilidade de lembrar o episódio no qual um item foi encontrado e o componente familiar, caracterizado pela capacidade de se reconhecer um item como previamente encontrado, contudo sem reconhecer o episódio no qual se deu o encontro (MANNS et al., 2003). Dados recentes demonstram que o hipocampo suporta o componente episódico da memória de reconhecimento, pois sua função na memória está relacionada à dependência do contexto no qual se deu o encontro com determinado objeto (LANGSTON; WOOD, 2010).

A tarefa clássica de exploração de objetos, denominada de teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específico, consiste de uma sessão de habituação, na qual os ratos ou camundongos exploram dois objetos iguais, e após um intervalo de tempo (geralmente 24 horas), segue-se uma sessão teste, em que são apresentados um objeto familiar e um novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Outro teste

utilizado para avaliar esse tipo de memória, o teste de reconhecimento de estímulos bidimensionais, consiste do mesmo princípio acima, porém com uso de figuras bidimensionais, em detrimento de objetos.

Ennaceur (2010) em seu trabalho afirma que os ratos possuem uma preferência em explorar o objeto novo, pela novidade à memória de reconhecimento. Essa preferência seria devida ao fato de que os objetos previamente encontrados foram memorizados pelos animais, e essa memória é evocada no momento do reconhecimento, fazendo com que os animais explorem mais os objetos nunca vistos anteriormente.

Evidências recentes sugerem que o cérebro pode ser vulnerável aos efeitos de dietas que induzem a obesidade durante os períodos iniciais da vida, período de rápido crescimento, maturação e desenvolvimento cerebral. Pesquisas utilizando modelos de roedores indicam que a exposição precoce a dietas ricas em gordura (40-65% kcal derivado de gordura) ou açúcares simples (sacarose ou xarope de milho) podem prejudicar processos de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo (CORDNER; TAMASHIRO, 2015; KANOSKI; DAVIDSON, 2011; MONTI; BAYM; COHEN, 2014).

Hsu et al. (2015) avaliaram os efeitos do consumo de sacarose e xarope de milho durante a adolescência ou fase adulta sobre os parâmetros cognitivos e metabólicos. Os ratos machos tiveram acesso por 30 dias à ração e água, com 11% de solução de sucralose, 11% de solução de xarope de milho. O grupo que consumiu alta concentração de frutose, através do xarope de milho, durante a adolescência apresentou a aprendizagem espacial e a memória prejudicadas, o mesmo não aconteceu quando o consumo foi na idade adulta.

Pesquisadores administraram dieta rica em gordura em camundongos machos adolescentes (5 semanas de idade) e adultos jovens (8 semanas de idade), durante 8 semanas e avaliaram o efeito desse tipo de dieta sobre o desempenho da memória espacial no teste de reconhecimento de objetos novos. Como resultado, apenas os animais que começaram a consumir a dieta rica em gordura durante a adolescência foram menos eficientes na execução de tarefas de memória espacial (VALLADOLID-ACEBES et al., 2013).

Em relação ao uso da dieta de cafeteria, foram realizados estudos para avaliar a memória, através do desempenho de animais adultos nos testes de reconhecimento de novos objetos, os dados da literatura relatam que essa dieta não foi capaz de alterar esse tipo de memória (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2014; KOSARI et al., 2012; LEFFA et al., 2015).

Levando em consideração o fato de que a exposição precoce a dietas ricas em gordura ou açúcares simples podem prejudicar os processos de aprendizagem e memória dependentes

do hipocampo, então justifica-se estudos que busquem analisar se a dieta de cafeteria, imposta durante esse período crítico de desenvolvimento, é capaz de alterar a aprendizagem, a memória de reconhecimento e a memória espacial.

4 ABORDAGEM METODOLÓGICA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos albinos machos e 11 ratas-mães da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. A metodologia desse estudo seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 072/2017) (ANEXO A).

4.2 COMPOSIÇÃO DAS NINHADAS

As ninhadas foram recebidas no dia de seu nascimento e foram alojadas no Biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

Foram utilizadas 11 ninhadas compostas pela rata-mãe e 8 filhotes machos, distribuídos de forma aleatória, a fim de que fossem evitadas possíveis variações genéticas. Após esse procedimento, as ninhadas foram divididas de acordo com sua condição nutricional. Do nascimento até o fim do período de lactação os animais foram amamentados pelas ratas-mães, e após o desmame, aos 21 dias de idade, os filhotes foram distribuídos em cada um dos grupos experimentais.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram formados por filhotes machos e mantidos em uma das condições descritas a seguir:

- **Controle (C)** - os filhotes desse grupo (n=16) foram amamentados por fêmeas que receberam dieta comercial durante a lactação, e no período pós-lactação eles se alimentaram também exclusivamente com dieta comercial.
- **Cafeteria Lactação (CL)** - os filhotes desse grupo (n=12) foram amamentados por fêmeas que receberam dieta de cafeteria durante a lactação, e no período pós-lactação eles se alimentaram exclusivamente com dieta comercial.

- **Cafeteria Pós-Lactação (CP)** - os filhotes desse grupo (n=20) foram amamentados por fêmeas que receberam exclusivamente dieta comercial durante a lactação, e no período pós-lactação eles se alimentaram com dieta de cafeteria.
- **Cafeteria Total (CT)** - os filhotes desse grupo (n=12) foram amamentados por fêmeas que receberam dieta de cafeteria durante a lactação, e no período pós-lactação eles se alimentaram com esse mesmo tipo de dieta.

As ratas não foram utilizadas no presente estudo, porque as flutuações hormonais associadas com o ciclo estral podem ser um fator de confundimento em testes comportamentais.

A dieta comercial usada foi a Nuvilab[®] (Nuvital, São Paulo, Brasil) (Fig. 1) e a dieta de cafeteria (Fig. 2) foi composta por 28 alimentos pertencentes ao uma lista elaborada com base no estudo realizado por Pini et al. (2017) e outros estudos realizados no Laboratório de Nutrição e Comportamento (USP/ Ribeirão Preto), adaptada de acordo com as opções de alimentos disponíveis no mercado local.

Os mesmos tipos de potes de vidro com capacidade de 240 mL foram utilizados para a dieta de cafeteria e dieta padrão. Para os grupos que receberam a dieta de cafeteria foram oferecidos 4 potes de vidro, cada um contendo um alimento específico da dieta de cafeteria, de acordo com o dia da semana, mais a dieta comercial oferecida por meio da tampa gradeada da caixa do animal. Os grupos controle receberam a dieta comercial dentro dos 4 potes de vidro (iguais aos tipos de pote utilizados nos grupos cafeteria), além da dieta comercial oferecida por meio da tampa gradeada da caixa do animal.



Figura 1. Ração comercial

Fonte: próprio autor.



Figura 2. Alimentos ofertados na dieta de cafeteria
Fonte: próprio autor.

Dessa forma, o desenho experimental completo segue na figura 3.

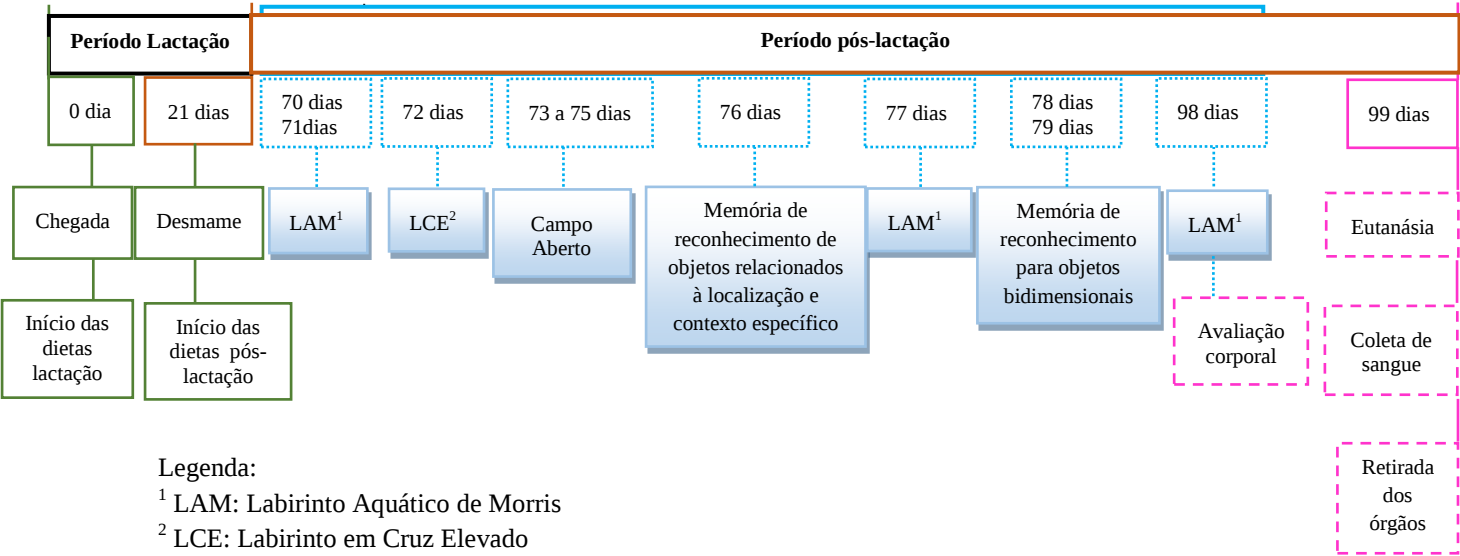


Figura 3. Esquema do desenho experimental do estudo
Fonte: próprio autor.

4.4 ALOJAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

A semana 1 começa no dia do nascimento (dia 0). Na fase de lactação (0 a 21 dias) as ninhadas permaneceram em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com tampa gradeada de aço inoxidável, providas de cama de serragem, com garrafa acoplada a um bico de inox

para água e cocho para ração. Aos 21 dias, foi realizado o desmame, que consistiu na separação dos filhotes da rata-mãe, eutanasiadas nesse dia, utilizando sobredose anestésica com pentobarbital sódico (150mg/kg) associado à lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal. Os filhotes foram alojados individualmente, para que fosse possível a mensuração do consumo alimentar, seguindo as mesmas especificações citadas anteriormente.

Durante todo o experimento os animais receberam água, as dietas experimentais e a ração padrão *ad libitum*. Foram mantidos a temperatura constante ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro e escuro de 12/12 horas, sendo a fase clara de 06:00 às 18:00 horas, de acordo com os padrões recomendados para roedores. Todos os experimentos foram conduzidos na fase clara do ciclo, com os animais alimentados.

A cada dia, foram oferecidos aos animais do grupo cafeteria a ração comercial associada a quatro alimentos de uma lista, onde cada alimento foi oferecido apenas uma vez na semana para evitar monotonia alimentar. Os alimentos que foram utilizados na dieta de cafeteria estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Alimentos utilizados na dieta de cafeteria

Domingo	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
Torrada (Visconti tradicional®)	Bolacha maisena (Mabel®)	Bolacha recheada de chocolate (Trakinas®)	Castanha do Pará (La Violetera®)	Pão branco de forma (Pullman®)	Bolo recheado chocolate (Ana Maria®)	Bolo recheado cenoura com chocolate (Ana Maria®)
Marshmallow (Haribo®)	Chocolate branco (Baton®)	Queijo processado (Polenguinho tradicional®)	Queijo prato (Ipanema®)	Cereal de milho sabor chocolate (Nescau®)	Bolacha água e sal (Duchen®)	Bacon (Sadia®)
Doce de amendoim Gibi (Santa Helena®)	Queijo mussarela (Ipanema®)	Amêndoa (La Violetera®)	Chocolate ao leite em Barra (Lacta®)	Queijo reino (Tirolez®)	Mortadela (Marba®)	Bolacha recheada wafer de chocolate (Bauducco®)
Salame italiano (Perdigão®)	Cereal de milho em flocos com açúcar (Snow Flakes®)	Doce de leite com coco em pasta (Frimesa®)	Creme de amendoim (Amendocrem®)	Biscoito canudo morango (Look®)	Confete de chocolate (Coloreti®)	Amendoim Grelhaditos (Santa Helena®)

Fonte: próprio autor. Adaptado de Pini et al., (2017).

Posteriormente, foi realizada uma avaliação da composição centesimal de alguns alimentos oferecidos na dieta de cafeteria e da ração comercial, para mensurar o consumo calórico e de macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras). Alguns alimentos haviam sido avaliados por Pini et al., (2017) e as análises foram utilizadas nesse estudo.

Os testes comportamentais se iniciaram aos 70 dias de vida (maturação sexual). Após a avaliação comportamental os animais foram colocados em jejum por 12 horas durante o período noturno e no dia seguinte foram eutanasiados para retirada de órgãos e amostra de sangue para avaliação bioquímica.

4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA DE CAFETERIA

As análises da composição centesimal dos alimentos que compõem a dieta de cafeteria e da ração comercial ofertada para os animais foram realizadas em triplicata no Laboratório de Análise e Tecnologia dos Alimentos da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Todos os procedimentos de análise dessa composição foram obtidos a partir do Método Internacional Oficial de Análises (AOAC, 2016). As amostras foram analisadas quanto aos teores de Umidade de acordo com a técnica de voláteis a 105°C; o Resíduo Mineral Fixo (cinzas) por incineração em mufla a 550°C; o Nitrogênio Total, segundo método de Micro-Kjeldahl; os Lipídios Totais, extraídos por meio do método de Soxhlet; as Fibras foram determinadas pelo método de Weende; os Carboidratos pelo cálculo da diferença entre os valores dos macronutrientes das demais análises realizadas, e o valor calórico total, expresso em kcal, foi calculado segundo a RDC nº 360 (BRASIL, 2003), que usa os coeficientes de Atwater (carboidratos: 4kcal/g; proteínas: 4kcal/g e lipídios: 9kcal/g).

4.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

4.6.1 Experimento 1 – Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Fig. 4) foi realizado de acordo com o descrito por Morris (1981). O aparato consiste em um tanque circular preenchido de água, medindo 1,5 m de diâmetro e 39 cm de altura esmaltado com tinta preta, dividido em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (Q1, Q2, Q3 e Q4). No centro do Q1 foi colocada uma plataforma circular com 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura, submersa a 1,5 cm abaixo do nível da água. Esse aparato foi situado em uma sala que continha pistas

visuais distais, como figuras nas paredes, além da porta e janela. Não foram oferecidas pistas visuais proximais, nem pistas auditivas e olfativas. E a temperatura da água foi controlada permanecendo entre $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo a mesma trocada a cada dia de teste.



Figura 4. Aparato utilizado no teste do LAM

Fonte: próprio autor.

Para registro e monitoramento das sessões experimentais foi utilizado o tracejador *Ethovision*, versão 3.1, fabricado pela *Noldus*[®] que possibilitou a análise do procedimento experimental por meio de dados precisos de estratégias de navegação.

Este experimento foi realizado com os animais nas idades de 70/71 dias, seguindo o protocolo que prevê dois dias consecutivos de testes para a fase de aprendizagem, e os testes de retenção de memória (retestes) foram realizados aos 77/98 dias de vida. Antes do início da primeira sessão experimental, o animal foi colocado na plataforma durante 60 segundos, para habituação. Após esse período o mesmo foi colocado na água no centro de um dos três quadrantes imaginários (Q2, Q3 ou Q4), de costas para o centro do tanque. O animal teve a oportunidade de nadar em busca da plataforma de fuga por um período de 60 segundos. A plataforma permaneceu na mesma localização durante todo o experimento.

Foram realizadas 12 tentativas diárias durante dois dias consecutivos, totalizando 24 tentativas. A cada tentativa o rato foi colocado em um quadrante diferente, escolhido randomicamente. A sequência da localização do animal em cada tentativa permaneceu a mesma para todos os animais testados. Quando o animal não alcançava a plataforma dentro do tempo estabelecido, ele era guiado pelo experimentador até a plataforma. Entre as tentativas, o mesmo permaneceu sobre a plataforma por 35 segundos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: latência de fuga (tempo despendido pelo animal para encontrar a plataforma em

cada uma das tentativas), distância percorrida ao longo das tentativas (cm) e a velocidade média do nado ao longo das mesmas (cm/s).

Após as sessões experimentais, no segundo dia, a plataforma foi removida e o animal foi colocado no quadrante diagonalmente oposto àquele que continha a plataforma. Foi permitido um período de 60 segundos de natação (*probe trial* – 25ª tentativa) e, nesta tentativa, foram analisados os seguintes parâmetros: frequência e duração do animal em cada quadrante, para analisar a precisão da resposta de busca pela plataforma e a efetivação do aprendizado da tarefa. A *probe trial* é uma tentativa de extinção, pois a ausência da plataforma não reforça o comportamento do animal.

No sétimo dia após o final da fase de aprendizagem, iniciou-se a fase de testes de retenção de memória espacial, onde os animais foram novamente testados em uma única tentativa (Reteste 1 – 26ª tentativa), sendo permitido que os animais nadassem livremente por 180 segundos a fim de verificar a consolidação da memória, através da análise da latência de fuga, da distância percorrida e da velocidade de natação dos animais. Após 21 dias da fase de testes os animais foram novamente testados em uma única tentativa (Reteste 2 – 27ª tentativa) e foram avaliados os mesmos parâmetros do reteste 1.

4.6.2 Experimento 2 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE (Fig. 5) é formado por dois braços fechados e dois braços abertos, localizados a 50 cm do chão, ambos com 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e uma região central medindo 10 cm x 10 cm. Acima do aparelho foi fixada uma câmera da marca Sony®, modelo Handcam, conectada a um computador da marca LG® com programa de captura de vídeo instalado para possibilitar o monitoramento e registro das imagens para posterior análise. O computador se encontrava na sala vizinha onde foram gravados os testes experimentais.



Figura 5. Aparato utilizado no teste do LCE

Fonte: próprio autor.

O teste do LCE foi realizado com os animais com a idade de 72 dias. Os mesmos foram colocados, individualmente, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e permitidos a explorar por 5 minutos. Após o teste com cada animal o aparato foi limpo com álcool etílico 50% para evitar pistas olfativas.

Foram avaliados os parâmetros tradicionais deste modelo: porcentagem de frequência de entrada e as porcentagens do tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados. A porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos foi calculada através da divisão do número de entradas nos braços abertos pelo número de entradas nos braços abertos e fechados x 100, enquanto que, a % de tempo nos braços abertos foi calculada através da divisão do tempo nos braços abertos pelo tempo nos braços abertos e fechados x 100. Sendo, a entrada nos braços definida pela passagem do animal com as quatro patas para dentro dos braços (GRUNDMANN et al., 2007; PELLOW et al., 1985).

Como alguns autores propuseram que a sensibilidade, confiabilidade e validade etológica desse teste podem ser melhoradas com análise de outros parâmetros comportamentais, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo (RODGERS; JOHNSON, 1995). Dentre essas medidas podem-se destacar: o tempo de permanência no centro; latência para a 1ª entrada no braço aberto, frequência de entrada em cada terço do braço aberto e de ida na ponta desse braço, falsa entrada (comportamento em que o animal coloca de 1 a 3 patas no braço aberto, porém não completa a entrada no mesmo), número de bolos fecais, número de *rearings* (comportamento exploratório no qual o animal apoia-se nos membros posteriores, adquirindo posição vertical, mantendo as patas anteriores movimentando-se no ar ou encostadas contra a parede do braço), número de

stretched attend postures (esticamento) postura em que o animal alonga o corpo, sem retirar suas patas traseiras, voltando a posição inicial, número de *head dippings* (mergulho da cabeça em direção ao solo) protegidos (quando o animal está com corpo no centro do labirinto ou nos braços fechados) e desprotegido (quando o animal está com corpo no braço aberto).

4.6.3 Experimento 3 – Campo Aberto

O Teste do campo aberto foi proposto por Calvin Hall em 1934 para estudo da emocionalidade em ratos. Consiste na mensuração dos comportamentos do animal, após confronto do mesmo com ambiente novo, geralmente uma arena circular, do qual a fuga é impedida por paredes, onde vários parâmetros podem ser avaliados, tais como exploração, auto-limpeza e defecação (PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976).

Os animais foram submetidos durante três dias consecutivos, nas idades de 73/74/75 dias, ao aparato do campo aberto quadrado (Fig. 6), da marca Insight® Pesquisa e Ensino, que consiste em uma arena quadrada de acrílico na cor branca com 80 cm de lado e 50 cm de altura, e posteriormente, ao aparato redondo (Fig. 7), da mesma marca, caracterizado por uma arena circular com base em madeira, medindo 60 cm de diâmetro, dividida em 8 segmentos, circundada por uma parede acrílica listrada de preto e branco medindo 49 cm de altura, e o chão da arena foi forrado com maravalha. Após a exposição de cada animal ao aparato, o mesmo foi limpo com álcool etílico 50%, para evitar pistas olfativas.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados nos aparatos descritos anteriormente: latência, ambulação total, ambulação no centro do aparato e na periferia, duração no centro (tempo que animal permaneceu no centro do aparato), tempo de *grooming*, número de *rearing* e números de bolos fecais. Esses comportamentos foram analisados e computados em um período de 5 minutos de observação para cada animal, tais parâmetros fornecem medidas de habilidades motoras físicas gerais e nível de interesse na novidade do ambiente.



Figura 6. Arena quadrada utilizada no teste do campo aberto

Fonte: próprio autor.



Figura 7. Arena redonda utilizada no teste do campo aberto

Fonte: próprio autor.

4.6.4 Experimento 4 - Memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos

O experimento foi conduzido de acordo com o teste previamente descrito por Langston e Wood (2010). Nesse procedimento, foram utilizados dois ambientes diferenciados

através de pistas que podem ser identificadas pelo animal. O ambiente X era composto por uma arena quadrada de acrílico medindo 1m x 1m x 1m com paredes brancas e com chão forrado por uma chapa de acrílico. Nesse ambiente a iluminação era de 100 lux. No ambiente Y foi inserido um campo aberto redondo com base de madeira medindo 60 cm de diâmetro e paredes de acrílico listradas de preto e branco medindo 50 cm de altura. O chão da arena foi forrado com maravalha e a sala na qual a arena permaneceu possuía uma iluminação de 30 lux. Em ambas as salas houve o controle de ruídos.

Foram utilizados dois pares de objetos, nos quais os objetos que compõem um mesmo par eram idênticos. Esses objetos consistem em um par de bolinhas de “ping-pong” (objetos A1 e A2) e um par de “legos” ovalados de plásticos (objetos B1 e B2). Os objetos e os aparatos foram limpos a cada tentativa com algodão embebido em álcool 50% para que fossem evitadas pistas olfativas. As maravalhas do campo aberto também foram trocadas a cada tentativa (Fig. 8).



Figura 8. Aparatos utilizados para o teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos

Fonte: próprio autor.

Antes do teste, os animais passaram por uma fase de habituação, permanecendo nos ambientes X e Y por três dias consecutivos (73/74/75 dias de vida) em sessões de cinco minutos cada, na ausência dos objetos.

O procedimento possui duas fases de aquisição e uma fase de teste, realizadas no 76º dia de vida do animal. Na Fase de aquisição 1, o animal foi exposto ao ambiente X, durante cinco minutos na presença dos objetos A1 e A2. Após um intervalo de cinco minutos tem-se a fase de aquisição 2, na qual o animal foi exposto ao ambiente Y na presença dos objetos B1 e B2. Na fase de teste, com um intervalo de cinco minutos, o animal foi exposto ao ambiente X na presença dos dois objetos diferentes (A1 e B1). Durante essa fase, o objeto A1 estava

localizado à direita da arena, enquanto o objeto B1 estava à esquerda, sendo este último o objeto que não pertence àquela localização e contexto (Fig. 9).

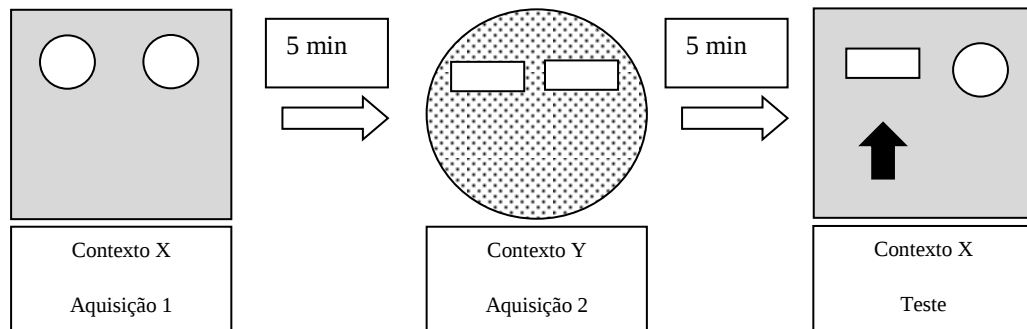


Figura 9: Esquema do teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos

Fonte: próprio autor. Adaptado de BRAGA; FUKUDA; ALMEIDA, 2014.

Legenda: A flecha na fase de teste indica o objeto não pertencente àquela localização dentro daquele contexto.

A exploração ao objeto novo ou conhecido foi definida como o ato do animal tocar o mesmo com nariz, com as patas dianteiras e traseiras. Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados: latência (tempo despendido para explorar o objeto pela primeira vez), frequência, porcentagem e tempo de exploração no objeto novo e conhecido. A porcentagem de exploração no objeto novo foi calculada através da divisão pelo tempo de exploração no objeto novo e tempo total da sessão x 100, enquanto que, porcentagem de exploração no objeto conhecido foi calculada através da divisão pelo tempo de exploração no objeto conhecido e tempo total da sessão x 100. Além disso foi calculado o Índice de Reconhecimento de Contexto (IR-ROC) através da fórmula: $IR-ROC = (\text{tempo de exploração do objeto novo} / \text{tempo de exploração do objeto novo} + \text{tempo de exploração do objeto conhecido}) \times 100$.

4.6.5 Experimento 5 - Memória de reconhecimento para objetos bidimensionais

O experimento foi realizado com base no teste previamente descrito por Forwood et al. (2007). Os animais nas idades de 78/79 dias, foram colocados no campo aberto quadrado, descrito anteriormente, situado em uma sala com controle de iluminação e ruídos.

