

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO SOBRE A MATURAÇÃO
REFLEXA E FUNÇÃO COGNITIVA DA PROLE DE RATOS**

MICHELLY PIRES QUEIROZ

JOÃO PESSOA-PB

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO SOBRE A MATURAÇÃO
REFLEXA E FUNÇÃO COGNITIVA DA PROLE DE RATOS**

MICHELLY PIRES QUEIROZ

JOÃO PESSOA-PB

2016

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO SOBRE A MATURAÇÃO
REFLEXA E FUNÇÃO COGNITIVA DA PROLE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Centro de
Tecnologia, Universidade Federal da
Paraíba em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Késsia Barbosa Soares

**Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto
Queiroga**

JOÃO PESSOA-PB

2016

Q3i

Queiroz, Michelly Pires.

Impacto da suplementação materna com ácido linoleico conjugado sobre a maturação reflexa e função cognitiva da prole de ratos / Michelly Pires Queiroz.- João Pessoa, 2016.
70f. : il.

Orientadora: Juliana Késsia Barbosa Soares

Coorientadora: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de alimentos. 2. Nutrição materna.
3. Lipídios. 4. Neurodesenvolvimento. 5. Memória. 6. Cérebro.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

MICHELLY PIRES QUEIROZ

**IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO (CLA) SOBRE A MATURAÇÃO REFLEXA E FUNÇÃO COGNITIVA
DA PROLE DE RATOS**

Dissertação aprovada em 18 de março de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana Késsia Barbosa Soares – UAS/UFPB
Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Jailane de Souza Aquino – CCS/UFPB
Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Gerlane Coelho Bernardo Guerra – DBF/CB/UFRN
Membro externo

JOÃO PESSOA-PB

2016

Á Deus, pela graça de ter me permitido concluir este trabalho.

Á minha mãe, por todo amor e dedicação.

Ao meu filho, por me fazer experimentar a mais linda e doce forma de amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai todo poderoso, pelo dom da vida, força, coragem e determinação, por não me deixar fraquejar mesmo nos momentos mais difíceis, por estar tão presente em mim.

À minha mãe M^a do Socorro, exemplo de vitória, por ter me guiado sempre pelos melhores caminhos, por me apoiar, incentivar, e realizar os meus sonhos, pelo nosso amor incondicional.

Ao meu pai Aluízo, pelos ensinamentos e incentivo, por ter investido na minha formação, por ter sido pai, mesmo distante.

Aos meus irmãos Alan e Alisson, pela compreensão e afeto, por tudo que foram pra mim durante toda vida.

À minha orientadora Dr^a.Prof^a. Juliana Késsia Barbosa Soares, pelo empenho, força, determinação, compromisso e responsabilidade.

Aos meus avós, tios e primos, por serem essa grande família, por estarem sempre presentes, por todo o amor e incentivo.

À UFPB e todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pelo conhecimento repassado, dedicação e comprometimento.

À secretária do PPGCTA Lindalva Nóbrega, pelo comprometimento, dedicação e excelente trabalho.

Às professoras Mayara Queiroga, Raphaela Rodrigues, Camilla Carolina, Marília Frazão e Elieidy Gomes, pelo o apoio durante a pesquisa.

Ao meu amigo e companheiro de pesquisa, Martiniano da Silva Lima, pelo o auxílio e dedicação imprescindíveis à realização desse trabalho.

Ao auxiliar de laboratório e amigo Jaciel Melo, por ser este grande profissional e cuidar tão bem de todas as pesquisas do Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), sem o qual este trabalho se tornaria inviável

À todos os meus amigos, pelos momentos de alegria, conselhos, e palavras de entusiasmo, por contribuírem de alguma forma para realização dessa conquista.

Aos alunos do LANEX, por me auxiliarem durante a pesquisa.

Aos meus amigos da turma de mestrado do PPGCTA, pelos dias de luta e companheirismo.

À minha amiga Maria Digian, pelo o apoio e por sempre me arrancar um sorriso do rosto.

À minha amiga Elvira, pelos conselhos, pela a ajuda nos trabalhos e em tudo o mais.

À minha amiga Ana Carolina, pela força e apoio. Pelos avisos sobre editais de concurso demonstrando cuidado e preocupação comigo.

À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela parceria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo o apoio financeiro.

“Desejo que você não tenha medo da vida, tenha medo de não vive-la. Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes. Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la. Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência. Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas. Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama”.

Augusto Cury

RESUMO

Os ácidos graxos essenciais são lipídios muito importantes para a formação do sistema nervoso central (SNC). Durante a gestação e lactação sua necessidade encontra-se aumentada para melhor desenvolvimento deste sistema. O Ácido Linoleico Conjugado (CLA) é um ácido graxo formado por isômeros de ácido linoleico. Este ácido graxo vem sendo investigado devido aos seus prováveis efeitos benéficos à saúde, porém os efeitos da mistura de CLA sobre alterações do SNC durante a fase de gestação e lactação ainda não foram investigados. Assim, este estudo tem como objetivo investigar o impacto de dieta materna com diferentes concentrações de CLA durante a gestação e lactação sobre a maturação reflexa neonatal e função cognitiva em ratos. Para tanto, foram formados 3 grupos: O Grupo Controle (GC) recebeu a dieta padrão sem adição de CLA; O Grupo GCLA1, a dieta experimental contendo 1% de CLA e o GCLA3, contendo 3% de CLA. Após o nascimento, as respostas reflexas foram avaliadas entre o 1º e 21º dia pós-natal, como também a aferição do tamanho da cabeça e o peso corporal. Aos 42 dias de vida, os animais participaram do teste de habituação ao campo aberto, sendo a segunda exposição após 7 dias. Para a avaliação da memória declarativa, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos 7 dias após o teste de habituação, usando o campo aberto. Após os testes os animais foram anestesiados e eutanasiados por punção cardíaca. Os dados foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidas pelo teste de Tukey para os dados paramétricos e o teste Kruskal Wallis para os dados não paramétricos, considerando-se diferença significativa para $p < 0,05$. Utilizou-se o programa Sigma Start para a análise dos dados. Os GCLA 1 e GCLA3 mostraram aceleração na maturação reflexa de filhotes para a maioria dos parâmetros avaliados. O peso corporal foi mais elevado em comparação com o grupo de controle ($p < 0,05$). Ao avaliar a medida da cabeça, pode-se observar que o GCLA1 e o GCLA3 apresentaram maior tamanho nas medidas laterolateral quando comparado ao controle. Já na medida anteroposterior o GCLA1 e GCLA3 mostraram-se menor quando comparado ao GC no 1º dia, havendo um aumento no perímetro avaliado no GCLA3 ao compara-lo GCLA1 no 7º e 21º dia ($p < 0,05$). No teste de habituação no campo aberto apenas o GCLA3 deambulou menos na segunda exposição ao campo aberto indicando facilitação da memória ($p < 0,05$). No teste de reconhecimento de objetos a longo prazo, houve diferença estatística significativa quando comparado o tempo de exploração do objeto familiar ao tempo de exploração do objeto novo nos GC, GCLA1 e GCLA3. Além disso, com relação à taxa de exploração dos objetos, no GCLA1 essa diferença foi observada quando comparado ao GC, e o GCLA3 ao GCLA1 ($p < 0,05$). O tratamento materno com CLA antecipa maturação reflexa, aumenta o peso corporal, tamanho da cabeça e melhora respostas em testes de memória na prole de ratas.

Palavra chaves: neurodesenvolvimento; nutrição materna; memória; cérebro; lipídios

ABSTRACT

The essential fatty acids are important lipids for formation of the central nervous system. During pregnancy and lactation the intake need is increased to further development of this system. The conjugated linoleic acid (CLA) is a fatty acid consisting of isomers of linoleic acid. The CLA is naturally produced by ruminant animals and is found in food products such as milk fat and meat of these animals. The CLA has been widely investigated because of its many beneficial health effects, however the effects of CLA on isolated CNS changes at this stage of life have not yet been investigated. This study aims to investigate the impact of maternal diet with different concentrations of CLA during pregnancy and lactation on the neonatal reflex maturation and cognitive function in rats. To this end, three groups were formed: the control group (GC) received a standard diet without added CLA; The GCLA1 group received the experimental diet containing 1% CLA and GCLA3 containing 3% CLA. After birth, the reflex responses were surveyed between 1 and 21 postnatal day, as well as the measurement of head size and body weight. At 42 days old, the animals participated in the habituation to the open field test, the second exposure occurred after 7 days. For the evaluation of declarative memory, it was performed for object recognition test 3 days after the habituation test using the open field. After the test the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. The analyzes were compared by one way ANOVA test followed by the Holm Sidak test, considering significant difference for $p < 0.05$. We used the Sigma start program for data analysis. The GCLA 1 and GCLA3 showed acceleration in reflex maturation of puppies for most of the evaluated parameters. Body weight was higher compared to the control group ($p < 0.05$). To assess the extent of the head, it can be seen that the GCLA1 and GCLA3 presented in laterolateral size measurements when compared to controls. In the anteroposterior extent GCLA1 and GCLA3 shown to be lower when compared to the control group on day 1, with an increase in the perimeter evaluated in GCLA3 to compare it GCLA1 on the 7th and 21th day ($p < 0.05$). On habituation in the open field test just wandered GCLA3 least the second open field indicating exposure to facilitating memory ($p < 0.05$). In the long term object recognition test, a significant difference when comparing the time of exploration of familiar object to the time of operation of the new object occurred in the GC, GCLA1 and GCLA3. Moreover, with respect to the explored ratio of the objects in GCLA1 there was a significant increase compared to GC and GCLA3 compared with GCLA1 ($p < 0.05$). Maternal treatment with CLA anticipates reflex maturation, increases body weight, head size and improves responses in memory tests in the offspring of rats.

Key word: neurodevelopment; maternal nutrition; memory; brain; lipids.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS – DISSERTAÇÃO

Figura 1	Esquema do metabolismo dos ácidos graxos da família n-3 e n-6.....	21
Figura 2	Delineamento experimental.....	29
Figura 3	Desenvolvimento, maturação reflexa e cognição da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3).....	30
Figura 4	Avaliação da maturação dos reflexos da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) e 3% de CLA (GCLA3). A) PP; B) RPD; C) CPV; D) AP.....	32
Figura 5	Avaliação da maturação dos reflexos da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) e 3% de CLA (GCLA3). E) GN; F) RS; G) RDQL.....	33
Figura 6	Medição do eixo crânio laterolateral e eixo ântero-posterior da cabeça da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3).....	34
Figura 7	Aferição do peso da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3).....	34
Figura 8	Aparelho do Campo Aberto.....	35
Figura 9	Teste de reconhecimento de objetos.....	37
Figura 10	Disposição dos objetos utilizados no Teste de Reconhecimento dos Objetos.....	38

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO

Figure 1	Body weight of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	60
Figure 2	Laterolateral skull axis of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	60
Figure 3	Anteroposterior skull axis of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CIA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	62
Figure 4	Habituation test of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CIA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	61
Figure 5	Object recognition test of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CIA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	63
Figure 6	Exploration Ratio of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CIA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	63

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS – DISSERTAÇÃO

Tabela 1	Composição da dieta controle e experimental.....	28
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS – ARTIGO

Tabela 1	Composition of control and experimental diets.....	55
Tabela 2	Description of the test reflex test.....	56
Tabela 3	Reflex maturation of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ácido Graxo Essencial
AGPCL	Ácido Graxo Poli-insaturado de Cadeia Longa
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AIN	American Institute of Nutrition
AKt	Proteína quinase B
AMP cíclico	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ARA	Ácido Araquidônico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulina-dependente da proteína quinase II
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
COX	Ciclooxigenase
DHA	Ácido Docosahexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
LOX	Lipoxigenase
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	17
2.2	EFEITO BIOLÓGICO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	19
2.3	LIPÍDIOS E NEURODESENVOLVIMENTO.....	20
2.4	MATURAÇÃO REFLEXA.....	24
2.5	LIPÍDIOS E MEMÓRIA.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	ANIMAIS E DIETA.....	27
3.2	ONTOGENIA REFLEXA NOS FILHOTES RECÉM-NASCIDOS	30
3.3	CARACTERÍSTICAS DE MATURAÇÃO FÍSICA.....	34
3.4	TESTE DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.....	35
3.5	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	36
3.6	ANÁLISE DOS DADOS.....	38
4	REFERÊNCIAS.....	40
5	RESULTADOS.....	48
5.1	ARTIGO ORIGINAL.....	49

1 INTRODUÇÃO

A nutrição é importante no desenvolvimento do cérebro, uma vez que influencia na sua composição, sendo cerca de 60 % do cérebro composto de lipídio. Durante o neurodesenvolvimento, há acumulação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), e isso representa cerca de 15-30 % de peso seco do cérebro (CRAWFORD, 1992; HALLAHAN; GARLAND, 2005; BALOGUN; CHEEMA, 2014).

O crescimento do cérebro no humano acontece a partir do terceiro trimestre de gravidez, continuando dois anos após o nascimento. Já no rato esse desenvolvimento acontece a partir da terceira semana de gestação e durante toda a lactação (MORGANE et al. 1993; GREEN; YAVIN, 1996; GUSTAVASSON et al. 2010; GOW; HIBBELN, 2014). Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPCL) são encontrados naturalmente no leite materno e essenciais para o desenvolvimento do concepto (HERRERA, 2002).

Quando a dieta materna é deficiente em ácidos graxos essenciais (AGE), os mesmos não são transferidos para o feto através da placenta ou leite materno provocando alterações nas membranas celulares da prole, o que dificulta o processo de aprendizagem ao longo do desenvolvimento e repercute na vida adulta (KAVRAAL et al. 2012). O baixo consumo ou excesso desses AGE na fase intrauterina e durante a lactação, provocam alterações no comportamento. Assim como a aprendizagem é afetada pelo consumo inadequado de n-3 e n-6, os sintomas de depressão, ansiedade e agressividade são também evidenciados (GOW; HIBBELN, 2014).

Um ácido graxo muito importante que vem sendo estudado devido seus possíveis efeitos à saúde é o ácido linoleico conjugado (CLA). Podendo ser caracterizado como uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico com ligações duplas insaturadas conjugadas em várias posições do carbono na cadeia que podem ser do tipo *cis* ou *trans*. O CLA é formado como intermediário durante a biohidrogenação de ácido linoleico para o ácido esteárico no rúmen de animais. O CLA também pode ser produzido sinteticamente, por meio de hidrogenação parcial ou isomerização alcalina do ácido linoleico ou de óleos ricos em ácido linoleico (óleo de girassol ou óleo de cártamo) (KHANAL; DHIMAN, 2004; JELIŃSKA et al. 2014).

Estudos experimentais mostram o potencial deste ácido graxo na intervenção profilática de várias doenças, incluindo obesidade, hiperinsulinemia, hipertensão e câncer (HALADE; RAHMAN; FERNANDES, 2010; PARK et al. 2010; FURLAN et al. 2013; JELIŃSKA et al. 2014).

