

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO ESTRESSE POR CONTENÇÃO NA VIGÊNCIA DE DIETA
PALATÁVEL EM RATOS SOBRE O COMPORTAMENTO E SOBRE O
DESBALANÇO OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

RACHEL KROLOW SANTOS SILVA

Porto Alegre – RS

2010

RACHEL KROLOW SANTOS SILVA

**EFEITOS DO ESTRESSE POR CONTENÇÃO NA VIGÊNCIA DE DIETA
PALATÁVEL EM RATOS SOBRE O COMPORTAMENTO E SOBRE O
DESBALANÇO OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do
Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Dalmaz

Porto Alegre – RS

2010

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus familiares e ao
meu marido, grande e verdadeiro amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela coragem, pela determinação e por iluminar a minha trajetória.

À Prof^a Dr^a Carla Dalmaz, pela atenção, confiança, sensibilidade, carinho, oportunidade, orientação, ensinamentos, apoio, confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, que contribuíram para a minha formação e aprendizado.

Ao Prof. Dr. William Peres pela oportunidade, carinho, motivação e pelos ensinamentos em bioquímica.

À Prof^a Maria da Graça Résem pela amizade, incentivo e por me fazer gostar tanto de bioquímica.

À Prof^a Maria Regina S. Lopes pela amizade, ensinamentos e estudos de bioquímica vegetal nas férias.

À minha amiga, madrinha e colega de laboratório Cristie Noschang pelo constante aprendizado, profissionalismo, amizade e carinho.

Aos colegas do laboratório 37 pela convivência e amizade. Danusa, por me ajudar muito e pela amizade, Luísa pela parceria, pela ajuda, pelo carinho. Fernanda pela amizade e confiança, Eduardo pela parceria nos trabalhos e amizade, Léo pela amizade, ICs pelo carinho, trabalho e confiança.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial a Cléia
pela paciência.

Aos meus pais Léa e Mário, pela confiança, motivação e principalmente pelo grande
amor que sentimos.

Aos meus irmãos Juliana e Rafael pelo apoio, amor e respeito.

Ao meu marido Luiz Henrique, por ser o meu parceiro em todas as horas, por me
motivar e pelo nosso grande amor.

À Capes: pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estresse	2
1.1.1 Estresse e Comportamento Alimentar	3
1.1.2 Estresse e Comportamento	5
1.1.3 Exposição ao Estresse e ao Desbalanço Oxidativo.....	6
1.2 Dieta Palatável (Chocolate)	7
1.2.1 Exposição à Dieta Palatável e ao Desbalanço Oxidativo.....	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS	12
3.1 Parte 1: Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner	14
3.2 Parte 2: Efeito da memória espacial e da produção de óxido nítrico em ratos machos submetidos á uma dieta hiperpalatável e ao estresse crônico.	55
3.2.1 Material e Métodos	56
3.2.2 Resultados	59
3.3 Parte 3: Efeito do estresse agudo em ratos machos submetidos á uma dieta hiperpalatável sob parâmetros do desbalanço oxidativo e dano ao ADN celular.....	62

3.3.1 Material e Métodos	63
3.3.2 Resultados	64
4. DISCUSSÃO	67
5. CONCLUSÕES.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMO

Foi proposto que animais submetidos a estresse crônico mostram uma resposta ao estresse que pode ser reduzida pela ingestão de alimentos palatáveis (“comfort foods”). No entanto, uma dieta saborosa, rica em açúcar ou gordura, também pode levar a dano oxidativo e lesão neuronal. Assim, o objetivo deste estudo é verificar, em ratos machos e fêmeas, os efeitos da exposição crônica ao estresse durante o acesso livre a ração padrão e a uma dieta altamente palatável sobre o comportamento exploratório, a memória espacial e a ansiedade, bem como o estresse oxidativo e quebras do ADN em duas estruturas do sistema nervoso, hipocampo e estriado. Ratos Wistar machos e fêmeas foram submetidos ao estresse de contenção por 40 dias. A dieta era ração padrão e chocolate *ad libitum*. O estresse crônico induziu um comportamento do tipo ansioso em ratas fêmeas e o consumo de uma dieta palatável aumentou a atividade locomotora; uma interação também foi observada entre a dieta e estresse, pois a dieta preveniu, ao menos em parte, os efeitos do estresse sobre o comportamento nas fêmeas. Nos ratos machos, a dieta mostrou um efeito facilitador na memória espacial em dias de treinamento. Os resultados também mostraram que o estresse e a dieta induziram aumento no índice de quebras de ADN e um desequilíbrio na atividade de enzimas antioxidantes, catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), nas estruturas estudadas em ambos os sexos, além da perturbação na produção de óxido nítrico, especialmente no hipocampo de ratos machos. Medidas de estresse oxidativo no hipocampo dos ratos machos mostraram que a dieta palatável diminuiu a atividade das enzimas GPx, CAT e da razão SOD:CAT. O estresse crônico mostrou uma tendência em aumentar a produção de óxido nítrico enquanto que a dieta diminuiu. Nas fêmeas, a exposição ao estresse crônico diminuiu a atividade da SOD e a dieta aumentou o potencial antioxidante reativo total (TRAP). Na exposição ao estresse agudo, foi observado, no hipocampo dos ratos machos, que o estresse agudo aumentou as quebras de ADN e houve uma tendência de aumentar a atividade da SOD, enquanto que a dieta palatável diminuiu a atividade desta enzima. Concluindo, observou-se que ratas fêmeas parecem ter maior susceptibilidade aos efeitos do estresse, e que o acesso a uma dieta palatável foi capaz de neutralizar alguns efeitos comportamentais do estresse. No entanto, esta mesma dieta induziu um aumento do estresse oxidativo e de quebras do ADN, especialmente nos machos. Além disso, uma única exposição ao estresse por contenção apresentou, no hipocampo de ratos machos, aumento nas quebras de ADN e a dieta induziu alterações na atividade de enzimas antioxidantes. O estresse por contenção e o consumo de uma dieta palatável induziram um estado de maior susceptibilidade ao estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais, considerando alterações na atividade das enzimas antioxidantes e nas quebras ao ADN e também na produção de óxido nítrico.

ABSTRACT

It has been proposed that animals subjected to chronic stress show a stress response that can be reduced by the intake of highly palatable foods (“comfort foods”). However, a palatable diet, rich in sugar or fat, can also lead to oxidative damage and neuronal injury. So, the aim of this study is to verify, in male and female rats, the effects of exposure to chronic stress during free access to regular chow and to a highly palatable diet, on exploratory, spatial memory and anxiety-like behavior, on oxidative stress and on DNA breaks in two structures of the nervous system, hippocampus and striatum. Wistar rats male and female were submitted to restraint stress for 40 days. The diet was standard chow and chocolate, *ad libitum*. Chronic stress induced anxiety-like behavior in female rats and the consumption of a palatable diet increased the number crossing and an interaction was also observed between diet and stress. In male rats, the diet showed a facilitatory effect on spatial memory on training days. About oxidative stress, the results showed stress- and diet-induced DNA breaks and an imbalance in the activity of antioxidants enzymes, such as CAT, GPx and SOD in the both structures, besides disturbed production of nitric oxide especially in male rats hippocampus. About oxidative stress, in the hippocampus of male rats, the palatable diet decreased GPx, CAT activities and SOD:CAT ratio and chronic stress showed a tendency to increase the production of nitric oxide, while the diet decreased it. In female rats, the exposure to chronic stress decreased SOD activity and diet increased TRAP. Acute stress increased DNA breaks and showed a tendency to increase SOD activity. In addition, we observed that female rats appear to have higher susceptibility to the stress effects evaluated, and that access to a palatable diet was able to counteract some behavioral effects of stress. However, this same diet induced oxidative stress and increased DNA breaks, especially in males. Furthermore, a single exposure restraint stress showed increased DNA breaks in the hippocampus of male rats. Restraint stress and consumption of a palatable diet induced a state of higher susceptibility to oxidative stress in different brain structures, considering the altered activities of antioxidant enzymes, production nitric oxide and DNA breaks.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH = Hormônio adrenocorticotrópico