Foram fixadas nas paredes laterais do aparato, imagens de figuras da natureza em preto e branco com diferentes padrões de preenchimento. Essas figuras foram impressas no formato “paisagem” em papel, e plastificadas, de modo a proporcionar a higienização com álcool a 50% a cada tentativa, evitando dessa forma pistas olfativas para os animais.

Três figuras diferentes foram confeccionadas, para que os estímulos da fase de aquisição e teste fossem contrabalanceados, evitando uma maior exploração do animal a uma determinada imagem, devido a um determinado estímulo, e não pela preferência ao novo.

Na fase de aquisição, duas das imagens foram fixadas nas paredes, e foi permitido que o animal explorasse livremente o aparato por cinco minutos. Na fase de teste, que ocorreu 24h após a fase de aquisição, uma das imagens foi substituída, e o animal foi novamente colocado no aparato (Fig. 10). Cada animal explorou o aparato por cinco minutos e foi medido o tempo gasto na exploração da imagem nova, assim como da imagem previamente explorada. Foi considerado que o animal explorava a imagem quando se aproximava dela a uma distância menor ou igual a cinco centímetros ou quando exibia comportamentos de *rearing* apoiados nos trechos das paredes do aparato que continham as imagens.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados: latência (tempo despendido para explorar a imagem pela primeira vez), frequência e tempo de exploração da imagem nova e conhecida. Com base nesses dados obtidos, foi calculado o Índice de Reconhecimento de Imagem (IR I) através da fórmula: $IR\ I = [\text{Tempo Imagem Nova} / (\text{Tempo Imagem Nova} + \text{Tempo Imagem Conhecida})] \times 100$.



Figura 10. Aparato utilizado para o teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais

Fonte: próprio autor.

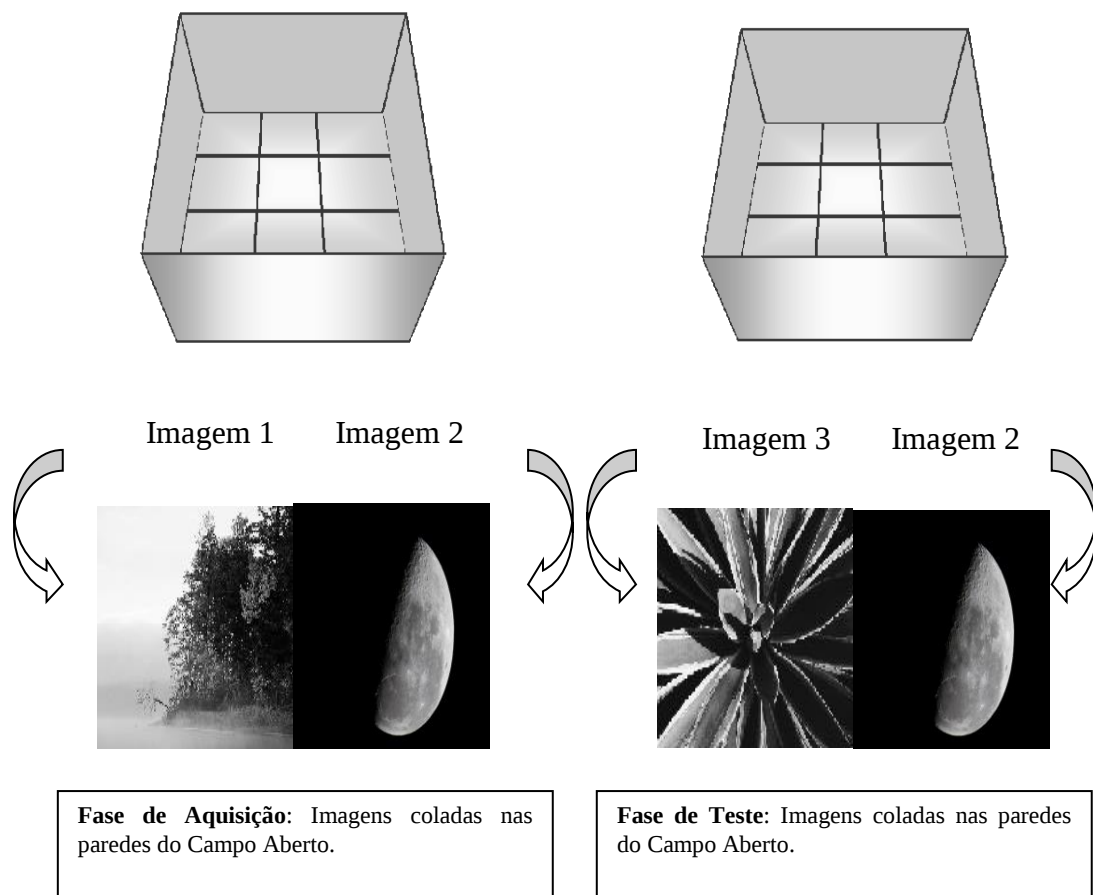


Figura 11: Esquema do teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais

Fonte: próprio autor. Adaptado de BRAGA; FUKUDA; ALMEIDA, 2014.

4.7 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA

4.7.1 Avaliação do peso corporal e consumo alimentar

O peso corporal dos animais foi determinado através do uso de uma balança eletrônica digital (Marte ®, Brasil). Pesagens semanais individuais foram realizadas no período de pós-lactação para determinação do peso corporal dos animais ao longo do experimento.

O consumo alimentar dos roedores foi determinado diariamente a partir da diferença entre a quantidade ofertada da ração comercial e dos alimentos que compõe a dieta de cafeteria e a quantidade de sobra, sempre no mesmo horário, referente ao dia anterior. Com os dados do consumo alimentar foi possível analisar as preferências alimentares e a ingestão de nutrientes.

4.7.2 Avaliação Murinométrica

Após a realização dos testes comportamentais, foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros físicos: peso corporal, comprimento naso-anal, circunferência torácica e abdominal, para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) que corresponde o peso corporal (g)/comprimento naso-anal² (cm²), e do Índice de Lee, que compreende a raiz cúbica do peso corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm) (LEE, 1928 apud BERNARDIS; PATTERSON, 1968; NOVELLI et al., 2007).

4.7.3 Peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e avaliação bioquímica do fígado dos animais

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (baço, coração, fígado, rins, suprarrenais e testículos) e gordura abdominal (gordura epididimal e retroperitoneal) foram retirados e pesados.

As amostras do fígado foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80 °C, para posteriores avaliações. O teor de lipídio foi quantificado pelo método descrito por Bligh & Dyer (1959). Após essa quantificação, a gordura foi suspensa por álcool isopropílico, e foram realizadas as dosagens do teor de colesterol total, triglicerídeos, seguindo as especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As proteínas hepáticas também foram quantificadas, seguindo as especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). E o estresse oxidativo foi determinado através do malondialdeído (MDA) de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998) com algumas adaptações.

4.7.4 Avaliação Bioquímica do soro sanguíneo

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Após jejum de 12h os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de 2ml de sangue, que foi centrifugado por 20 minutos, a 3500 rotações por minuto (rpm), a 4°C em centrífuga Universal (320 R Hettich Zentrifugen – Alemanha), onde foi separado o soro para a avaliação bioquímica, através de testes enzimáticos de glicemia, colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol, VLDL colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, ureia, creatinina, bilirrubina, Transaminase

Glutâmico-Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP), seguindo as especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O estresse oxidativo foi avaliado através da análise de malondialdeído (MDA) realizada de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998) com algumas adaptações, e da análise da glutathiona reduzida (GSH) através do protocolo adaptado por Costa, Santos e Lima, 2006.

Enquanto que, o dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) foi medido através da dosagem do 8OHdG na diluição de 1:21 através do kit Elisa de dano oxidativo de DNA/RNA (Cayman Chemical, Michigan, Estados Unidos).

4.7.5 Histopatologia do fígado

Após a eutanásia do animal, fragmentos de fígado foram fixados em 10% de formalina tamponada durante 48 horas, mantidos em álcool e conduzidos ao Laboratório de Patologia Hepática (FMRP-USP), onde foram incorporados em parafina, para análise histológica através da microscopia ótica.

As secções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina foram cortadas em uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. Um patologista cego ao tratamento, utilizou um microscópio de luz binocular (Olympus BX51 – Shinjuku, Tóquio, Japão) para avaliar a porcentagem de animais com esteatose hepática. A análise foi realizada em 30 campos de 40 vezes de aumento escolhidos aleatoriamente (HPFs; ampliação x40) em cada slide. A classificação da gravidade da esteatose hepática foi a seguinte: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de esteatose <5%; grau 1, esteatose leve 6-33%; grau 2, esteatose moderada a grave 34-66%; grau 3, esteatose grave > 66%. A inflamação portal e lobular foi pontuada da seguinte forma: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de inflamação; grau 1, inflamação leve; grau 2, inflamação moderada a grave; e grau 3, inflamação grave. O depósito de colágeno foi avaliado utilizando as preparações de Sirius Red como se segue: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de fibrose; grau 1, fibrose moderada; grau 2, fibrose moderada a grave; e grau 3, fibrose severa (BRUNT et al., 2011).

4.8 MÉTODOS DE EUTANÁSIA

Sobredose anestésica com pentobarbital sódico (150mg/kg) associado à lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da histopatologia do fígado foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0, submetidos ao teste de Qui-Quadrado. As análises dos demais dados foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Statistica versão 13, submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todos os dados foram apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

REFERÊNCIAS

- AKASH; KRISHNAMURTHY, L.; SHASHIKALA KRISHNAMURTHY, P. Hematological parameters versus serum vitamin B12 levels in diagnosis of vitamin B12 deficiency neurological deficits. **International Journal of Science and Research**, v. 05, n. 03, p. 567-569, 2016.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontier in Genetics**, v. 02, n.27, p. 01-13, 2011.
- ALRAMADHAN, E. et al. Dietary and botanical anxiolytics. **Medical Science Monitor**, v.18, n. 04, p. 40-48, 2012.
- ANDA, R. F. et al. The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 03, p. 174-186, 2006.
- ANTIPATIS, V.; GILL, T. Obesity as a global problem. **International Textbook of Obesity**, p. 3-22, 2001.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 20. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2016.
- ASTRUP, A. et al. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 02, p.350-355, 1994.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v.10, n. 01, p. 1077–1081, 1986.
- BAS DEL, J. M. et al. Grape seed procyanidin supplementation to rats a high-fat diet during pregnancy and lactation increases the body fat content and modulates the inflammatory response and the adipose tissue metabolism of the male offspring in youth. **International Journal of Obesity**, v. 39, p.7-15, 2015.
- BAYOL, S. A. et al. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. **Endocrinology**, v. 151, n. 04, p. 1451-1461, 2010.
- BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p. 134-141, 2014.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 04, p. 527-528, 1968.
- BILBO, S. D.; TSANG, V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 06, p. 2104-2115, 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRAGA, J. E. F. et al. Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 02, p. 93-100, 2010.

BRAGA, N. N.; FUKUDA, M. T. H.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*). **Psychology & Neuroscience (Online)**, v. 07, n. 02, p. 103-111, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003. **Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/360_03rdc.htm>. Acesso em: 11 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2016: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. Estatística e Informação em Saúde, Brasília, 2017. Disponível em: http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf. Acesso em: 06 jun. 2017.

BRUNETTI, L. et al. Cafeteria diet increases prostaglandin E₂ levels in rat prostate, kidney and testis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 23, n. 04, p. 1073–1078, 2010.

BRUNT, E. M. et al. Misuse of scoring systems. **Hepatology**, v. 54, n. 01, p. 369-370, 2011.

BUCKLEY, A. J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism**, v. 54, n. 04, p. 500–507, 2005.

BUDSON, A. E. Understanding memory dysfunction. **The Neurologist**, v. 15, n. 02, p. 71-79, 2009.

BUDSON, A. E.; PRICE, B. H. Memory Dysfunction in Clinical Practice. **Discovery Medicine**, v. 05, n. 26, p. 135-141, 2005.

BULTMAN, S. J.; MICHAUD, E. J.; WOYCHIK, R. P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. **Cell**, v. 71, n. 07, p. 1195-1204, 1992.

CARROLL, J.; VOISEY, J.; DAAL, A. V. Mouse models of obesity. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 345-349, 2004.

CASTELL-AUVÍ, A. et al. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 07, p. 1155–1162, 2012.

CASTRO, H. et al. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 03, p. 430-437, 2015.

CHAMPAGNE, D. L. et al. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 23, p. 6037-6045, 2008.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during pregnancy and offspring health: the importance of animal models and what can be learned from them. **International of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 06, 2016. E586.

CORDNER, Z. A.; TAMASHIRO, K. L. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 363-371, 2015.

COSTA, C. M.; SANTOS, R. C. C.; LIMA, E. S. Procedimento automatizado simples para determinação de tióis em amostras de soro humano. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 05, p. 345-350, 2006.

COSTA-SILVA, J. H. et al. New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. **Frontier in Physiology**, v. 06, n. 345, 2015.

COSTA-SILVA, J. H.; SIMÕES-ALVES, A. C.; FERNANDES, M. P. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. **Frontiers in Physiology**, v. 07, n. 504, 2016.

CULPEPPER, L. Generalized anxiety disorder and medical illness. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70, n. 02, p. 20-24, 2009.

DAVIDSON T. L. et al. A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 07, n. 06, p. 613-616, 2007.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **The British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 04, p. 606-615, 2014.

_____. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 05, p. 907-914, 2015.

DE SCHEPPER, J. et al. Study of serum leptin in cafeteria-diet-overfed rats. **Hormone Research in Pediatrics**, v. 50, n. 05, p. 271-275, 2000.

DE LARTIGUE, G. Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 20, p. 5791-5815, 2016.

DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS. 5. ed. **American Psychiatric Association**, Porto Alegre: Artemed, 2013.

DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 07, 2017. e00006016.

DIEMEN, V. V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Modelo experimental para induzir obesidade em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 06, p. 425-429, 2006.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition memory in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 02, p. 244-254, 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research**, v. 01, n. 31, p.47-59, 1988.

ESTRELA, D. da C. et al. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 252-263, 2015.

FAN, L. et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate off spring. **International journal of obesity (2005)**, v. 37, n. 02, p. 254-262, 2013.

FERREIRA, D. S. et al. Perinatal lowprotein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult off spring. **Nutritional Neuroscience**, v. 19, n. 08, p. 369-375, 2015.

FERREIRA, V.; WANDERLEY, E. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, n. 01, p. 185-194, 2010.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat off spring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **The British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 03, p. 449-456, 2013.

FORWOOD, S. E. et al. Rats spontaneously discriminate purely visual, two-dimensional stimuli in testes of recognition memory and perceptual oddity. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 05, p. 1032-1042, 2007.

GAZZANIGA, M. S.; IVRY, R. B.; MANGUN, G. R. Cognitive neuroscience: the biology of the mind, New York: W. W. Norton e Co, 1998.

GERARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1176-1183, 1998.

GHOSH, S.; BOUCHARD, C. Convergence between biological, behavioural and genetic determinants of obesity. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 02, p. 731-748, 2017.

GOMEZ-SMITH, M. et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet modelo of metabolic syndrome in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 382-391, 2016.

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. **Transtornos da Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 05, n. 07, p. 545-552, 2004.

GRUBER, L. et al. Maternal high-fat diet accelerates development of crohn's disease-like ileitis in TNFDeltaARE/WT off spring. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n.09, p. 2016-2025, 2015.

GRUNDMANN, O. et al. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 03, p. 406-411, 2007.

GUREJE, O. Comorbidity of pain and anxiety disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 10, n. 04, p. 318-322, 2008.

HABBOU, A. et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short and long term patho physiological consequences. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 05, p. 553-562, 2013.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear” – motivated behavior. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 54, n. 01, p. 01-05, 1984.

HETEM, L. A. B. Diagnóstico diferencial. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 191-206.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 01, p. 21-30, 1996.

HOLEMANS, K. et al. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 03, p. 858-865, 2004.

HSU, T. M. et al. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. **Hippocampus**, v. 25, n. 02, p. 227-239, 2015.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

JANG, I. et al. Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity resistant Sprague dawley rats in response to moderate high fat diet. **Experimental Animals**, v. 52, n. 02, p. 99-107, 2003.

KALUEFF, A. V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 1-12, 2007.

KANOSKI, S. E.; DAVIDSON, T. L. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 01, p. 59-68, 2011.

KLEYN, P. W. et al. Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. **Cell**, v. 85, n. 02, p. 281-290, 1996.

KOSARI, S. et al. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 01, p. 98-103, 2012.

KURAJOH, M. et al. Plasma leptin level is associated with cardiac autonomic dysfunction in patients with type 2 diabetes: HSCAA study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 117, p. 01-08, 2015.

- LADER, M. H. Clinical anxiety and the benzodiazepines. In: PALMER, G. C. **Neuropharmacology of central nervous system and behavioral disorders**. New York: Academic Press, 1981, p. 224-241.
- LANGSTON, R. F.; WOOD, E. Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampus lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. **Hippocampus**, v. 20, n. 10, p. 1139-1153, 2010.
- LEANDRO, C. G. et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n.07, p. 807–815, 2012.
- LEFFA, D. D. et al. Effects on palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 04, p. 1073–1082, 2015.
- LEOPOLDO, A. S. et al. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 04, p. 1-9, 2016.
- LEVITT, P. Structural and functional maturation of the developing primate brain. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 04, p. 35-45, 2003.
- MACCARI, S. et al. The consequences of early-life adversity: neurobiological: behavioural and epigenetic adaptations. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 10, p. 707-723, 2014.
- MACEDO, I. C. et al. Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. **Neuropeptides**, v. 51, p. 75-81. 2015.
- MACHLEIDT, F. et al. Experimental hyperleptinemia acutely increases vasoconstrictory sympathetic nerve activity in healthy humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n.03, p. E491–E496, 2013.
- MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 13, n.10, p. 423–444, 2015.
- MANNS, J. R. et al. Recognition memory and the human hippocampus. **Neuron**, v. 37, n. 01, p. 171-180, 2003.
- MATTHEWS, B. R. Memory dysfunction. **Behavioral Neurology and Neuropsychiatry**, v. 21, p. 613-26, 2015.
- MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. Epigenetics and nutritional environmental signals. **Integrative and comparative biology**. v. 54, n.01, p. 21–30, 2014.
- MITCHELL, S.; SHAW, D. The worldwide epidemic of female obesity. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 29, n. 03, p. 289-299, 2014.
- MINA, D. et al. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. 211, n. 03, p. 1-13, 2014.

MONTI, J. M.; BAYM, C. L.; COHEN, N. J. Identifying and characterizing the effects of nutrition on hippocampal memory. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 05, n. 03, p. 337S-343S, 2014.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 09, p. 1113-1120, 1997.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v. 12, n. 02, p. 239-260, 1981.

MULLER, A. P. et al. Metabolic and behavior effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. **Behavior and Pharmacology**, v. 21, n. 07, p. 668-675, 2010.

NAGGERT, J. K. et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase e mutation which reduces enzyme activity. **Nature Genetics**, v. 10, n. 02, p. 135-142, 1995.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2014.

NOVELLI E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 01, p. 111-119, 2007.

NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 02, p. 233-266, 1990.

OANA, F. et al. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rat and lean Zucker rats concerning adiponectin. **Metabolism**, v. 54, n. 08, p. 995-1001, 2005.

OBEN, J. A. et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 06, p. 913-920, 2010.

O'BRIEN, P. E.; DIXON, J. B. The extent of the problem of obesity. **The American Journal of Surgery**, v. 184, n. 6973, p. 2S-8S, 2002.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 03, p. 219-233, 2001.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 03, p. 149-167, 1985.

PEÑA, C. J. et al. Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring. **The European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 06, p. 946-956, 2014.

PINHEIRO, A.; FREITAS, S.; CORSO, A. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004.

PINI, R. T. B. et al. Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 07, p. 396-408, 2017.

PONS, Z. et al. Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats. **British Journal of Nutrition**, v.117, n. 02, p. 200–208, 2017.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 03-33, 2003.

PURCELL, R. H. et al. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. **Physiology & Behavior**. v. 104, n. 03, p. 474-479, 2011.

QUAIOTI, T.; ALMEIDA, S. S. Determinantes psicobiológicos do comportamento alimentar: uma ênfase em fatores que contribuem para a obesidade. **Psicologia Universidade de São de Paulo**, v. 17, n. 04, p. 193-211, 2006.

RAYNOR, H. A.; EPSTEIN, L. H. Dietary variety, energy regulation and obesity. **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 03, p. 325-341, 2001.

REICHELT, A. C. et al. Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 43, p. 68-75, 2015.

RICE, D.; BARONE, S. JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 03, p. 511-533, 2000.

ROBERTS, V. H.; FRIAS, A. E.; GROVE, K. Impact of maternal obesity on fetal programming of cardiovascular disease. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 03, p. 224–231, 2015.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.52, n. 02, p. 297–303, 1995.

ROSSETI, C. et al. Evidence for a compulsive-like behavior in rats exposed to alternate access to highly preferred palatable food. **Addiction Biology**, v. 19, n. 06, p. 975-985, 2014.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 06, p. 1109–1117, 2011.

SCOARIS, C. R. et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, n. 03, p. 312-320, 2009.

SCHWEIGERT, I. D.; SOUZA, D. O. G.; PERRY, M. L. S. Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 02, p. 271-281, 2009.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 03, p. 461-471, 1976.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, n. 01, p. 34-38, 2009.

SIROSKI, C. et al. The stigma of obesity in the general public and its implications for public health: a systematic review. **BioMed Central Public Health**, v. 11, n. 661, p. 1-8, 2011.

SOLLEIRO, D. R. et al. Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. **Plos One**, v. 12, n. 05, e0176554, 2017.

SOUZA, C. G. et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Science**, v. 81, n. 03, p. 198-203, 2007.

SPEIGHT, A. et al. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 57, p. 34-40, 2017.

SPENRATH, M. A.; CLARKE, M. E.; KUTCHER, S. The science of brain and biological development: implications for mental health research, practice and policy. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 04, p. 298-304, 2011.

STECKLER, T. et al. Recognition memory in the rat I: concepts and classification. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 03, p. 289-311, 1998.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychology Review**, v. 20, n. 04, p. 327-348, 2010.

SULLIVAN, E. L.; NOUSEN, E. K.; CHAMLOU, K. A. Maternal high-fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. **Physiology & Behavior**, v. 123, p. 236-242, 2014.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 07, p. 1263-1271, 1995.

VALADARES, C.T. et al. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 06, p. 274-282, 2010.

VALLADOLID-ACEBES, I. et al. Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice is there a role of leptin? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 18-25, 2013.

- VEL SZIC, K. S. et al. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? **Clinical Epigenetics**, v. 07, n. 01, p. 33, 2015.
- VIANA, M. B. Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. **Natureza Humana**, v. 12, n. 01, p. 163-196, 2010.
- VIDAL-SANTOS, R. et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 08, n. 02, p. 216-225, 2017.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 03, p. 481-504, 1976.
- WANG, J. et al. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. **The FASEB journal**, v. 24, n. 06, p. 2066–2076, 2010.
- WARNEKE, W. et al. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 45-54, 2014.
- WATSON, R. E. et al. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. **Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 77, n. 05, p. 471-484, 2006.
- WELLS, J. C. Obesity as malnutrition: the role of capitalism in the obesity global epidemic. **American Journal of Human Biology**, v. 24, n. 03, p. 261–276, 2012.
- WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **Journal of experimental zoology. Part B Molecular and developmental evolution**. v. 304, p. 610–618, 2005.
- WRIGHT, M. V. et al. Impact of cafeteria feeding during lactation in the rat on novel object discrimination in the offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 02, p. 1933-1937, 2014.
- WRIGHT, T.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 02, p. 164–172, 2011.
- World Health Organization (WHO). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: WHO; 2009.
- _____. Obesity and overweight. Atualizado em outubro de 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> Acesso em 24 abr. 2018.
- WOODS, S. C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 04, p. 1081-1087, 2003.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Artigo 1

Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós lactação altera o perfil lipídico/peroxidação lipídica e aumenta o comportamento de ansiedade em filhotes de ratos machos

Periódico: Nutritional Neuroscience
ISSN: 1028-415X (Print)
1476-8305 (Online)

FI: 3,765

QUALIS: B1 na área de Nutrição

(ANO-BASE 2013-2016)

**Dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós lactação altera o perfil
lipídico/peroxidação lipídica e aumenta o comportamento de ansiedade em filhotes de
ratos machos**

Camyla Rocha de Carvalho Guedine¹, Liana Clébia de Moraes Pordeus¹, Tania Regina Riul²,
Alceu Afonso Jordão Júnior³, Sebastião Sousa Almeida^{4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição, UFPB, Cidade Universitária, s/n., João Pessoa, PB 58059-900, Brasil, ²Departamento de Nutrição, FCBS, UFVJM, Rodovia MGT 367, KM 583, Alto da Jacuba, 5000, Diamantina, MG 39100-000, Brasil, ³Laboratório de Nutrição e Metabolismo, FMRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brasil, ⁴Laboratório de Nutrição e Comportamento, FFLCLRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brasil.

* Corresponding author:

Universidade de São Paulo (USP), Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14040-901

Laboratório de Nutrição e Comportamento

Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Tel.: +55 (16) 3315-3663

E-mail: sebasalm@usp.br

Abstract

Objective: Evaluate the impact of the cafeteria diet during lactation and/or post-lactation on physiological parameters and anxiety in the offspring of Wistar rats. **Methods:** Male offspring of Wistar rats (n=60) were randomized into four groups: Control (C), Lactation Cafeteria (LC), Post-lactation Cafeteria (PC) and Total Cafeteria (TC). Later in adult life the animals were submitted to the behavioral (elevated plus-maze and open field) and biological (body weight, consumption and food preference, glycemia, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, VLDL cholesterol, triglycerides, total proteins, urea, creatinine, bilirubin, serum glutamic oxaloacetic transaminase, serum glutamic pyruvic transaminase, serum protein, and oxidative stress) evaluations. The data were submitted to ANOVA, followed by the Newman–Keuls test ($p < 0.05$). **Results:** Animals treated with the cafeteria diet presented greater weight measurements compared to the control group. Triglyceride levels were higher in the PC group than in the other groups. MDA levels were higher in the PC and TC group than CL and C. The animals of the PC and TC groups presented higher levels of anxiety compared to the C and LC groups. No significant differences due to diet were observed in the locomotor and exploratory behaviors. **Conclusions:** The cafeteria diet ingestion was capable of triggering biological and behavioral alterations in rats.