Uma explicação para a variedade de atividades biológicas de CLA é a mistura dos seus isômeros. A sua forma mais prevalente é o *cis* - 9, *trans* - 11 encontrado em alimentos derivados de ruminantes como leite, queijo e carne. O outro isômero ativo é o *trans*-10, *cis*-12, presente apenas em quantidades vestigiais nos alimentos de origem animal (KHANAL; DHIMAN, 2004; DHIMAN; NAM; URE, 2005; JELIŃSKA et al. 2014).

Com relação a atuação do CLA no sistema nervoso, pesquisa verificou que o CLA atravessa a barreira hematoencefálica (FA et al. 2005), reduz angiogênese no cérebro de mamíferos (SIKORSKI; HEBERT; SWAIN, 2008) e protege células corticais contra elementos neurotóxicos *in vitro* (HUNT et al. 2010). Ademais, dieta materna contendo gordura de leite de cabra que é fonte de CLA, alterou atividade elétrica cortical (SOARES et al. 2012) e a ansiedade na prole de ratos (SOARES et al. 2013).

Pesquisas anteriores demonstraram que quando a gordura de leite de cabra fonte de CLA foi ofertada a ratas durante a gestação e/ou lactação alterou o funcionamento cerebral da prole (SOARES et al. 2012; SOARES et al. 2013). Porém não se sabe se o CLA ou outros lipídios foram responsáveis por este efeito. Desta forma, hipotetizou-se que a suplementação materna com CLA comercial, livre de outros ácidos graxos, quando ofertado na fase inicial da vida alteraria o comportamento da prole. Sendo assim, objetivou-se com a presente pesquisa avaliar se dieta materna com mistura de CLA durante a gestação e lactação interfere na maturação reflexa e memória da prole de ratas Wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

O ácido linoleico conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico com duas ligações duplas insaturadas conjugadas em várias posições do carbono na cadeia do ácido graxo, estas ligações podem ser do tipo *cis* ou *trans*. As duas fontes alimentares mais ricas em CLA são o leite e a carne de animais ruminantes, originando-se a partir de dois processos naturais. Em um dos processos o CLA é formado durante a biohidrogenação ruminal do ácido linoleico. No outro processo, é sintetizado pelos tecidos de origem animal a partir do *trans*-11C18:1, outro intermediário da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (PARIZA; HARGRAVES, 1985; BAUMAN; BAUMGARD; CORL; GRIINARI, 1999; KHANAL; DHIMAN, 2004; JELIŃSKA et al. 2014).

Quando os ruminantes se alimentam de lipídeos, os mesmos passam por duas transformações importante no rúmen de animais. Na primeira ocorre hidrólise das ligações dos ésteres por lipases microbianas, e na segunda a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados. A isomerização da dupla ligação *cis*-12 representa o passo inicial durante biohidrogenação dos ácidos graxos que contêm um sistema de dupla ligação *cis* - 9, *cis* - 12. A enzima responsável pela formação das ligações duplas conjugadas do *cis*-9, *cis*-12, bem como do ácido α - e γ -linolênico é a linoleate isomerase. Esta enzima é ligada à membrana celular bacteriana e demonstra uma exigência absoluta pelo substrato, um sistema dienocis-12, *cis*-9 e um grupo carboxilo livre. A segunda reação é uma redução na qual *cis*-9, *trans*-11 CLA é convertido a *trans* - 11 C 18:1 (ácido vacênico). A biohidrogenação do ácido linolênico é semelhante com a biohidrogenação do linoleico, começando com uma isomerização seguida por uma sequência de reduções e finalizando com a formação do ácido esteárico. No rúmen a biohidrogenação do ácido α - linolênico produz *cis*-9, *trans*- 11, *cis*- 15 ácido octadecatrienóico conjugado como o produto de isomerização inicial predominante, e esta é seguida por redução da *cis*- duplas ligações. Consequentemente, *trans*-11 octadecenóico é formado, sendo um intermediário comum na biohidrogenação tanto do ácido α - linolênico como do ácido linoleico. Além disso, a biohidrogenação do γ -

linolênico, ácido *cis*- 6, *cis* -9, *cis* - 12 do ácido octadecatrienóico, também resulta em formação de *trans* -11 C18:1 (HARFOOT; HAZELWOOD, 1988; VAN SOEST, 1994).

A síntese endógena de CLA ocorre pela dessaturação do *trans* -11 C18:1 (ácido vacênico) pela enzima $\Delta 9$ – dessaturase, originando o *cis* - 9, *trans* - 11 CLA. O sistema de dessaturase é um complexo multienzimático que inclui NADH - citocromo b5 redutase, citocromo b5, acil- CoA sintetase, e a terminal $\Delta 9$ - dessaturase. Na Reação a $\Delta 9$ - dessaturase introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos. Estearoil - CoA e palmitoil- CoA são os principais substratos para $\Delta 9$ - dessaturase, e os produtos desta reação são componentes importantes de fosfolípidios e triglicérides, em particular para a manutenção da fluidez da membrana (BAUMAN; BAUMGARD; CORL; GRIINARI, 1999; KHANAL; DHIMAN, 2004).

O CLA também pode ser produzido sinteticamente, por meio de hidrogenação parcial ou isomerização alcalina do ácido linoleico ou de óleos ricos em ácido linoleico (óleo de girassol ou óleo de cártamo) (JELIŃSKA et al. 2014).

A hidrogenação é uma tecnologia bastante utilizada para modificar características de fusão e a plasticidade de óleos vegetais, procurando atingir propriedades técnico-funcionais desejáveis e estabilidade oxidativa. No entanto, durante a hidrogenação catalítica, ocorre naturalmente a formação de duplas ligações que podem ser do tipo *cis* ou *trans* (OOMEN; OCKE, 2001).

Óleos vegetais são ricos em triglicerídeos, tal como girassol (45 a 68%) e óleo de cártamo (75 a 80%) (BOYLSTONE; BEITZ, 2002), porém são pobres em CLA, 0,1 mg CLA / g de óleo em óleo de coco e 0,7 mg CLA / g de óleo para o óleo de cártamo (CHIN et al. 1992). Isômeros de CLA são produzidos industrialmente a partir da hidrólise total de triglicerídeos presentes em óleos vegetais (girassol e cártamo) (BERDEAUX; VOINOT; ANGIONI; SEBEDIO, 1998).

A forma sintética do CLA é consumida como suplemento alimentar, especialmente por praticantes de atividades física, devido seus efeitos na perda de massa gorda e ganho de massa magra (BARALDI et al. 2016).

Na alimentação humana, o CLA é um ácido graxo encontrado principalmente em produtos lácteos e cárneos (BAUMAN; CORL; PETERSON; 2003; SERAFEIMIDOU; ZLATANOS; KRITIKOS, 2013). Pesquisas buscam manipular a ração de ruminantes aumentando os teores de CLA na carne e leite, com a finalidade de alterar a relação n-6/n-3 nesses alimentos, aumentando o conteúdo de AGPI e CLA

simultaneamente e facilitando o consumo pela população (ALFAIA et al. 2009; BOMFIM et al. 2006). Pesquisa realizada por Alfaia et al. (2009), verificaram que ingestão das gramíneas pelos ruminantes aumentou os teores de ácido α – linolênico e os isômeros do CLA na carne.

Modificações na dieta animal podem diminuir significativamente o teor de ácidos graxos saturados e multiplicar as concentrações de compostos bioativos (por exemplo, CLA e/ou n- 3) no leite. Na ovelha, as estratégias mais efetivas desenvolvidas são a complementação da alimentação dos ruminantes com diferentes óleos ou oleaginosas enriquecidas com ácido linoleico (HERVAS et al. 2008) ou linolênico (GOMEZ- CORTES et al. 2009).

Evidências científicas e orientações nutricionais recomendam uma redução na ingestão total de gordura, principalmente de ácidos graxos saturados (AGS) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2003), devido estas gorduras estarem associadas a um maior risco de obesidade, hipercolesterolemia e alguns tipos de câncer (WOOD et al. 2004). Sendo assim, as estratégias citadas anteriormente são de grande valia para controle das gorduras que causam malefícios e inserção dos ácidos graxos essenciais na alimentação habitual dos indivíduos.

2.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO

Além dos efeitos benéficos dos ácidos graxos n-3 sobre a saúde humana, o CLA individual também têm atraído maior atenção, devido suas propriedades biológicas. De fato, alguns isômeros do CLA, pelo menos, o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12, apresentam atividades biológicas como ação anticarcinogênica, antiobesidade, antidiabéticas, antiaterogênica, imunomodulação e modulação do crescimento ósseo (ALFAIA et al. 2009; FURLAN et al. 2013; HALADE; RAHMAN; FERNANDES, 2010; PARK et al. 2010; JELÍŃSKA et al. 2014). Gorduras de ruminantes é a fonte dietética natural mais rica de *cis*-9, *trans*-11, que é o principal isômero de CLA, conhecido como ácido rumênico. Vinte e quatro diferentes isômeros de CLA têm sido relatados por ocorrer naturalmente em alimentos (ALFAIA et al. 2009).

Os mecanismos pelos quais o CLA atua promovendo efeitos benéficos ainda não são totalmente conhecidos e por isso vêm sendo estudados. Um mecanismo

subjacente proposto a estas atividades é baseado em que o CLA pode interferir na produção de eicosanóides, diminuindo o fornecimento de ácido araquidônico (20:4 n-6) como um substrato para as vias lipoxigenase (LOX) e cicloxigenase (COX) (BANNI et al. 1999; JELÍŇSKA et al. 2014). A diminuição de 20:4n-6 se dá provavelmente devido ao metabolismo de ácidos graxos dieno conjugado (CD) 18:3, 20:3 e 20:4 pela ação das enzimas Δ 6-dessaturase, elongase e a Δ -5-dessaturase, respectivamente, competindo assim com ácido linoleico para formação de 20:4 n-6 (BANNI, 2002).

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para avaliar o efeito do CLA na saúde. Furlan et al. (2013), relataram que a dieta suplementada com CLA ou fitoesteróis ou sua combinação por 65 dias foram eficazes na redução da gordura corporal, tecido adiposo e consumo de ração de ratos. Park et al.(2010), observaram que este ácido graxo pode reduzir a incidência de acidente vascular cerebral.

Enquanto muitos estudos mostram o efeito benéfico do CLA, há os que vão contra estes resultados. Tais estudos apresentam resultados controversos quanto à segurança da suplementação do CLA, tendo sido relatados em inúmeras oportunidades: indução de dislipidemias; aumento nos teores de glicose e insulina; aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (DINIZ et al. 2008; HALADE; RAHMAN; FERNANDES, 2010). Por este motivo, mais estudos a cerca deste ácido graxo são necessários para elucidar seus efeitos no organismo.

2.3 LIPÍDIOS E NEURODESENVOLVIMENTO

As duas classes de AGPI são α -linolênico (18:3 n-3) e α -linoleico (18:2 n-6), ambos estão envolvidos de forma direta em diversos processos metabólicos e fisiológicos do organismo humano, principalmente na gênese e desenvolvimento cerebral, além de atuarem como precursores dos AGPICL, originando os ácidos araquidônico - ARA (20:4 n-6), eicosapentaenoico - EPA (20:5 n-3) e docosahexaenóico - DHA (22:6 n-3), sendo estes sintetizados no retículo endoplasmático liso, especialmente no fígado, através de biorreações de alongamento da cadeia de carbono e dessaturação (Figura 1) (ANDRADE, CARMO, 2006).

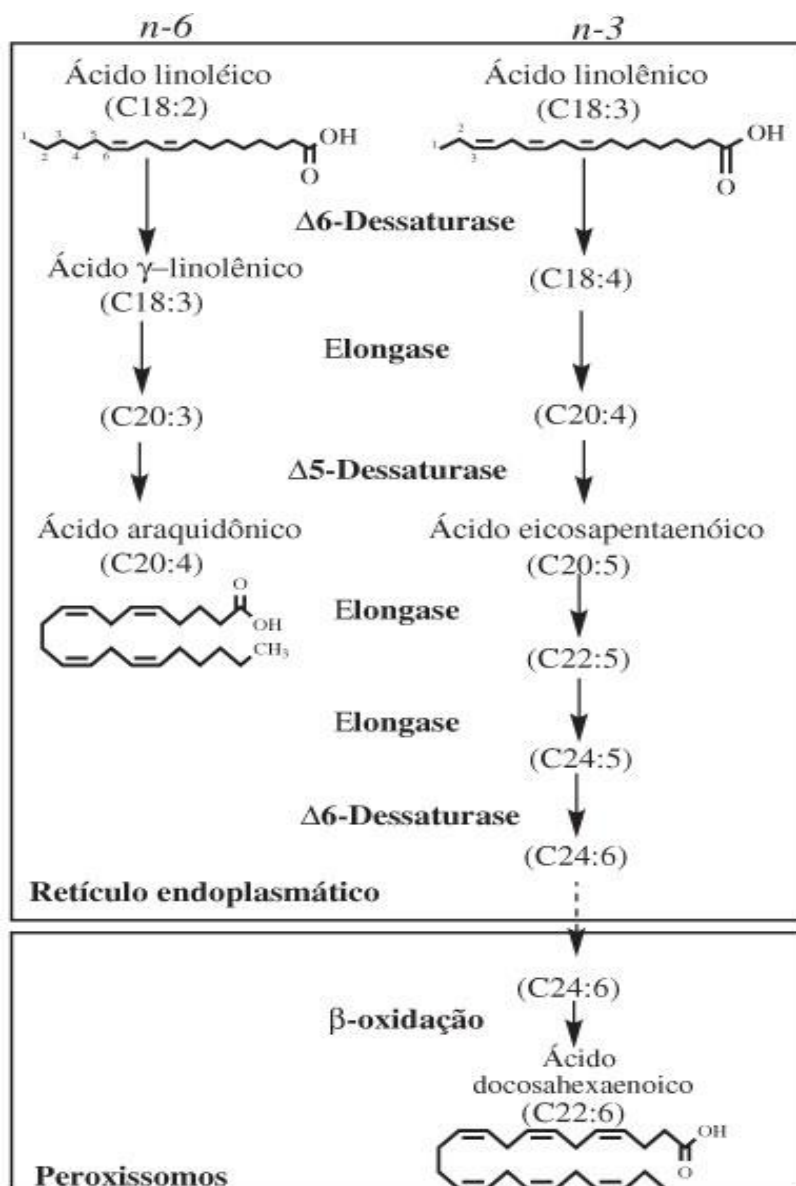


Figura 1. Esquema do metabolismo dos ácidos graxos da família n-3 e n-6.

Fonte: Appolinário et al., (2011).

Estudos têm apontado que a incorporação dos AGPICL pelo sistema neurológico começa a ocorrer ainda na fase intrauterina, uma vez que gênese do sistema nervoso central (SNC) se dá no início do primeiro trimestre de gestação perpassando até os primeiros anos de vida, sendo em ratos a ocorrência dessa maturação no final da gestação e durante toda a lactação. Esta fase é descrita por alguns autores como período crítico de desenvolvimento, onde ocorre intensa atividade neuronal que compreende a neurogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular, mielinogênese, formação das sinapses e a síntese e liberação de neurotransmissores (MORGANE et al. 1993; CLANDININ, 1999; SCHIEFERMEIER; YAVIN, 2002), de

modo que a ausência desses ácidos graxos durante esse período tem sido correlacionada a uma incapacidade específica de crescimento do cérebro e a danos irreparáveis (KUS; MANCINI-FILHO, 2010).