ADN = Ácido desoxirribonucléico

CAT = Catalase

ERO= Espécies reativas do oxigênio

GPx = Glutationa peroxidase

HPA= Hipotálamo-pituitária-adrenal

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NO = Óxido nítrico

nNOS = Óxido nítrico sintase neuronal

iNOS = Óxido nítrico sintase induzível

eNOS = Óxido nítrico sintase endotelial

PPAR- γ = Receptor gama de proliferação ativada do peroxissomo

SOD = Superóxido dismutase

TRAP = Potencial antioxidante reativo total

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Estamos constantemente sujeitos a vários agentes estressores, que podem desencadear alterações no organismo. O estresse é capaz de perturbar a homeostasia fisiológica e psicológica de um indivíduo. A exposição ao estresse induz uma variedade de respostas no organismo, incluindo respostas neurovegetativa, imunológica, comportamental (ansiedade, depressão e anorexia) e ativação do eixo límbico-hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) com liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides agem em vários sistemas do organismo, incluindo o sistema nervoso. Essas ações, que incluem a ativação do eixo HPA e a consequente liberação dos glicocorticóides, são adaptativas e essenciais para a sobrevivência imediata quando em resposta a estímulos agudos, levando a aumento da disponibilidade de energia e melhora do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo (TSIGO ET AL., 2002). Por outro lado, a exposição prolongada aos glicocorticóides pode produzir efeitos deletérios em vários sistemas do organismo, inclusive dano neuronal (MCINTOSH ET AL., 1996). No entanto, o término dessa resposta prolongada dos glicocorticóides é controlada por uma eficiente retroalimentação negativa envolvendo a amígdala, o hipocampo, o hipotálamo e a hipófise.

O estresse por contenção, caracterizado como um estresse psicológico, pode levar a alterações neuroquímicas e comportamentais indesejáveis que irão depender da intensidade / duração do estressor. Sabe-se, por exemplo, que uma exposição repetida a altos níveis de glicocorticóides pode levar a uma *down-regulation* dos receptores de glicocorticóides do hipocampo, o que prejudica a capacidade deste em controlar a

retroalimentação negativa dos glicocorticóides no eixo HPA (SAPOLSKY, KREY e McEWEN, 1984).

Outra consideração importante é que ativação do eixo HPA age diferentemente sob condições basais e condições induzidas pelo estresse, dependendo do sexo. Por exemplo, ratas fêmeas apresentam níveis mais altos de corticosterona do que ratos machos (CRITCHLOW ET AL., 1963).

1.1.1 Estresse e Comportamento Alimentar

A ingestão alimentar é regulada por duas vias complementares: (a) homeostática e (b) hedônica. A via homeostática aumenta a motivação para comer em função do balanço energético, sendo ativada quando ocorre a depleção dos estoques de gordura. Substratos energéticos presentes no sangue também têm importância na regulação da via homeostática. A via hedônica, ou regulação baseada na recompensa, pode se sobrepor à via homeostática durante períodos de relativa abundância de energia por aumentar o desejo para o consumo de alimentos altamente palatáveis.

O estímulo crônico do eixo HPA, resultando no excesso de glicocorticóides, parece provocar a ingestão de alimentos altamente palatáveis como forma de reduzir a resposta do eixo HPA, sendo uma resposta adaptativa ao estresse (PECORARO ET AL., 2004). Isso mostra que o eixo HPA não só é um condutor das respostas ao estresse, como também está intimamente relacionado com a regulação endócrina do apetite (ADAM e EPEL, 2007) e esse tipo de ação é considerado uma forma do organismo repor energias gastas durante o período em que foi submetido ao estresse. Alguns estudos em humanos mostraram que indivíduos que eram altamente reativos ao estresse ingeriam mais calorias e que esse comportamento estava associado com o

comportamento compulsivo (EPEL ET AL., 2001; FREEMAN e GIL, 2004). Em concordância com tais estudos, trabalhos usando ratos adultos mostraram que, se esses animais fossem submetidos a um estresse crônico, podia ocorrer um aumento da ingestão de alimentos palatáveis (ELY ET AL., 1997; PECORARO ET AL., 2004; SILVEIRA ET AL., 2004). A gravidade e a duração da exposição ao estressor, no entanto, são capazes de modificar diferentemente o comportamento alimentar.

Por sua vez, a atividade do eixo também pode ser influenciada pelo tipo de alimento consumido. Uma dieta hipercalórica, rica em alimento doce e gordura, pode levar a uma redução da resposta do eixo ao estresse (PECORARO ET AL., 2004), sugerindo um efeito metabólico periférico da dieta sobre o cérebro (DALLMAN ET AL., 2003). Entretanto, uma dieta contendo alto teor de gordura realça os níveis de glicocorticoides basais e induzidos por estresse, possivelmente agindo como um fator estressor (TANNENBAUM ET AL., 1997; KAMARA ET AL., 1998).

Os efeitos do estresse sobre o consumo dos alimentos “confortantes” (“comfort foods”) pode ser específico ao sexo (LIANG, BYERS e IRWIN, 2007; ELY ET AL., 1997). Além disso, se sabe que distúrbios alimentares são mais frequentes em mulheres (PEBLES, WILSON e LOCK, 2006). Estudo anterior do nosso laboratório também mostrou que ratos machos e fêmeas submetidas ao estresse crônico e que têm acesso a chocolate como “alimento confortante” são diferentemente afetados (FACHIN ET AL., 2008).