Keywords: Cafeteria diet, Obesity, Hyperphagia, Cholesterol, Triglycerides, Oxidative stress, Anxiety, Locomotor activity

Introdução

Os hábitos de vida materna são capazes de modular o fenótipo, o desenvolvimento e o comportamento da prole. Especificamente, eles podem alterar funções neurais, aspectos cognitivos e neuroendócrinos.^{1,2} Dentre os hábitos, pode-se destacar o consumo de uma dieta inapropriada durante a gestação e lactação, que resulta em modificações no organismo da mãe e da prole,^{3,4,5} devido, principalmente, pela influência da dieta materna sobre a composição do leite ofertado aos animais.^{4,5} Este fenômeno, conhecido como plasticidade fenotípica refere-se à capacidade de um organismo reagir a um ambiente interno e externo com alterações na forma, estado, fisiologia ou taxa de atividade, sem modificações genéticas.⁶

Dietas que promovem obesidade em animais são modelos mais apropriados para estudar as consequências dessa doença. Dentre essas manipulações a dieta de cafeteria é particularmente importante, porque contém alimentos como bacon, nozes, leite condensado, refrigerante, chocolates, batatas fritas, patê, amendoim, salsinha, queijo, geleia e outras guloseimas.⁷⁻⁹ Esta dieta é altamente palatável, com elevado teor de sódio, carboidratos simples e gorduras, principalmente gorduras saturadas e/ou trans, além do baixo teor de proteínas, fibras alimentares e micronutrientes.³

Diversas alterações fisiológicas são decorrentes da exposição na fase adulta. Entre essas alterações a hiperfagia, dislipidemias, aumento da glicose no sangue, da pressão arterial e do estresse oxidativo, podem ser destacados.^{7,10-13} No entanto, os efeitos a essa exposição em outras fases da vida precisam ser mais estudados. O consumo da dieta de cafeteria também é capaz de promover alterações comportamentais, em relação a atividade exploratória e a ansiedade em roedores. Os estudos, no entanto, mostram resultados controversos,¹³⁻¹⁶ e não avaliam o consumo da dieta de cafeteria durante o período de lactação comparando com o período pós-lactação, ou com o período total (que envolve ambos os períodos da lactação e pós-lactação).

Portanto, uma vez que a nutrição no período de lactação desempenha um papel crítico no desenvolvimento fisiológico e comportamental da prole, aliado à escassez de estudos, esse trabalho busca evidenciar os efeitos tardios causados pelo consumo da dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós lactação.

Material e métodos

Delineamento experimental

Ninhadas compostas pela rata-mãe e 08 filhotes machos (n=11), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, randomizados

de forma aleatória em 4 grupos: Controle (C) animais que receberam apenas a dieta comercial (n=16), Cafeteria Lactação (CL) animais receberam a dieta de cafeteria durante a lactação, e a dieta comercial no pós-lactação (n=12); Cafeteria Pós-Lactação (CP) animais que receberam dieta comercial durante a lactação, e dieta de cafeteria no pós-lactação (n=20); e Cafeteria Total (CT) animais que receberam a dieta de cafeteria durante todo experimento (n=12). A semana 1 começa no dia do nascimento (dia 0). A fase de lactação compreende o dia 0 ao dia 21 quando ocorre o desmame. A fase de pós-lactação começa com o desmame. As ratas não foram utilizadas no presente estudo, porque as flutuações hormonais associadas com o ciclo estral pode ser um fator de confundimento em testes comportamentais. A dieta padrão usada foi a Nuvilab[®] (Nuvital, São Paulo, Brasil) e a dieta de cafeteria foi composta por 28 alimentos pertencentes a uma lista elaborada baseada em um estudo anterior do nosso grupo¹⁷ e foi adaptada de acordo com as opções de alimentos disponíveis no mercado local. Os mesmos tipos de potes foram utilizados para a dieta de cafeteria e dieta padrão. Os grupos que receberam a dieta de cafeteria forem oferecidos 4 potes de vidro, cada um contendo um alimento específico da dieta de cafeteria, de acordo com o dia da semana, mais a dieta padrão oferecida por meio da tampa gradeada da caixa do animal. Os grupos controle receberam a dieta padrão dentro dos 4 potes de vidro (iguais aos tipos de pote utilizados nos grupos cafeteria), além da dieta padrão oferecida por meio da tampa gradeada da caixa do animal.

Ao longo de todo o experimento, os animais receberam água, dietas experimentais e ração comercial ad libitum. Eles foram mantidos na temperatura constante de (23±1C°) com um ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com luzes acessas às 06:00 horas. Todos os experimentos foram conduzidos na fase clara do ciclo, a partir das 08:00 horas da manhã.

Os testes comportamentais se iniciaram aos 70 dias de vida. Após a avaliação comportamental (aos 99 dias de idade), os animais foram colocados em jejum por 12 horas, e foram eutanasiados para retirada de amostra de sangue para avaliação bioquímica.

Análise centesimal dos alimentos

As análises da composição centesimal dos alimentos que compõem a dieta de cafeteria e da ração comercial ofertada para os animais foram realizadas em triplicata. Todos os procedimentos de análise dessa composição foram obtidos a partir do Método Internacional Oficial de Análises.¹⁸ Exceto, a análise de carboidratos, realizada pelo cálculo da diferença entre os valores dos macronutrientes das demais análises realizadas. O valor calórico total, expresso em kcal, foi calculado segundo os coeficientes de Atwater (carboidratos: 4kcal/g; proteínas: 4kcal/g e lipídios: 9kcal/g).

Avaliação comportamental

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é formado por dois braços fechados e dois braços abertos, localizados a 50 cm do chão, ambos com 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e uma região central medindo 10 cm x 10 cm, localizado em uma sala com controle de ruído e iluminação de aproximadamente 70 lux. O braço aberto foi dividido em 3 porções, medindo aproximadamente 16,7 cm cada porção, a fim de diferenciar a porção mais próxima a ponta do aparelho (porção distal) do mais próximo da porção central (porção proximal).

Os animais foram colocados no centro do labirinto individualmente por 5 minutos. Após a exposição de cada animal ao aparato, o mesmo foi limpo com álcool etílico 50%, para evitar pistas olfativas.

Os parâmetros tradicionais avaliados foram a porcentagem de frequência de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. A porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos foi calculada através da divisão do número de entradas nos braços abertos pelo número de entradas nos braços abertos mais fechados x 100. A porcentagem de tempo nos braços abertos foi calculada através da divisão do tempo nos braços abertos pelo tempo nos braços abertos mais fechados x 100.

Além disso, o tempo de permanência no centro, a latência para a 1ª entrada no braço aberto, a frequência de entrada em cada terço do braço aberto, a frequência de ida na ponta desse braço, entrada falsa, número de bolos fecais, número de rearings, número de stretched attend postures, além do número de head dippings protegidos e desprotegido também foram analisados.

Campo Aberto

No teste do campo aberto, os animais foram colocados no aparelho quadrado do campo aberto, da marca Insight® Pesquisa e Ensino, durante três dias consecutivos. Este aparelho consiste em uma arena quadrada de acrílico na cor branca com lados de 80 cm e altura de 50 cm. Posteriormente, eles foram colocados em um aparato redondo, da mesma marca, caracterizado por uma arena circular com base em madeira medindo 60 cm de diâmetro, dividida em 08 segmentos, circundada por uma parede acrílica listrada de preto e branco medindo 49 cm de altura. Para diferenciar os dois aparelhos do campo aberto tínhamos a parede listrada de preto e branco e o chão da arena foi forrado com maravalha. A iluminação do campo aberto redondo era de aproximadamente 70 lux e do campo aberto quadrado era de

aproximadamente 100 lux. Após a exposição de cada animal ao aparato, o mesmo foi limpo com álcool etílico a 50%, para evitar pistas olfativas.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram observados nos aparatos descritos anteriormente: latência, ambulação total, ambulação no centro do aparato e na periferia, duração no centro (tempo em que o animal permaneceu no centro do aparato), tempo de grooming, número de rearing e números de bolos fecais. Esses comportamentos foram analisados e computados em um período de 5 minutos de observação para cada animal. Tais parâmetros fornecem medidas de habilidades motoras físicas gerais e nível de interesse na novidade do ambiente.

Avaliação fisiológica

Avaliação do peso corporal, consumo e preferência alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram determinados através do uso de uma balança eletrônica digital (Marte®, Brasil). Pesagens semanais individuais foram realizadas no período de pós-lactação para determinação do peso corporal dos animais ao longo do experimento. O consumo alimentar foi determinado diariamente a partir da diferença entre a quantidade ofertada da ração comercial e dos alimentos que compõe a dieta de cafeteria e a quantidade de sobra. Isso sempre foi feito no mesmo horário, referente ao dia anterior. Com os dados desse consumo foi possível analisar as preferências alimentares.

Avaliação Bioquímica do soro sanguíneo

Após um jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue de 2 ml foram coletadas. Estas amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 3500 rotações por minuto (rpm), a 4°C em centrífuga Universal (320 R Hettich Zentrifugen – Alemanha). Onde o soro foi separado para a avaliação bioquímica, através de testes enzimáticos de glicemia, colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol, VLDL colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, ureia, creatinina, bilirrubina, Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP). As especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) foram seguidas.

O estresse oxidativo foi avaliado através da análise de malondialdeído (MDA) realizada de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al.¹⁹ com algumas adaptações, e da análise da glutathiona reduzida (GSH) através do protocolo adaptado por Costa, Santos e Lima.²⁰ Enquanto que, o dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) foi medido através da

dosagem do 8OHdG na diluição de 1:21 através do kit Elisa de dano oxidativo de DNA/RNA (Cayman Chemical, Michigan, EUA).

Métodos de eutanásia

Sobredose anestésica com pentobarbital sódico (150mg/kg) associado à lidocaína (10mg/kg) administrada intraperitonealmente.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todos os dados foram apresentados com valores da média $\pm$ EPM. O software STATISTICA v.13 (Stat Soft) foi utilizado para as análises estatística.

Resultados

Análise centesimal dos alimentos

Os resultados obtidos na análise da composição centesimal dos alimentos que compunham a dieta de cafeteria e da ração comercial encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal dos alimentos que compõe a dieta de cafeteria e a dieta padrão oferecidas aos animais (g/100g)

ALIMENTO	Umidade (g)	Cinza (g)	Proteína (g)	Lipídeo (g)	Carboidrato (g)	Fibra (g)	Caloria (kcal)
Torrada (Visconti tradicional®)	6,93 $\pm$ 0,04	2,03 $\pm$ 0,07	13,05 $\pm$ 0,61	5,30 $\pm$ 0,01	70,83	1,85 $\pm$ 0,33	383
Marshmallow (Haribo®)	13,27 $\pm$ 0,12	0,19 $\pm$ 0,02	5,35 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,01	78,90	2,10 $\pm$ 0,18	339
Doce de amendoim Gibi (Santa Helena®)*	8,22 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,02	11,07 $\pm$ 0,41	21,67 $\pm$ 0,69	52,56	5,06 $\pm$ 0,42	450
Salame italiano (Perdigão®)	35,5 $\pm$ 0,4	5,38 $\pm$ 0,05	23,5 $\pm$ 0,74	28,7 $\pm$ 0,48	4,5	2,42 $\pm$ 0,52	370
Bolacha maisena (Mabel®)	5,05 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,01	10,25 $\pm$ 0,48	9,02 $\pm$ 0,00	71,45	2,45 $\pm$ 0,04	408
Chocolate branco (Baton®)*	1,66 $\pm$ 0,02	1,51 $\pm$ 0,03	6,41 $\pm$ 0,27	32,59 $\pm$ 0,70	54,63	3,22 $\pm$ 0,11	537
Queijo mussarela (Ipanema®)	44,74 $\pm$ 0,07	3,32 $\pm$ 0,04	23,32 $\pm$ 0,92	22,27 $\pm$ 0,43	6,02	0,32 $\pm$ 0,29	318

Cereal de milho em flocos com açúcar (SnowFlakes®)*	1,63 ± 0,04	2,71 ± 0,01	4,20 ± 0,14	0,59 ± 0,044	87,13	3,75 ± 0,41	371
Bolacha recheada de chocolate (Trakinas®)*	1,71 ± 0,09	1,37 ± 0,02	5,37 ± 0,04	18,85 ± 0,47	69,80	2,91 ± 0,18	470
Queijo processado (Polenguinho tradicional®)	55,96 ± 0,45	8,93 ± 0,02	8,47 ± 0,32	24,08 ± 0,03	2,55	0,00	261
Amêndoa (La Violetera®)*	2,68 ± 0,02	2,95 ± 0,006	21,68 ± 0,15	47,30 ± 0,36	18,95	6,43 ± 0,27	588
Doce de leite com coco em pasta (Frimesa®)	26,25 ± 0,69	1,86 ± 0,05	6,68 ± 0,36	0,00 ± 0,00	64,38	0,83 ± 0,08	284
Castanha do Pará (La Violetera®)*	1,93 ± 0,03	3,43 ± 0,04	10,88 ± 0,59	68,52 ± 1,34	4,72	10,53 ± 0,13	679
Queijo prato (Ipanema®)	42,76 ± 0,02	3,34 ± 0,0	23,25 ± 0,45	21,77 ± 0,08	5,82	3,06 ± 0,1	312
Chocolate ao leite em barra (Lacta®)*	1,69 ± 0,09	1,65 ± 0,005	5,40 ± 0,24	26,80 ± 0,9	61,26	3,21 ± 0,13	508
Creme de amendoim (Amendocrem®)*	2,23 ± 0,06	2,25 ± 0,0005	13,07 ± 0,33	43,94 ± 0,56	34,26	4,25 ± 0,21	585
Pão branco de forma (Pullman®)*	32,78 ± 0,13	1,96 ± 0,04	7,97 ± 0,17	1,54 ± 0,06	54,76	0,99 ± 0,02	265
Cereal de milho sabor chocolate (Nescau®)*	4,00 ± 0,04	3,25 ± 0,011	4,17 ± 0,25	1,10 ± 0,011	82,16	5,31 ± 0,26	355
Queijo reino (Tirolez®)	39,09 ± 0,02	3,86 ± 0,02	21,94 ± 0,24	27,14 ± 0,1	7,97	0,00	364
Biscoito canudo morango (Look®)	3,07 ± 0,03	0,33 ± 0,03	3,87 ± 0,21	21,25 ± 0,72	68,45	3,02 ± 0,54	481
Bolo recheado chocolate (Ana Maria®)	22,41 ± 0,05	1,33 ± 0,0	4,51 ± 0,58	6,39 ± 0,07	63,26	2,10 ± 0,35	329
Bolacha água e sal (Duchen®)	3,07 ± 0,04	3,08 ± 0,01	11,83 ± 0,12	9,97 ± 0,05	70,15	1,89 ± 0,23	418
Mortadela (Marba®)	57,04 ± 0,06	4,56 ± 0,01	11,03 ± 0,34	16,09 ± 0,88	6,65	4,63 ± 0,62	216

Confete de chocolate (Coloreti®)	1,30 ± 0,02	0,90 ± 0,0	2,45 ± 0,03	19,31 ± 0,27	71,67	4,37 ± 0,75	470
Bolo recheado cenoura com chocolate (Ana Maria®)	22,56 ± 0,04	1,25 ± 0,01	4,44 ± 0,57	6,31 ± 0,57	64,43	1,00 ± 0,39	332
Bacon (Sadia®)*	28,07 ± 0,93	2,01 ± 0,02	11,57 ± 0,34	52,97 ± 2,13	0	5,97 ± 0,47	521
Bolacha recheada wafer de chocolate (Bauducco®)*	2,01 ± 0,03	0,99 ± 0,004	4,96 ± 0,11	24,13 ± 0,19	64,88	3,02 ± 0,07	496
Amendoim sem pele Grelhaditos (Santa Helena®)*	1,69 ± 0,009	2,59 ± 0,07	20,27 ± 0,99	52,06 ± 0,20	12,70	10,70 ± 0,58	600
Ração comercial Nuvilab (Nuvital®)*	9,42 ± 0,09	7,59 ± 0,09	17,68 ± 0,17	4,51 ± 0,05	47,35	13,45 ± 0,47	301

*Fonte: PINI et al.¹⁵

Avaliação comportamental

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Houve um efeito significativo do fator dieta na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(3,55)}=5,75$, $p<0,005$). A análise post-hoc mostrou que esta medida no grupo CT foi menor do que o grupo CP, e este, menor do que os grupos C e CL (Fig. 1A). Para a porcentagem de tempo de permanência nesses braços ($F_{(3,55)}=5,87$, $p<0,005$) os valores foram menor para os grupos CP e CT quando comparados aos grupos C e CL (Fig. 1B).

A frequência de entradas em relação as três porções dos braços abertos mostrou efeitos significativos de porção ($F_{(2,110)}=105,27$, $p<0,0001$), e dieta ($F_{(3,110)}=5,05$, $p<0,005$). Análises post hoc do fator porção mostraram entradas significativamente menores nas porções distais dos braços abertos (Fig. 2A). A frequência de entradas no final dos braços abertos (porção 3) mostrou um efeito significativo de dieta ($F_{(3,55)}=4,79$, $p<0,005$), com post hoc mostrando que CP e CT, mas não os animais CL, tiveram menos entradas na porção distal dos braços abertos (porção 3) em comparação com os animais C (Fig. 2B).

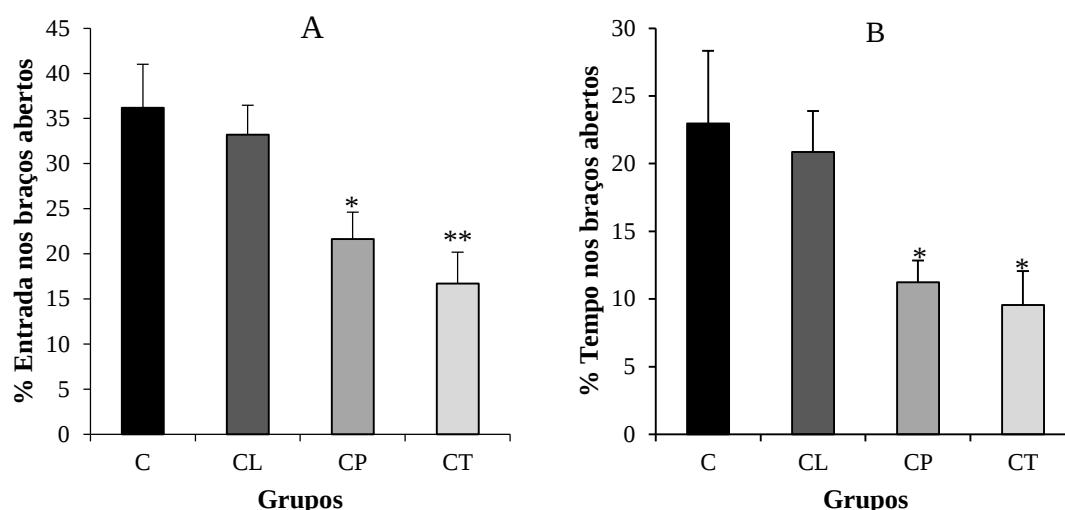


Figura 1. Porcentagem de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B) no LCE. Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). * $p < 0,005$ comparados aos grupos C e CL. ** $p < 0,005$ comparado aos grupos C, CL e CP.

O número de head dippings desprotegidos apresentou efeito de dieta ($F_{(3,55)}=3,94$, $p < 0,05$), com os grupos CP ($5,84 \pm 1,05$) e CT ($5,17 \pm 1,23$) apresentando menor frequência quando comparado ao grupo CL ($10,08 \pm 2,18$). Nenhum dos outros parâmetros do teste LCE apresentou diferença estatística entre os grupos.

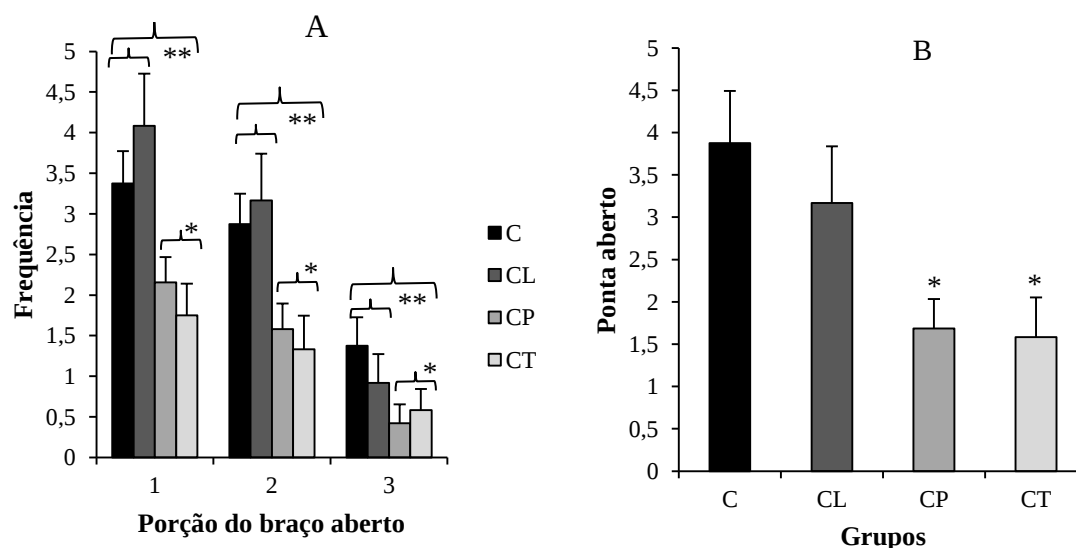


Figura 2. Frequência de entradas nas porções dos braços abertos (A) e frequência de entrada no final dos braços abertos (B). Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). * $p < 0,005$ comparados aos grupos C e CL. ** $p < 0,0001$ comparado as porções.

Campo Aberto

A frequência do comportamento de rearing no aparato redondo apresentou efeito significativo de dia no teste ($F_{(2,108)}=19,08$, $p<0,0001$) com valores maiores no primeiro dia quando comparado ao segundo e terceiro dia do teste. Também foi demonstrado um efeito de dieta ($F_{(3,108)}=4,59$, $p<0,01$), com o grupo CP apresentando menor frequência quando comparado aos grupos CL e C (Fig. 3A)

O grooming no aparato quadrado mostrou efeito de dia no teste ($F_{(2,106)}=14,68$, $p<0,0001$), com menor frequência no primeiro dia do que no segundo e terceiro dia. Houve também efeito de dieta ($F_{(3,106)}=4,03$, $p<0,05$), com a frequência desse comportamento maior no grupo CP do que nos grupos CL e CT (Fig. 3B).

Em relação aos demais parâmetros avaliados nos aparatos quadrado e redondo houve apenas um efeito de dia no teste, com as medidas dos parâmetros sendo maiores no primeiro dia do teste do que no segundo e terceiro dia, indicando um processo de habituação ao longo dos dias.

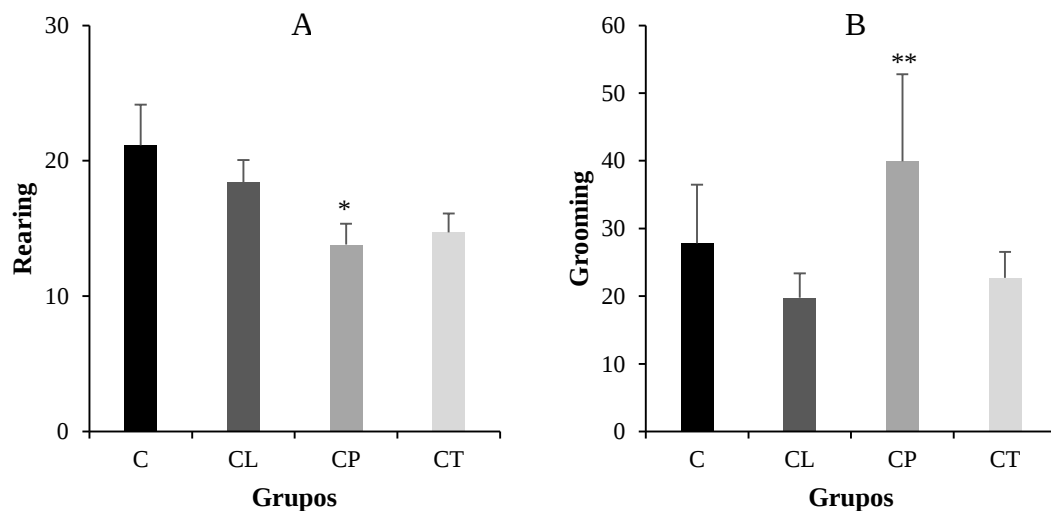


Figura 3. Rearing (A) e Grooming (B) no teste do Campo Aberto. Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12). * $p<0,01$ comparados aos grupos C e CL. ** $p<0,05$ comparados aos grupos C e CL.