Segundo Apolinário et al. (2011) dos AGPIC, o ARA é o mais comumente encontrado na maior parte dos tecidos, porém, encontra-se mais relacionado com os processos de aprendizado e memória, através do fortalecimento sináptico e plasticidade. Alguns estudos têm evidenciado o potencial desse AG quanto à sua capacidade de se difundir através da membrana celular e modular uma série de funções, como por exemplo, a liberação de neurotransmissores, além de desempenhar um importante papel na manutenção dos axônios e sinapses centrais (CAMPELLO-COSTA et al. 2006; VELASCO, 2009).

Quanto ao DHA, este desempenha papel essencial na fisiologia do cérebro (BOURRE, 2004), se sobrepõe em questão de quantidade em relação aos outros ácidos graxos e é rapidamente incorporado nas membranas plasmáticas cerebrais, atuando na neurotransmissão química (APPOLINÁRIO et al. 2011). A rapidez com que o DHA é incorporado pelo tecido cerebral talvez se dê ao fato da capacidade de captação, síntese e esterificação bastante efetiva desse AG na célula neuronal.

No último trimestre de gestação há um aumento da captação de DHA e ARA (GOW; HIBBELN, 2014), estimando-se que a taxa de acréscimo no último trimestre gestacional seja de aproximadamente 45 mg/kg por dia (LAPILLONE; JENSEN, 2009), devido à demanda, a placenta estabelece preferência no transporte desses ácidos graxos.

Almeida (2007) ao realizar um estudo *in vivo* objetivando avaliar o perfil dos AG dos cérebros de ratos filhotes, oriundos de mães alimentadas com dieta à base de linhaça e de caseína, observou um acúmulo significativo de DHA e outros importantes ácidos graxos quando comparados ao grupo caseína e controle, corroborando com a hipótese de que há de fato a transferências do DHA da mãe para o feto durante o período gestacional.

Em outras décadas já se evidenciava a relação entre dietas deficientes em ácido linolênico com a redução na condução do estímulo auditivo (SASTE et al. 1998). Estudos mais atuais têm confirmado tal hipótese associando esse tipo de dieta a um menor crescimento de neuritos em neurônios hipocampusais, decréscimo no tamanho dos corpos celulares de neurônios em várias regiões encefálicas e alteração na

arborização dendrítica (AHMAD et al. 2002; WAINWRIGHT, 2002; CALDERON; KIM, 2004).

No período pós-natal, considerado como pico de crescimento cerebral e de mielinização, os ácidos graxos passam a ser ofertados via leite materno, uma vez que o organismo do lactente não é maduro o suficiente para a síntese desses ácidos devido a sua imaturidade hepática (ALMEIDA, 2007; GAETE; ATALAH, 2003). O leite materno apresenta em sua composição um teor de ARA e DHA três vezes superior quando comparado ao leite de vaca, assim, importa destacar que em questão de composição nutricional adequada referente ao desenvolvimento neurológico, o leite de vaca se torna insuficiente para atender as necessidades do lactente (SILVA; MIRANDA; SOARES, 2007). Segundo Bortolozo e colaboradores (2013), o leite materno possui uma quantidade significativa de DHA, variando entre 0,2 e 0,6% da gordura do leite, porém, seu conteúdo lipídico quanto ao tipo de ácido graxo pode ser alterado por diversos fatores, dentre esses, a ingestão alimentar materna (COSTA; SABARENSE, 2010).

Carvalho (2010), ao avaliar o efeito da suplementação de óleo de peixe (fonte de n-3) e óleo de prímula (fonte de n-6), em uma concentração de 2 gramas de óleo/dia durante 15 dias, em um grupo de gestantes e a sua influência nos ácidos graxos do leite materno, constatou que a suplementação do óleo de peixe alterou de forma favorável a composição lipídica do leite materno, aumentando significativamente o DHA e EPA, corroborando assim com a hipótese de que crianças amamentadas com leite materno possuem níveis maiores de DHA e fosfolipídios do córtex cerebral, além de apresentarem vantagens em seu desenvolvimento intelectual (GORDON, 1997), isso devido a influência que tais lipídios exercem sobre a membrana celular, podendo alterar sua fluidez, densidade e até mesmo suas propriedades biofísicas comumente responsáveis por tais efeitos funcionais (UAUY; DANGOUR, 2006).

A incorporação de CLA no cérebro foi detectado apenas em alguns casos e em concentrações muito baixas (ALASNIER et al., 2002). Este fato pode ocorrer por diferentes razões: (1) má incorporação em fosfolipídios (PL); (2) abastecimento relativamente baixo; (3) incorporação seletiva de outros ácidos graxos; e (4) competição com ácidos graxos incomuns com ligações duplas trans como CLA (FA et al., 2005).

O estado metabólico das células do cérebro desempenha papel fundamental na fisiopatologia deste órgão (TRAVIS, 1994; CARMIGNOTO, 2000). Sabe-se que os astrócitos são capazes de sintetizar ARA e DHA, para participar na síntese e catabolismo de eicosanóides (BERNOUD, 1998; GHARAMI; DAS; DAS, 2015), e para ter um papel no transporte e metabolismo de ácido graxo (SPRECHER, 2000; MOORE et al. 2001). Assim, a incorporação de metabolitos de CLA no cérebro pode exercer atividades biológicas benéficas também neste órgão (FA et al. 2005). Pesquisa *in vitro* observou que o CLA protegeu neurônios corticais embrionários de morte excitotóxica causada pelo efeito do glutamato. Uma suposta explicação é que o CLA aumenta os níveis de B-celllymphoma 2 (Bcl-2), genes que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, bloqueando assim vias de morte resultante da permeabilidade mitocondrial, o que pode ter impedido a entrada do glutamato (HUNT et al. 2010). Estudos *in vivo* realizados com a gordura do leite de cabra que é fonte de CLA e ofertada a ratos na fase inicial da vida, demonstrou que esta dieta altera a eletrofisiologia cerebral quando ofertado durante o aleitamento (SOARES et al. 2012) e parâmetros de ansiedade quando ofertado na gestação (SOARES et al. 2013).

2.5 MATURAÇÃO REFLEXA

Para o estudo acerca do desenvolvimento do SNC um dos métodos utilizados é a ontogênese de reflexos. Os reflexos representam uma das expressões comportamentais da função cerebral. A maturação de reflexos específicos em ratos tem sido bem estabelecida (FOX, 1965). Smart e Dobbing (1971) verificaram alterações na ontogênese reflexa de ratos submetidos à desnutrição no período crítico de desenvolvimento do SNC.

Evidências científicas indicam uma inter-relação entre dietas utilizando diferentes teores de lipídeos e o desenvolvimento reflexo. Dietas confeccionadas com óleo de peixe e óleo de milho nos teores de 10%, foram ofertadas a ratos nos períodos de gestação e lactação. Ao término do experimento os autores observaram retardo na maturação da resposta reflexa ao susto e o tempo de condução maior na via auditiva do tronco cerebral (SASTE et al.1998).

Santilan et al. (2010), ao estudarem camundongos provenientes de mães tratadas durante a gestação e aleitamento, com dietas contendo teores de n-6/n-3

(óleo de soja e girassol) confrontada a uma dieta comercial, constataram que, ambos os tratamentos anteciparam o aparecimento do reflexo de aversão ao precipício e retardaram o reflexo de geotaxia negativa no grupo óleo de soja.

A gordura de leite de cabra contendo CLA, foi introduzida a ratos durante períodos de gestação e/ou lactação em comparação com óleo de soja, observaram que este tratamento no período de aleitamento foi capaz de acelerar o aparecimento reflexo recuperação do decúbito em queda livre. No entanto, proporcionou atraso em resposta aversão ao precipício quando comparado ao grupo controle (SOARES et al. 2013). Pode-se observar nos estudos supracitados, que o desenvolvimento do sistema nervoso pode ser diretamente afetado por modificações dietéticas durante o período crítico do desenvolvimento.

2.6 LIPÍDIOS E MEMÓRIA

Uma alimentação adequada, aquela rica em todos os nutrientes é de extrema importância para o desenvolvimento do SNC. Escolher os alimentos adequados, tais como alguns tipos de lipídios, especialmente os AGCL, poderá influenciar decisivamente nas fases do desenvolvimento mental e conseqüentemente na memória (FERNANDES, 2011).

Fernandes et al. (2011) estudaram o desenvolvimento cognitivo em ratos que receberam dieta rica em linhaça, semente fonte de n-3, durante a gestação, lactação e fase adulta. Com os resultados pode-se observar que a linhaça ofertada durante o perinatal e períodos pós-desmama melhora a cognição em detrimento de crescimento. Porém, os autores chamam a atenção para o equilíbrio entre n-3/n-6, pois uma proporção alterada pode contribuir não só para um déficit no crescimento, mas também em uma variedade de alterações metabólicas envolvendo síntese de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos.

A adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) é uma molécula importante na transdução de sinal em uma célula, atuando como mensageiro secundário celular. Esta proteína está envolvida na aprendizagem e memória e é um importante modulador da expressão do gene de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF auxilia na sobrevivência neuronal e na neurogênese (FINKBEINER, 2000).

Dieta rica em DHA é importante para produção de proteínas de sinalização como a proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt, fundamental nas funções cerebrais (AKBAR et al., 2005), a Ca^{2+} /calmodulina-dependente da proteína quinase II (CaMKII), envolvida no desempenho físico, memória e aprendizagem (VAYNMAN et al. 2007) e nos efeitos do BDNF sobre a plasticidade sináptica (YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2007).

Pesquisa relacionando dieta rica em n-3 e exercício físico em ratos, aumentou significativamente habilidade na aprendizagem espacial, e estes efeitos foram reforçadas pelo exercício. Foi observado também aumento nos níveis de BDNF, Akt e CaMKII (WU; YING; GOMEZ-PINILLA, 2008).

Hashimoto et al. (2015), ofertaram dieta suplementada com EPA e DHA durante a fase de senescência de ratos. O comportamento relacionado com a aprendizagem foi avaliado por um labirinto radial de oito braços, sendo cada animal testado 6 dias por semana, para um total de 5 semanas. O estudo sugere que a longo prazo administração EPA + DHA pode ser uma possível estratégia de prevenção contra o declínio cognitivo relacionado com a idade.

Trabalho realizado por Gustavsson et al. (2010), ofertaram lipídios complexos durante a gravidez e lactação e utilizou o teste de reconhecimento de objetos e labirinto de Morris, para avaliar a memória dos roedores. Os dados sugerem que a suplementação materna com estes lipídios durante a gravidez e lactação é segura e tem um impacto significativo no aumento do peso do cérebro, conteúdo de gangliosídeos e fosfolipídios na prole, mas não melhorou a memória a longo prazo.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 ANIMAIS E DIETA

Os filhotes utilizados na pesquisa foram obtidos de ratas da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério de criação da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com idade entre 90 e 120 dias e peso de 250 ± 50 g. Foram utilizadas 12 fêmeas primíparas para obtenção dos neonatos, sendo mantida uma fêmea para cada macho durante o acasalamento.

Após confirmação da prenhez através de esfregaço vaginal, as ratas gestantes foram alojadas em gaiolas-maternidade individuais de polipropileno, em condições-padrão: temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro (12:00 h; início da fase clara às 6:00 h), umidade de $\pm 65\%$, recebendo ração e água *ad libitum*. Na primeira semana de gestação as ratas receberam ração comercial (Presense - Purina®), sendo a dieta experimental ofertada a partir do sétimo dia de gestação e durante toda lactação. Foram formados 3 grupos: Grupo Controle (GC) (n=11) recebendo a dieta experimental contendo óleo de soja; Grupo GCLA1 (n=13), recebeu dieta experimental contendo 1% de CLA e o GCLA3 (n=12), contendo 3% de CLA, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) como mostra a Tabela 1. O consumo de ração das mães foi aferido semanalmente no horário de 11:00-12:00 h.

Após o desmame, os filhotes foram alojados em gaiola de polipropileno sendo mantidos dois animais por gaiola. Receberam dieta comercial durante todo o tempo de experimento (Presense - Purina®). As ninhadas foram padronizadas em 6 filhotes machos e o desmame realizado aos 21 dias pós-natal. A pesquisa seguiu o protocolo experimental segundo as recomendações éticas do National Institute of Health (Bethesda, USA), com relação aos cuidados com os animais. O presente trabalho teve aprovação do Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Federal da Paraíba Nº: 0407/13.

A mistura de CLA utilizada foi da marca comercial Clarinol® Powder (Loders Crockland) contendo na composição *cis* - 9 *trans* - 11 (36,9%) e *trans* -10*cis* -12 (37,4%). Este produto é um pó natural contendo uma mistura de mistura de CLA, sem adição de outros ingredientes. O mesmo foi adquirido em loja comercial da Flórida,

nos Estados Unidos, onde é bastante utilizado por praticantes de atividade física. A escolha da marca foi baseada em pesquisa que também utilizou a mistura de isômeros (BATTHACHARYA et al. 2005). As concentrações 1% e 3% foram selecionadas com base em estudos, com a finalidade de estimar a dose mínima e máxima do CLA (ALASNIER et al. 2002; Fa et al. 2005; DINIZ et al. 2008; FURLAN et al. 2013; JELIŃSKA, 2014; STEPHANIE et al. 2015).

Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). O delineamento experimental do estudo está representado na (Figura 2). Todos os testes realizados encontram-se expressos na (Figura 3).