1.1.2 Estresse e Comportamento

Fatores ambientais como o estresse podem precipitar a síndrome da ansiedade e influenciar o comportamento do organismo (HANDLEY ET AL, 1993). Estudos mostram que o uso de fármacos ansiolíticos como o diazepam reverte as alterações comportamentais induzidas pelo estresse no teste do labirinto em cruz elevado e também no campo aberto. Ambos os testes avaliam o perfil comportamental de animais sob influência de agentes ansiogênicos/ansiolíticos (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; PRUT e BELZUNG, 2003). Essas alterações comportamentais irão depender da intensidade, duração do estressor e também do sexo. O estresse por contenção pode induzir um comportamento do tipo ansioso, e essa alteração comportamental é mais marcada em ratos machos do que em fêmeas (CHAKRABORTI ET AL., 2007). Além do tipo do estressor, a intensidade também apresenta diferentes alterações comportamentais. Por exemplo, ratos submetidos a um estresse agudo aumentam o comportamento do tipo ansioso (MACNEIL ET AL., 1997; MORILAK ET AL., 2003); por outro lado, ratos submetidos ao estresse crônico variado podem apresentar um perfil ansiolítico no labirinto em cruz elevado (D' AQUILA ET AL., 1994). Adicionalmente, existem estudos relacionando ansiedade e comportamento alimentar em animais estressados cronicamente (ELY ET AL., 1997). Por outro lado, os níveis de ansiedade podem também ser influenciados pela dieta: um recente estudo mostrou que o consumo de uma dieta rica em sacarose parece induzir um comportamento do tipo ansioso em ratos machos submetidos ao teste claro-escuro (SOUZA ET AL., 2007).

Outros estudos mostraram que a memória espacial é prejudicada em machos, mas não em fêmeas, após uma breve exposição (1h) ao estresse por contenção. Importante

salientar que a aparente resistência das fêmeas ao prejuízo neuronal possa ser por influência dos estrógenos (BOWMAN ET AL., 2002).

1.1.3 Exposição ao Estresse e ao Desbalanço Oxidativo

O desbalanço oxidativo tem sido implicado na patogênese de doenças neurológicas e psiquiátricas. O sistema nervoso é particularmente vulnerável ao dano oxidativo por apresentar elevado consumo de oxigênio, diminuição de enzimas antioxidantes, conteúdo abundante de lipídeos e íons ferro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas em baixos níveis nas células dos mamíferos por vários processos metabólicos, como a cadeia respiratória na mitocôndria, a atividade da NADPH oxidase e o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico. ERO são espécies muito oxidantes, capazes de afetar estrutura e função de distintos componentes celulares. O balanço redox fisiológico das células é mantido pelo sistema antioxidant, que pode ser enzimático ou não-enzimático. O sistema antioxidant enzimático é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que converte radical superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT), que promove a degradação do peróxido de hidrogênio, e a glutationa peroxidase (GPx), que promove a degradação de peróxidos, especialmente os derivados da oxidação dos fosfolipídeos de membrana (KEHRER, 2000). O estresse oxidativo resulta quando a célula perde a capacidade em detoxificar o excesso de ERO, levando a danos em componentes celulares, como proteínas, lipídeos e ADN e, com isso, causando um declínio das funções fisiológicas e possível morte celular.

Os glicocorticóides, conforme explicado acima, são hormônios secretados pelas glândulas adrenais em resposta ao estresse. Esses hormônios são essenciais para a

viabilidade cerebral, no entanto, quando eles ficam elevados por muito tempo, levam a danos neuronais que podem ser induzidos pelo aumento do desequilíbrio oxidativo (MCINTOSH ET AL., 1996). O estresse por contenção, por exemplo, tem sido relatado resultar em um desequilíbrio das defesas antioxidantes, levando a um desbalanço oxidativo (MADRIGAL ET AL., 2001; KOVACHEVA-IVANOVA ET AL., 1994; OISHI ET AL., 1999; RADAK ET AL., 2001).

1.2 Dieta Palatável (Chocolate)

O chocolate, antigamente conhecido como alimento divino, foi escolhido para o nosso estudo por ser um característico alimento “confortante”, utilizado por muitos. Além disso, é muito apreciado pelos ratos. O chocolate, constituído de substâncias biologicamente ativas (metilxantinas, aminas biogênicas, canabinóides e ácidos graxos), pode interagir com neurotransmissores (dopamina, serotonina e endorfinas) os quais contribuem para o apetite, recompensa e regulação do humor.