Avaliação fisiológica

Avaliação do peso corporal, consumo e preferência alimentar

Em relação ao peso corporal dos animais, houve efeitos significativos da dieta ($F_{(3,561)}=4,84$, $p<0,005$), idade ($F_{(11,561)}=4226,07$, $p<0,0001$), e interação entre dieta e idade ($F_{(33,561)}=16,74$, $p<0,0001$). As comparações post hoc mostraram maior peso nos animais dos

grupos CP e CT quando comparados aos animais do grupo C aos 63, 77 e 84 dias de vida. Além disso, esta análise também mostrou um maior peso dos grupos CP, CL e CT em comparação com o grupo C aos 70, 91 e 98 dias, enquanto o grupo CT teve um peso maior do que os grupos CP e CL aos 91 e 98 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Peso dos ratos Wistar em cada grupo nutricional, do desmame até os 98 dias de vida

Grupos Nutricionais	Peso Corporal											
	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98
C	68,38	133,20	215,14	292,24	365,65	432,67	481,99	521,77	553,34	579,86	602,28	622,09
	±1,02	±2,32	±3,90	±5,62	±6,72	±8,46	±9,49	±10,65	±11,39	±11,70	±11,30	±12,90
CP	59,73	107,81	187,51	274,87	359,22	440,44	507,14 ^a	563,20 ^a	602,58 ^a	655,47 ^a	675,56 ^a	707,69 ^a
	±1,21	±3,89	±6,87	±9,58	±10,88	±13,31	±14,90	±15,58	±17,79	±13,98	±18,96	±19,86
CL	80,38	139,20	224,54	307,75	390,65	467,63	527,19	575,05 ^a	609,74	636,74	651,29 ^a	672,22 ^a
	±2,72	±3,30	±3,98	±4,53	±6,25	±7,68	±8,90	±9,32	±11,00	±11,89	±8,35	±7,24
CT	70,81	114,06	199,83	293,64	387,76	463,13	535,75 ^a	597,89 ^a	655,27 ^a	700,01 ^a	735,09 ^{ab}	773,65 ^{ab}
	±2,39	±3,64	±8,96	±13,58	±16,61	±17,98	±19,80	±21,71	±22,37	±23,40	±22,58	±25,37

^a p<0,001, comparado ao grupo C.

^b p<0,001, comparado ao grupo CP e CL.

C (n=15), CP (n=18), CL (n=12) e CT (n=12).

O consumo alimentar calórico revelou efeitos significativos da dieta ($F_{(3,530)}=29,45$, $p<0,0001$), idade ($F_{(10,530)}=404,13$, $p<0,0001$) e interação dieta por idade ($F_{(30,530)}=5,66$, $p<0,0001$). O grupo CT apresentou maior consumo calórico do que o grupo CP; no grupo CP, maior consumo calórico do que o grupo CL, e o grupo CL, consumo calórico superior ao grupo C (Fig. 4A).

Em relação ao consumo de lipídios, houve efeitos significativos da dieta ($F_{(3,530)}=123,35$, $p<0,005$), idade ($F_{(10,530)}=119,79$, $p<0,005$) e interação dieta por idade ($F_{(30,530)}=11,23$, $p<0,005$). Os animais dos grupos CP e CT apresentaram um maior consumo de lipídios do que os grupos C e CL, durante todas as semanas do experimento (Fig. 4B).

Para o consumo de carboidratos, houve efeitos significativos da dieta ($F_{(3,530)}=6,17$, $p<0,005$), idade ($F_{(10,530)}=343,81$, $p<0,0001$) e interação dieta por idade ($F_{(30,530)}=5,46$, $p<0,0001$). O grupo CT apresentou maior consumo glicídico do que os demais grupos experimentais (Fig. 4C).

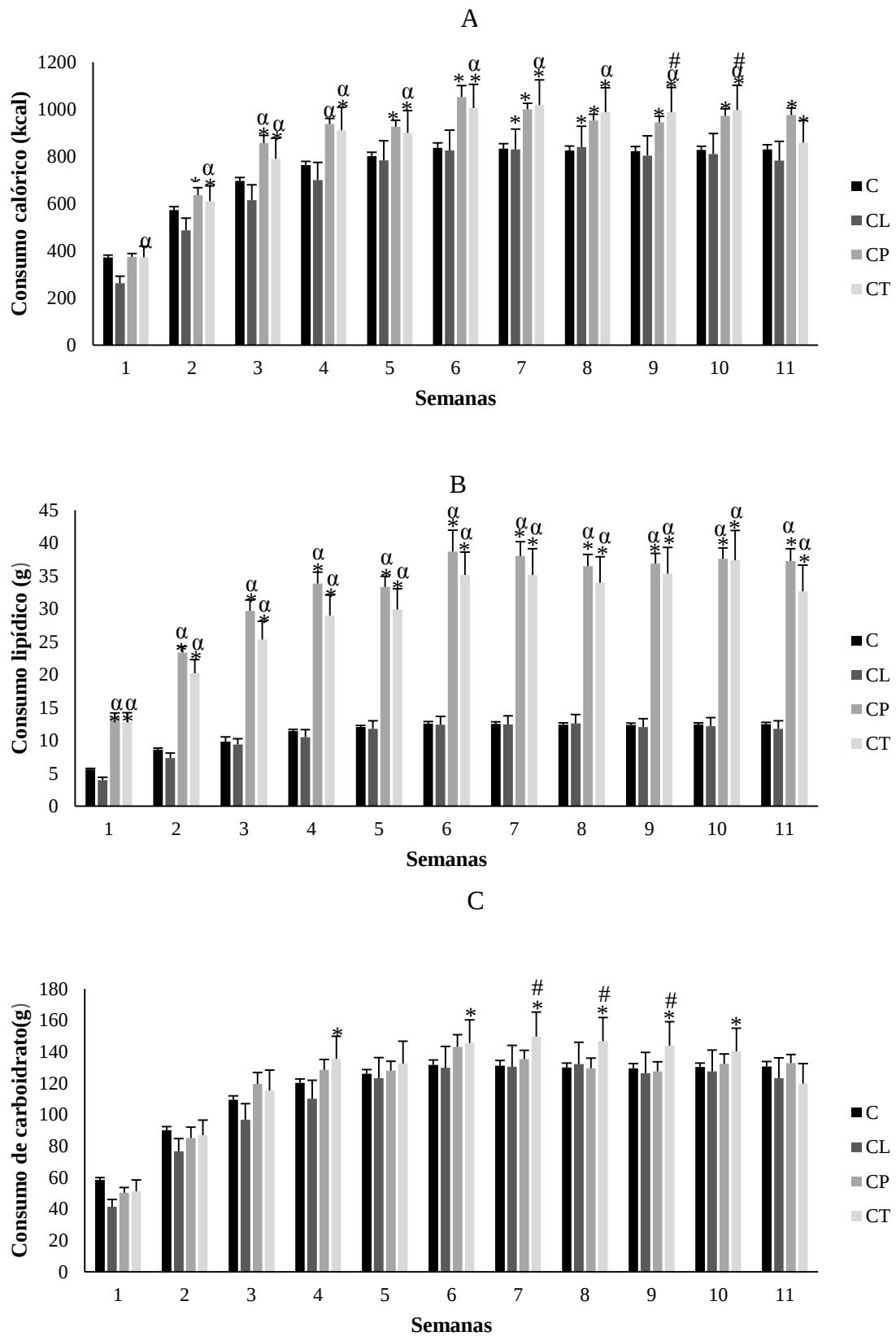


Figura 4. (A) Consumo calórico dos animais, (B) Consumo lipídico e (C) Consumo de carboidrato. Nos grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=12). *p<0,005 comparados ao grupo C. #p<0,005 comparados ao grupo CP. αp<0,005 comparado ao grupo CL.

O consumo de proteínas revelou efeitos significativos da dieta ($F_{(3,530)}=144,51$, $p<0,005$), idade ($F_{(10,530)}=286,79$, $p<0,005$) e interação dieta por idade ($F_{(30,530)}=21,29$, $p<0,005$). Os grupos CP e CT tiveram menor consumo proteico do que o grupo C, e o grupo C, menor consumo de proteína do que o grupo CL (Fig. 5A).

Quanto ao consumo de fibras, houve efeitos significativos da dieta ($F_{(3,530)}=364,69$, $p<0,005$), idade ($F_{(10,530)}=200,18$, $p<0,005$) e interação dieta por idade ($F_{(30,530)}=45,36$, $p<0,005$). O grupo CL apresentou maior consumo de fibras do que o grupo C, e o grupo C, maior consumo de fibras do que os grupos CP e CT (Fig. 5B).

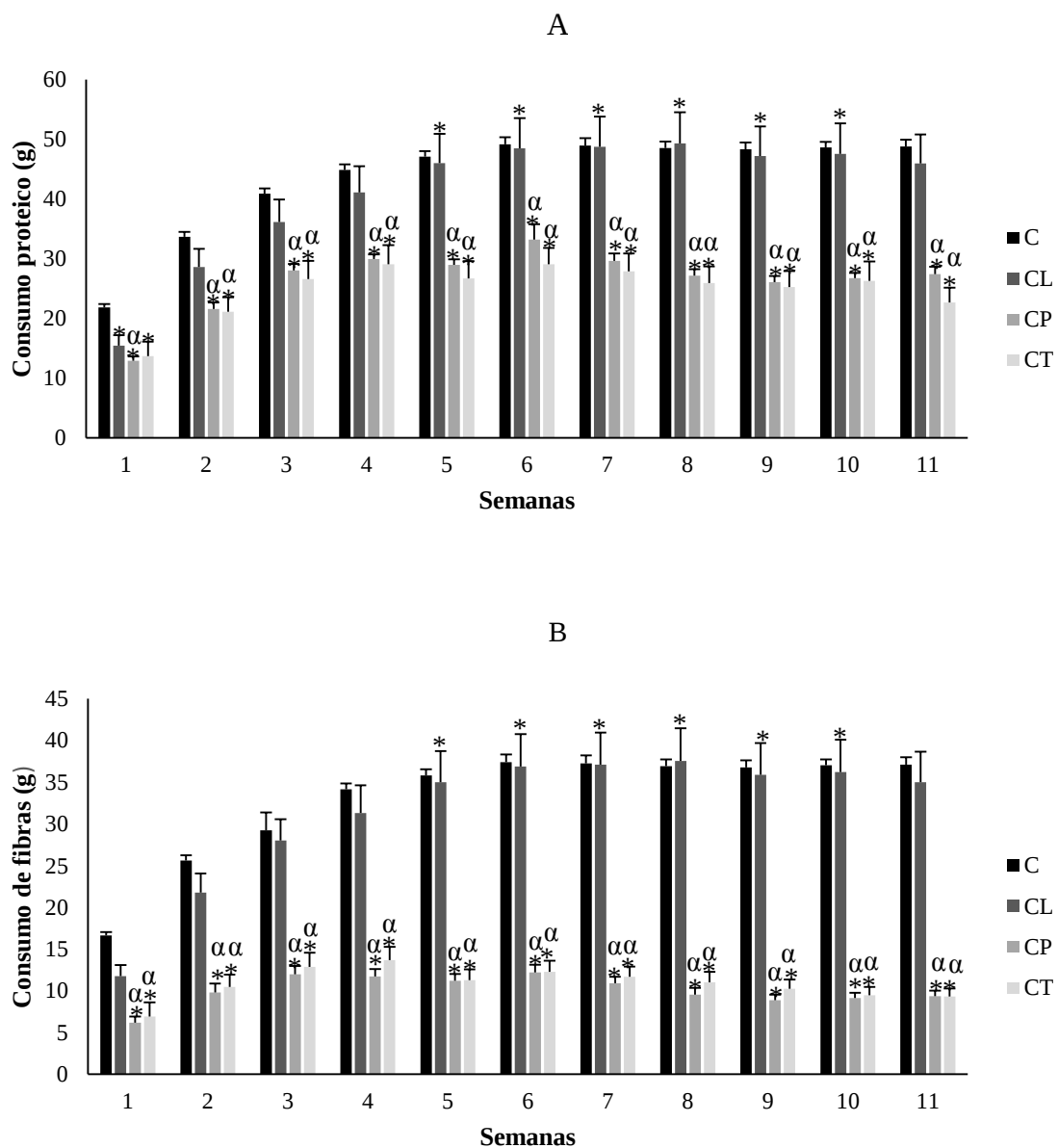


Figura 5. (A) Consumo proteico (g) e (B) de fibras (g) dos animais. Nos grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=12). * $p<0,005$ comparados ao grupo C. α $p<0,005$ comparado ao grupo CL.

Dados de preferência alimentar mostraram efeitos significativos da dieta ($F_{(1,756)}=4,74$, $p<0,05$) com o maior consumo para o grupo CT do que para o grupo CP. Além disso, houve efeito de alimento ($F_{(27,756)}=54,81$, $p<0,0001$) em que o cereal de milho (snow flakes®) e o pão foram os alimentos preferidos, com o consumo acima de 200g para cada alimento, ao longo de todo o experimento. Os alimentos menos consumidos pelos animais foram o chocolate branco, o chocolate ao leite e a castanha do Pará, com o consumo abaixo de 10g para cada alimento.

Avaliação Bioquímica do soro sanguíneo

Os níveis de triglicerídeos ($F_{(3,28)}=7,80$, $p<0,001$) e os níveis de VLDL-colesterol ($F_{(3,28)}=7,80$, $p<0,001$) mostraram efeito significativo da dieta, com valores mais elevados no grupo CP do que nos grupos CL, CT e C. Os níveis de proteínas séricas ($F_{(3,28)}=3,08$, $p<0,05$) também mostraram um efeito significativo da dieta com valores mais elevados no grupo CT do que nos grupos CL e CP. Os níveis de MDA mostraram um efeito significativo da dieta ($F_{(3,28)}=8,23$, $p<0,0005$) com valores mais elevados nos grupos CP e CT do que nos grupos CL e C. Nenhuma das outras análises bioquímicas mostraram diferenças significativas devido ao tratamento com a dieta (Tabela 3).

Tabela 3. Análise bioquímica do soro dos animais

Análise bioquímica	GRUPO			
	C	CL	CP	CT
Glicose	124.22 ± 3.19	122.53 ± 4.36	119.52 ± 5.40	123.95 ± 4.97
Colesterol total (mg/dl)	81,08 ± 5,66	3,82 ± 4,50	80,56 ± 4,26	72,86 ± 5,99
HDL - Colesterol (mg/dl)	52,13 ± 5,52	53,23 ± 3,58	48,53 ± 2,27	51,88 ± 6,03
LDL – Colesterol (mg/dl)	24,09 ± 3,98	14,98 ± 2,20	24,18 ± 3,19	15,34 ± 3,02
VLDL – Colesterol (mg/dl)	4,86 ± 0,37	5,61 ± 0,40	7,85 ± 0,64*	5,64 ± 0,39
Triglicerídeos (mg/dl)	24,31 ± 1,84	28,04 ± 2,00	39,23 ± 3,18*	28,19 ± 1,96
Proteínas totais (g/dl)	6,89 ± 0,21	6,92 ± 0,12	7,00 ± 0,13	7,61 ± 0,28**
Creatinina (mg/dl)	0,94 ± 0,05	1,00 ± 0,06	1,05 ± 0,05	0,89 ± 0,02
Uréia (mg/dl)	33,27 ± 5,26	32,64 ± 5,89	21,87 ± 3,63	19,26 ± 3,37
Bilirrubina (mg/dl)	0,60 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,43 ± 0,09	0,58 ± 0,08
TGO (U/mL)	69,11 ± 3,31	57,51 ± 2,74	63,39 ± 3,65	60,52 ± 3,54
TGP (U/mL)	20,68 ± 0,92	19,88 ± 1,22	20,05 ± 0,83	18,89 ± 0,35
MDA (nmol/gP)	44,09 ± 5,74	40,76 ± 6,31	72,32 ± 3,80***	62,66 ± 4,80***
GSH (nmol/gP)	21,55 ± 2,19	21,25 ± 1,11	23,40 ± 0,91	23,63 ± 1,04
8OHdG (ng/mL)	0,77 ± 0,08	0,75 ± 0,12	0,75 ± 0,09	1,01 ± 0,07

* $p<0,001$ comparado aos grupos C, CL e CT. ** $p<0,05$ comparado aos grupos CL e CP. *** $p<0,0005$ comparado aos grupos CL e C. C (n=08), CP (n=08), CL (n=08) e CT (n=08).

Discussão

Através da análise da composição centesimal dos alimentos que compuseram a dieta de cafeteria do presente estudo evidenciou-se que essa dieta possui alta densidade energética, além de ser rica em carboidratos simples e lipídios, e pobre em proteínas e fibras. Esses dados corroboram com estudos previamente publicados na literatura, utilizando outros procedimentos para avaliar as dietas de cafeteria.^{3,12,8}

Os aumentos do peso dos grupos CP, CT e CL, principalmente ao fim do experimento, mostram que a dieta de cafeteria foi capaz de induzir obesidade nesses animais mesmo quando oferecida apenas durante o período de lactação. Este efeito foi intensificado quando a dieta de cafeteria foi oferecida durante o período total, com o grupo CT apresentando o maior peso. Estudos prévios demonstram que o peso dos animais submetidos a dieta de cafeteria é maior quando comparado aos animais tratados com dieta padrão, levando ao acúmulo de gordura visceral e subcutânea, além de alterações fisiológicas, metabólicas e indução à obesidade.^{11,13,21} Shafat, Murray e Rumsey¹² relataram, ao final do experimento, aumento do peso dos animais, alimentados com dieta de cafeteria ad libitum por um período de 43 dias, quando comparados ao grupo controle. Esse aumento do peso corporal atingiu um nível de significância nos dias 5 a 20, com maior ganho de peso de 20 a 43 dias de idade. Além disso, é interessante que as diferenças de peso corporal entre os grupos só surgiram quando os animais atingiram a idade adulta (63 dias de vida). Isso pode sugerir, a longo prazo, uma mudança no balanço energético (balanço energético positivo), indicando uma ingestão calórica maior do que o gasto energético, favorecendo o ganho de peso à medida que os animais envelhecem. Resultados semelhantes foram observados em um estudo anterior do nosso laboratório com dietas ricas em gordura¹⁷, mostrando que as diferenças no ganho de peso só surgem após 77 dias de idade. Estes resultados sugerem que um longo tempo de exposição a dietas hiperlipídicas parece ser uma variável importante para demonstrar os efeitos obesogênicos dessa dieta.

Os animais que consumiram a dieta de cafeteria durante a lactação apresentaram hiperfagia. O maior consumo alimentar foi no grupo CL, mesmo após o desmame e a retirada da dieta de cafeteria, e no grupo CT, que recebeu essa dieta obesogênica durante todo o experimento. Dados da literatura afirmam que a dieta de cafeteria ad libitum, por um período superior a 30 dias, foi capaz de estimular a hiperfagia em ratos machos Sprague-Dawley desde o primeiro dia de exposição a essa dieta. Os ratos alimentados com a dieta controle consumiram uma média de $23,3 \pm 0,6$ g de dieta por dia, enquanto os ratos que consumiram a dieta de cafeteria consumiram em média de $29,0 \pm 1,3$ g de dieta de cafeteria por dia. Sendo

assim, os animais do grupo cafeteria consumiram 25% mais de alimentos quando comparados ao grupo controle.⁹ Sabe-se que o aumento do consumo de nutrientes durante a gestação e/ou lactação pode levar a alterações na rede de regulação do apetite hipotalâmico da prole, que está envolvido na homeostase energética, expressando o neuropeptídeo Y (NPY) orexígeno, e suprimindo o neuropeptídeo pró-opio-melanocortina (POMC) anorexígeno. Isso estimula o apetite da prole e leva à hiperfagia persistente durante a vida pós-natal.²²

O consumo calórico foi maior no grupo CT do que no grupo CP, este do que no grupo CL, e este do que no grupo C. Isso mostra que quanto maior o tempo de exposição a dieta de cafeteria, maior o consumo de calorias provenientes desses alimentos. Os dados da literatura corroboram com os dados encontrados neste estudo, que mostraram que o grupo cafeteria consumiu uma média de 158 kJ/rato/dia a mais que o grupo controle.¹²

No presente estudo, o aumento do consumo de lipídios dos grupos CP e CT, associado ao aumento do consumo de carboidrato pelo grupo CT, deve-se ao maior tempo de exposição desses grupos a dieta de cafeteria, rica nesses nutrientes. Corroborando com esses dados, outro estudo evidenciou que a energia do consumo de carboidratos foi elevada em 16% para o grupo cafeteria em relação ao grupo controle, com um aumento exacerbado no consumo de gordura, que foi de 119 kJ/rato/dia, representando 75% do aumento do consumo de energia.¹²

O consumo de proteínas e o consumo de fibras foram menores nos grupos CP e CT, devido à dieta de cafeteria ser pobre nesses nutrientes. Por outro lado, devido à hiperfagia induzida desde a fase de lactação, o grupo CL foi o que apresentou maior consumo proteico e consequentemente maior consumo de fibras devido ao maior consumo de alimentos da dieta comercial imposta durante o período pós-lactação. Corroborando com esses dados, os pesquisadores observaram uma diminuição no consumo de proteínas e um aumento no consumo energético, lipídico e sacarose no grupo cafeteria quando comparado ao grupo controle, com a exposição a essa dieta sendo realizada durante o período de lactação.⁸

Os dados mostram que os alimentos fontes de carboidratos foram os preferidos, dentre eles, o cereal de milho (snow flakes) e o pão, corroborando com os dados da literatura, que afirmam que os ratos têm preferência por alimentos ricos em açúcares e gorduras.^{8,12} Em contrapartida, os pesquisadores observaram que ratos machos Sprague-Dawler preferiram 3 alimentos, dentre os ofertados na dieta de cafeteria, sendo dois deles fontes de proteínas.²³

Os níveis de triglicerídeos foram maiores no grupo CP do que nos demais grupos. Este resultado pode ser devido ao aumento do consumo de lipídios desse grupo em relação aos demais, embora o consumo alimentar em gramas tenha sido igualado ao grupo controle, demonstrando uma maior concentração de gordura na dieta desses animais. Os dados de

Navarro et al.²⁴ diferem dos dados encontrados neste trabalho. Os autores avaliaram as alterações fisiológicas em ratos com 10 semana de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: o grupo cafeteria que recebeu a dieta comercial e os alimentos processados, como biscoito wafer, leite condensado, óleo de palmeira, e a água potável com adição de açúcar, e o grupo controle que recebeu a dieta comercial com água potável. Após seis semanas de tratamento, os animais que receberam a dieta de cafeteria aumentaram a glicose e triglicerídeos séricos.

A elevação dos níveis de MDA nos grupos CP e CT demonstrou que quanto maior o tempo de exposição à dieta de cafeteria maior o estresse oxidativo, corroborando com os dados de Gil-Cardoso et al.¹⁰, mostrando que a exposição a sobrecarga crônica de energia por uma dieta de cafeteria que induz obesidade resultou em inflamação intestinal. Essa inflamação se deve ao aumento do estresse oxidativo, ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROs), ao aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) e ao aumento da expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no intestino dos animais.

No presente estudo, a redução na porcentagem de entradas nos braços abertos, na porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, na frequência de entradas na terceira porção dos braços abertos, bem como na porcentagem de head dippings desprotegidos nos grupos CT e CP indicam que quanto maior o tempo de exposição a dieta de cafeteria, maior o efeito ansiogênico dessa dieta no LCE. Além disso, reforçando esse efeito, evidenciamos a diminuição do número de rearing e o aumento no tempo de grooming do grupo CP comparado aos demais no aparato do campo aberto, sem alteração na capacidade motora dos animais. Esse aumento da ansiedade sugere a associação negativa da obesidade, decorrente da alimentação da dieta de cafeteria, com alterações na homeostase dos organismos desses animais.

Corroborando nossos dados, Da Costa Estrela et al.¹⁴ analisaram o efeito da obesidade associada ao estresse crônico nos parâmetros comportamentais de ratos com 45 dias de idade que foram expostas a quatro grupos de dietas: grupo controle, grupo cafeteria, grupo controle mais estresse e o grupo cafeteria mais estresse, que receberam dieta e água ad libitum. Usando os testes de Campo Aberto, LCE e Nado Forçado, os pesquisadores observaram que os ratos que consumiram a dieta de cafeteria e foram induzidas ao protocolo de estresse mostraram um aumento na atividade ansiogênica e predisseram comportamento depressivo. No entanto, o comportamento exploratório permaneceu inalterado.

Por outro lado, outros estudos demonstraram um efeito ansiolítico da dieta de cafeteria^{8,16,25} Avaliaram os efeitos da dieta de cafeteria sobre comportamentos cognitivos e

não cognitivos em camundongos Swiss, expostos a dieta por 13 semanas ad libitum. No LCE, o grupo de cafeteria mostrou um efeito ansiolítico com aumento no tempo gasto nos braços abertos e uma diminuição no tempo gasto nos braços fechados. No entanto, nenhum efeito da dieta de cafeteria foi observado na locomoção e exploração dos animais no Campo Aberto. Estes efeitos controversos podem ser devido às diferenças no procedimento para expor os animais à dieta de cafeteria como o tipo de animal utilizado, a composição da dieta, a idade dos animais e a duração da exposição à dieta experimental. Tal discrepância de dados na literatura sugere que estudos adicionais são necessários para avaliar como diferentes procedimentos para expor animais a dieta de cafeteria podem afetar o comportamento.

Finalmente, foi demonstrado que os cuidados maternos durante a lactação podem afetar os comportamentos da prole na idade adulta.²⁶ Assim, é possível que as alterações comportamentais observadas no presente estudo possam ser devidas as diferenças nos cuidados maternos induzidos pela dieta de alto consumo de gordura. Apoiando essa hipótese, foi demonstrado²⁷ que uma dieta hiperlipídica induziu aumento no tempo em que a mãe gasta na amamentação, bem como o tempo na postura preferencial de arqueamento, durante o período do ciclo escuro nos dias 3-6 pós-natais. Como não medimos as relações mãe-filhote durante o período de lactação, é possível que alterações na relação como resultado da introdução da dieta de cafeteria pudessem explicar, em parte, as alterações comportamentais observadas posteriormente na prole adulta. Essa possibilidade precisa ser investigada em estudos futuros com o presente protocolo nutricional.

Em resumo, os resultados do presente estudo mostraram que: (a) a dieta de cafeteria leva a hiperfagia, mesmo quando imposta apenas no período de lactação; (b) quanto maior exposição à dieta, maior o aumento do peso corporal, assim como o aumento no consumo de calorias, carboidratos e lipídios, levando ao aumento dos triglicerídeos séricos e estresse oxidativo; (c) a exposição à dieta de cafeteria no período pós-lactação demonstrou efeito ansiogênico nos dois testes comportamentais utilizados; e (d) esse tipo de dieta não afetou a atividade locomotora e exploratório dos animais.