Tabela 1. Composição da dieta controle e experimental

Ingredientes (g/Kg)	DIETAS		
	Controle	CLA1%	CLA3%
Amido de milho	530	520	500
Caseína	199,5	199,5	199,5
Sacarose	100	100	100
Óleo de soja	70	70	70
Mistura de isômeros do CLA	-	10	30
Celulose	50	50	50
Mistura de mineral (AIN-93G-MX)	35	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93-VX)	10	10	10
L-Cistina	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Total de calorias (Kcal)	39,60	40,10	41,10

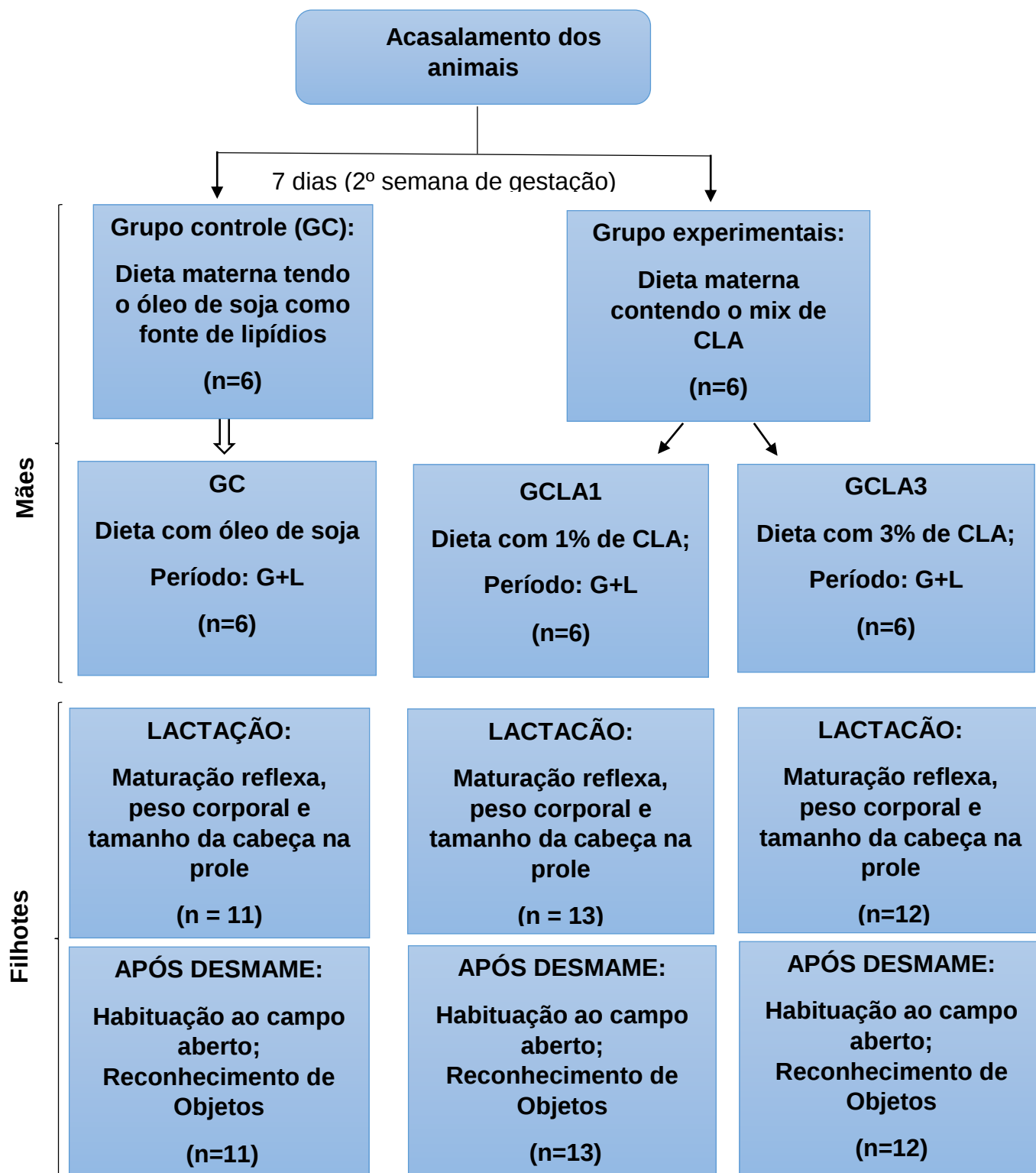


Figura 2. Delineamento experimental.

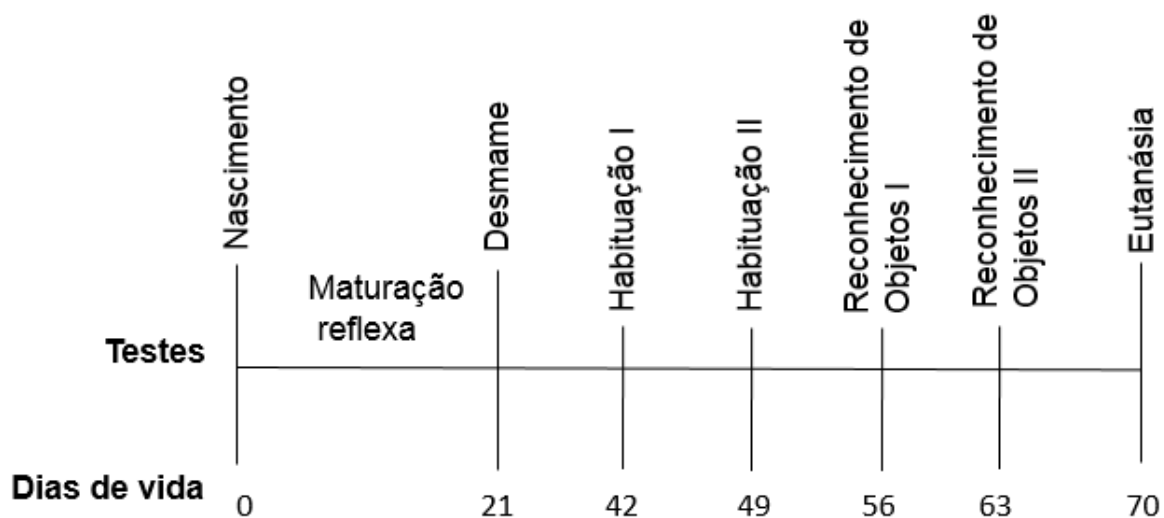


Figura 3. Desenvolvimento, maturação reflexa e cognição da prole de ratas tratadas com dieta padrão (GC), contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3) durante a gestação e lactação.

3.2 ONTOGENIA REFLEXA NOS FILHOTES RECÉM-NASCIDOS

As respostas reflexas (Figura 4 e Figura 5) foram pesquisadas diariamente, entre 12:00-13:00 h, do 1º ao 21º dia pós-natal. A consolidação da resposta foi considerada positiva quando houve repetição à reação reflexiva durante três dias seguidos. Os primeiros modelos experimentais de reflexos para ratos foram estabelecidos por Smart e Dobbing (1971).

Foram analisados os seguintes reflexos: (1) desaparecimento da Preensão Palmar, e (2) aparecimentos das seguintes respostas: a) Recuperação Postural de Decúbito, b) Colocação Espacial Desencadeada Pelas Vibrissas, c) Aversão ao Precipício, d) Geotaxia Negativa, e) Resposta ao Susto e f) Recuperação do Decúbito em Queda Livre. Tendo como tempo máximo de observação de 10 segundos, de acordo com os seguintes procedimentos:

a) Desaparecimento da Preensão Palmar (PP) – utilizou-se um bastonete metálico com aproximadamente 5 cm de comprimento por 1mm de diâmetro, fazendo uma leve toque na palma da pata dianteira direita de cada animal. Em resposta, ocorria flexão

rápida dos artelhos. Com o desenvolvimento do recém-nascido, esta resposta desaparecia.

b) Recuperação Postural de Decúbito (RPD) – O rato foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana e lisa. Em resposta, observava-se o retorno ao decúbito ventral. A resposta foi considerada positiva quando o animal assumia o decúbito ventral, apoiado sobre as quatro patas.

c) Resposta de Colocação (“placing”) pelas Vibrissas (CPV) – O filhote foi suspenso pela cauda, de tal forma que suas vibrissas tocavam levemente a borda de uma superfície plana. Em resposta, o animal colocava as duas patas anteriores sobre a mesa e realizava movimentos de marcha, associados com extensão de tronco.

d) Aversão ao Precipício (AP) – O animal foi colocado sobre uma superfície plana e alta (mesa), com as patas dianteiras na extremidade da mesa, de maneira que ele detectava o precipício. Em resposta o animal se deslocava para um dos lados e caminhava em sentido contrário à borda, caracterizando a aversão ao precipício.

e) Geotaxia Negativa (GN) – O animal foi colocado no centro de uma rampa medindo 34 x 24 cm, revestida com papel antiderrapante (papel crepon), com inclinação aproximada de 45°, com a cabeça na parte mais baixa da rampa. Em resposta, o animal girava o corpo, num ângulo de 180°, posicionando a cabeça em sentido ascendente.

f) Resposta ao Susto (RS) – O animal foi submetido a um estímulo sonoro intenso e súbito, produzido pela percussão de um bastão de ferro sobre um recipiente metálico (6 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura), a uma distância aproximada de 10 cm da cabeça. Em resposta, ocorre uma retração das patas anteriores e posteriores, com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal.

g) Recuperação do Decúbito em Queda Livre (RDQL) – O animal foi segurado pelas quatro patas, com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm, e solto em queda livre sobre um leito de espuma sintética (30 x 12 cm). Em resposta, o animal recuperava o decúbito durante a queda livre caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas.

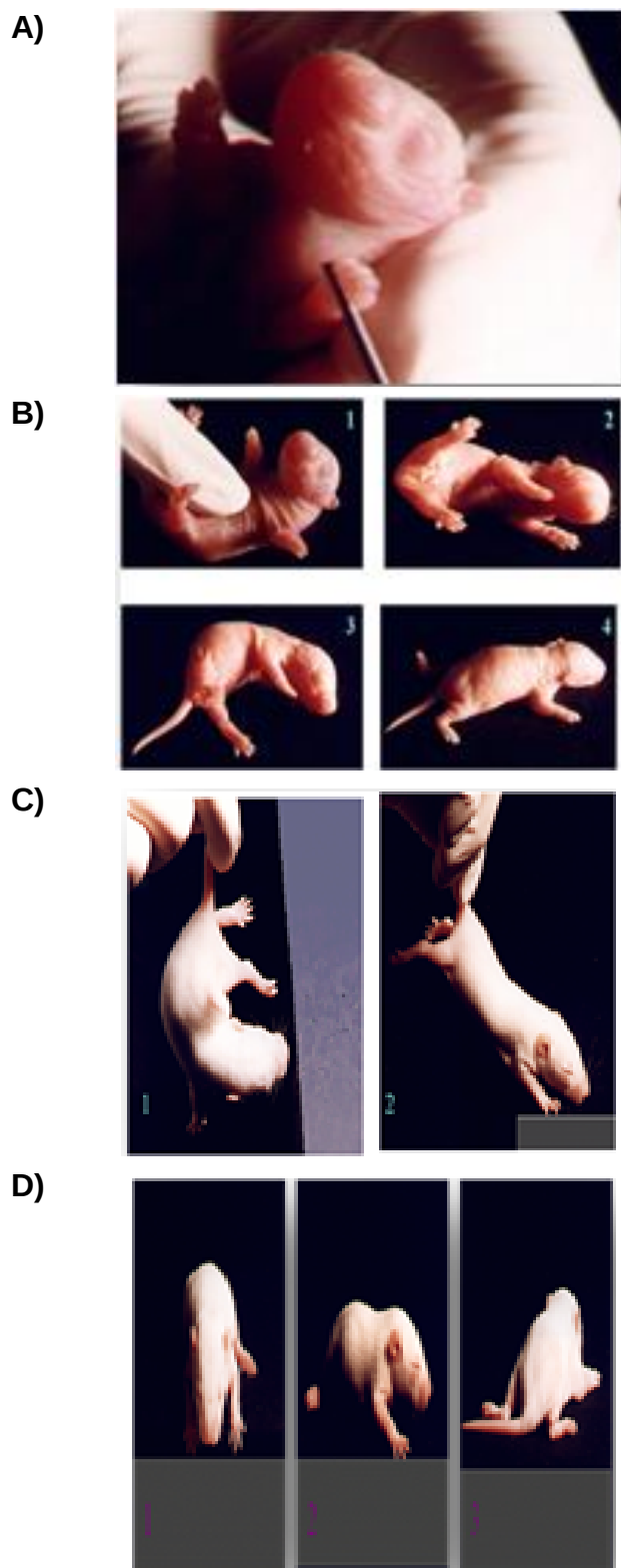


Figura 4. Avaliação da maturação dos reflexos da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3). A) PP; B) RDP; C) CPV; D) AP. **Fonte:** Barros, 1999.

E)



F)



G)



Figura 5. Avaliação da maturação dos reflexos da prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação com dieta padrão contendo óleo de soja (GC) e dieta experimental contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3). E) GN; F) RS; G) RDQL
Fonte: Fotos: Barros, 1999.

3.3 CARACTERÍSTICAS DE MATURAÇÃO FÍSICA

O comprimento do eixo crânio laterolateral (distância entre os dois ouvidos) e comprimento do eixo ântero-posterior da cabeça (distância entre focinho e a articulação da cabeça-pescoço) foram aferidos semanalmente com um paquímetro com 0,01 mm de precisão (Figura 6). O peso corporal também foi aferido semanalmente do dia 0 ao 21º dia de vida (Figura 7).

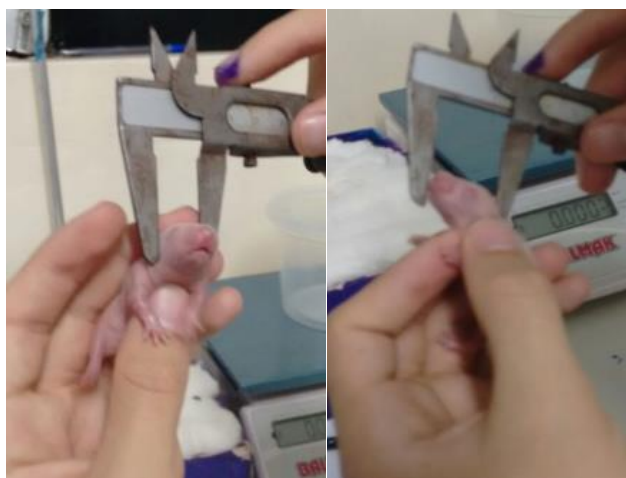


Figura 6. Aferição do eixo crânio laterolateral e eixo ântero-posterior da cabeça da prole de ratas tratadas com dieta padrão (GC), contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3) durante a gestação e lactação.

Fonte: Próprio autor



Figura 7: Aferição do peso da prole de ratas tratadas com dieta padrão (GC), contendo 1% de CLA (GCLA1) ou 3% de CLA (GCLA3) durante a gestação e lactação.

Fonte: Próprio autor

3.4 TESTE DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

O teste de habituação ao campo aberto tem por objetivo avaliar a capacidade de habituação do animal a longo prazo no aparelho do campo aberto (Figura 8), que consiste em uma arena circular metálica (de cor branca), delimitada por paredes brancas com a parte superior aberta. O piso da arena é dividido em 17 campos (com linhas pretas), sendo 3 círculos concêntricos que, por sua vez, são subdivididos em um total de 16 segmentos e um círculo central. O teste consistiu em colocar o animal no centro da arena circular do campo aberto. O parâmetro avaliado foi atividade locomotora como índice de facilitação da memória: número de cruzamentos dos campos pelo animal com as quatro patas, ou seja, um maior número de campos cruzados significa possivelmente que o animal não lembrou do local e por isso sentiu curiosidade de explorar mais. O tempo de observação foi de 10 minutos.

Todo o procedimento foi repetido 7 dias após a primeira exposição. E foi realizado entre às 14:00–18:00h, utilizando todos os animais do grupo com 42 dias de vida da prole na primeira exposição e com 49 dias na segunda exposição. No dia do experimento, os ratos foram manipulados apenas no momento de colocá-los no campo aberto para que não houvesse mudança de ambiente ou alguma alteração no comportamento.



Figura 8. Aparelho do Campo Aberto.

Fonte: próprio autor

Os animais foram identificados por meio de números em placas de papéis que foram colocadas em locais que pudessem ser captados pelo vídeo. Ao final de cada teste, o aparelho foi limpo com álcool a 10% a cada troca de animal.

As sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo instalada em um suporte situado acima do aparato. Posteriormente os vídeos foram analisados e a categoria comportamental foi identificada e registrada manualmente. Em roedores, a habituação é analisada através da atividade locomotora no campo aberto, sendo considerada um indicativo de aprendizagem não associativa (LEUSSIS; BOLIVAR, 2006; GAMBERINI et al. 2015).