1.2.1 Exposição à Dieta Palatável e ao Desbalanço Oxidativo

O tipo de dieta consumida tem efeitos altamente significativos no desbalanço oxidativo e em mecanismos relacionados à inflamação. O alto consumo de alimentos ricos em gordura e/ou carboidratos leva ao aumento do metabolismo aeróbico e à superprodução de radicais livres, além do aumento nos estoques de gordura. O excesso da adiposidade pode desencadear resistência à insulina. Em modelos de síndrome metabólica em ratos, ingestão de alimentos rico em gordura e carboidrato pode levar ao estresse oxidativo por uma *up-regulation* da NADPH oxidase nos rins e tecido

cardiovascular e uma *down-regulation* do sistema antioxidante (LING, SMITH e BISTRIAN, 2007; ROBERTS ET AL., 2006). Além disso, dietas ricas em gordura diminuem atividade do receptor gama de proliferação ativada do peroxissomo (PPAR- γ), o qual tem ação anti-inflamatória, e induzem desequilíbrio oxidativo. Estudo em ratos utilizando agonistas do PPAR- γ mostrou que estes reduzem a resistência à insulina e o desbalanço oxidativo (MACIAS-GONZALEZ ET AL., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar as interações entre o consumo crônico de chocolate e o estresse crônico em parâmetros comportamentais e em parâmetros relacionados ao desbalanço oxidativo, estudando no hipocampo e estriado de ratos machos e fêmeas.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos do consumo do chocolate e do estresse crônico sobre os seguintes parâmetros comportamentais:
 - Ansiedade (labirinto em cruz elevado e campo aberto),
 - atividade motora (campo aberto),
 - memória espacial (labirinto aquático de Morris);
- Avaliar os efeitos do consumo de chocolate em animais cronicamente estressados e controles sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao desbalanço oxidativo, analisando esses parâmetros em hipocampo e estriado:
 - Potencial antioxidante reativo total (TRAP),
 - Atividade das enzimas antioxidantes (GPx, SOD e CAT),
 - Produção de óxido nítrico (medida dos metabólitos do óxido nítrico);
 - Dano ao ADN celular (Ensaio Cometa);

- Adicionalmente, estudar em ratos machos os efeitos da exposição ao estresse agudo, quando os animais têm acesso a alimentos “confortantes” (chocolate), sobre o desbalanço oxidativo e o dano ao ADN no hipocampo.

3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS

O material e os métodos e os resultados desta dissertação estão apresentados a seguir, da seguinte forma:

- Parte 1: Artigo submetido à revista *Appetite*;
- Parte 2: Material e métodos e resultados adicionais – efeitos sobre a memória e produção de óxido nítrico;
- Parte 3: Material e métodos e resultados adicionais – efeitos da exposição ao estresse agudo.

3.1Parte 1

Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner

Artigo submetido para publicação na revista *Appetite*.

**CONSUMPTION OF A PALATABLE DIET BY CHRONICALLY STRESSED
RATS PREVENTS EFFECTS ON ANXIETY-LIKE BEHAVIOR BUT
INCREASES OXIDATIVE STRESS IN A SEX-SPECIFIC MANNER**

Krolow R.; Noschang, C.G.; Arcego, D.; Andreazza, A.C.;
Peres, W.; Gonçalves, C.A.; Dalmaz, C.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Mailing address: Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS
Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37.
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil
Phone: 55 51- 3316-5570.
Fax: 55 51- 3316-5535.
E-mail: carladalmaz@yahoo.com.br

ABSTRACT

It has been proposed that animals subjected to chronic stress show a stress response that can be reduced by the intake of highly palatable foods (“comfort foods”). However, a palatable diet, rich in sugar or fat, can also lead to oxidative damage and neuronal injury. So, the aim of this study is to verify, in male and female rats, the effects of exposure to chronic stress during free access to regular chow and to a highly palatable diet, on exploratory and anxiety-like behavior, on oxidative stress and on DNA breaks in two structures of the nervous system, hippocampus and striatum. The results showed stress- and diet-induced DNA breaks and an imbalance in the activity of antioxidants enzymes, such as CAT, GPx and SOD in the both structures. In addition, we observed that female rats appear to have higher susceptibility to the stress effects evaluated, and that access to a palatable diet was able to counteract some behavioral effects of stress. However, this same diet induced oxidative stress and increased DNA breaks, especially in males.

Key-words: chronic stress, palatable diet, chocolate, sex, anxiety-like behavior, oxidative stress, DNA breaks.