Declarações de isenção de responsabilidade

Contribuidores: Todos os autores contribuíram igualmente.

Financiamento: O apoio financeiro foi fornecido pela Capes.

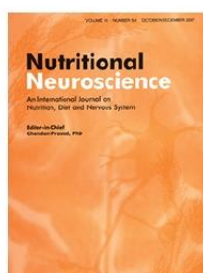
Conflitos de interesse: Os autores relatam não haver conflito de interesse.

Aprovação ética: Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº072/2017).

Referências

1. Champagne DL, Bagot RC, Van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, De Kloet ER. *et al.* Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J neurosci* 2008;28:6037-6045.
2. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological: behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* 2014;26:707-723.
3. Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 2010;151:1451-1461.
4. Costa-Silva JH, De Brito-Alves JL, Barros MA, Nogueira VO, Paulino-Silva KM, De Oliveira-Lira A. *et al.* New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. *Front Physiol* 2015;6.
5. Wells JC. Obesity as malnutrition: the role of capitalism in the obesity global epidemic. *Am J Hum Biol* 2012;24:261-276.
6. West-Eberhard MJ. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005;304:610-618.
7. Muller AP, Tort AH, Gnoatto J, Moreira JD, Vinadé ER, Perry ML. *et al.* Metabolic and behavior effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behav Pharmacol* 2010;21:668-675.
8. Speight A, Davey WG, McKenna E, Voight JPW. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. *Int J Dev Neurosci* 2017;57:34-40.
9. Wright TM, King MV, Davey WG, Langley-Evans SC, Voigt JP. Impact of cafeteria feeding during lactation in the rat on novel object discrimination in the offspring. *Br J Nutr* 2014;112:1933-1937.
10. Gil-Cardoso K, Ginés L, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 2017;117:218-229.
11. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B. *et al.* A physiological characterization of the cafeteria diet modelo of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 2016;167:382-391.
12. Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 2009; 52:34-38.
13. Warneke W, Klauss S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of diferente ages. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;116:45-54.
14. Da Costa Estrela D, da Silva WA, Guimarães AT, de Oliveira Mendes B, da Silva Castro AL, da Silva Torres IL. *et al.* Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiol Behav* 2015;151:252-263.
15. Rebolledo-Solleiro D, Roldán-Roldán G; Díaz D, Velasco M, Larqué C, Rico-Rosillo G. *et al.* Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *Plos One* 2017;12:5:e0176554.
16. Wright, T, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav* 2011;103:164-172.

17. Pini RTB, Ferreira VLDM, Braga CTM, Almeida SS. Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. *Nutr Neurosci* 2017;20:396-408.
18. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 20. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2016.
19. Gerard-Monnier D, Erdelmeier L, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;1176-1183.
20. Costa CM, Santos RCC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:345-350.
21. Castro H, Pomar CA, Picó C, Sánchez J, Palou A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes* 2015;39:430-437.
22. Chen H, Simar D, Morris MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *Plos One* 2009;4:e.6259.
23. Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *Plos One* 2013;08:e60407.
24. Navarro MEL, Dos Santos KC, Do Nascimento AF, Francisqueti FV, Minatel IO, Pierine DT. *et al.* Renal inflammatory and oxidate and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. *J Bras Nefrol* 2016;38:09-14.
25. Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM. *et al.* Effects on palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metab Brain Dis* 2015;30:1073-1082.
26. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedmann A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997;277:1659–62.
27. Purcel RH, Sun B, Pass LL, Power ML. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 2011;104:474–9.



Nutritional Neuroscience

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System



ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ynns20>

Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring

Camyla Rocha de Carvalho Guedine, Liana Clébia de Moraes Pordeus, Tania Regina Riul, Alceu Afonso Jordão Júnior & Sebastião Sousa Almeida

To cite this article: Camyla Rocha de Carvalho Guedine, Liana Clébia de Moraes Pordeus, Tania Regina Riul, Alceu Afonso Jordão Júnior & Sebastião Sousa Almeida (2018): Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2018.1529283](https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1529283)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1529283>



Published online: 05 Oct 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ynns20>



Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring

Camyla Rocha de Carvalho Guedine¹, Liana Clébia de Moraes Pordeus¹, Tania Regina Riul², Alceu Afonso Jordão Júnior ³, Sebastião Sousa Almeida ⁴

¹Graduate Program in Nutrition, UFPB, Cidade Universitária, s/n, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil, ²Nutrition Department, FCBS, UFVJM, Rodovia MGT 367, KM 583, Alto da Jacuba, 5000, Diamantina, MG 39100-000, Brazil, ³Metabolism and Nutrition Laboratory, FMRP, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil, ⁴Behavior and Nutrition Laboratory, FFLCLRP, University of São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

Objective: Evaluate the impact of the cafeteria diet during lactation and/or post-lactation on physiological parameters and anxiety in the offspring of Wistar rats.

Methods: Male offspring of Wistar rats ($n = 60$) were randomized into four groups: Control (C), Lactation Cafeteria (LC), Post-lactation Cafeteria (PC) and Total Cafeteria (TC). Later in adult life the animals were submitted to the behavioral (elevated plus-maze and open field) and biological (body weight, consumption and food preference, glycemia, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, VLDL cholesterol, triglycerides, total proteins, urea, creatinine, bilirubin, serum glutamic oxaloacetic transaminase, serum glutamic pyruvic transaminase, serum protein, and oxidative stress) evaluations. The data were submitted to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

Results: Animals treated with the cafeteria diet presented greater weight measurements compared to the control group. Triglyceride levels were higher in the PC group than in the other groups. MDA levels were higher in the PC and TC group than CL and C. The animals of the PC and TC groups presented higher levels of anxiety compared to the C and LC groups. No significant differences due to diet were observed in the locomotor and exploratory behaviors.

Conclusions: The cafeteria diet ingestion was capable of triggering biological and behavioral alterations in rats.

Keywords: Cafeteria diet, Obesity, Hyperphagia, Cholesterol, Triglycerides, Oxidative stress, Anxiety, Locomotor activity

Introduction

The habits of maternal life are capable of modulating the offspring's phenotype, development, and behavior. More specifically, they are able to alter neural functions and cognitive and neuroendocrine aspects.^{1,2} Among these habits, the consumption of an inappropriate diet during gestation and lactation results in modifications in the mother's and offspring's organisms.^{3–5} This is mainly due to the maternal diet's influence on the milk composition offered to the animals.^{4,5} This phenomenon, known as phenotypic plasticity, refers to the ability of an organism to react to an

internal and external environment with changes in shape, state, physiology or activity rate without genetic modifications.⁶

Diets that promote obesity in animals are more appropriate models for studying the consequences of that disease. Among these manipulations, the cafeteria diet is particularly important because it contains foods such as bacon, nuts, condensed milk, soda, chocolates, potato chips, pate, peanuts, pork pie, cocktail sausages, cheese, jam and other goodies.^{7–9} This diet is a highly palatable diet with a high sodium content, simple carbohydrates, and fats, mainly saturated and or trans fats, in addition to a low protein, dietary fiber, and micronutrient content.³

Several physiological changes are due to the exposure of this type of diet in adulthood. Among

Correspondence to: Sebastião Sousa Almeida, Behavior and Nutrition Laboratory, University of São Paulo (USP), Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto 14040-901, São Paulo, Brasil. Email: sebasalm@usp.br

such changes, hyperphagia, dyslipidemia, increased blood glucose and blood pressure, and oxidative stress can be highlighted.^{7,10–13} However, the effects of this exposure in other phases of life need to be studied further. The consumption of the cafeteria diet is also capable of promoting behavioral changes related to exploratory activity and anxiety in rodents. The studies, however, show controversial results^{13–16} and do not evaluate the consumption of the cafeteria diet during the lactation period compared to the post-lactation period, or with the total period (which involves both the lactation and post-lactation periods).

Therefore, since nutrition during the lactation period plays a critical role in the physiological and behavioral development of the offspring and coupled with a lack of studies, this work seeks to substantiate the late effects caused by the consumption of the cafeteria diet during lactation and/or post-lactation.

Material and methods

Experimental outline

Litters composed of a mother rat and 08 male offspring ($n = 11$) from the Biotério Central at the Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, were randomized into 4 groups: Control (C) animals that received only the commercial diet ($n = 16$); Cafeteria Lactation (CL) animals that received the cafeteria diet during lactation and the commercial diet during post-lactation ($n = 12$); Cafeteria Post-Lactation (CP) animals that received the commercial diet during lactation, and the cafeteria diet in post-lactation ($n = 20$); and Total Cafeteria (CT) animals that received the cafeteria diet throughout the experiment ($n = 12$). The Week 1 begins on the day of birth (day 0). The lactation phase comprehends day 0 to day 21 when weaning occurs. Post-lactation phase begins with the weaning. The female rats were not used in the present study since hormonal fluctuations associated with the estrous cycle can be a confounding factor in behavioral tests. The standard diet used was the Nuvilab® (Nuvital, São Paulo, Brazil) and the cafeteria diet was composed of 28 foods belonging to a list based on a previous study of our group¹⁷ and that was adapted according to the food options available at the local market. The same jar types were used for the standard diet and cafeteria diet. The groups that received the cafeteria diet were offered through 4 jar types, each containing a specific food from the cafeteria diet referring to that day of the week, plus the standard diet offered through the grated lid of the animal's box. Control groups received the standard diet within the 4 jar types (equal to the jar types of the cafeteria group), plus the standard diet offered through the grated lid of the animal's box.

Throughout the entire experiment, the animals received water, experimental diets, and the commercial

food ration ad libitum. They were kept at the constant temperature of ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a light and dark cycle of 12/12 hours with lights on at 06:00 am. All of the experiments were conducted during the light phase of the cycle, starting at 8:00 am.

The behavioral tests started at 70 days of life. After the behavioral evaluation (at 99 days of age) the animals were put on a fast for 12 hours and then euthanized in order to take blood samples for biochemical evaluation.

Centesimal analysis of the food

The centesimal composition analyses of the foods that compose the cafeteria diet and of the commercial food ration offered to the animals were carried out in triplicate. All of the analysis procedures of this composition were obtained from the Official Methods of Analysis of AOAC International.¹⁸ That is, except for the carbohydrate analysis that was carried out by calculating the difference between the macronutrient values of the other analyses that were performed. The total caloric value, expressed in kcal, was calculated according to the Atwater coefficients (carbohydrates: 4 kcal/g; proteins: 4 kcal/g and lipids: 9 kcal/g).

Behavioral evaluation

Elevated Plus-Maze (EPM)

The EPM is formed by two closed arms and two open arms, elevated 50 cm from the ground floor, both 50 cm long by 10 cm wide, and with a central region measuring 10 cm $\times$ 10 cm, located in a room with noise control and lighting of approximately 70 lux. The open arm of the EPM was divided into 3 equal portions, measuring approximately 16.7 cm each portion, in order to differentiate the closest portion to the appliance tip (distal portion) of the closest portion to the center (proximal portion).

The animals were put into the center of the labyrinth individually for 5 minutes. After the exposure of each animal to the apparatus, the apparatus was cleaned with 50% ethyl alcohol in order to avoid olfactory clues.

The traditional parameters evaluated were the entry frequency percentage and the dwell time in the open and closed arms. The percentage of open arms entries was calculated by dividing the number of entries in the open arms by the number of entries in the open plus closed arms $\times 100$. The percentage of time into open arms was calculated by dividing the time into open arms by the time into the open plus closed arms $\times 100$.

In addition, the dwell time in the center, the latency for the 1st entry in the open arm, the entry frequency in each third of the open arm, the exit frequency at the end of the open arm, false entry, number of fecal cakes, number of rearings, number of stretched attend

postures and the number of protected and unprotected head dippings were also analyzed.

Open field

In the open field test, the animals were put into the square open field apparatus, from the brand Insight® Research and Teaching, during three consecutive days. This apparatus consists of a white square acrylic arena with sides of 80 cm and a height of 50 cm. They were later put into a round apparatus, of the same brand, characterized by a circular arena with a wooden base measuring 60 cm in diameter, divided into 08 segments, and surrounded by a white and black stripped acrylic wall measuring 49 cm in height. In order to differentiate the two open field apparatus, we also had the walls striped black and white creating the two environments. The arena's floor was lined with wood shavings. The lighting of the round open field was approximately 70 lux, and of the square open field was approximately 100 lux. After the exposure of each animal to the apparatus, the apparatus was cleaned with 50% ethyl alcohol in order to avoid olfactory clues.

The following behavioral parameters were observed in the previously described apparatuses: latency, total ambulation, ambulation in the apparatus's center and periphery, duration in the center (time in which the animal remained in the center of the apparatus), grooming time, number of rearings and number of fecal cakes. These behaviors were analyzed and computed in a 5-minute observation period for each animal. Such parameters provide measures of general physical motor skills and interest level in the novelty of the environment.

Biological evaluation

Evaluation of body weight, consumption and food preference

The body weight and the food consumption of the animals were determined using a digital electronic balance (Marte®, Brazil). Individual weekly weighings were performed in the post-lactation period in order to determine the respective body weight of each animal throughout the experiment. The food consumption was determined daily from the difference between the quantity of the commercial food ration offered and the quantity that was left over and from the foods that make up the cafeteria diet and the quantity that was left over. This was always done at the same time relating to the previous day. This consumption data made it possible to analyze alimentary preferences.

Biochemical evaluation of blood serum

After a fast of 12 hours, the animals were euthanized and blood samples of 2 ml were collected. These samples were centrifuged for 20 minutes at 3500

rotations per minute (rpm) at 4°C and in a Universal Centrifuge (320 R Hettich Zentrifugen – Germany). Here the serum was separated for a biochemical evaluation that was done through enzymatic tests for glycemia, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, VLDL cholesterol, triglycerides, total proteins, urea, creatinine, bilirubin, Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT), Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT), and serum protein. The specifications of the manufacturer (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) were followed.

The oxidative stress was evaluated through Malondialdehyde (MDA) analysis, which was performed according to the method proposed by Gerard-Monnier et al.¹⁹ with some adaptations, and through the reduced glutathione (GSH) analysis by way of the protocol adopted by Costa, Santos and Lima.²⁰ While damage to deoxyribonucleic acid (DNA) was measured by measuring 8OHdG at the 1:21 dilution through the Elisa oxidative DNA/RNA damage kit (Cayman Chemical, Michigan, USA).

Methods of euthanasia

Anesthetic overdose with sodium pentobarbital (150 mg/kg) with lidocaine (10 mg/kg) administered intraperitoneally.

Statistical analysis

The data were submitted to ANOVA, followed by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$). All data were presented with mean $\pm$ SEM values. The software STATISTICA v.13 (Stat Soft) was used for the statistical analyses.

Results

Centesimal food analysis

The results obtained in the centesimal composition analysis of the food that composed the cafeteria diet and the commercial food ration are found in Table 1.

Behavioral evaluation

Elevated Plus-Maze (EPM)

There was a significant effect of diet on the percentage of open arm entries ($F_{(3,55)} = 5.75$, $p < 0.005$). The post hoc analysis showed that this percentage in the TC group was lower than the PC group, and in the PC group, it was lower than the C and LC groups (Fig. 1A). For the dwell time percentage in these arms ($F_{(3,55)} = 5.87$, $p < 0.005$) the values were lower for the PC and TC groups when compared to the C and LC groups (Fig. 1B).

The frequency of entries in the tree portions of the open arms showed significant effects of portion ($F_{(2,110)} = 105.27$, $p < 0.0001$) and diet ($F_{(3,110)} = 5.05$, $p < 0.005$). Post hoc analyses on the portion

Table 1 Centesimal composition of the foods that compose the cafeteria diet and the standard diet offered to the animals (g/100 g)

FOOD	Humidity (g)	Ash (g)	Protein (g)	Lipid (g)	Carbohydrate (g)	Fiber (g)	Calorie (kcal)
Toast (Visconti tradicional®)	6.93 ± 0.04	2.03 ± 0.07	13.05 ± 0.61	5.30 ± 0.01	70.83	1.85 ± 0.33	383
Marshmallow (Haribo®)	13.27 ± 0.12	0.19 ± 0.02	5.35 ± 0.10	0.19 ± 0.01	78.90	2.10 ± 0.18	339
Gibi Peanut Candy (Santa Helena®) ^a	8.22 ± 0.03	1.42 ± 0.02	11.07 ± 0.41	21.67 ± 0.69	52.56	5.06 ± 0.42	450
Italian salami (Perdigão®)	35.5 ± 0.4	5.38 ± 0.05	23.5 ± 0.74	28.7 ± 0.48	4.5	2.42 ± 0.52	370
Cornstarch cookie (Mabel®)	5.05 ± 0.04	1.77 ± 0.01	10.25 ± 0.48	9.02 ± 0.00	71.45	2.45 ± 0.04	408
White Chocolate (Baton®) ^a	1.66 ± 0.02	1.51 ± 0.03	6.41 ± 0.27	32.59 ± 0.70	54.63	3.22 ± 0.11	537
Mozzarella Cheese (Ipanema®)	44.74 ± 0.07	3.32 ± 0.04	23.32 ± 0.92	22.27 ± 0.43	6.02	0.32 ± 0.29	318
Sugar coated corn flakes (SnowFlakes®) ^a	1.63 ± 0.04	2.71 ± 0.01	4.20 ± 0.14	0.59 ± 0.044	87.13	3.75 ± 0.41	371
Chocolate filled cookie (Trakinas®) ^a	1.71 ± 0.09	1.37 ± 0.02	5.37 ± 0.04	18.85 ± 0.47	69.80	2.91 ± 0.18	470
Processed cheese (Polenguiho tradicional®)	55.96 ± 0.45	8.93 ± 0.02	8.47 ± 0.32	24.08 ± 0.03	2.55	0.00	261
Almonds (La Violetera®) ^a	2.68 ± 0.02	2.95 ± 0.006	21.68 ± 0.15	47.30 ± 0.36	18.95	6.43 ± 0.27	588
Doce de leite with coconut in paste (Frimesa®)	26.25 ± 0.69	1.86 ± 0.05	6.68 ± 0.36	0.00 ± 0.00	64.38	0.83 ± 0.08	284
Brazil nut (La Violetera®) ^a	1.93 ± 0.03	3.43 ± 0.04	10.88 ± 0.59	68.52 ± 1.34	4.72	10.53 ± 0.13	679
Queijo prato cheese (Ipanema®)	42.76 ± 0.02	3.34 ± 0.0	23.25 ± 0.45	21.77 ± 0.08	5.82	3.06 ± 0.1	312
Milk chocolate bar (Lacta®) ^a	1.69 ± 0.09	1.65 ± 0.005	5.40 ± 0.24	26.80 ± 0.9	61.26	3.21 ± 0.13	508
Peanut butter (Amendocrem®) ^a	2.23 ± 0.06	2.25 ± 0.0005	13.07 ± 0.33	43.94 ± 0.56	34.26	4.25 ± 0.21	585
White loaf bread (Pullman®) ^a	32.78 ± 0.13	1.96 ± 0.04	7.97 ± 0.17	1.54 ± 0.06	54.76	0.99 ± 0.02	265
Chocolate flavored cereal corn puffs (Nescau®) ^a	4.00 ± 0.04	3.25 ± 0.011	4.17 ± 0.25	1.10 ± 0.011	82.16	5.31 ± 0.26	355
Edam cheese (Tirolez®)	39.09 ± 0.02	3.86 ± 0.02	21.94 ± 0.24	27.14 ± 0.1	7.97	0.00	364
Strawberry rolled wafer cookies (Look®)	3.07 ± 0.03	0.33 ± 0.03	3.87 ± 0.21	21.25 ± 0.72	68.45	3.02 ± 0.54	481
Chocolate filled cake (Ana Maria®)	22.41 ± 0.05	1.33 ± 0.0	4.51 ± 0.58	6.39 ± 0.07	63.26	2.10 ± 0.35	329
Saltine cracker (Duchet®)	3.07 ± 0.04	3.08 ± 0.01	11.83 ± 0.12	9.97 ± 0.05	70.15	1.89 ± 0.23	418
Mortadella (Marba®)	57.04 ± 0.06	4.56 ± 0.01	11.03 ± 0.34	16.09 ± 0.88	6.65	4.63 ± 0.62	216
Chocolate candy (Coloreti®)	1.30 ± 0.02	0.90 ± 0.0	2.45 ± 0.03	19.31 ± 0.27	71.67	4.37 ± 0.75	470
Chocolate filled carrot cake (Ana Maria®)	22.56 ± 0.04	1.25 ± 0.01	4.44 ± 0.57	6.31 ± 0.57	64.43	1.00 ± 0.39	332
Bacon (Sadia®) ^a	28.07 ± 0.93	2.01 ± 0.02	11.57 ± 0.34	52.97 ± 2.13	0	5.97 ± 0.47	521
Chocolate filled wafer cookie (Bauducco®) ^a	2.01 ± 0.03	0.99 ± 0.004	4.96 ± 0.11	24.13 ± 0.19	64.88	3.02 ± 0.07	496
Skinless toasted peanuts (Santa Helena®) ^a	1.69 ± 0.009	2.59 ± 0.07	20.27 ± 0.99	52.06 ± 0.20	12.70	10.70 ± 0.58	600
Nuvilab Commercial Ration (Nuvital®) ^a	9.42 ± 0.09	7.59 ± 0.09	17.68 ± 0.17	4.51 ± 0.05	47.35	13.45 ± 0.47	301

^aSource: PINI et al.¹⁵.

factor showed significant lower entries in the distal portions of the open arms (Fig. 2A). Frequency of entries at the end of the open arms (portion 3) showed a significant effect of diet ($F_{(3,55)} = 4.79$, $p < 0.005$), with post hoc showing that PC and TC but not LC animals had lower entries in the more distal

portion of the open arms (portion 3) as compared with C animals (Fig. 2B).

The number of unprotected head dippings showed dietary effect ($F_{(3,55)} = 3.94$, $p < 0.05$), with the PC (5.84 ± 1.05) and TC (5.17 ± 1.23) groups presenting a lower frequency when compared to the LC group

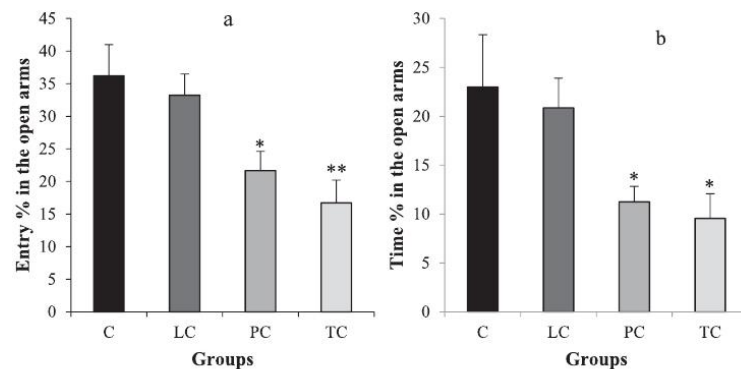


Figure 1 Entry percentage (A) and dwell time percentage in the open arms (B) of the EPM. The C ($n = 16$), LC ($n = 12$), PC ($n = 19$) and TC ($n = 12$) groups. * $p < 0.005$ compared to the C and LC groups. ** $p < 0.005$ compared to the C, LC and PC groups.

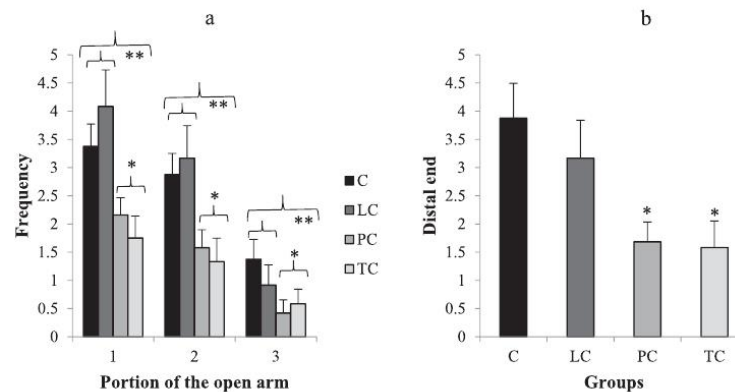


Figure 2 Entry frequency in the open arm portions (A) and exit frequency at the end of the open arms (B). The C ($n = 16$), LC ($n = 12$), PC ($n = 19$) and TC ($n = 12$) groups. * $p < 0.005$ compared to the C and LC groups. ** $p < 0.0001$ compared to the portions.

(10.08 ± 2.18). None of the other parameters in the EPM test presented a statistical difference between the groups.

Open field

The frequency of rearing behavior in the round apparatus showed a significant effect of the day of the test ($F_{(2,108)} = 19.08$, $p < 0.0001$), with higher values on the first day when compared to the second and third days of the test. It was also showed a diet effect ($F_{(3,108)} = 4.59$, $p < 0.01$), with the PC group presenting lower frequency when compared to the LC and C groups (Fig. 3A).

The grooming in the square apparatus showed an effect of the day of the test ($F_{(2,106)} = 14.68$, $p < 0.0001$), with a lower frequency on the first day than on the second and third days. There was also a diet effect ($F_{(3,106)} = 4.03$, $p < 0.05$), with the frequency

of this behavior being higher in the PC group than in the LC and TC groups (Fig. 3B).

Regarding the other parameters evaluated in the square and round apparatuses, there was only an effect of day of the test, with the parameter measures being higher on the first day of the test than on the second and third days, indicating a habituation process across days.