3.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O teste compreendeu duas exposições do animal ao campo aberto, sendo que a segunda exposição ocorre 7 dias após a primeira. O teste envolve 4 momentos, sendo o primeiro a sessão de habituação (sem objetos), seguida do segundo momento, sessão de treino com exposição do animal a objetos, o terceiro momento, relacionando-se ao primeiro teste onde foi analisado a memória a curto prazo com exposição de objetos e quarto momento ao segundo teste onde foi analisado a memória a longo prazo com exposição aos objetos (Figura 9).

Com relação à sessão de habituação, todos os animais um por vez foram colocados no campo aberto na ausência de objetos, ficando livres para explorar e permaneceram por 3 minutos, apenas para se habituar ao local do teste. Após a sessão de habituação do animal, no 56º dia, este foi colocado de volta na arena do campo aberto contendo 2 objetos diferentes (A1- familiar e A2- novo). O rato pode explorar os objetos livremente por 10 minutos.

O primeiro teste (memória a curto prazo) ocorreu no mesmo dia da sessão de treino, de forma que o primeiro rato da sessão de treino foi colocado três horas após a sessão, isso ocorreu sucessivamente com todos os ratos que realizaram o teste. Neste teste foi mantido o objeto familiar A1 e um objeto novo A3, com duração de 5 minutos. Os ratos submetidos a esse teste estavam com 56 dias de vida.

O segundo teste, memória a longo prazo, foi realizado 7 dias após o teste de memória a curto prazo, quando o animal se encontrava com 63 dias de vida. Neste

teste foi mantido o objeto familiar A1 e um objeto novo A4. O animal foi introduzido na arena para explorar por 5 minutos os objetos.

Para todos os testes os objetos foram colocados em lados opostos (padronizados para todos os animais) e o animal foi colocado no centro da arena do campo aberto, de modo que nenhum dos objetos ficasse de frente pra o mesmo. E o parâmetro avaliado foi o tempo gasto para explorar cada objeto: a exploração foi definida como o comportamento do animal ao cheirar ou tocar o objeto com o focinho e/ou patas dianteiras.

Utilizou-se 4 objetos para a realização do experimento, sendo 1 para ser o objeto familiar (A1); 1 objeto novo para o treino (A2); 1 objeto novo para o primeiro teste (A3) e 1 objeto novo para o segundo teste (A4) (Figura 10).

O procedimento foi realizado entre as 08:00–12:00h, utilizando o número de animais de cada grupo. No dia do experimento, os animais permaneceram em suas gaiolas, manipulados apenas no momento de colocá-los na arena do campo aberto para que não houvesse mudança de ambiente ou alguma alteração no comportamento. As sessões foram filmadas com uma câmera de vídeo instalada em um suporte. Posteriormente os vídeos foram analisados e as categorias comportamentais identificadas e registrada manualmente.

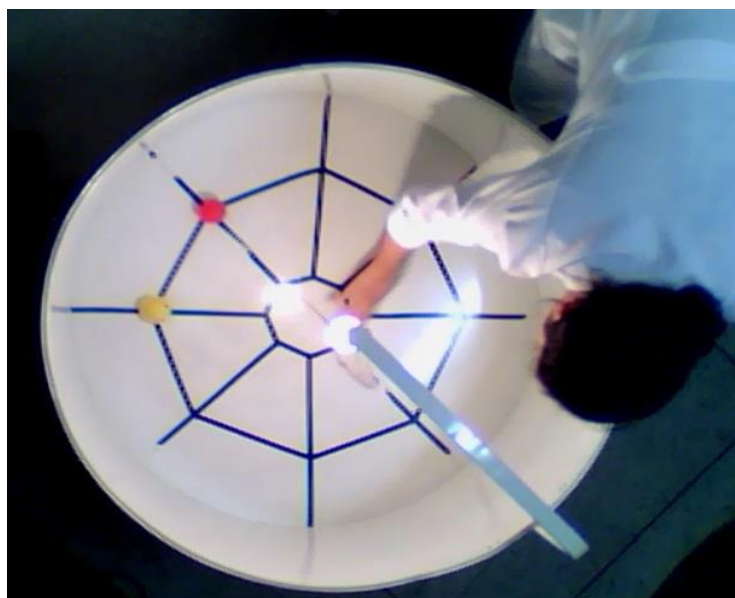


Figura 9. Teste de reconhecimento de objetos.

Fonte: Sousa, 2015.

Os animais foram identificados por meio de números em placas de papéis que foram colocadas em locais que pudesse ser captados pelo vídeo. A cada animal testado o aparelho foi limpo antes de iniciar e depois de concluído o teste com álcool a 10%.

Após análise dos vídeos foi determinada a relação da exploração do objeto pelo animal. Os resultados foram analisados como o tempo total gasto explorando o objeto novo/ o tempo total do objeto familiar + razão do objeto novo (GUSTAVSSON et al. 2010).

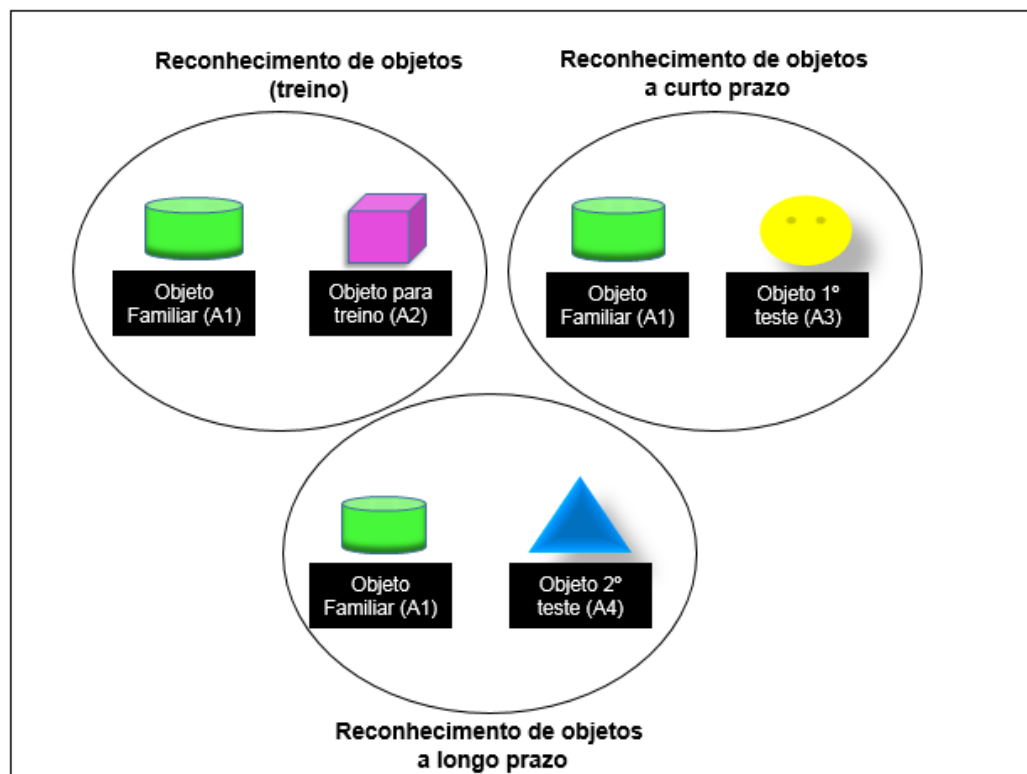


Figura 10. Disposição dos objetos utilizados no Teste de Reconhecimento dos Objetos.

Fonte: Próprio autor

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tratados com análise estatística mediante a utilização do programa Sigma Stat 3.1. Foi utilizado como teste o ANOVA One way seguido pelo teste Holm-Sidak para os dados paramétricos e o teste Kruskal-Wallis, seguido do

teste de Dunn para os dados não paramétricos. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoic in the rat hippocampus. **Nutritional Neuroscience**, v. 2, p. 103-113, 2002.
- ALASNIER, C; BERDEAUX, O; CHARDIGNY, J.M; SEBEDIO, J. L. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.13, p. 337–345, 2002.
- ALFAIA, C. P. M; ALVES, S. P; MARTINS, S. I. V; COSTA, A. S. H; FONTES, C. M. G. A; LEMOS, J. P. C; BESSA, R. J. B; PRATES, J. A. M. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. **Food Chemistry**, v.114, p.939–946, 2009.
- AKBAR, M; CALDERON, F; WEN, Z. KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 10858 –10863, 2005.
- ALMEIDA, K. C. L. **A incorporação de ácidos graxos ômega – 3, oriundos da semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), influenciando o desenvolvimento cerebral de ratos filhotes**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista MN-Metabolica**, v. 8, p. 135-143, 2006.
- APPOLINÁRIO, P. P.; DEROGIS, P. B. M. C.; YAMAGUTI, T. H.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenóico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v. 34, n.8. 2011.
- BALOGUN, K. A; CHEEMA, S. K. The expression of neurotrophins is differentially regulated by omega-3polyunsaturated fatty acids at weaning and post weaning in C57BL/6mice cerebral córtex. **Neurochemistry International**, v.66, p.33–42, 2014.
- BANNI, S; ANGIONI, E; CASU, V; MELIS, M.P; CARTA, G; CORONGIU, F.P; THOMPSON, H; IP, C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.20, p. 1019–1024, 1999.
- BANNI, S. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v.13, p. 261–266, 2002.
- BARALDI, F. G; VICENTINI, T. M; TEODORO, B. G; DALALIO, F. M; DECHANDT, C. R. P; PRADO, I. M. R; CURTI, C; CARDOSO, F. C; UYEMURA, S. A; ALBERICI, L. C. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin

resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 147–154, 2016.

BARROS, S. R. A. **Efeito dos lipídeos dietéticos sobre a utilização protéica**. 1980. 135p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

BAUMAN, D. E; BAUMGARD, L. H; CORL, B. A; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999. Disponível em: <<http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/CLA.pdf>>. Acesso em: 11 de julho de 2015.

BAUMAN, D. E; CORL, B.A; PETERSON, G. P. The biology of conjugated linoleic acids. *Advances in conjugated linoleic acid research*, v. 2, p. 146-173, 2003.

BERDEAUX, O; VOINOT, L; ANGIONI, E; JUANEDA, P; SEBEDIO, J. L. A simple method of preparation of methyl trans-10, cis-12 and cis-9, trans-11 octadecadienoates from methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p.1749-1755, 1998.

BERNOUD, N; FENART, L; BENISTANT, C; PAGEAUX, J. F; DEHOUCK, M. P; MOLIERE, P; LAGARDE, M; CECHELLI, R; LECERF, J. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. **The Journal of Lipid Research**, v. 39, p.1816 - 1824, 1998.

BHATTACHARYA, A.; RAHMAN, M.; SUN, D. et al.; The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat–fed male Balb/C mice. **Journal of Nutrition**, v.135, p.1124–1130, 2005.

BOMFIM, M. A. D; LANNA, D.P.D; FACO, O; RODRIGUES, M.T; GOMES, G.M.F; PEREIRA, L.P.S. Manipulação do perfil de ácidos graxos e potencial funcional da gordura do leite de cabra para a nutrição e saúde humanas. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DO LEITE, 9, Porto Alegre, 2006. **Anais...** Porto Alegre, 2006. (CD ROM)

BORTOLOZO, E. A. F. Q.; SAUER, E.; SANTOS, M. S.; BAGGIO, S. R.; JUNIOR, G. S.; FARAGO, P. V.; CÂNDIDO, L. M. B.; PILATTI, L. A. Supplementation with the omega-3 docosahexaenoic acid: influence on the lipid composition and fatty acid profile of human milk. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 1. 2013.

BOURRE, J.M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. **Journal Nutritional Health Aging**, v.8, p.163-174, 2004.

BOYLSTON, T. D; BEITZ, D. C. Conjugated Linoleic Acid and Fatty Acid Composition of Yogurt Produced from Milk of Cows Fed Soy Oil and Conjugated Linoleic Acid, **Journal of Food Science**, v.67, p.1973–1978, 2007.

CALDERON, F; KIM H.Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 4, p. 979-988, 2004.

CAMPELLO-COSTA, P.; FOSSE, A. M. J.; OLIVEIRA-SILVA, P.; SERFATY, C. A. Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection. **Neuroscience**, v. 139, n.3, p.979-989, 2006.

CARVALHO, F. D. F. **Efeitos da suplementação com ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 em nutrízes na composição de ácidos graxos sérico e do leite materno e nos biomarcadores de oxidação lipídica**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, São Paulo, 2010.

CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. **Progress in Neurobiology**, v.62, p.561–581, 2000.

CHIN, S. F; LIU, W; STORKSON, J. M; HA, Y. L; PARIZA, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, p. 185-197, 1992.

CLANDININ M. T. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, v.34, p. 131-137, 1999.

CRAWFORD, M.A. The role of dietary fatty acids in biology: their place in the evolution of the human brain. **Nutrition Reviews**, v.50, p. 3–11, 1992.

COSTA, A. G. V.; SABARENSE, C. M. Modulação e composição de ácidos graxos do leite humano. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, 2010.

DHIMAN, T. R; NAM, S. H; URE, A. L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and fat. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 63-82, 2005.

DINIZ, Y. S; SANTOS, P. P; ASSALIN, H. B; SOUZA, G. A; ROCHA, K. H. R; EBAID, G. M. X; SEIVA, F. R. F; AMAUCHI, J. F; FILHO, J. L. V. B. N; NOVELLI, E. L. B. Conjugated linoleic acid and cardiac health: Oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p.318 – 325, 2008.

FA, M; DIANA, D; CARTA, G; CORDEDDU, L; MELIS, M. P; MURRU, E; SOGOS, V; BANNI, S. Incorporation and metabolism of c9,t11 and t10,c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1736, p.61 – 66, 2005.

FERNANDES, F. S; SOUZA, A. S; CARMO, M. G. T; BOAVENTURA, G. T. Maternal intake of flaxseed-based diet (*Linum usitatissimum*) on hippocampus fatty acid profile. Implications for growth, locomotor activity and spatial memory **Nutrition**, v. 27, p.1040–1047, 2007.

FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. **Neuron**, v. 25, p. 11–14, 2000.

FOX, W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v.13, n.2, p.234-241, 1965.

FURLAN, C. P. B; MARQUES, A. C; MARINELI, R. S; JÚNIOR, M. R. M. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. **Food Research International**, v.51, p. 429–435, 2013.

GAETE, G. M.; ATALAH S. E. Niveles de LC-PUFA n-3 em la leche materna después de incentivar el consumo de alimentos marinos. **Revista Chilena de Pediatría**, v.74, n. 2. 2003.

GHARAMI, K; DAS, M; DAS, S. Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 51 – 62, 2015.

GAMBERINI, M. T; RODRIGUES, D. S; RODRIGUES, D; PONTES, V. B. Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p.45-49, 2015.

GOMEZ-CORTES, P; BACH, A; LUNA, P; JUAREZ, M; DE LA FUENTE, M. A. Effects of extruded linseed supplementation on n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid in milk and cheese from ewes. **Journal of Dairy Science**, v.92, p. 4122–4134, 2009.