Introduction

The stress response is a reaction of the organism against insults that may disrupt homeostasis, involving changes in physiological and neurochemical factors. Exposure to chronic stress activates mechanisms that lead to adaptive or maladaptive responses (Carrasco, & Van de Kar, 2003), and the consequences of repeated stress may affect both the body and the central nervous system (McEwen, 2006; Ray & Henke, 1990). One of the consequences of stress exposure is altered food intake (Ely, Dapper, Marasca, Corrêa, Gamaro, Xavier, Michalowski, Catelli, Rosat, Ferreira, & Dalmaz, 1997; Silveira, Xavier, Souza, Manoli, Rosat, Ferreira, & Dalmaz, 2000; Gamaro, Prediger, Lopes, & Dalmaz, 2003). Human studies also show greater food consumption, mainly palatable food, in periods of psychological stress (Epel, Lapidus, McEwen, & Brownell, 2001; García-Prieto, Tébar, Nicolás, Larqué, Zamora, & Garaulet, 2007; Newman, O'Connor, & Conner, 2007; Gluck, Geliebter, Hung, & Yahav, 2004).

Stressors stimulate the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, releasing corticotropin-releasing hormone (CRH), adrenocorticotropin (ACTH), and ultimately increasing circulating glucocorticoids (GCs), secreted by the adrenal cortex (Macri, Pasquali, Bonsignore , Pieretti , Cirulli, Chiarotti, & Laviola, 2007; Lackschewitz, Huther , & Kroner-Herwig, 2008). Glucocorticoids have been associated with increased palatable food intake (Pecoraro, Gomez , & Dallman, 2005), and a model of reward-based eating has been suggested as a mean to reduce the stress response (Adam,& Epel, 2007). In this sense, palatable food, rich in fat and carbohydrates (“comfort food”) has been shown to decrease the stress response in chronically stressed rats (Pecoraro, Reyes, Gomez , Bhargava, & Dallman, 2004), suggesting the possibility of an interaction between the effects of chronic stress and consumption of easily available palatable food.

Stress effects on “comfort food” consumption may be sex-specific (Liang, Byers, & Irwin, 2007; Ely et al, 1997). Moreover, it is known that eating disorders are more frequent in women (Pebles, Wilson, & Lock, 2006). In addition, male and female rats subjected to stress and receiving chocolate as a “comfort food” are differentially affected (Fachin, Silva, Noschang, Pettenuzzo, Bertinetti, Billodre et al., 2008), which emphasizes the importance of considering sex-specific differences in studies concerning stress and food consumption. Chocolate is one of the most widely used "comfort foods", and is able to interact with neurotransmitters such as dopamine, serotonin and endorphins (Parker, Parker, & Brotchie, 2006), which contribute to appetite, reward and regulation of mood (Wurtman, & Wurtman, 1995; Bruinsma, & Taren, 1999).

The neuroendangerment observed after stress exposure or elevated GCs levels has been linked to an increased generation of reactive oxygen species (ROS) (McIntosh, & Sapolsky, 1996). Lower concentrations of these highly reactive species are involved in the regulation of a number of physiological processes, whereas overproduction results in oxidative injury which can be an important mediator of damage to cell structures like lipids, membranes, protein and DNA (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007). The imbalance between high cellular levels of ROS in relation to cellular antioxidant defenses, namely oxidative stress, may be involved in the pathogenesis of several brain diseases (Halliwell, & Gutteridge, 2000; Kovacheva-Ivanova, Bakalova, & Ribavov, 1994; Oishi, Yokoi, Maekawa, Sodeyama, Shiraishi, Kondo, Kuriyama, & Machida, 1999 ; Radak, Sasvari, Nyakas, Kaneko, Ohno, & Goto, 2001; Mitra, Vyas, Chatterjee, & Chattarji, 2005).

On the other hand, some studies have presented evidence that the presence of ROS and excessive intake of fatty foods can lead to breaks in cellular DNA (Muqbil, Azmi, & Banu, 2006; Higashimoto, Isoyama, Ishibashi, Inoue, Takiguchi, Suzuki,

Ohnishi, & Sato, 2009; Olivo-Marston, Zhu , Lee, Cabanes , Khan, Zwart , Wang, Clarke, & Hilakivi-Clarke, 2008). Therefore, the use of a palatable diet to oppose to stress effects may also lead to unwanted neurochemical changes. Therefore, the effects of the use of a highly palatable diet in chronically stressed animals becomes an important issue, worthy of study. Our goal in this work is to evaluate, in male and female rats, the effects of exposure to chronic stress during free access to a highly palatable diet, on exploratory behavior, on oxidative stress and on the DNA breaks in two structures of the nervous system related to stress and consumatory behavior, hippocampus and striatum.