Physiological evaluation

Evaluation of body weight, consumption and food preference

Regarding the animals' body weight there were significant effects of diet ($F_{(3,561)} = 4.84$, $p < 0.005$), age ($F_{(11,561)} = 4226.07$, $p < 0.0001$) and diet by age interaction ($F_{(33,561)} = 16.74$, $p < 0.0001$). The post hoc comparisons showed higher weight in the animals from the PC and TC groups as compared with

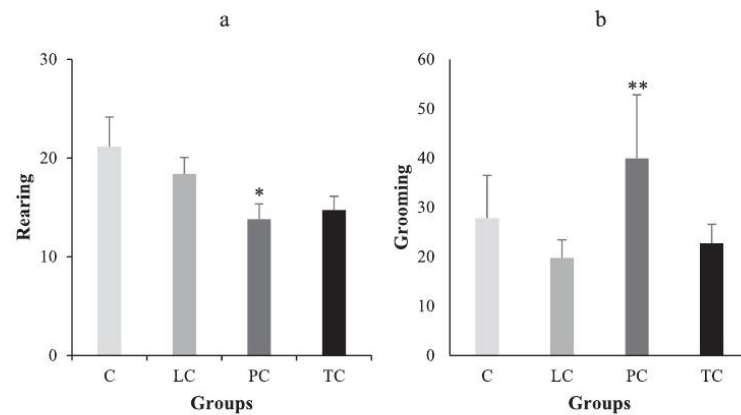


Figure 3 Rearing (A) and Grooming (B) in the Open Field test. Groups C ($n = 16$), LC ($n = 12$), PC ($n = 19$) and TC ($n = 12$). * $p < 0.01$ compared to the C and LC groups. ** $p < 0.05$ compared to the C and LC groups.

animals from the C group at 63, 77 and 84 days of life. In addition, this analysis also showed a higher weight from the PC, LC and TC groups as compared with the C group at 70, 91 and 98 days, while the TC group had a higher weight than the PC and LC groups at 91 and 98 days (Table 2).

The caloric consumption showed significant effects of diet ($F_{(3,530)} = 29.45$, $p < 0.0001$), age ($F_{(10,530)} = 404.13$, $p < 0.0001$) and diet by age interaction ($F_{(30,530)} = 5.66$, $p < 0.0001$). The TC group had a higher caloric consumption than the PC group; the PC group a higher caloric consumption than the LC group; and the LC group a higher caloric consumption than the C group (Fig. 4A).

Regarding lipid consumption, there were significant effects of diet ($F_{(3,530)} = 123.35$, $p < 0.005$), age ($F_{(10,530)} = 119.79$, $p < 0.005$) and diet by age interaction ($F_{(30,530)} = 11.23$, $p < 0.005$). The animals from the PC and TC groups had a higher lipid consumption than the C and LC groups during all weeks of the experiment (Fig. 4B).

For carbohydrate consumption, there were significant effects of diet ($F_{(3,530)} = 6.17$, $p < 0.005$), age ($F_{(10,530)} = 343.81$, $p < 0.0001$) and diet by age interaction ($F_{(30,530)} = 5.46$, $p < 0.0001$). The TC group had a higher glycemic consumption than all other groups (Fig. 4C).

The protein consumption revealed significant effects of diet ($F_{(3,530)} = 144.51$, $p < 0.005$), age ($F_{(10,530)} = 286.79$, $p < 0.005$) and diet by age interaction ($F_{(30,530)} = 21.29$, $p < 0.005$). The PC and TC groups had lower protein consumption than the C group, and the C group a lower protein consumption than the LC group (Fig. 5A).

Regarding fiber consumption, there were significant effects of diet ($F_{(3,530)} = 364.69$, $p < 0.005$), age ($F_{(10,530)} = 200.18$, $p < 0.005$) and diet by age

interaction ($F_{(30,530)} = 45.36$, $p < 0.005$). The LC group had higher fiber consumption than the C group, and the C group a higher fiber consumption than the PC and TC groups (Fig. 5B).

Dietary preference data showed significant effects of diet ($F_{(1,756)} = 4.74$, $p < 0.05$) with higher consumption for the TC group than for the PC group. In addition, there was a food effect ($F_{(27,756)} = 54.81$, $p < 0.0001$) in which the corn cereal (snow flakes®) and the bread were the preferred foods, with the consumption above 200 g for each food throughout the entire experiment. The foods less consumed by the animals were the white chocolate, milk chocolate, and the Brazil nut, with the consumption below 10 g for each food.

Biochemical evaluation of the blood serum

The triglyceride levels ($F_{(3,28)} = 7.80$, $p < 0.001$) and the VLDL cholesterol levels ($F_{(3,28)} = 7.80$, $p < 0.001$) showed significant effects of diet with higher values in the PC group than in the LC, TC and C groups. The serum protein levels ($F_{(3,28)} = 3.08$, $p < 0.05$) also showed a significant effect of diet with higher values in the TC group than the LC and PC groups. The MDA levels showed a significant effect of diet ($F_{(3,28)} = 8.23$, $p < 0.0005$) with higher values in the PC and TC groups than in the LC and C groups. None of the other biochemical analyses showed significant differences due to diet treatment (Table 3).

Discussion

Through the centesimal composition of the foods that composed the cafeteria diet in the present study evidenced that this diet has a high energy density, besides being rich in simple carbohydrates and lipids, and poor in proteins and fibers. This data corroborates

Table 2 Weight of the Wistar rats in each nutritional group from weaning until 98 days of life

Nutritional Groups	Body Weight (days of life)									
	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
C	68.38 ± 1.02	133.20 ± 2.32	215.14 ± 3.90	292.24 ± 5.62	365.65 ± 6.72	432.67 ± 8.46	481.99 ± 9.49	521.77 ± 10.65	553.34 ± 11.39	579.86 ± 11.70
PC	59.73 ± 1.21	107.81 ± 3.89	187.51 ± 6.87	274.87 ± 9.58	359.22 ± 10.88	440.44 ± 13.31	507.14 ± 14.90	563.20 ± 15.58	602.58 ± 17.79	655.4 ^{ab} ± 13.98
LC	80.38 ± 2.72	139.20 ± 3.30	224.54 ± 3.98	307.75 ± 4.53	390.65 ± 6.25	467.63 ± 7.68	527.19 ± 8.90	575.05 ^a ± 9.32	609.74 ± 11.00	636.74 ± 11.89
TC	70.81 ± 2.39	114.06 ± 3.64	199.83 ± 8.96	293.64 ± 13.58	387.76 ± 16.61	463.13 ± 17.98	535.75 ^b ± 19.80	597.89 ^a ± 21.71	655.27 ^b ± 22.37	700.01 ^b ± 23.40

^a*p* < 0.001, compared to the C group.^b*p* < 0.001, compared to the PC and LC groups.

C (n = 15), PC (n = 18), LC (n = 12) and TC (n = 12).

previously reported studies in the literature utilizing other procedures to evaluate cafeteria diets.^{3,8,12}

The weight increases in the PC, TC and LC groups, mainly at the end of the experiment, shows that the cafeteria diet was capable of inducing obesity in these animals even when offered only during the lactation period. This effect was intensified when the cafeteria was offered during the total period, with the TC group presenting the highest weight. Previous studies have shown that the weight of the animals submitted to the cafeteria diet is higher when compared with animals treated with a standard diet, leading to the accumulation of visceral and subcutaneous fat, as well as physiological, metabolic and obesity-induced changes.^{11,13,21} Shafat, Murray and Rumsey¹² reported, at the end of the experiment, an increased weight in the animals fed with the cafeteria diet ad libitum for a 43-day period, when compared to the control group. This body weight increase reached a level of significance on days 5 to 20, with a greater weight gain from 20 to 43 days of age. In addition, it is interesting that the differences in body weight between the groups only emerged when the animals reached adulthood (63 days of life). This may suggest, in the long term, a change in the energy balance (positive energy balance) indicating a caloric intake greater than the energy expenditure, thus favoring the weight gain as the animals get older. Similar results were observed in a previous study from our laboratory with high-fat diets,¹⁷ showing that the differences in weight gain emerge only after the age of 77 days. These results suggest that a long time of exposure to high-fat diets seems to be an important variable to demonstrate the obesogenic effects of these diets.

The animals that consumed the cafeteria diet during lactation had hyperphagia. The highest food consumption was in the LC group, even after the weaning and the withdrawal from the cafeteria diet, and in the TC group, which received this obesogenic diet throughout the entire experiment. Data from the literature affirms that the cafeteria diet ad libitum, for a period of more than 30 days, was capable of stimulating hyperphagia in male Sprague–Dawley rats from the very first day of exposition to this diet. The rats fed with the control diet consumed an average of 23.3 ± 0.6 g of food per day, while the rats that consumed the cafeteria diet consumed an average of 29.0 ± 1.3 g of cafeteria diet food per day. Thus, the animals from the cafeteria groups consumed 25% more food when compared to the control group.⁹ It is known that an increased consumption of nutrients during gestation and/or lactation can lead to changes in the regulation network of the offspring's hypothalamic appetite, which is involved in energy homeostasis, by expressing the orexigenic neuropeptide Y (NPY), and suppressing the anorexigenic proopiomelanocortin neuropeptide

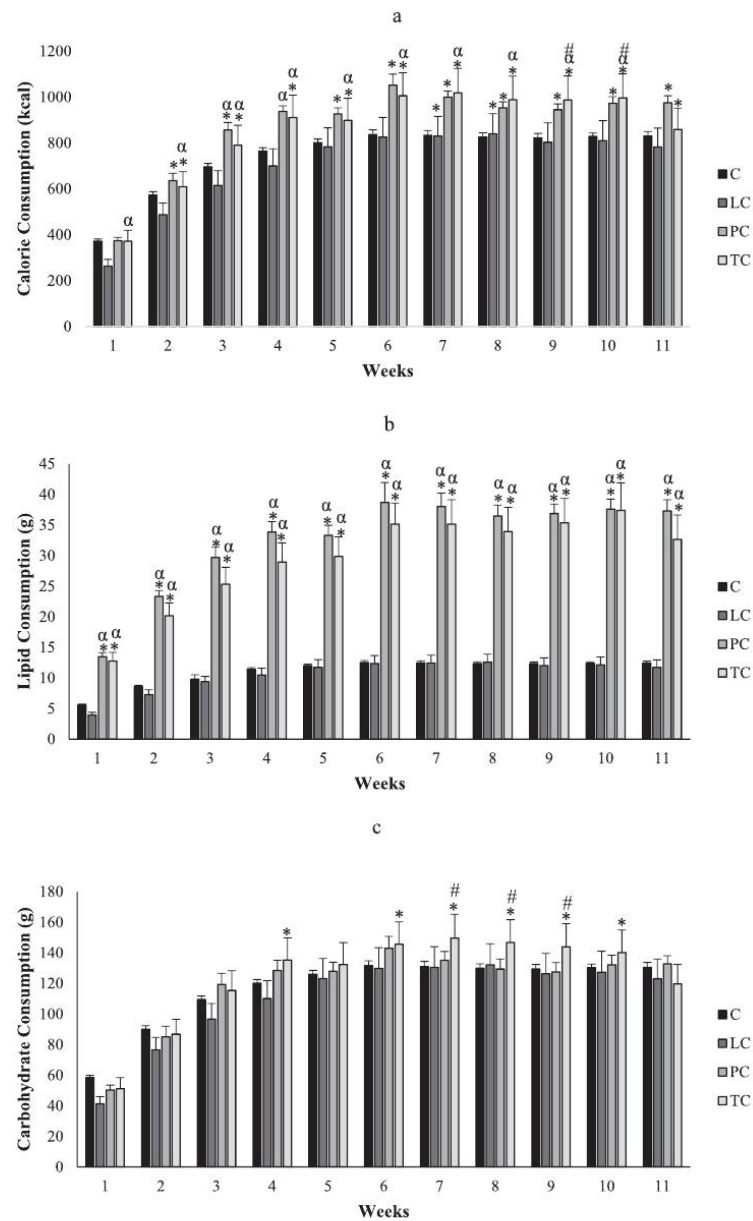


Figure 4 (A) Caloric consumption by the animals, (B) Lipid consumption and (C) Carbohydrate consumption. In the C ($n = 15$), LC ($n = 12$), PC ($n = 18$) and TC ($n = 12$) groups. * $p < 0.005$ compared to the C group. # $p < 0.005$ compared to the PC group. α $p < 0.005$ compared to the LC group.

(POMC). This stimulates the offspring's appetites and leads to persistent hyperphagia during postnatal life.²²

The caloric consumption was higher in the TC group than in the PC group, higher caloric in the PC than in the LC group, and the higher in the LC group than in the C group. This shows that the

longer the exposure time to the cafeteria diet, the higher the caloric consumption of these foods. The data from the literature corroborate the data found in this study, which showed that the cafeteria group consumed an average of 158 kJ/rat/day more than the control group.¹²

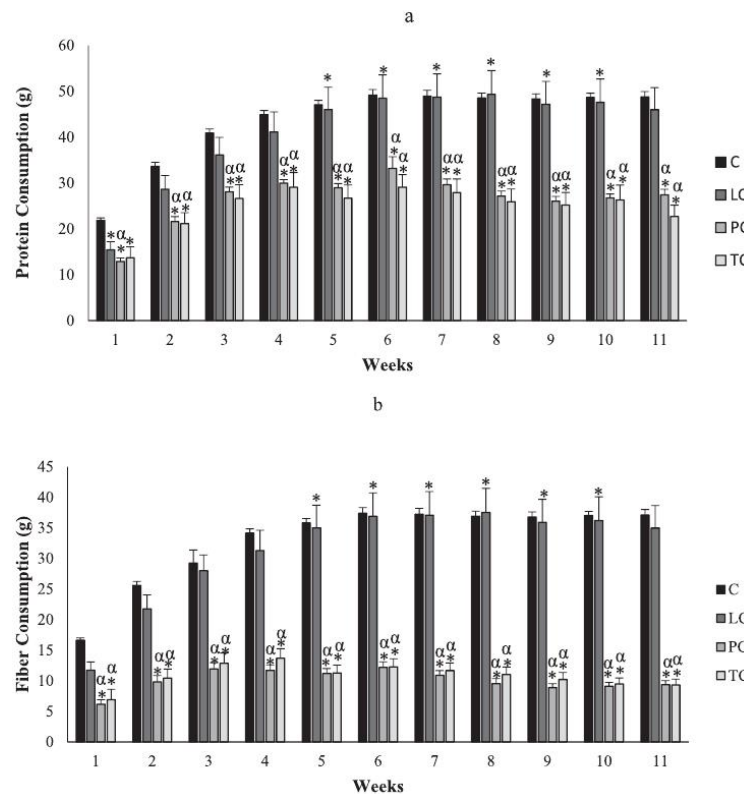


Figure 5 (A) Protein consumption (g) and (B) fiber consumption (g) of the animals. In the C ($n = 15$), LC ($n = 12$), PC ($n = 18$) and TC ($n = 12$) groups. * $p < 0.005$ compared to the C group. $\alpha p < 0.005$ compared to the LC group.

In the present study, the increase in the lipid consumption of the PC and TC groups, associated with the increase in carbohydrate consumption by the TC

group, is due to the longer exposure time of these groups to the cafeteria diet, which is rich in these nutrients. Corroborating this data, another study showed

Table 3 Biochemical analysis of the animals' serum

Biochemical analysis	GROUP			
	C	LC	PC	TC
Glucose	124.22 $\pm$ 3.19	122.53 $\pm$ 4.36	119.52 $\pm$ 5.40	123.95 $\pm$ 4.97
Total cholesterol (mg/dl)	81.08 $\pm$ 5.66	3.82 $\pm$ 4.50	80.56 $\pm$ 4.26	72.86 $\pm$ 5.99
HDL – Cholesterol (mg/dl)	52.13 $\pm$ 5.52	53.23 $\pm$ 3.58	48.53 $\pm$ 2.27	51.88 $\pm$ 6.03
LDL – Cholesterol (mg/dl)	24.09 $\pm$ 3.98	14.98 $\pm$ 2.20	24.18 $\pm$ 3.19	15.34 $\pm$ 3.02
VLDL – Cholesterol (mg/dl)	4.86 $\pm$ 0.37	5.61 $\pm$ 0.40	7.85 $\pm$ 0.64*	5.64 $\pm$ 0.39
Triglycerides (mg/dl)	24.31 $\pm$ 1.84	28.04 $\pm$ 2.00	39.23 $\pm$ 3.18*	28.19 $\pm$ 1.96
Total protein (g/dl)	6.89 $\pm$ 0.21	6.92 $\pm$ 0.12	7.00 $\pm$ 0.13	7.61 $\pm$ 0.28**
Creatinine (mg/dl)	0.94 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.02
Urea (mg/dl)	33.27 $\pm$ 5.26	32.64 $\pm$ 5.89	21.87 $\pm$ 3.63	19.26 $\pm$ 3.37
Bilirubin (mg/dl)	0.60 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.08
SGOT (U/mL)	69.11 $\pm$ 3.31	57.51 $\pm$ 2.74	63.39 $\pm$ 3.65	60.52 $\pm$ 3.54
SGTP (U/mL)	20.68 $\pm$ 0.92	19.88 $\pm$ 1.22	20.05 $\pm$ 0.83	18.89 $\pm$ 0.35
MDA (nmol/gP)	44.09 $\pm$ 5.74	40.76 $\pm$ 6.31	72.32 $\pm$ 3.80***	62.66 $\pm$ 4.80***
GSH (nmol/gP)	21.55 $\pm$ 2.19	21.25 $\pm$ 1.11	23.40 $\pm$ 0.91	23.63 $\pm$ 1.04
8OHdG (ng/mL)	0.77 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.12	0.75 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.07

* $p < 0.001$ compared to the C, LC and TC groups.

** $p < 0.05$ compared to the LC and PC group.

*** $p < 0.0005$ compared to the LC and C group.

C ($n = 08$), PC ($n = 08$), LC ($n = 08$) and TC ($n = 08$).

that the energy from carbohydrate consumption was increased by 16% for the cafeteria group in relation to the control group, with an exacerbated increase in fat consumption, which was 119 kJ/rat/day, representing 75% of increased energy consumption.¹²

Protein consumption and fiber consumption were lower in the PC and TC groups due to the cafeteria diet being poor in these nutrients. On the other hand, due to the hyperphagia induced since the lactation phase, the LC group was the group that had a higher protein consumption and consequently a higher fiber consumption due to the higher food consumption from the commercial diet imposed during the post-lactation period. Corroborating this data, researchers observed a decrease in protein consumption and an increase in energy, lipid, and sucrose consumption in the cafeteria group when compared to the control group, with the exposure to this diet being performed during the lactation period.⁸

The data shows that the preferred carbohydrate sources were the corn cereal (snowflakes) and the bread, corroborating the data from the literature, which affirms that the rats have a preference for food rich in sugars and fats.^{8,12} In contrast, researchers observed that male Sprague–Dawley rats preferred 3 foods among those offered in the cafeteria diet, two of which were protein sources.²³

Triglyceride levels were higher in the PC group than in all other groups. This result can be due to this group's increase in lipid consumption in relation to the others even though the food consumption in grams was equated with the control group, showing a higher fat concentration from the diet of these animals. The data from Navarro et al.²⁴ differ partially from the data found in this work. The authors evaluated the physiological changes in rats at the age of 10 weeks. Animals were randomized into two groups: the cafeteria group that received the commercial diet and processed foods such as wafer cookies, condensed milk, palm oil, and drinking water with added sugar, and the control group that received the commercial diet with drinking water. After six weeks of treatment, the animals that received the cafeteria diet had an increase in glucose and serum triglycerides.

The elevation of MDA levels in the PC and TC groups demonstrated that the longer the exposure time to the cafeteria diet the higher the oxidative stress, corroborating data from Gil-Cardoso et al.¹⁰, showing that exposure to a chronic energy overload through a cafeteria diet that induces obesity resulted in intestinal inflammation. This inflammation was due to increased oxidative stress, increased reactive oxygen species (ROS), increased myeloperoxidase (MPO) activity and increased tumor necrosis factor alpha gene expression (TNF- α) in the intestines of animals.

In the present study, the reduction in the percentage of open arm entries, in the percentage time spent into open arms, in the frequency of entries in the third portion of the open arms, as well as in the percentage of unprotected head dippings in the TC and PC groups indicates that the longer the exposure time to the cafeteria diet the greater the anxiogenic effect of this diet in the EPM. In addition, reinforcing this effect, we evidenced the decrease in the number of rearings and the increase in the grooming time of the PC group compared to the others in the open field apparatus, without alteration in the motor capacity of the animals. This increase in anxiety suggests the negative association of obesity, arising from nourishment from the cafeteria diet, with alterations in the homeostasis of these animals' systems.

Corroborating our data, Da Costa Estrela et al.¹⁴ analyzed the effect of obesity associated with chronic stress in the behavioral parameters of rats with 45 days of age that were exposed to four diet conditions: the control group, the cafeteria group, the control group plus stress and the cafeteria group plus stress, which received food and water ad libitum. Using the open field, EPM and forced swimming tests the researchers observed that the rats that consumed the cafeteria diet and the rats exposed to the stress protocol showed an increase in anxiogenic activity and predicted depressive behavior. However, the exploratory behavior was unchanged.

On the other hand, other studies have demonstrated an anxiolytic effect of the cafeteria diet.^{8,16,25} They evaluated the effects of a cafeteria diet on cognitive and non-cognitive behaviors in Swiss mice exposed to the diet for 13 weeks, ad libitum. In the EPM, the cafeteria group showed an anxiolytic effect with an increase in time spent in the open arms and a decrease in time spent in the closed arms. However, no effect of the cafeteria diet was observed in the locomotion and exploration in the open field. These controversial effects can be due to differences in the procedure to expose animals to the cafeteria diet as the type of animal used, the diet composition, the age of the animals and the duration of exposition to the experimental diet. Such a discrepancy of data in the literature suggests that additional studies are needed to evaluate how different procedures to expose animals to cafeteria diets can affect behavior.

Finally, it has been showed that maternal care during lactation can affect the offspring behaviors in adulthood.²⁶ Thus, it is possible that behavioral alterations observed in the present study could be due to differences in maternal care induced by the high-fat cafeteria diet. Supporting this assumption it has been demonstrated²⁷ that a high-fat diet induced increase in the time the dam spends nursing as well as time in the preferable arched-back nursing posture, during

the dark cycle period on postnatal days 3-6. As we did not measure mother-pup relationships during the lactation period, it is possible that alterations in the relationship as result to the introduction of cafeteria diet could explain, in part, the behavioral alterations observed latterly in the adult offspring. This possibility needs investigation in future studies with the present nutritional protocol.

In summary, the results of the present study showed that: (a) the cafeteria diet leads to hyperphagia, even when imposed only during the lactation period; (b) the longer the exposure to the diet, the greater the increase in the body weight, as well as, the increase in the consumption of calories, carbohydrates, and lipids, leading to increases in serum triglycerides and oxidative stress; (c) exposure to the cafeteria diet in the post-lactation period showed an anxiogenic effect in the two behavioral test used; and (d) this type of diet did not affect the locomotor and exploratory activity of the animals.

Disclaimer statements

Contributors All of the authors contributed equally.

Funding Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001).

Financing The financial support was provided by CAPES.

Conflicts of interest The authors report no conflicts of interest.

Ethical approval This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (protocol nº072/2017).

ORCID

Alecu Afonso Jordão  <http://orcid.org/0000-0003-1288-0802>

Sebastião Sousa Almeida  <http://orcid.org/0000-0002-1551-9062>

References

- Champagne DL, Bagot RC, Van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, De Kloet ER, et al. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 2008;28:6037-45.
- Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* 2014;26:707-23.
- Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 2010;151:1451-61.
- Costa-Silva JH, De Brito-Alves JL, Barros MA, Nogueira VO, Paulino-Silva KM, De Oliveira-Lira A, et al. New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. *Front Physiol* 2015;6:345.
- Wells JC. Obesity as malnutrition: the role of capitalism in the obesity global epidemic. *Am J Hum Biol* 2012;24:261-76.
- West-Eberhard MJ. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005;304B:610-8.
- Muller AP, Tort AH, Gnoatto J, Moreira JD, Vinadé ER, Perry ML, et al. Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behav Pharmacol* 2010;21:668-75.
- Speight A, Davey WG, McKenna E, Voight JPW. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. *Int J Dev Neurosci* 2017;57:34-40.
- Wright TM, King MV, Davey WG, Langley-Evans SC, Voigt JP. Impact of cafeteria feeding during lactation in the rat on novel object discrimination in the offspring. *Br J Nutr* 2014;112:1933-7.
- Gil-Cardoso K, Ginés L, Pinet M, Ardévol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 2017;117:218-29.
- Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, et al. A physiological characterization of the cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 2016;167:382-91.
- Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 2009;52:34-8.
- Warneke W, Klaus S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;116:45-54.
- Da Costa Estrela D, da Silva WA, Guimarães AT, de Oliveira Mendes B, da Silva Castro AL, da Silva Torres IL, et al. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiol Behav* 2015;151:252-63.
- Rebolledo-Solleiro D, Roldán-Roldán G, Díaz D, Velasco M, Larqué C, Rico-Rosillo G, et al. Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *Plos One* 2017;12(5):e0176554.
- Wright T, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav* 2011;103:164-72.
- Pini RTB, Ferreira VLD, Braga CTM, Almeida SS. Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats. *Nutr Neurosci* 2017;20:396-408.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 20th ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2016.
- Gerard-Monnier D, Erdelmeier L, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1176-83.
- Costa CM, Santos RCC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:345-50.
- Castro H, Pomar CA, Picó C, Sánchez J, Palou A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes* 2015;39:430-7.
- Chen H, Simar D, Morris MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *Plos One* 2009;4:e6259.
- Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *Plos One* 2013;8:e60407.
- Navarro MEL, Dos Santos KC, Do Nascimento AF, Francisquetti FV, Minatel IO, Pierine DT, et al. Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. *J Bras Nefrol* 2016;38:9-14.
- Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM, et al. Effects on palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metab Brain Dis* 2015;30:1073-82.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedmann A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997;277:1659-62.
- Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* 2011;104:474-9.