GORDON, N. Nutrition and cognitive function. **Brain & Development**, v.19, p.165-170, 1997.

GOW, R. V.; HIBBELN, J. R. Omega-3 Fatty Acid and Nutrient Deficits in Adverse Neurodevelopment and Childhood Behaviors. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v.23, p. 555–590, 2014.

GUSTAVSSON, M; HODGKINSON, S. C; FONG, B; NORRIS, C; GUAN, J; KRAGELOH, C. U; BREIER, B. H; DAVISON, M; MCJARROW, P. Maternal supplementation with a complex milk lipid mixture during pregnancy and lactation alters neonatal brain lipid composition but lacks effect on cognitive function in rats. **Nutrition Research**, v.30, p.279–289, 2010.

GREEN, P.; YAVIN, E. Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain. **Lipids**, v. 31, n. 8, p. 859-865, 1996

HALADE, G. V; RAHMAN, M. D. M; FERNANDES, G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p. 332–337, 2010.

HALLAHAN, B; GARLAND, M. R. Essential fatty acids and mental health. **British Journal of Psychiatry**, v.186, p. 275–277, 2005.

HARFOOT, C. G; HAZELWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: P. N, HOBSON (ed.), **The rumen microbial ecosystem**, Elsevier, 1988. 527p.

HERRERA, E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development – a review. **Placenta**, v. 23, p. 9-19, 2002.

HERVAS, G; LUNA, P; MANTECON, A. R; CASTANARES, N; DE LA FUENTE, M. A; JUAREZ, M; FRUTOS, P. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 399–405, 2008.

HASHIMOTO, M; KATAKURA, M; TANABE, Y; MAMUN, A. A; INOUE, T; HOSSAIN, S; ARITA, M; SHIDO, O. n-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 203–209, 2015.

HUNT, W. T; KAMBOJ, A. ANDERSON, H. D; ANDERSON, C. M. Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. **Journal of Neurochemistry**, v.115, p.123–130, 2010.

JELIŃSKA, M; BIAŁEK, A; MOJSKA, H; GIELECÍŃSK, I; TOKARZ, A. Effect of conjugated linoleic acid mixture supplemented daily after carcinogen application on linoleic and arachidonic acid metabolites in rat serum and induced tumours. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 2230–2236, 2014.

KAVRAAL, S.; ONCU, S. K.; BITIKTAS, S.; ARTIS, A. S.; DOLU, N.; GUNES, T.; SUER, C. Maternal intake of Omega-3 essential fatty acids improves long term potentiation in the dentate gyrus and Morris water maze performance in rats. **Brain Research**, v. 1482, p. 32-39, 2012.

KHANAL, R. C; DHIMAN, T. R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. **Journal of Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 72-81, 2004.

KUS, M. M. M; MANCINI-FILHO, J. **Ácidos graxos: eicosapentaenoico (EPA) docosahexaenóico (DHA)**. São Paulo: ILSI Brasil, 2010.

LAPILLONNE, A.; JENSEN, C. L. Reevaluation of the DHA requirement for the premature infant. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n.2, p. 143-150, 2009.

LEUSSIS, M. P; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.30, p.1045-1064, 2006.

MOORE, S. A; YODER, E; MURPHY, S; DUTTON, G. R; SPECTOR, A. A. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). **Journal of Neurochemistry**, v. 56, p. 518–524, 1991.

MOORE, S. A. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.16, p.195 –200, 2001.

MORGANE, P. J; AUSTIN-LAFRANCE, R; BRONZINO, J; TONKISS, J; DIAZ-CINTRA, S; CINTRA, L; KEMPER, T; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.17, p.91 – 128, 1993.

MURPHY, S; PEARCE, B; JEREMY, J; DANDONA, P. Astrocytes as eicosanoid-producing cells. **Glia**, v.1, p. 241–245, 1988.

OOMEN, C. M; OCKÉ, M. C; FESKENS, E. J; ERP-BAART, V. M. A; KOK, F. J; KROMHOUT, D. Association between trans fatty acid in taje and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population- based study. **Lancet**, v. 357, p. 746-751, 2001.

Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Organização Mundial da Saúde: Geneva, 2003, n. 916,

PARIZA, M. W; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. **Carcinogenesis**, v.6, p. 591–593, 1985.

PARK, Y; ALBRIGHT, K. J; STORKSON, J. M; LIU, W; PARIZA, M. W. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 5 4 –5 9, 2010.

REEVES, P. G; NIELSEN, F. H; FAHEY, C. G. J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p. 1939 – 1951, 1993.

SANTILLÁN, M. E; VINCENTI, L.M; MARTINI, A.C; CUNEO, P. M; ARNALDO MANGEAUD, A; STUTZ, A, Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different u-6: u-3 ratios in mice Nutrition. **Basic Nutritional Investigation**. v. 26, p.423–43, 2010.

SASTE, M. D.; CARVER, J. D.; STOCKARD, J. E.; BENFORD, V. J.; CHEN, L.T.; PHELPS, C. P. Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 740-743, 1998.

SERAFEIMIDOU, A; ZLATANOS, S; KRITIKOS, G; TOURIANIS, A. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p.24–30, 2013.

SCHIEFERMEIER, M; YAVIN, E. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. **J. Lipid Res**, v.43, p.124–131, 2003.

SIKORSKI, A. M; HEBERT, N; SWAIN, R. A. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain. **BrainResearch**, v.40, p. 35 – 40, 2008.

SILVA, D. R. B.; MIRANDA JUNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2. 2007.

SMART, J. I; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**, v. 28, p. 85–95, 1971.

SOARES, J. K. B; ROCHA-DE-MELO, A. P; MEDEIROS, QUEIROGA, R. C. R. E; BOMFIM, M. A. D; SOUZA, A. F. O; NASCIMENTO, A. L. V; GUEDES, R. C. A. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1820, p.1490 –1495, 2012.

SOARES, J. K. B; MELO, A. P. R; MEDEIROS, M. C; QUEIROGA, R. C. R. E; BOMFIM, M. A. D; SANTIAGO, E. C. A; GUEDES, R. C. A. Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: Na elevated plus maze analysis. **Neuroscience Letters**, v.552, p. 25 – 29, 2013.

SOUSA, M. M. **Efeitos de dietas a base de castanha de caju no desenvolvimento comportamental da prole de ratos. 2015. 54 fl.** Monografia (Curso de Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1486, p. 219–231, 2000.

TRAVIS, J. Glia-The brains other cells. **Science**, v.266, p. 970–972, 1994.

UAUY, R.; PEIRANO, P.; HOFFMAN, D. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. **Lipids**, v. 31, p. 167-176, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: CORNELL UNIVERSITY, 1994, 476p.

VAYNMAN, S; YING, Z; GOMEZ-PINILLA, F. The select action of hippocampal calcium calmodul in protein kinase II in mediating exercise enhanced cognitive function. **Neuroscience**, v. 144, p. 825–833, 2007.

VELASCO, C. P. **Impacto da restrição de ácidos graxos essenciais na Manutenção das conexões retinotectais de roedores**. 2009. 108 f. Dissertação

(Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.

WAINWRIGH, T P. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 61-69, 2002.

WOOD, J. D; RICHARDSON, R. I; NUTE, G. R; FISHER, A. V; CAMPO, M. M; KASAPIDOU, P. R; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v.66, n.1, p. 21–32, 2004.

World Health Organization (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 916. Geneva: World Health Organization.

WU, A; YING, Z; GOMEZ-PINILLA, F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v. 155, p. 751–759, 2008.

YOSHII, A; CONSTANTINE-PATON, M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. **Neuroscience**, v.10, p. 702–711, 2007.

5 RESULTADOS

A partir desse estudo, foi elaborado um artigo:

- O artigo original, situado nas páginas 52 a 75, intitulado **“Maternal supplementation with conjugated linoleic acid during pregnancy and lactation improves neonatal reflex maturation and cognitive function in rats”**, foi enviado para a Revista Nutrition Research, que possui fator de impacto de 2.472, sendo classificada como Qualis B1 na área de Ciências de Alimentos, pela CAPES.

5.1 ARTIGO ORIGINAL

MATERNAL SUPPLEMENTATION WITH CONJUGATED LINOLEIC ACID DURING PREGNANCY AND LACTATION IMPROVES NEONATAL REFLEX MATURATION AND COGNITIVE FUNCTION IN RATS

Submetido à Revista *Nutrition Research*

QualisB1; fator de impacto 2,472

Maternal supplementation with conjugated linoleic acid during pregnancy and lactation improves neonatal reflex maturation and cognitive function in rats

Michelly Pires Queiroz^a, Martiniano da Silva Lima^b, Mayara Queiroga Barbosa^b, Marília Ferreira Frazão Tavares-de-Melo^b, Camila Carolina de Menezes Patrício Santos^b, Maria Elieidy Gomes de Oliveira^{ab}, Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga^{ac}, Juliana Késsia Barbosa Soares^{ab*}

^aProgram of Food Science and Tecnology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil;

^bLaboratory of Experimental Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Campina Grande, Cuité, CG, Brazil;

^cLaboratory of Bromatology, Department of Nutrition, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil;

* Corresponding author: E-mail: julianakessia2@gmail.com. Phone: +55 83 33721900

queiroz_m.p@hotmail.com

m.artiniano@hotmail.com

mayara.queirogab@gmail.com

mariliafrazao@hotmail.com

camilacarolina01@gmail.com

elieidynutri@yahoo.com.br

rcqueiroga@yahoo.com.br

Abbreviations

CLA; Conjugated linoleic acid

PUFA; polyunsaturated fatty acids

AA; arachidonic acid

DHA; docosahexaenoic acid

CNS; central nervous system

UFPE; Federal University of Pernambuco

AIN; American Institute of Nutrition

DCHA; Docosatetraenoic acid

EPA; eicosapentaenoic acid

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is naturally produced by ruminant animals and has been investigated due to its beneficial effects to health. However, the effects of a mixture of CLA on central nervous system (CNS) at early stages of life have not yet been investigated. This study aimed to investigate the impact of maternal diet with different CLA concentrations during pregnancy and lactation on the neonatal reflex maturation and cognitive function of newborn rats males. The animals were divided into 3 groups: control group (CG): receiving standard diet without CLA; CLA1 group: receiving experimental diet containing 1% CLA and CLA3 group: diet containing 3% CLA. After birth, the reflex responses were observed from the 1st to the 21st postnatal day, as well as body weight. After weaning, the memory of animals was measured by habituation test and object recognition test using the open field arena. Analyses were compared by one-way Anova test followed by Holm Sidak test considering $p < 0.05$. CLA1 and CLA3 induced acceleration in reflex maturation. CLA3 showed higher body weight compared to CG ($p < 0.05$). In habituation and object recognition tests, CLA3 showed increased memory. Maternal treatment with CLA anticipates reflex maturation, increases body weight and improves the responses of newborn rats in memory tests.

Keywords: Conjugated linoleic acid; Neurodevelopment; Physical parameters; Fatty acids; Maternal nutrition

1. Introduction

The central nervous system in humans usually arises in the embryo at around the 3rd and 4th week after fertilization and development continues up to the age of 2 years. In rats, this development occurs from the second week of pregnancy until the end of lactation. This phase is known as "critical period of development" and any injury can cause permanent damage [1,2].

In the critical period of development, there is an increased need for polyunsaturated fatty acids (PUFA), mainly arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA), which together comprise about 20% of brain tissue. DHA provides better flow and optimizes the development and functions of the neuronal membrane [3,4]. Constant PUFA intake becomes important in the regulation of neurotrophins, which perform essential functions during the development of the fetal nervous system [4]. During breast milk, lactation takes the placental function, carrying nutrients from the nursing mother to the neonate. The lipid fraction present in breast milk, in addition to the energy function, is responsible for structuring the myelin sheath [5].

Among PUFAs, linoleic acid and linolenic are essential fatty acids found in breast milk. Adequate intake of these fatty acids is related to proper neurological and cognitive development of infants and their deficiency in the brain development phase is associated with behavioral abnormalities [5,6,7].

It is made up of linoleic acid isomers, where their double bonds are conjugated. CLA is naturally produced by ruminant animals and is found in food products such as milk fat and meat of these animals [8,9]. CLA isomers can be commercially prepared by partial hydrogenation of linoleic acid [9]. CLA has been widely investigated due to its many beneficial health effects [10,13]. It was found that CLA crosses the blood brain barrier [14], angiograms angiogenesis in the mammalian brain [15] and protects cortical cells against neurotoxic *in vitro* elements [16]. In addition, maternal diet containing fat of goat milk is a source of CLA, altering the cortical electrical activity [17] and the anxiety in rats [18]. But the effects of the mix of CLA on isolated Central Nervous System (CNS) changes at this stage of life have not yet been investigated.

Knowing that dietary lipids, when offered during the initial phase of life, may alter reflex maturation [19,20] and the behavior of animals [18,21]. The hypothesis of this

study is that maternal supplementation containing a mixture of CLA isomers when offered during pregnancy and lactation positively influences reflex maturation (short time) and improves memory (long time) in offspring rats. Thus, this study aims to investigate the impact of a mix of CLA maternal diet with different concentrations on reflex ontogeny and memory testing a novel recognizing objects and habituation in open field in the pups.

2. Methods and materials

2.1 Animals and diets

Female Wistar rats aged 90 and 120 days and weighting 230 ± 30 grams were used to obtain puppies and acrided from the Federal University of Paraiba (UFPB). During mating, two females were maintained for each male. After pregnancy confirmation, mothers were housed in individual maternity polypropylene cages in standard conditions: temperature $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, with light-dark cycle (12 h; early light phase at 6:00 h), humidity of $\pm 65\%$, receiving food and water *ad libitum*. In the first week of gestation, rats received commercial diet (presense - Purina), and the experimental diet offered from the second week of gestation and throughout lactation. During pregnancy and lactation maternal feed intake was measured weekly. Three groups were formed: control group (CG) receiving standard diet without CLA; CLA1 receiving experimental diet containing 1% CLA and CLA3 containing 3% CLA (Table 1), according to recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN-93G) [22]. CLA used was Clarinol powder (Loders Crockland) with composition containing c9 t11 (36.9%) and t10c12 (37.4%).

Litters were standardized in six puppies and weaning was performed at 21 days after birth. The research followed the experimental protocol in accordance with ethical recommendations of the National Institute of Health (Bethesda, USA) and was approved by the ethics research commission of the Federal University of Paraíba nº 0407/13 .

Table 1. Composition of control and experimental diets.

Ingredient (g/Kg)	DIETS		
	Control	CLA1	CLA3
Cornstarch	530	520	500
Casein	199.5	199.5	199.5
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
CLA mix isomers	-	10	30
Fiber	50	50	50
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
L-Cystine	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Total Calories (Kcal)	39.60	40.10	41.10

2.2 Reflex ontogeny in newborn puppies

Reflex responses were observed every day, on 12:00 p.m. between 1st and 21st postnatal day. Response consolidation was considered positive when there was repetition to reflex reaction for three consecutive days. Smart and Dobbing [24] established an experimental model for reflex maturation in rats represented in Table 2.

Table 2. Description of the reflex test.