Material and Methods

Experimental Procedures

Animals: Thirty-nine adult male Wistar rats (60 days at the beginning of the treatment, 300-350g) and fifty-eight adult female Wistar rats (same age, 150-200g) from our breeding stock were used. Experimentally naive animals were housed in groups of 4-5 in home cages made of Plexiglas material (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust. They were maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on between 7.00h – 19.00h) at room temperature (22 + 2°C). The rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, except during the period of exposure to the stressor. All animal procedures followed the Principles of laboratory animal care (NIH publication No. 86-23, revised 1985) and were approved by the institutional Research Committee.

Chronic exposure to palatable food (chocolate) - All animals were weighed and randomized. One week later, they were divided into two groups: (1) receiving regular

chow ad libitum, and (2) receiving both chow and chocolate ad libitum, in such a way that this group of animals could choose. During 40 days, previously weighed amounts of chocolate and standard lab chow were offered, and the remaining amount was measured each day to evaluate the consumption. See Table 1 for nutritional composition of these foods.

Chronic restraint stress procedure - The animals were subdivided into two groups, control and chronically restraint, in such a way that we had the following groups: controls receiving chow, controls receiving chow + chocolate, stressed receiving chow and stressed receiving chow + chocolate, resulting in 8 groups considering males and females. Animals were stressed during 1h daily, 5 days per week for 40 days ([Ely et al, 1997](#)). Restraint was carried out by placing the animal in a 25 x 7 cm plastic tube and adjusting it with plaster tape on the outside, so that the animal was unable to move. There was a 1 cm hole in the far end for breathing. The control group was not submitted to stress, being kept in their home cages. The restraint procedure was performed between 10:00h and 12:00h.

Exposure to the open field - After 40 days of chronic restraint stress exposure all animals were handled and subjected to exposure in a behavioral apparatus, to reduce the handling effect. Twenty-four hours later, the animals were subjected to the open field task. A 50-cm high, 40×60-cm open field made of wood with a frontal glass wall was used ([Mello-e-Souza, Rohden, Meinhardt, Gonçalves, & Quillfeldt, 2000](#); [Silveira, Portella, Clemente, Gamaro, & Dalmaz, 2005](#)). The floor was subdivided with white lines into 12 equal 13.3- by 15.0-cm rectangles, and the animals were gently placed facing the left corner and allowed to explore the arena for 5 min. The performance was observed, and line crossings, the time spent in central squares and the number of fecal bolus were counted. The number of crossings was used as a measure of motor activity,

number of fecal bolus was evaluated as a measure of emotional behavior, while time spent in central squares was considered to evaluate anxiety-like behavior (Prut & Belzung, 2003).

Elevated plus-maze test - The elevated plus maze test was conducted after 40 days of treatment, using a standard plus maze apparatus kept 80 cm above the floor, consisting of four arms arranged in the shape of a cross (arms measured 45 x 10 cm). The four arms were joined at the center by a 10 cm square platform. Two of the arms, opposite to each other, had no walls (open arms); the two other arms (closed arms) had 23-cm high walls. This test is considered sensitive to the anxiety state of the animal, based on the principle that exposure to an elevated and open arm leads to an approach conflict that is stronger than that evoked by exposure to an enclosed arm maze (Pellow & File, 1986). On the day of the experiment, the animals were acclimatized to the behavioral testing room for 5 min prior to the initiation of the test. Animals were placed individually on the center of the maze, on the junction between open and closed arms, facing one of the open arms, and performance was scored during 5 min. A rat was considered to have entered one arm of the maze when all four feet were within the arm. Conventional parameters of anxiety-like behavior were monitored, i.e., the number of entries into the closed arms, entries into the open arms, total entries, and the total time spent in each arm.

Preparation of the Samples – After behavioral procedures, the animals continued being treated (stress and/or diet) during one week more, and they were killed by decapitation 24 h after the last exposure to stress. Their hippocampus and striatum were quickly dissected out and were stored at -70°C until analysis, when they were homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA for most determinations. To measure catalase activity, samples were

homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4° C and the supernatant was used.