APÊNDICE B. Artigo 2

O efeito da exposição à dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós lactação sobre parâmetros murinométricos, fisiológicos e comportamentais na prole de ratos Wistar

Periódico: Neuroscience Letter
ISSN: 0304-3940

FI: 2,159

QUALIS: B1 na área de Nutrição

(ANO-BASE 2013-2016)

O efeito da exposição à dieta de cafeteria durante a lactação e/ou pós lactação sobre parâmetros murinométricos, fisiológicos e comportamentais na prole de ratos Wistar

Camyla Rocha de Carvalho Guedine¹, Liana Clébia de Moraes Pordeus¹, Tania Regina Riul², Telma Maria Braga Costa³, Alceu Afonso Jordão Júnior⁴, Leandra Naira Zambelli Ramalho⁵, Sebastião Sousa Almeida^{6*}

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n., João Pessoa, PB 58059-900, Brasil, ²Departamento de Nutrição, FCBS, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rodovia MGT 367, Km 583, 5000, Alto da Jacuba, Diamantina, MG 39100-000, Brasil, ³Curso de Nutrição, Universidade de Ribeirão Preto, Avenida Costabile Romano, 2201, Ribeirão Preto, SP 14096-900, Brasil, ⁴Laboratório de Nutrição e Metabolismo, FMRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brasil, ⁵Laboratório de Patologia Hepática, FMRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brasil, ⁶Laboratório de Nutrição e Comportamento, FFLCLRP, Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brasil.

* Corresponding author:

Universidade de São Paulo (USP), Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14040-901

Laboratório de Nutrição e Comportamento

Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Tel.: +55 (16) 3315-3663

E-mail: sebasalm@usp.br

Highlights

- A dieta de cafeteria provoca alterações nas medidas murinométricas e acúmulo de gordura.
- A dieta de cafeteria prejudica a estrutura hepática e causa peroxidação lipídica nesse tecido.
- A dieta de cafeteria não prejudica a aprendizagem espacial e a memória.

Abstract

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da dieta cafeteria durante a lactação e/ou pós-lactação sobre parâmetros murinométricos, fisiológicos, aprendizagem e memória na prole de ratos *Wistar*. Ratos *Wistar* machos (n=60) foram randomizados em quatro grupos: Controle (C), Cafeteria Lactação (LC), Cafeteria Pós-lactação (PC) e Cafeteria Total (TC). Os animais com 70 dias de vida foram submetidos aos testes comportamentais: Labirinto Aquático de Morris (LAM), memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos, memória de reconhecimento para objetos bidimensionais, além disso, foram realizadas a avaliação do ganho de peso dos animais ao longo do experimento, e no dia da eutanásia foi realizada a avaliação murinométrica, mensurado o peso dos órgãos e gordura abdominal, e posteriormente, realizada a avaliação histopatológica e bioquímica do fígado. Os resultados demonstram que a dieta de cafeteria altera os parâmetros murinométricos, acarreta acúmulo de gordura, altera a estrutura do fígado com a presença de esteatose hepática, além de estresse oxidativo nesse tecido. Além disso, a dieta de cafeteria não causou prejuízo na aprendizagem espacial e memória. Os dados do presente estudo sugerem que a ingestão da dieta de cafeteria é capaz de alterar os parâmetros murinométricos e fisiológicos, sem alterar os parâmetros comportamentais estudados.

Abreviações

C, controle; LAM, labirinto aquático de Morris; LC, cafeteria lactação; PC, cafeteria pós-lactação; TC, cafeteria total.

Palavras-chave

Dieta Hipercalórica; Esteatose hepática; Aprendizagem; Memória

1. Introdução

Os hábitos de vida materna são capazes de modular o fenótipo, o desenvolvimento e o comportamento da prole [1,2,3]. Dentre os insultos nutricionais na lactação pode-se destacar, a dieta de cafeteria, como capaz de induzir a obesidade em animais, sendo um modelo apropriado para estudar as consequências dessa doença [4,5,6]. Diversas são as alterações fisiológicas decorrentes do consumo desse tipo de dieta, como as dislipidemias, esteatose hepática, resistência insulínica, aumento da pressão arterial, entre outras [7,8,9,10,11,5,12].

Evidências recentes sugerem que o cérebro pode ser vulnerável aos efeitos de dietas que induzem a obesidade durante os períodos iniciais da vida, sendo considerado um período de rápido crescimento, maturação e desenvolvimento cerebral [13,14]. Pesquisas utilizando modelos de roedores indicam que a exposição precoce a dietas ricas em gordura ou açúcares simples podem prejudicar processos de aprendizagem e memória dependentes do hipocampo [15,16].

Os estudos, no entanto, não avaliam o consumo da dieta de cafeteria durante o período de lactação comparando com o período de pós-lactação e/ou com o período total (que envolve ambos os períodos da lactação e pós-lactação). Portanto, é relevante investigar se a dieta de cafeteria imposta durante diferentes períodos da vida é capaz de alterar parâmetros murinométricos, fisiológicos, aprendizagem, memória de reconhecimento e memória espacial.

2. Material e Métodos

2.1 Desenho experimental

Ninhadas compostas pela rata-mãe e 08 filhotes machos de ratos *Wistar* (n=11), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, randomizados de forma aleatória em 4 grupos: Controle (C) animais que receberam a dieta comercial (n=16), Cafeteria Lactação (CL) animais receberam a dieta de cafeteria durante a lactação, e a dieta comercial no pós-lactação (n=12); Cafeteria Pós-Lactação (CP) animais que receberam dieta comercial durante a lactação, e dieta de cafeteria no pós-lactação (n=20); e Cafeteria Total (CT) animais que receberam a dieta de cafeteria durante todo experimento (n=12). A semana 1 começa no dia do nascimento (dia 0). A fase de lactação compreende o dia 0 ao dia 21 quando ocorre o desmame e a fase de pós-lactação começa com o desmame. As fêmeas não foram utilizadas no presente estudo, porque as flutuações hormonais associadas com o ciclo estral podem ser um fator de confundimento em testes comportamentais. A dieta comercial usada foi a Nuvilab[®] (Nuvital, São Paulo, Brasil) e a

dieta de cafeteria foi composta por 28 alimentos pertencentes a uma lista elaborada baseada em um estudo anterior do nosso grupo [17] associada à dieta comercial.

Ao longo de todo o experimento, os animais receberam água, dieta experimental e ração comercial *ad libitum*. Eles foram mantidos na temperatura constante de $(23\pm 1^\circ\text{C})$ com um ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com luzes acessas às 06:00 horas. Todos os experimentos foram conduzidos na fase clara do ciclo, a partir das 08:00 horas da manhã.

Os testes comportamentais se iniciaram aos 70 dias de vida. Após a avaliação comportamental (aos 99 dias de idade), os animais foram eutanasiados e sacrificados para retirada dos órgãos que foram pesados, além da coleta do fígado para avaliação bioquímica e histopatológica.

A metodologia desse estudo seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 072/2017).

2.2 Avaliação Fisiológica

2.2.1 Avaliação Murinométrica

Após a realização dos testes comportamentais, foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros físicos: peso corporal, ganho de peso, comprimento naso-anal, circunferência torácica e abdominal, além do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) que corresponde o peso corporal (g)/comprimento naso-anal² (cm²), e do Índice de Lee, que compreende a raiz cúbica do peso corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm) x 100 [18,19].

2.2.2 Peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e avaliação bioquímica do fígado dos animais

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (baço, coração, fígado, rins, suprarrenais e testículos) e gordura abdominal (gordura epididimal e retroperitoneal) foram retirados e pesados.

As amostras do fígado foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , para posterior avaliações. O teor de lipídio foi quantificado pelo método descrito por Bligh & Dyer [20]. Após essa quantificação, a gordura foi suspensa por álcool isopropílico, e foram realizadas as dosagens do teor de colesterol total, triglicerídeos, seguindo as especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As

proteínas hepáticas também foram quantificadas, seguindo as especificações do fabricante (Labtest Diagnostica®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). E a peroxidação lipídica foi determinada através do malondialdeído (MDA) de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al. [21] com algumas adaptações.

2.2.3 Histopatologia do Fígado

Fragmentos de fígado foram fixados em 10% de formalina tamponada durante 48 horas, mantidos em álcool e incorporados em parafina, para análise histológica através da microscopia ótica.

As secções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina foram cortadas em uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. Um patologista cego ao tratamento, utilizou um microscópio de luz binocular (Olympus BX51 – Shinjuku, Tóquio, Japão) para avaliar a porcentagem de animais com esteatose hepática. A análise foi realizada em 30 campos de 40 vezes de aumento escolhidos aleatoriamente (HPFs; ampliação x40) em cada lâmina. A classificação da gravidade da esteatose hepática foi a seguinte: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de esteatose <5%; grau 1, esteatose leve 6-33%; grau 2, esteatose moderada a grave 34-66%; grau 3, esteatose grave > 66%. A inflamação portal e lobular foi pontuada da seguinte forma: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de inflamação; grau 1, inflamação leve; grau 2, inflamação moderada a grave; e grau 3, inflamação grave. O depósito de colágeno foi avaliado utilizando as preparações de Sirius Red como se segue: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de fibrose; grau 1, fibrose moderada; grau 2, fibrose moderada a grave; e grau 3, fibrose severa [22].

2.3 Avaliação comportamental

2.3.1 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O teste do LAM foi realizado de acordo com o descrito por Morris [23] e Pini et al., [24] com algumas modificações. Foram realizadas 12 tentativas diárias durante dois dias consecutivos, totalizando 24 tentativas (fase de aprendizagem) e os seguintes parâmetros foram avaliados: latência de fuga (tempo despendido pelo animal para encontrar a plataforma em cada uma das tentativas), distância percorrida ao longo das tentativas (cm) e a velocidade média do nado ao longo das mesmas (cm/s).

Após as sessões experimentais, no segundo dia, a plataforma foi removida e o animal foi colocado no quadrante diagonalmente oposto àquele que continha a plataforma. Foi

permitido um período de 60 segundos de natação (*probe trial* – 25ª tentativa) e, nesta tentativa, foram analisados os seguintes parâmetros: frequência e duração do animal em cada quadrante, para analisar a precisão da resposta de busca pela plataforma e a efetivação do aprendizado da tarefa. A *probe trial* é uma tentativa de extinção, pois a ausência da plataforma não reforça o comportamento do animal.

Na fase de memória foram realizados retestes em dois momentos distintos, após 7 dias da fase de aprendizagem (reteste 1 – 26ª tentativa), e após 21 dias da fase de teste de aprendizagem (reteste 2 – 27ª tentativa), sendo permitido em cada reteste que os animais nadassem livremente por 180 segundos a fim de verificar a consolidação da memória, através da análise da latência de fuga, da distância percorrida e da velocidade de natação dos animais.

2.3.2 Memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos

O experimento foi conduzido de acordo com o teste previamente descrito por Langston e Wood [25] e Braga [26]. Foram utilizados dois ambientes diferenciados através de pistas que podem ser identificadas pelo animal e dois pares de objetos, nos quais os objetos que compõem um mesmo par eram idênticos. Antes do teste, os animais passaram por uma fase de habituação, permanecendo nos ambientes X e Y por três dias consecutivos em sessões de cinco minutos cada, na ausência dos objetos.

O procedimento possui duas fases de aquisição e uma fase de teste. Na Fase de aquisição 1, o animal foi exposto ao ambiente X, durante cinco minutos na presença dos objetos A1 e A2. Após um intervalo de cinco minutos tem-se a fase de aquisição 2, na qual o animal foi exposto ao ambiente Y na presença dos objetos B1 e B2. Na fase de teste, com um intervalo de cinco minutos, o animal foi exposto ao ambiente X na presença dos dois objetos diferentes (A1 e B1). Durante essa fase, o objeto B1 não pertence àquela localização e contexto. A exploração ao objeto novo ou conhecido foi definida como o ato do animal tocar o mesmo com nariz, com as patas dianteiras e traseiras.

Foi calculado o Índice de Reconhecimento de Contexto (IR-ROC) através da fórmula:
$$\text{IR-ROC} = (\text{tempo de exploração do objeto novo} / \text{tempo de exploração do objeto novo} + \text{tempo de exploração do objeto conhecido}) \times 100.$$

2.3.3 Memória de reconhecimento para objetos bidimensionais

O experimento foi realizado com base no teste previamente descrito por Forwood et al. [27] e Braga [26]. Os animais foram colocados no campo aberto quadrado, onde foram

fixadas nas paredes laterais do aparato, imagens de figuras da natureza em preto e branco com diferentes padrões de preenchimento.

Na fase de aquisição, duas das imagens foram fixadas nas paredes, e foi permitido que o animal explorasse livremente o aparato e as imagens por cinco minutos. Na fase de teste, que ocorreu 24h após a fase de aquisição, uma das imagens foi substituída e o animal foi novamente colocado no aparato para a exploração por cinco minutos. Foi considerado que o animal explorava a imagem quando tocava, cheirava ou olhava para a mesma a uma distância menor ou igual a cinco centímetros.

Foi calculado o Índice de Reconhecimento de Imagem (IR I) através da fórmula: $IR\ I = [\text{Tempo Imagem Nova} / (\text{Tempo Imagem Nova} + \text{Tempo Imagem Conhecida})] \times 100$.

2.4 Métodos de Eutanásia

Sobredose anestésica com pentobarbital sódico (150mg/kg) associado à lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal.

2.5 Análise Estatística

Os dados da histopatologia do fígado foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0, submetidos ao teste de Qui-Quadrado. As análises dos demais dados foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Statistica versão 13, submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todos os dados foram apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

3. Resultados

3.1 Avaliação Fisiológica

3.1.1 Avaliação Murinométrica

Ao final do experimento (98 dias) houve efeito do fator dieta para o peso corporal ($F_{(3,52)}=11,38$, $p < 0,0001$), para o ganho de peso ($F_{(3,52)}=11,83$, $p < 0,0001$), para o comprimento naso-anal ($F_{(3,53)}=5,86$, $p < 0,005$), para a circunferência torácica ($F_{(3,53)}=5,86$, $p < 0,005$), para a circunferência abdominal ($F_{(3,52)}=13,97$, $p < 0,0001$), o IMC ($F_{(3,52)}=7,01$, $p < 0,0005$) e o Índice de Lee ($F_{(3,52)}=4,54$, $p < 0,05$).

A análise post-hoc demonstrou que o peso corporal foi maior no grupo CT do que os demais grupos, além disso o grupo CP apresentou peso corporal maior do que o grupo

controle, enquanto que, o comprimento naso-anal foi maior em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. Em relação ao ganho de peso, o grupo CT apresentou maior ganho de peso do que o grupo CP, e este, do que os grupos CL e C. A circunferência torácica, o grupo CT apresentou uma maior circunferência do que os demais grupos. Enquanto que, a circunferência abdominal foi maior no grupo CT, do que nos grupos CP e CL e estes, do que no grupo C. Animais do grupo CT apresentaram maior IMC e Índice de Lee do que os animais dos grupos CL e C. Além disso, os animais do grupo CP apresentaram maior Índice de Lee do que os animais do grupo CL (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros murinométricos avaliados ao fim do experimento (98 dias de vida dos animais)

Parâmetros murinométricos	GRUPO			
	C	CL	CP	CT
Peso (g)	622,09±12,90 ^{ac}	707,69±19,86 ^a	672,22±7,23 ^{ad}	773,65±25,37 ^b
Ganho de peso (g)	553,71±13,16 ^a	647,96±19,37 ^a	590,52±7,84 ^b	702,84±26,46 ^c
Comprimento naso-anal (cm)	29,77 ± 0,26 ^a	31,17 ± 0,28 ^b	30,58 ± 0,19 ^b	31 ± 0,31 ^b
Circunferência torácica (cm)	20 ± 0,19 ^a	20,58 ± 0,20 ^a	20,72 ± 0,28 ^a	21,63 ± 0,36 ^b
Circunferência abdominal (cm)	22,17 ± 0,40 ^a	23,96 ± 0,43 ^b	24,68 ± 0,29 ^b	26 ± 0,61 ^c
IMC (g/cm ²)	70,22 ± 1,19 ^a	69,43 ± 1,28 ^a	75,54 ± 1,81	80,62 ± 2,74 ^b
Índice de Lee (√ ³ g/cm)	28,68 ± 0,20 ^a	28,16 ± 0,25 ^{a,d}	29,09 ± 0,22 ^{b,c}	29,60 ± 0,38 ^b

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os grupos.

C (n=08), CP (n=08), CL (n=08) e CT (n=08).

3.1.2 Peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e avaliação bioquímica do fígado dos animais

Houve um efeito do fator dieta para o peso do coração ($F_{(3,28)}=3,75$, $p<0,05$), baço ($F_{(3,28)}=5,25$, $p<0,01$), fígado ($F_{(3,27)}=10,33$, $p<0,0005$), testículo ($F_{(3,60)}=5,20$, $p<0,005$), gordura epididimal ($F_{(3,28)}=33,24$, $p<0,0001$) e gordura retroperitoneal ($F_{(3,28)}=38,45$, $p<0,0001$).

A análise post-hoc revelou que o peso do coração foi maior no grupo CT e CP do que no grupo controle. Em relação ao peso do baço, o grupo CT apresentou maior peso do que o grupo CP e C. O peso do fígado foi maior nos grupos experimentais do que no grupo

controle. Enquanto que, os pesos dos testículos foram maiores no grupo CP quando comparado ao grupo CL e CT. Com relação ao peso das gorduras abdominais epididimal e retroperitoneal foi evidenciado que os animais do grupo CT apresentaram maior acúmulo dessas gorduras do que o grupo CP, e este do que o grupo CL e C. Os pesos dos demais órgãos não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Além disso, houve um efeito significativo do fator dieta para os níveis de colesterol ($F_{(3,28)}=4,88$, $p<0,01$) e os níveis de MDA no fígado ($F_{(3,28)}=2,95$, $p<0,05$).

As análises post hoc mostraram que os níveis de colesterol total foram maiores no grupo CL quando comparado aos grupos CP e CT, e no grupo controle quando comparado ao grupo CP. Enquanto que, os níveis de MDA foram maiores nos grupos CL e CT quando comparados ao grupo CP. Todas as outras análises dosadas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do peso dos órgãos e da gordura abdominal dos animais, além do teor lipídico e bioquímica do fígado desses animais

Peso dos órgãos	GRUPO			
	C	CL	CP	CT
Coração	2,21±0,08 ^a	2,34±0,08	2,56±0,10 ^b	2,51±0,07 ^b
Baço	1,19±0,06 ^a	1,32±0,05	1,27±0,04 ^a	1,48±0,06 ^b
Fígado	15,34±0,22 ^a	17,27±0,40 ^b	18,99±0,87 ^b	21,22±1,12 ^b
Rins	1,99±0,03	2,05±0,04	2,10±0,06	2,13±0,06
Suprarrenais	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
Testículos	2,22±0,06	2,36±0,07 ^a	2,03±0,04 ^b	2,20±0,06 ^a
Peso gorduras	C	CL	CP	CT
Gordura epididimal	8,78±0,54 ^a	10,71±0,39 ^a	20,92±1,62 ^b	34,26±3,65 ^c
Gordura retroperitoneal	5,87±0,40 ^a	8,75±0,98 ^a	18,64±1,15 ^b	31,77±3,44 ^c
Teor lipídico e bioquímica do fígado	C	CL	CP	CT
Gordura (g/gT)	0,11±0,02	0,11±0,01	0,17±0,00	0,15±0,02
Proteína (g/dL)	3,37±0,12	3,43±0,12	3,16±0,14	3,39±0,20
Triglicerídeos (mg/gG)	370,15±95,24	456,15±74,83	349,93±88,32	438,82±109,94
Colesterol (mg/gG)	77,63±7,96	75,61±6,43 ^a	43,30±3,23 ^b	50,27±11,63 ^b
MDA (nmol/gT)	39,18±5,93	38,75±7,24 ^a	18,12±2,96 ^b	35,84±6,30 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os grupos. C (n=08), CP (n=08), CL (n=08) e CT (n=08).

3.1.3 Histopatologia do fígado

Apenas os animais do grupo CT atingiram graus 1, 2 ou 3 de esteatose hepática em relação aos grupos CP, CL e C ($p<0,001$). Não foram observadas outras alterações

histológicas como inflamação ou fibrose. A análise histopatológica está representada na Figura 1 e a quantificação do grau de esteatose hepática na Figura 2.

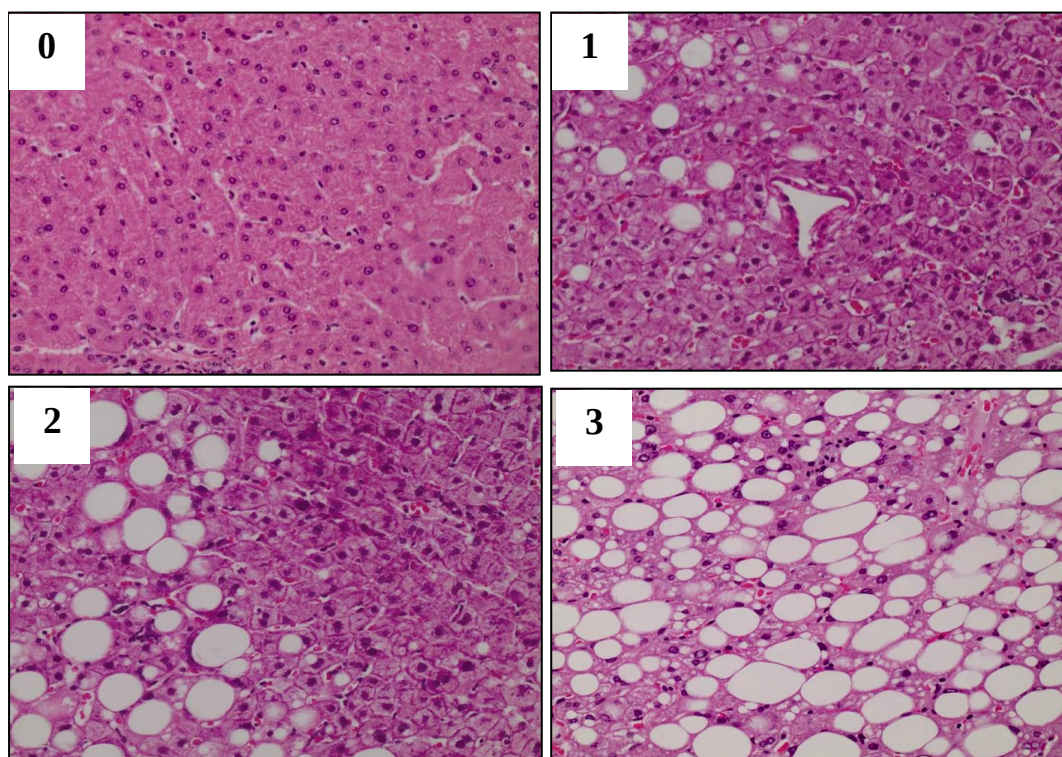


Figura 1. Histopatologia do tecido hepático do fígado, retratando os graus de esteatose hepática (grau 0, 1, 2, 3). Coloração com hematoxilina e com eosina (aumento de 10x).

Nota: a seta indica esteatose.

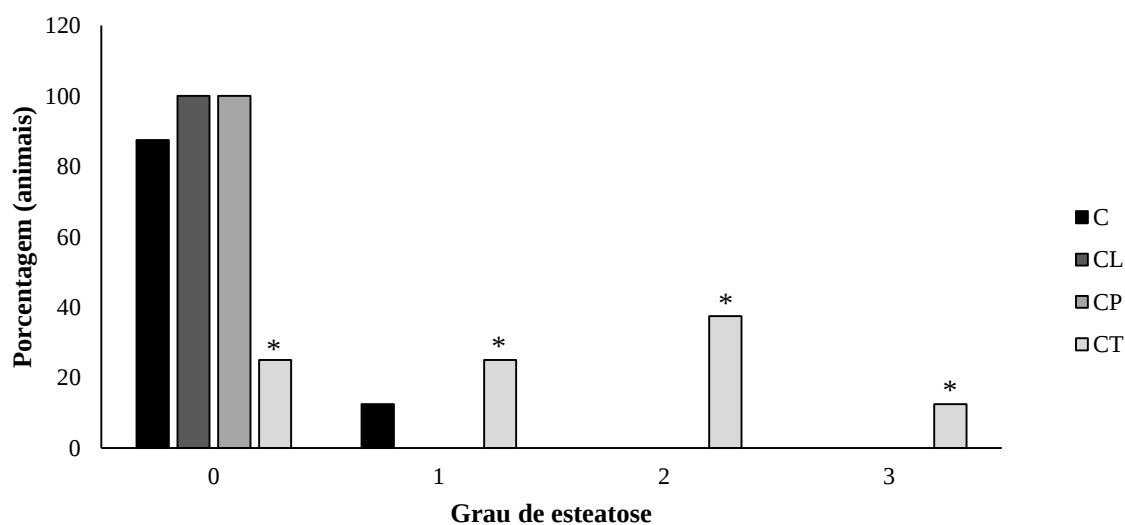


Figura 2. Escore da esteatose hepática nos grupos C (n=08), CL (n=08), CP (n=08) e CT (n=08). * $p < 0,001$ comparado aos grupos CP, CL e C. Teste de Qui-Quadrado.

3.2 Avaliação comportamental

LAM

A latência de fuga ($F_{(3,165)}=92,99$, $p<0,0001$), a distância percorrida ($F_{(3,165)}=120,35$, $p<0,0001$) e a velocidade de natação ($F_{(3,165)}=39,68$, $p<0,0001$) mostraram efeitos significativos de blocos. As análises post-hoc mostraram que a latência de fuga dos animais e a distância percorrida pelos animais foram maiores no bloco 1 do que no bloco 2 e 3, e no bloco 3, maior do que no bloco 4. Enquanto a velocidade de natação dos animais foi maior no bloco 1 quando comparado ao bloco 3, e no bloco 3, maior velocidade de natação quando comparado aos blocos 2 e 4. Em relação aos dados dos animais dos grupos C, CL, CP e CT, na 25ª tentativa (*probe trial*) foi demonstrado efeito na frequência de entrada no quadrante ($F_{(3,162)}=172,59$, $p<0,0001$) e duração de tempo no quadrante ($F_{(3,162)}=8,92$, $p<0,0001$), onde os animais dos 4 grupos nutricionais entraram mais vezes e permaneceram mais tempo no quadrante 1, local onde a plataforma estava anteriormente. No teste de retenção de memória houve efeito de tentativa para os dados de latência de fuga ($F_{(2,108)}=9,10$, $p<0,0005$), sendo maior o tempo para encontrar a plataforma na 26ª e 27ª tentativa do que na 24ª. O mesmo foi observado com a velocidade de natação ($F_{(2,108)}=64,41$, $p<0,0001$) e a distância percorrida pelos animais ($F_{(2,108)}=13,19$, $p<0,0001$).

Memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos

Neste experimento não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 3A).

Memória de reconhecimento para objetos bidimensionais

Neste experimento não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 3B).

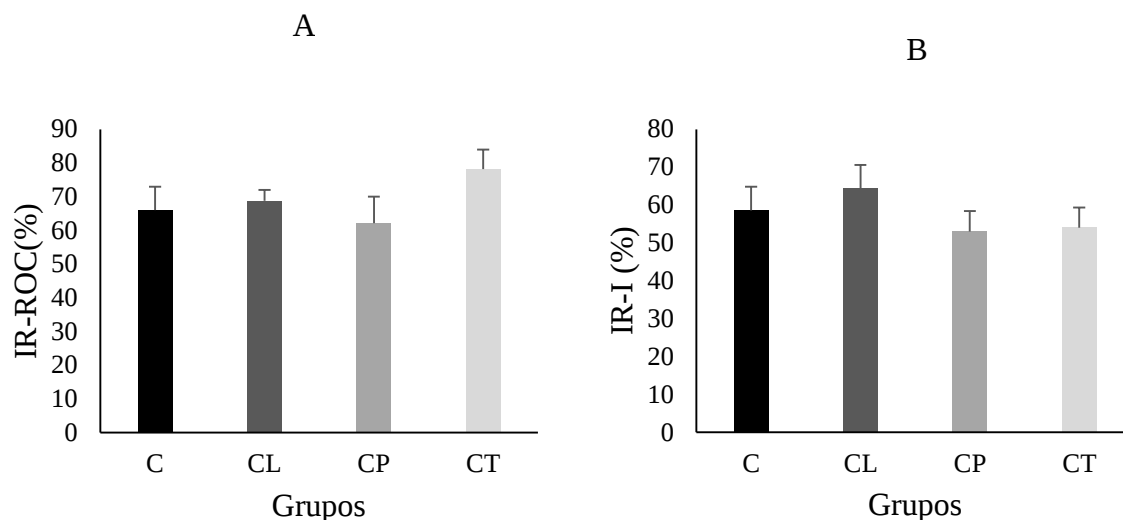


Figura 3. (A) Índice de Reconhecimento (IR-ROC%) obtido no teste de memória de reconhecimento de objetos relacionados à localização e contexto específicos. (B) Índice de Reconhecimento (IR-I%) obtido no teste de memória de reconhecimento para objetos bidimensionais. Grupos C (n=15), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=11).

4. Discussão

A dieta de cafeteria foi eficaz na indução à obesidade, como demonstrado através da avaliação murinométrica, realizada ao fim do experimento, foi evidenciado que quanto maior o tempo de exposição a dieta de cafeteria maior os parâmetros murinométricos avaliados, o peso, o comprimento, a circunferência torácica, a circunferência abdominal, o IMC e o Índice de Lee, além do aumento da reserva de gordura epididimal e retroperitoneal. Corroborando com os dados apresentados, Beilharz, Maniam, Morris mostraram que os ratos que consumiram dieta de cafeteria pesaram significativamente mais do que o grupo controle após 15 e 20 dias de exposição da dieta [28]. Ribeiro et al., observaram que camundongos fêmeas alimentadas com dieta de cafeteria durante a gestação tiveram maior ganho de peso a partir da sexta semana de gestação comparadas ao grupo controle [29]. E além disso, a dieta de cafeteria durante os períodos de pré-gestação e gestação foi capaz de aumentar o peso dos depósitos de gordura e da gordura corporal total em ratos [30].

Outro estudo que utilizou 60 ratos wistar machos, com 60 dias de idade e peso de 350 g, analisaram vários parâmetros, dentre eles o peso corporal e o Índice de Lee dos animais que foram expostos à dieta de cafeteria. Evidenciaram o aumento do peso do grupo cafeteria à partir da décima semana ao final do experimento, com uma significativa associação entre tempo e grupo, com o ganho de peso maior no grupo cafeteria do que no grupo controle. Além disso, houve um aumento no Índice de Lee à partir da nona semana e continuou durante todo o período do estudo [31].

Vithayathil et al., forneceram uma dieta de cafeteria para ratos wistar durante a gestação e lactação e avaliaram na prole ao desmame e 3 semanas após o desmame e evidenciaram que a porcentagem de massa gorda total ao desmame foi aproximadamente 2 vezes maior em filhotes amamentados pela mãe do grupo cafeteria em comparação com o controle, independentemente de terem nascido no grupo cafeteria ou controle. A massa relativa de depósitos individuais de gordura, incluindo gordura gonadal, gordura interescapular, gordura retroperitoneal, gordura omental e gordura subcutânea, também foram aproximadamente 1,5 e 2 vezes maior na prole amamentada por uma mãe do grupo cafeteria em comparação com a prole amamentada por uma mãe do grupo controle. Às 6 semanas do experimento não houve mais diferença na porcentagem de massa gorda total entre qualquer um dos grupos de tratamento, mostrando que quando a administração da dieta de cafeteria foi cessada (após o desmame) a mudança corporal passa a não apresentar diferença estatística entre os grupos [32].

Por outro lado, Higa et al., compararam a exposição da dieta de cafeteria e da dieta hiperlipídicas na indução de disfunção metabólica em camundongo. Os resultados mostraram que não houve diferença no ganho de peso, no Índice de Lee e no peso corporal dos animais no início e no final do protocolo experimental. Porém, ambos os grupos apresentaram um aumento no volume de placas de gordura retroperitoneal e periepididimal em comparação ao grupo controle. Além disso, a dieta de cafeteria foi capaz de induzir a hipertrofia de adipócitos, hiperfagia, hiperglicemia e resistência precoce à insulina. No entanto, o peso dos músculos sóleo, gastrocnêmico e plantar, além do peso dos rins, pulmões, fígado, coração e baço não diferiram entre os grupos [33], o que diverge dos dados do nosso estudo, onde o peso do baço foi maior no grupo CT, o peso do coração foi maior no grupo CT e CP e o peso do fígado foi maior nos grupos que receberam dieta de cafeteria em comparação ao grupo controle.

Mali et al., induziram a obesidade em camundongos swiss albino através da exposição à dieta de cafeteria por 40 dias e avaliaram parâmetros como peso corporal, Índice de Massa Corporal (IMC), Índice de Obesidade de Lee, índice aterogênico, peso de órgãos e massa de gordura corporal. O grupo cafeteria apresentou aumento significativo do peso corporal aos 10, 20, 30 e 40 dias em comparação com o grupo controle, além do aumento do IMC, LIO e índice aterogênico. Além disso, houve o aumento do peso das gorduras mesentéricas e perirenais, do fígado e do intestino delgado em comparação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os pesos de órgãos como o cérebro, estômago, coração, baço, pulmões, rins e glândulas suprarrenais [34].

No presente estudo foi observado um comprometimento do fígado que apresentou um peso maior, como também esteatose hepática em graus variáveis no grupo que consumiu a dieta de cafeteria durante todo o estudo. A exposição a dieta de cafeteria na fase de lactação mostrou maior prejuízo ao organismo dos animais com o acúmulo de colesterol no fígado, além do aumento da peroxidação lipídica com a elevação dos níveis de malondealdeído (MDA) nesse tecido. Elwahab et al., ao estudarem em ratos albinos adultos, o efeito da taurina na doença hepática não alcoólica, induzida por uma dieta de cafeteria por 12 semanas, composta por hambúrguer de carne, pão e maionese avaliaram o perfil lipídico, as enzimas hepáticas e índices glicêmicos no soro, além da mensuração do peso do fígado, a avaliação do estresse oxidativo através do MDA e a Glutathione Reduzida (GSH), como também a avaliação de citocinas inflamatórias como Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α) e o estudo histopatológico desse órgão. Eles demonstraram que a dieta de cafeteria foi capaz de aumentar o peso corporal e do fígado dos animais, induzir dislipidemia com aumento de triglicerídeos, colesterol total e LDL colesterol e a diminuição de HDL-colesterol, além da elevação de testes da função hepática, como a Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Transaminase (AST), Fosfatase Alcalina (ALP) e gama-GT, além das alteração da glicemia de jejum, da insulina e do HOMA-IR. O consumo da dieta de cafeteria evidenciou um desequilíbrio no sistema pró/anti-inflamatório hepático, causando um aumento nos níveis de marcadores pró-inflamatórios hepáticos como o TNF α e decréscimo nas citocinas anti-inflamatórias como IL-10, além do aumento de níveis de MDA e diminuição de GSH [35].

Além disso, o exame microscópico dos tecidos hepáticos do grupo cafeteria mostrou degeneração gordurosa com infiltração de células inflamatórias de linfócitos e células mononucleares com áreas focais de degeneração, congestão e necrose, além da deposição de fibras colágenas ao redor da veia central e tratos do portal, demonstrando que a dieta de cafeteria foi capaz de trazer um prejuízo histopatológico e funcional ao fígado [35].

Sagae et al., demonstraram que ratos alimentados com uma dieta de cafeteria no início da vida se tornaram obesos, com aumento do Índice de Lee, além de alterações como esteatose hepática de graus variados, decréscimo de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e aumento dos níveis plasmáticos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) [36].

No presente estudo não houve efeito de dieta para os parâmetros observados no teste do LAM. Os animais demonstraram que aprenderam a tarefa ao longo das tentativas e apresentaram a retenção da memória espacial, de acordo com relatos na literatura, de que à medida que o experimento é realizado, durante as tentativas da fase de aprendizagem, os

animais levam cada vez menos tempo e percorrem uma distância menor para encontrar a plataforma de fuga, demonstrando que aprenderam a tarefa, através do reconhecimento de pistas distais oferecidas, evidenciando a aquisição e consolidação das informações durante esta etapa do teste. Na probe trial é esperado que os animais passem mais tempo no quadrante alvo, onde a plataforma estava localizada, demonstrando que os animais distinguiram esse quadrante dos demais. No teste de retenção de memória, na 26ª e 27ª tentativas é relatado aumento da latência de fuga e distância navegada com relação a 24ª tentativa, devido a um esquecimento da posição da plataforma, após a imposição de apenas uma semana de tempo entre as tentativas [37,38].

Em nosso estudo, a ausência de alterações na memória de trabalho espacial avaliada no LAM foi corroborada pelos dados obtidos no novo teste de reconhecimento de objeto, no qual ratos de todos os grupos foram igualmente capazes de discriminar um novo objeto de um objeto familiar ao qual eles foram expostos anteriormente. Assim, os dados obtidos nesses dois testes, ambos abordando a memória de trabalho, sugerem que a dieta de cafeteria consumida em diferentes períodos da vida não prejudica a memória de trabalho, assim como a memória de reconhecimento de objetos.

Corroborando com nossos dados, Ferreira et al., avaliaram em ratos machos jovens com 4 semanas de idade o efeito de duas dietas hipercalóricas, uma dieta rica em açúcar e uma dieta de cafeteria. Os animais foram alimentados por 8 semanas com essas dietas e submetidos aos testes comportamentais para analisar o comportamento de memória nos testes do LAM e do campo aberto, os processos de aprendizagem e memória no LAM e no teste de reconhecimento do objeto novo, analisar a resposta ao medo no teste de condicionamento físico e o estado de depressão no teste de nado forçado, além da neurogênese no giro denteado usando o marcador de duplocortina neuroproliferação (DCX). Os resultados mostram que todos os ratos reduziram progressivamente a distância percorrida e a latência para encontrar a plataforma de fuga durante a fase de aprendizagem e que as medidas analisadas nos testes de retenção não tiveram diferença estatísticas entre os grupos, sendo assim, fica evidente que a aprendizagem e a memória espacial de trabalho avaliadas no LAM não foi afetada pelo consumo com a dieta de cafeteria em ratos adultos jovens. No teste de reconhecimento do objeto novo, os animais de todos os grupos gastaram mais tempo explorando o objeto novo em relação ao antigo, porém não houve diferença entre os grupos. Entretanto, houve uma redução do número total de células imunorreativas à DCX na camada subgranular do giro denteado, evidenciando alteração na neurogênese, porém sem prejuízos comportamentais [39].

Sabe-se que animais desnutridos, por meio de dietas restritivas, como restrição calórica e/ou proteica, apresentam prejuízos cognitivos, tanto no aprendizado quanto na memória [40,41]. Por outro lado, como foi observado no presente estudo, a hiperalimentação parece não causar prejuízos cognitivos em ratos. Com base nisso, futuros estudos devem ser realizados para a elucidação de possíveis mecanismos protetores na cognição após a exposição a dieta de cafeteria.

Declaração de interesse

Nenhum.

Fonte de financiamento

O apoio financeiro foi fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Beatriz Coimbra, Beatriz de Oliveira, Deisy da Silva, Rodrigo Mazzei e Paula Payão pela assistência técnica especializada ao longo do trabalho.

Referências

- [1] D.L. Champagne, R.C. Bagot, F. Van Hasselt, G. Ramakers, M.J. Meaney, E.R. De Kloet, M. Joëls, H. Krugers, Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress, *The Journal of neuroscience* 28 (2008) 6037-6045.
- [2] C.J. Peña, Y.D. Neugut, C.A. Calarco, F.A. Champagne, Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring, *The European journal of neuroscience* 39 (2014) 946-956.
- [3] S. Maccari, H.J. Krugers, S. Morley-Fletcher, M. Szyf, P.J. Brunton, The consequences of early-life adversity: neurobiological: behavioural and epigenetic adaptations. *Journal Neuroendocrinology* 26 (2014) 707-723.
- [4] D.D. Leffa, S.S. Valvassori, R.B. Varela, J. Lopes-Borges, F. Daumann, L.M. Longaretti, A.L. Dajori, J. Quevedo, V.M. Andrade, Effects on palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice, *Metabolic brain disease* 30 (2015) 1073-1082.
- [5] A. Shafat, B. Murray, D. Rumsey, Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat, *Appetite* 52 (2009) 1-5.
- [6] R. Vidal-Santos, F.N. Macedo, M.N. Santana, V.U. de Melo, J.L. de Brito Alves, M.R. Santos, L.C. Brito, E. Nascimento, J.H. Costa-Silva, V.J. Santana-Filho, Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats, *Journal of developmental origins of health and disease* 08 (2017) 216-225.

- [7] L. Brunetti, S. Leone, A. Chiavaroli, G. Orlando, L. Recinella, C. Ferrante, C. Di Nisio, V. Verrati, M. Vacca, Cafeteria diet increases prostaglandin E₂ levels in rat prostate, kidney and testis, *International journal of immunopathology and pharmacology* 23 (2010) 1073–1078.
- [8] A. Castell-Auví, L. Cedó, V. Pallarès, M. Blay, A. Ardévol, M. Pinent, The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats, *British journal of nutrition* 108 (2012) 1155–1162.
- [9] M. Gomez-Smith, S. Karthikeyan, M.S. Jeffers, R. Janik, L.A. Thomason, B. Stefanovic, D. Corbett, A physiological characterization of the Cafeteria diet modelo of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & behavior* 167 (2016) 382–391.
- [10] Z. Pons, M. Margalef, F.I. Bravo, A. Arola-Arnal, B. Muguerza, Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats, *British journal of nutrition* 117 (2017) 200–208.
- [11] B.P. Sampey, A.M. Vanhoose, H.M. Winfield, A.J. Freemerman, M.J. Muehlbauer, P.T. Fueger, C.B. Newgard, L. Makowski, Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high fat diet, *Obesity* 19 (2011) 1109–1117.
- [12] W. Warneke, S. Klauss, H. Fink, S.C. Langley-Evans, J.P. Voigt, The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of diferente ages, *Pharmacology Biochemistry Behavior* 116 (2014) 45–54.
- [13] I.C. Macedo, J.R. Rozisky, C. Oliveira, C.M. Oliveira, G. Laste, Y. Nonose, V.S. Santos, P.R. Marques, M.F. Ribeiro, W. Caumo, I.L. Torres, Chronic stress associated whith hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats, *Neuropeptides* 51 (2015) 75–81.
- [14] J-P. Morin, L.F. Rodríguez-Durán, K. Guzmán-Ramos, C. Perez-Cruz, G. Ferreira, S. Diaz-Cintra, G. Pacheco-López, Palatable Hyper-Caloric Food Impact on Neuronal Plasticity, *Frontiers in Behavioural Neuroscience* 11 (2017) 1–11.
- [15] Z.A. Cordner, K.L. Tamashiro, Effects of high-fat diet exposure on learning & memory, *Physiology and behavior* 152 (2015) 363–371.
- [16] J.M. Monti, C.L. Baym, N.J. Cohen, Identifying and characterizing the effects of nutrition on hippocampal memory, *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 05 (2014) 337–343.
- [17] C.R.C. Guedine, L.C.M Pordeus, T.R. Riul, A.A. Jordão Júnior, S.S. Almeida. Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring, *Nutritional Neuroscience* 22 (2018) 1–11.
- [18] L.L. Bernardis, B.D. Patterson, Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions, *The journal of endocrinology* 40 (1968) 527–528.
- [19] E.L.B. Novelli, Y.S. Diniz, C.M. Galhardi, G.M.X. Ebaid, H.G. Rodrigues, F. Mani, A.A.H Fernandes, A.C. Cicogna, J.L.V.B Novelli Filho, Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats, *Laboratory Animals* 41 (2007) 111–119.
- [20] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37 (1959), 911–917.
- [21] D. Gerard-Monnier, L. Erdelmeier, K. Régnard, N. Moze-Henry, J.C. Yadan, J. Chaudière, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chemical research in toxicology* 11 (1998) 1176–1183.

- [22] E.M. Brunt, D.E. Kleiner, C. Behling, M.J. Contos, O.W. Cummings, L.D. Ferrell, M.S. Torbenson, M. Yeh, Misuse of scoring systems, *Hepatology* 54 (2011) 369-370.
- [23] R.G.M. Morris, Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learning and motivation* 12 (1981) 239-260.
- [24] R.T.B. Pini, L.D.M. Ferreira do Vales, T.M. Braga Costa, S.S. Almeida, Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats, *Nutrition Neuroscience* 20 (2017) 396-408.
- [25] R.F. Langston, E. Wood, Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampus lesions on object-place, object-context and object-place-context memory, *Hippocampus* 20 (2010) 1139-1153.
- [26] N.N. Braga, M.T.H. Fukuda, S.S. Almeida, Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*), *Psychology & Neuroscience* 07 (2014) 103-111.
- [27] S.E. Forwood, S.J. Bartko, L.M. Saksida, T.J. Bussey, Rats spontaneously discriminate purely visual, two-dimensional stimuli in tests of recognition memory and perceptual oddity, *Behavioral neuroscience* 121 (2007) 1032-1042.
- [28] J. E. Beilharz, J. Maniam, M.J. Morris, Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats, *Brain, Behavior, and Immunity* 37 (2014) 134-141.
- [29] A.C.E.F. Ribeiro, T.H. Batista, V.B. Veronesi, A. Giusti-Paiva, F.C. Vilela, Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring, *International Journal of Developmental Neuroscience* 68 (2018) 45-52.
- [30] A. Akyol, S.C. Langley-Evans, S. McMullen, Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat, *British Journal of Nutrition* 102 (2009) 1601-1610.
- [31] J. Cavagni, T. P. Wagner, E.J. Gaio, R.O.C.C. Rêgo, I.L.S. Torres, C.K. Rosing, Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats, *Archives of Oral Biology* 58 (2013) 1034-1039.
- [32] M.A. Vithayathil, J.R. Gugusheff, Z.Y. Ong, S.C. Langley-Evans, R.A. Gibson, B.S. Muhlhausler, Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. *Nutrition & Metabolism* 15 (2018) 1-15.
- [33] T.S. Higa, A.V. Spinola, M.H. Fonseca-Alaniz, F.S. Evangelista, Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice, *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 6 (2014) 47-54.
- [34] P.Y. Mali, P. Bigoniya, S.S. Panchal, I.S. Muchhandi, Anti-obesity activity of chloroform-methanol extract of *Premna integrifolia* in mice fed with cafeteria diet, *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences* 05 (2013) 229-236.
- [35] A.H.A. Elwahab, B.K. Ramadan, M.F. Schaalan, A.M. Tolba, A novel role of SIRT1/FGF-21 in taurine protection against cafeteria diet-induced steatohepatitis in rats, *Cellular Physiology and Biochemistry* 43 (2017) 644-659.
- [36] S.C. Sagae, B. Zanardini, E.D. Ribeiro-Paz, A.C. Amaral, G.A. Bronczek, C. Lubaczewski, S. Grassioli, P. Koehler-Santos, J.R. de Oliveira, M.V.F. Donadio, C. Rainecki. Metabolic dysfunction in a rat model of early-life scarcity-adversity: modulatory role of cafeteria diet, *Experimental physiology* 103 (2018) 1481-1493.
- [37] L.D.F.M. Vales, M.T.H. Fukuda, S.S. Almeida, Effects of Acute Stress on Learning and Memory Processes of Malnourished Rats, *Psychology: Reflection and Criticism* 27 (2014) 784-793.
- [38] C.V. Vorhees, M.T. Williams, Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nature protocols*. 01 (2006) 848-858.

- [39] A. Ferreira, J.P. Castro, J.P. Andrade, M.D. Madeira, A. Cardoso, Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat, *Neurobiology of learning and memory* 155 (2018) 197-207.
- [40] N.N. Braga, M.T.H. Fukuda, S.S. Almeida, Early postnatal protein malnutrition impairs recognition memory in rats (*Rattus norvegicus*), *Psychology & Neuroscience* 07 (2014) 103-111.
- [41] C.T. Valadares, M.T. Fukuda, A.L. Françolin-Silva, A.S. Hernandez, S.S. Almeida, Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures, *Nutritional Neuroscience* 13 (2010) 274-282.

OUTROS RESULTADOS

Tabela 1. Comportamentos dos animais avaliados no LAM, na fase de aprendizado, *probe* e na fase de retenção de memória (retestes)

Fase de Aprendizagem	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4
Latência	33,10 ^a	16,70	17,21	10,71 ^b
Distância	791,49 ^a	357,40	407,72	223,37 ^b
Velocidade	23,60 ^c	21,02	22,72 ^d	20,49
Probe	Quadrante 1	Quadrante 2	Quadrante 3	Quadrante 4
Frequência de entrada	10,22 ^e	4,40	4,62	5,41
Duração de tempo	22,83 ^e	9,04	11,46	13,05
Memória (Retestes)	Tentativa 24	Tentativa 26	Tentativa 27	
Latência	9,77	21,90 ^f	29,78 ^f	
Distância	198,28	553,69 ^f	705,86 ^f	
Velocidade	19,77	26,03 ^f	25,80 ^f	

^ap<0,0001, comparado aos blocos 2 e 3.

^bp<0,0001, comparado aos blocos 1,2 e 3.

^cp<0,0001, comparado ao bloco 3.

^dp<0,0001, comparado aos blocos 2 e 4.

^ep<0,0001, comparado aos quadrantes 2, 3 e 4.

^fp<0,0005, comparados a tentativa 24.

Grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=19) e CT (n=12).

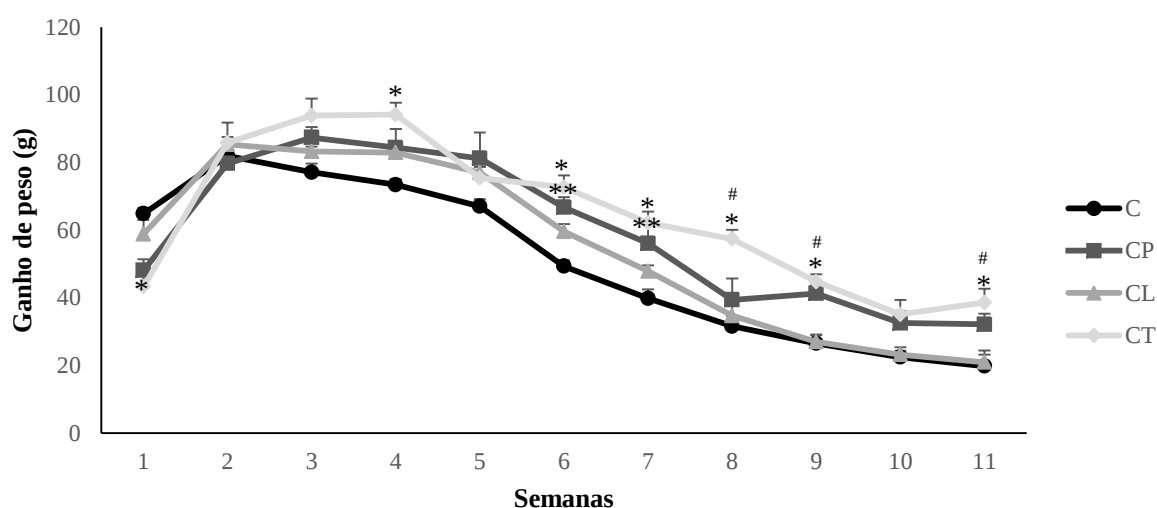


Figura 1. Ganho de peso semanal de ratos Wistar nos grupos C (n=16), CL (n=12), CP (n=18) e CT (n=12). *p<0,0001 comparado ao grupo C. **p<0,0001 comparado ao grupo C. #p<0,0001 comparado ao grupo CP.

ANEXO

ANEXO A. Certidão de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeitos do consumo de dieta de cafeteria durante o período crítico do desenvolvimento sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em ratos Wistar*", registrado com o número **072/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Marisa Tomoe Hebihara Fukuda**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 06 ratos Wistar-OLD fêmeas pesando 400g e 48 ratos Wistar-OLD machos pesando 5g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 01/02/2018.

We certify that the Protocol *n° 072/2017*, entitled "*Effects of consumption of cafeteria diet on the critical period of development on metabolic and behavioral parameters in Wistar rats*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 06 female Wistar-OLD rats weighing 400g and 48 male Wistar-OLD rats weighing 5g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/01/2018.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,
em exercício