Reflex	Stimulus	Response
Palmar grasp	Light percussion on the palm of the right foreleg	Quick bending of ankles.
Righting	The rat is placed in supine position on a surface.	Return to the prone position with all paws in 10s.
Cliff-avoidance	The rat is placed on a flat and high surface (table), with legs towards the extremity.	Moves to one side and walks in the opposite direction to the edge
Vibrissa-placing	The is was suspended by the tail and its vibrissae lightly touch the edge of a flat surface.	Both front legs are placed on the table, performing march movements.
Negative-geotaxis	The rat is placed at the center of an inclined ramp with head facing downwards	Body spin at an angle of 180 °, positioning head upwards.
Auditory-startle response	Intense and sudden sound stimulus	Retraction of anterior and posterior legs, with rapid and involuntary body immobilization
Free-fall righting	Held by the four legs, at a height of 30 cm, it is released in free fall on a synthetic foam bed.	Position recovery during freefall on the surface supported on four paws.

2.3 Physical maturation

The length of the laterolateral skull axis (distance between the ear holes) and length of the anteroposterior axis of the head (distance between snout and head-neck articulation) were weekly measured using caliper with 0.01 mm precision. Body weight was weekly measured until the end of lactation.

2.4 Habituation test in the open field

The habituation test in the open field is used to evaluate the animal with respect to long-term capacity on the open device, consisting of a metal circular arena (painted in white), bordered by white walls with open top. The floor is divided into 17 fields (lines

painted in black), with concentric circles 3 cm in diameter, respectively) which, in turn, are subdivided into a total of 16 segments and a central circle.

In rodents, habituation is analyzed by locomotor activity in the open field and is considered an indicator of non-associative learning [25,26].

At 42 days old, the animals were exposed to the open in two phases, the second exhibition occurred seven (7) days after the first. The parameter analyzed was ambulation for 10 minutes. All sessions were recorded with a video camera attached to the laboratory ceiling and later the videos were analyzed.

2.5 Object recognition test

For the evaluation of declarative memory, the object recognition test was held three days after the open field habituation test, using the same open field arena. The animal underwent two exhibitions to the open field, and the second seven days after the first. The first test is associated with the short-term memory and the second is related to the long-term memory [21].

This test assesses the holding of the animal in time spent (sniffing or touching the object with the nose and / or front legs). First, habituation was performed in the absence of any object, where animals could freely explore the arena for 3 min. Then, in the training session, animals were placed in the arena containing two different objects (A1 and A2) for free exploration for 10 minutes for animals to recognize and identify object A1 (familiar object). The test session was held 180 minutes after the training session to evaluate short-term memory, in which animals were placed in the arena containing two objects, A1 (familiar object) and A3 (novel object), to freely explore for 5 minutes. After 7 days, the retest was performed to assess the long-term memory, in which the animals were placed in the arena to freely explore A1 (familiar object) and A4 (novel object) objects.

Before and after each test, the device and the objects were cleaned with 10% alcohol and after the exchange of animals and objects, unit and objects were cleaned with 10% alcohol and paper towels.

Results were analyzed as the total time spent exploring the objects and the novel object/total familiar + novel object ratio [7].

3. Statistical analyses

Intergroup differences for reflex maturation were analyzed with one-way Kruskal–Wallis test, followed by Dunn test. For the rest of the data, One-Way ANOVA followed by the Holm–Sidak test was used. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The Sigma Start software was used for data analysis.

4. Results

4.1 Feed Intake

The average feed intake during pregnancy GC, GCLA1 and GCLA3 were 134.37, 133.73 and 141.0 respectively. Lactation GC showed average (225.67), the GCLA1 (215.33) and GCLA3 (175). There was no difference in maternal food intake between the groups ($p > 0.05$).

4.2 Reflex ontogeny in newborn puppies

From the evaluation of the reflex maturation measured in this study (Table 3), it was observed that disappearance of the palmar grasp in CLA1 and CLA3 animals showed a delay in relation to CG and CLA3 compared with CLA1 ($p < 0.05$). CLA3 animals showed acceleration compared with CG when the maturation of righting, cliff avoidance, vibrissa placing, negative geotaxis and auditory startle was investigated ($p < 0.05$). CLA3 animals accelerated righting and vibrissa placing in relation to CLA1. Regarding free fall righting, CLA3 animals showed retardation compared to CG ($p < 0.05$). Animals treated with 3% CLA had better results as shown in advance most of the responses evaluated when compared mainly to the GC.

Table 3. Reflex maturation of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3).

REFLEX MATURATION	GROUPS		
	CONTROL (n=11)	CLA 1 (n=16)	CLA 3 (n=12)
Palmar grasp ^a	3(3-6)	3,5(2-10)*	5(2-10)*#
Righting ^b	3(1-6)	3(2-6)	2(1-4)#
Cliff-avoidance ^b	10(6-13)	7,5(3-13)	6(5-7)*
Vibrissa-placing ^b	11(8-12)	10(4-13)	6(3-10)*#
Negative-geotaxis ^b	17(8-18)	13(11-17)*	13(8-16)*
Auditory-startleresponse ^b	14(12-17)	13(12-15)	12(12-13)*
Free-fall righting ^b	11(8-15)	12(9-14)	13(10-16)*

Data expressed in Median (min – max); (Statistical test: One way Anova followed by Kruskal Wallis); *versus control group; # versus CLA1 group; a=desappearance; b=appearance

4.3 Physical maturation

Body weight analysis showed that CLA3 had higher body weight than the other groups in every days analyzed, except on the seventh day, which was different only compared with CLA1 ($p < 0.05$) (Figure 1).

Treatment with CLA 1% and 3% CLA was responsible for larger size laterolateral perimeter of the animal head on virtually every day study to compare them to the GC (Figure 2) ($p < 0.05$).

A higher concentration of CLA (3%) increased the anterior posterior axis of the head on the 7th and 21th day. However, the lowest concentration of CLA decreased the perimeter assessed the first days of life offspring ($p < 0.05$). (Figure 3)

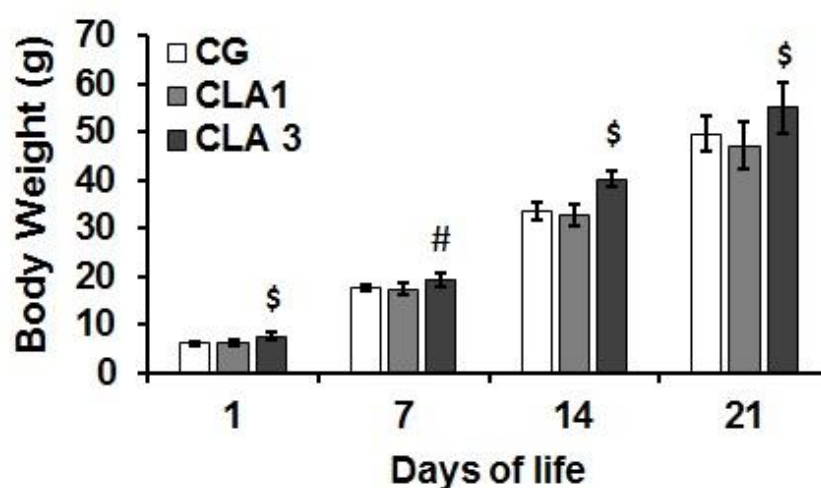


Figure 1. Body weight of rats which mothers were treated during gestation and lactation added standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); # versus CLA1 group; \$ versus all group.

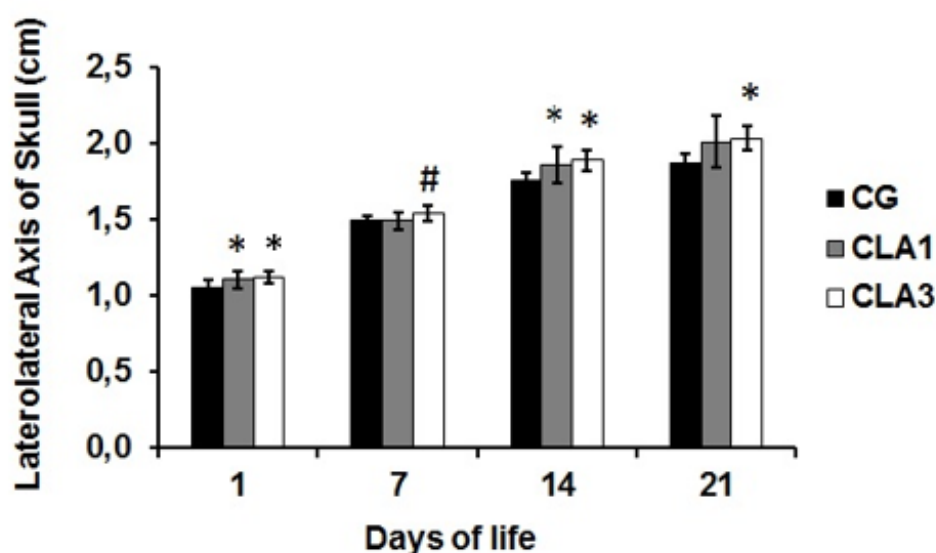


Figure 2. Laterolateral skull axis of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); * versus control group; # Versus CLA1 group

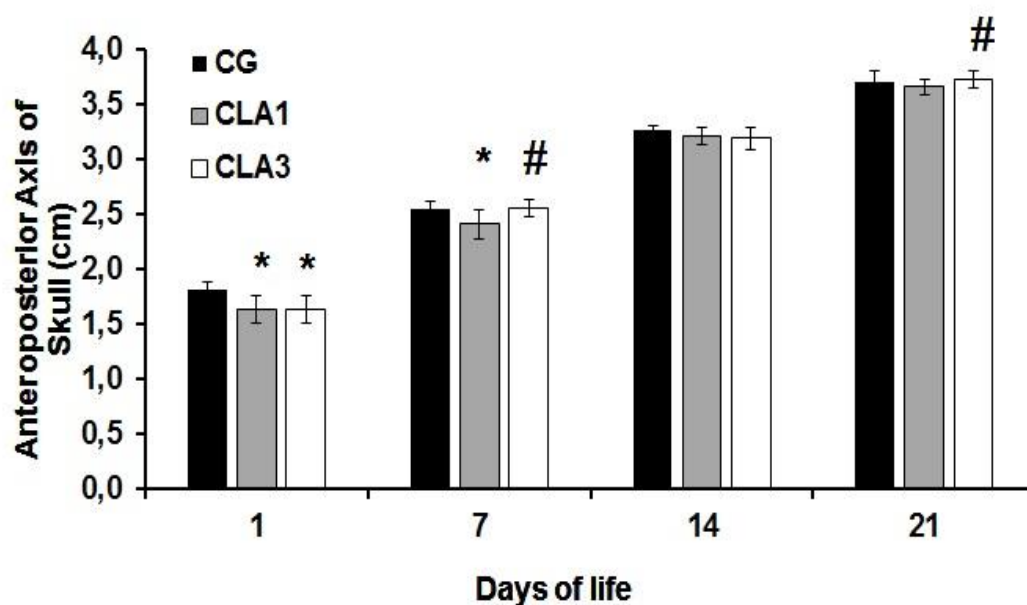


Figure 3. Anteroposterior skull axis of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); * versus control group; # Versus CLA1 group.

4.4 Habituation to the open field

According to (Figure 4), the GCLA3 ambula less in the second exposure compares the first exposure ($p < 0.05$). This fact shows that the animals of this group possibly remembered the place and so did not feel the need to explore.

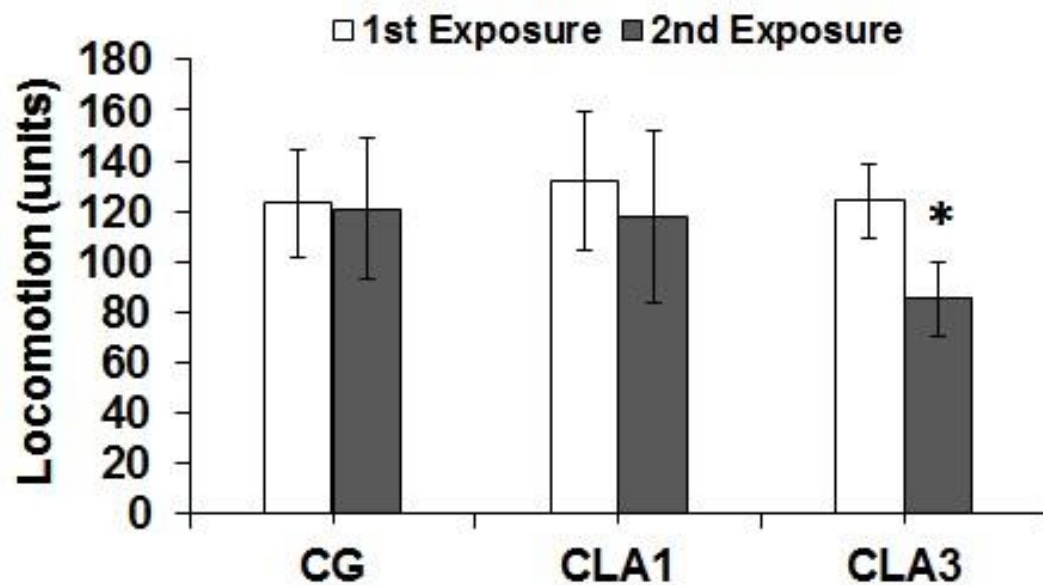


Figure 4. Habituation test of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); * versus first exposure in the same group.

4.5 Object recognition

For short-term memory test, there was no significant difference among groups (Figure 5A). On the other hand, in the long-term memory test, CG, CLA1 and CLA3 explored more unfamiliar objects than familiar objects (Figure 5B), showing that remembered the familiar object ($p < 0.05$). Moreover, GCLA 1 show increased operating ratio in the long run when compared to the CG and GCLA3 decrease of this ratio when compared to GCLA1 (Figure 6B).

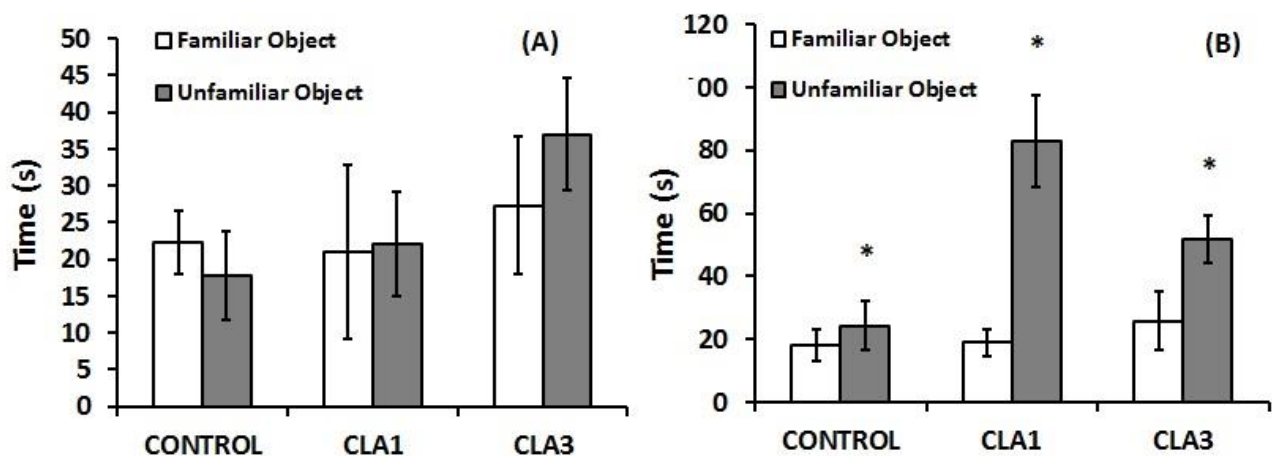


Figure 5. Object recognition test of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); (A) first test; (B) second test; * versus familiar object in the same group.

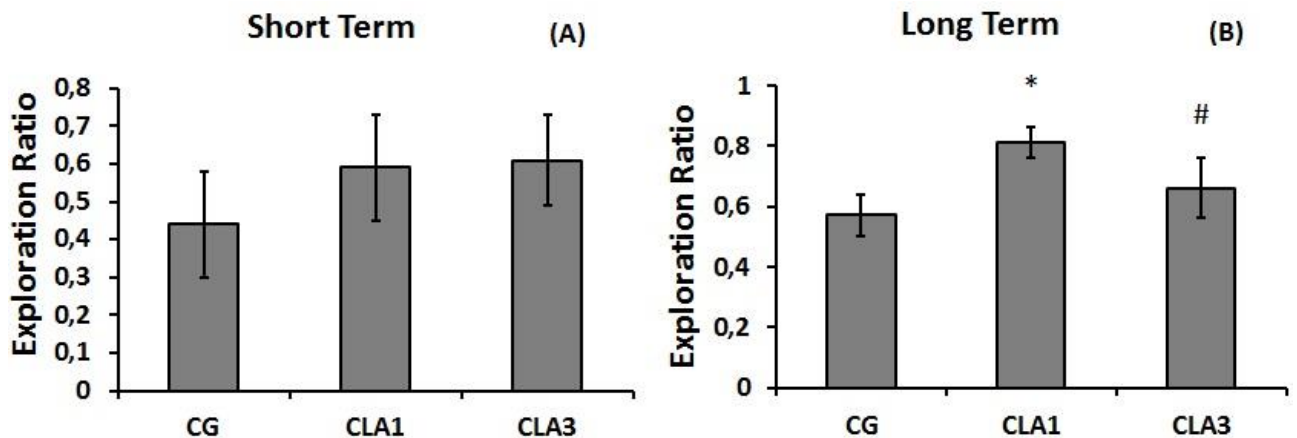


Figure 6. Exploration Ratio of rats which mothers were treated during gestation and lactation with standard diet containing soybean oil and other two groups with experimental diets, one containing 1% CLA (CLA1) and the other with 3% CLA (CLA3). Values expressed as mean and standard deviation (One way ANOVA, Holm-Sidak); (A) short term test; (B) long term test; * versus CG; # versus CLA1 group.

5. Discussion

This study evaluated, in the progeny of rats, the developmental effects of maternal supplementation with different CLA concentrations (1% and 3%) administered during gestation and lactation. Data have shown significant effects of CLA on physical growth (with increase in body weight and laterolateral skull axis) and on the neurodevelopment of newborn rats (acceleration in reflex maturation and memory).

In this study, maternal consumption with an 6 fatty acid with a double bond, the CLA, induced an improvement in memory and acceleration in the neurodevelopment of offspring. Lipids play an increasingly recognized role in neuronal function in the brain and neurodevelopment occurs in the perinatal period [1,27]. In this phase, essential fatty acids of n-3 and n-6 families constitute a lipid substrate that is absolutely required for adequate formation of nerve cell membranes and these lipids are also involved in cell signaling and regulate synaptic throughput [28]. The effects of n-3 in the maternal diet on brain development of newborn rats are already known [29,30] but the effects of n-6 have been less investigated.

Maternal diets with different n-6: n-3 ratios have been associated with reflex ontogeny and physical growth changes in the progeny of rats [19,20]. These results demonstrate the vulnerability of the developing nervous system to inadequate balance of essential fatty acids in the diet during the early life. Study treating animals during lactation with goat fat containing CLA observed delay in cliff avoidance but there was anticipation in free-fall righting [18]. Another study found delay in negative geotaxis in animals consuming soybean oil and acceleration of cliff avoidance in animals treated with sunflower oil [19]. The cerebellum has its development peak during lactation and reflex maturation is directly related to the continuous differentiation and maturation of cerebellar neurons [31]. However, lipids offered by contained only 1.2% CLA [18]. In the present study, 1% CLA induced acceleration only on negative geotaxis but when this dose was tripled, almost all reflexes observed were increased. The reflex maturation involves visual and postural system [32]. CLA can cross the blood-brain barrier and be deposited in the brain [14,17]. Possibly, it was the proper formation of the membranes of neurons induced by CLA, which enabled the early maturation of the nervous system in these puppies. These findings suggest that CLA positively interfere

in the offspring neurodevelopment, anticipating reflex maturation of offspring; At least, this effect was best observed when the dose of CLA was increased to 3%.

Maternal dietary lipids may also interfere in the body weight of newborn rats. In this study, the body weight of pups whose mothers received 3% CLA was higher throughout lactation. Similar result was observed when animals receiving diet containing CLA [17]. Different result was observed when lactating rats were treated with 1.35% CLA, they had a lower body weight [33]. Pups treated during pregnancy and lactation with 1.47% CLA showed decreased body weight [34]. The authors have attributed this effect to the reduction of lipids in breast milk; possibly, this reduction was not induced in the present study. These data demonstrate that the amount of maternal dietary lipids may interfere differently in the physical parameters of newborn rats.

There was no significant difference in feed intake of mothers of GC, GCLA1 and GCLA3. But the body weight of the offspring of mothers treated with CLA3% was higher in much of the study. Possibly a higher dose of CLA may have increased the amount of fat in the breast milk, thus influencing the higher body weight of pups.

Spatial memory was modified in young rats fed with diet rich in trans fatty acids offered during early life and after weaning [35]. Another research demonstrated that maternal diet high in lard induced damage in the memory and learning ability of the offspring [36]. However, both studies evaluated memory using Morris test and in our study, novel object recognition was used and groups treated with CLA showed increased exploration of unfamiliar object in the long term. When animals explore more unfamiliar objects than familiar ones, it indicates good object recognition. In addition [36], treated animals with saturated fatty acids and we used polyunsaturated fatty acids. Linoleic acid is precursor of AA (20:4 n-6), docosatetraenoic acid (DCHA) (22:4 n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA) (22:5 n-6). The amount of DHA in the brain was increased in the offspring of animals treated before weaning, during pregnancy, lactation and after weaning with flaxseed diet, being correlated with better spatial memory performance [37]. These fatty acids are essential for brain development and memory because they modulate synaptic plasticity, improving learning ability. In human infants, the accumulation of these fatty acids occurs during gestation and lactation through placenta and breast milk [38] and our study investigates the same stage of life. Another index of memory used was the open field habituation test. When there is lower locomotor activity in a repeated exposure, it indicates good recognition

[21]. Our data have shown a decrease in the habituation test during the second exposure in the CLA3 group, indicating higher memory. n-3 diet induced an increase in the exploratory activity in young rats, which was not observed in mature or older rats [39] on the other hand, maternal n-3 diet reduced ambulatory activity as demonstrated in the present study [40]. Thus, it was shown for the first time that with bond CLA was able to interfere in these learning parameters.

These findings are very important because they demonstrate the benefits that CLA consumption can bring to a developing brain. Moreover, these effects can persist into adulthood, and the safe consumption of fatty acids should always be investigated, especially in the early life.

6. Conclusion

Based on the results obtained, it could be concluded that maternal supplementation with CLA influences the development of the central nervous system of the offspring, accelerating the reflex maturation (short-term) and improving memory (long-term).

Acknowledgements

The authors thank the financial support from the CAPES and CNPq.

References

- [1] Morgane PJ, Miller M, Kempler T, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosc Behav Rev* 1993;17: 91–128.
- [2] Hsieh T, Brenna T. Dietary docosahexaenoic acid but no arachidonic acid influences central nervous system fatty acid status in baboon neonates. *Prost Leuk Essen Fat Acids* 2009;8:105–10.
- [3] Valenzuela AB, Nieto SK. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 em la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Pediatr* 2003;74:149–57.

- [4] Balogun KA, Randunu RS, Cheema SK. The effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins of C57BL/6 mice is age and sex specific. *Prost, Leuk Essen Fat Acids* 2014;91:39 – 47.
- [5] Hayat L, Al-Sughayer M, Afzal M. A comparative study of fatty acids in human breast breast milk substitutes in kuwait. *Nutr Res* 1999;19:827–41.
- [6] Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental fetal and postnatal development—a review. *Placenta* 2002;23:9–19.
- [7] Gustavsson M, Hodgkinson SC, Fong B, Norris C, Guan J, Krageloh CU, et al. Maternal supplementation with a complex milk lipid mixture during pregnancy and lactation alters neonatal brain lipid composition but lacks effect on cognitive function in rats. *Nutr Res* 2010;30:279–89.
- [8] Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Pro Lipid Res* 2001;40:283–98.
- [9] Banni S. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:261–66.
- [10] Furlan CPB, Marques AC, Marineli RS, Júnior MRM. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. *Food Res Int* 2013;51:429–35.
- [11] Halade GV, Rahman MDM, Fernandes, G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice. *J Nutr Biochem* 2010;21:332–37.
- [12] Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Pariza MW. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on spontaneously hypertensive rats. *J Funct Foods* 2010;2:54–59.
- [13] Jelińska M, Białek A, Mojska H, Gieleciński I, Tokarz A. Effect of conjugated linoleic acid mixture supplemented daily after carcinogen application on linoleic and arachidonic acid metabolites in rat serum and induced tumours. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1842:2230 –36.
- [14] Fa M, Diana A, Carta G, Cordeddu L, Melis MP, Murru E, et al. Incorporation and metabolism of c9, t11 and t10, c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 2005;1736:61–6.
- [15] Sikorski AM, Hebert N, Swain RA. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain. *Brain Res* 2008;40:35–40.

- [16] Hunt WT, Kamboj A, Anderson HD, Anderson CM. Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. *J Neurochem* 2010;115:123–30.
- [17] Soares JKB, Rocha-de-Melo AP, Medeiros MC, et al. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. *Bioch Biophys Acta* 2012;1820:1490–95.
- [18] Soares JKB, Melo APR, Medeiros MC, Queiroga RCRE, Bomfim MAD, Santiago ECA, et al. Anxiety behavior is reduced, and physical growth is improved in the progeny of rat dams that consumed lipids from goat milk: Na elevated plus maze analysis. *Neurosci Lett* 2013;552:25–29.
- [19] Santillan ME, Vincenti LM, Martini AC, Cuneo MF, Ruiz RD, Mangeaud A, Stutz G. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different n-6: n-3 ratios in mice. *Nutrition* 2010;26:423–31.
- [20] Aquino JS, Soares JKB, Magnani M, Stamford TCM, Mascarenhas RJ, Tavares RL, Stamford TLM. Effects of Dietary Brazilian Palm Oil (*Mauritia flexuosa* L.) on Cholesterol Profile and Vitamin A and E Status of Rats. *Molecules* 2015;20:9054–70.
- [21] Rachetti ALF, Arida RM, Patti CL, Zanin KA, Fernandes-Santos L, Frussa-Filho R, et al. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. *Behav Brain Res* 2012;237:283–89.
- [22] Reeves PG, Nielsen FHC, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition. *J Nutr* 1993;123:939–51.
- [23] Bhattacharya A, Rahman MM, Sun D, Lawrence R, Mejia W, McCarter R, et al. The Combination of Dietary Conjugated Linoleic Acid and Treadmill Exercise Lowers Gain in Body Fat Mass and Enhances Lean Body Mass in High Fat–Fed Male Balb/C Mice. *J Nutr* 2005;135:1124–30.
- [24] Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research* 1971;28:85–95.
- [25] Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Res* 2006;30:1045–64.

- [26] Gamberini MT, Rodrigues DS, Rodrigues D, Pontes VB. Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. *J Ethnopharmacol* 2015;68:45–49.
- [27] Salvat S, Attorri L, Avellino C, Di-Biase A, Sanchez M. Diet, lipids and brain development. *Dev Neurosci* 2000;20:481–487.
- [28] Muller CP, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Gulbins E, Kornhuber J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015;1851:1052– 65.
- [29] Mucci DB, Fernandes FS, Souza AS, Sardinha FLC, Soares-Mota M, Carmo MGT. Flaxseed mitigates brain mass loss, improving motor hyperactivity and spatial memory, in a rodent model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Prost Leuk Essen Fat Acids* 2015;97:13–19.
- [30] Rathod R, Khaire A, Kemse N, Kale A, Joshi S. Maternal omega-3 fatty acid supplementation on vitamin B12 rich diet improves brain omega-3 fatty acids, neurotrophins and cognition in the Wistar rat offspring. *Brain Dev* 2014;36:853–63.
- [31] Allam AA, Albo-Eleneen RE. The development of sensorimotor reflexes in albino mice; albino rats and black-hooded rats. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:545–53.
- [32] Boyle R. Vestibulo spinal control of reflex and voluntary head movement. *Ann NY Acad Science* 2001;942:364–80.
- [33] Hayashi AA, Medeiros SR, Carvalho MH, et al. Conjugated linoleic acid (CLA) effects on pups growth, Milk composition and lipogenic and lipogenic enzymes in lactating rats. *J Dairy Res* 2007;74:160–6
- [34] Ringseis R, Saal D, Müller A, Steinhart H, Eder K. Dietary Conjugated Linoleic Acids Lower the Triacylglycerol Concentration in the Milk of Lactating Rats and Impair the Growth and Increase the Mortality of their Suckling Pups, *J Nutr* 2004;134:3327–34.
- [35] Souza AS, Rocha MS, Carmo MGT. Effects of a normolipidic diet containing trans fatty acids during perinatal period on the growth, hippocampus fatty acid profile, and memory of young rats according to sex. *Nutrition* 2012;28:458–64.

- [36] Yu H, Bi Y, Ma W, He L, Yuan L, Feng J, Xiao R. Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int J Devl Neuroscience* 2010;28:271–76.
- [37] Fernandes FS, Souza AS, Carmo MGT, Boaventura GT. Maternal intake of flaxseed-based diet (*Linum usitatissimum*) on hippocampus fatty acid profile: Implications for growth. *Loco act spat memory. Nutr* 2011;27:1040–47.
- [38] Das UN. Can memory be improved? A discussion on the role of frs, GABA acetylcholine, NO, insulin, TNF- α , and long-chain polyunsaturated fatty acids in memory formation and consolidation. *Brain Dev* 2003;25:251–61.
- [39] Carrié I, Guesnet P, Bourre JM, Francès H. Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behavior differently during development than ageing in mice. *Br J Nutr* 2000;83:439–47.
- [40] Chalon S, Delion S, Vancassel S, Guilloteau D, Lequisquet AM, Besnard JC, et al. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *J Nutr* 1998;128:2512–19.