Total radical-trapping potential (TRAP) Assay - This assay is based on luminol-enhanced chemiluminescence measurement induced by an azo initiator (Evelson, Travacio, Repetto, Escobar, Llesuy & Lissi, 2001). The reaction mixture contained 10 mM 2-2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP), a source of peroxy radicals, and 0.01 mM luminol in glycine buffer (0.1 M, pH 8.6). The chemiluminescence generated was measured in a scintillation counter (Beckman) working out of coincidence mode. The addition of Trolox (antioxidant standard) or samples decreased chemiluminescence for a period (induction time) proportional to the concentration of antioxidants. The TRAP values were calculated as equivalents of Trolox per mg of protein and expressed as percent of control.

Superoxide Dismutase (SOD) Activity - SOD activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs., USA) which is based on the procedure described by (Delmas-Beauvieux, Peuchant, Dumon, Receveur, Le Bras & Clerc, 1995). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 492 nm at 37° C. The inhibition in production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample; one unit of SOD causes 50% inhibition of the rate of reduction of INT under the conditions of the assay.

Catalase (CAT) Activity – CAT is an enzyme able to degrade peroxides, including hydrogen peroxide (H_2O_2), and its activity assessment is based upon establishing the rate of H_2O_2 degradation spectrophotometrically at 240 nm at 25° C (Aebi, 1984). CAT

activity was calculated in terms of micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

Glutathione Peroxidase(GPx) Activity – GPx activity was determined according to (Wendel, 1981), with modifications. The reaction was carried out at 37° C in a solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of GPx was measured taking tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was calculated as pmol NADPH oxidized per minute per mg protein and expressed as % of control.

Comet assay - A standard protocol for Comet assay preparation and analysis was followed (Tice, et al., 2000). The slides were prepared by mixing 20 µL of hippocampus and striatum homogenate (in cold PBS pH 7.4) with 80 µL low melting point agarose (0.75%). The mixture (cells/agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 µL of normal melting agarose (1%). After solidification, the cover slip was gently removed and the slides were placed overnight in lyse solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0–10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide [DMSO]). Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6) for 20 min. The DNA was electrophoresed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA under alkaline conditions (pH >13). After that, we neutralized the slides three times during five minutes with 0.4 M Tris (pH 7.5). Finally, we stained the DNA with ethidium bromide.

Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay to ensure the reliability of the procedure. Images of 100 randomly selected cells (50 cells

from two replicated slides) were analyzed from each animal. Cells were also scored visually according to tail size into five classes, from no tails (0), to maximally (4), resulting in a single DNA breaks score for each subject, and consequently for each study group. Therefore, a group breaks index could range from 0 (all cells no tail, 100 cells×0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells×4) (Collins, Dusinska, Franklin, Somorovská, Petrovská, & Duthie.,et al, 1997).

Protein Assay - The total protein concentrations were determined using the method described by Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall (1951) with bovine serum albumin as the standard.

Statistical Analysis - Data were expressed as means \pm SE of the mean, and were analyzed using three-way ANOVA, with chronic stress, sex and diet as factors (ANOVA using blocks was used when indicated, to account for variations between distinct groups of rats). Results were later analyzed using the 2 X 2 design to assess results within each sex.

Results

There were no differences between control and stressed animals in the amount consumed during chronic exposure to regular and palatable diets, agreeing with previous results (Fachin et al., 2008). The groups receiving chocolate presented a reduced consumption of regular rat chow ($P < 0.01$), while no stress effect was detected (data not shown). Interestingly, a marginally significant interaction in the consumption of rat chow was observed between diet and sex ($P = 0.0503$), due to the fact that females had a more marked reduction in the consumption of rat chow when they could choose between chow and chocolate.

Behavior in the open field - Results from exposure to the open field are shown in Table 2. An ANOVA using blocks showed an interaction between stress and sex [$F(1,81)=4.92$, $P < 0.05$] for the time spent in the central squares; in the number of crossings, we observed effect of sex [$F(1,81)= 108.26$, $P < 0.001$], as well as interactions between diet and stress [$F(1,81)= 4.12$, $P < 0.05$] and between diet and sex [$F(1,81)= 11.34$, $P < 0.01$]. In the number of fecal bolus, just an effect of sex was observed [$F(1,81)= 9.49$, $P < 0.01$], without any interaction. Analyzing each sex, no significant effect was observed in males (two-way ANOVA using blocks; $P > 0.05$). In females, chronic stress exposure decreased time spent in central squares [$F(1,50)= 4.75$, $P < 0.05$], and a significant interaction between stress and diet was also observed [$F(1,50)=6.25$, $P < 0.02$], since the palatable diet prevented the reduction on time spent in central squares. Consumption of a palatable diet increased the number of crossings in females [$F(1,50)=14.76$, $P<0.001$], and an interaction was also observed between diet and stress [$F(1,50)=9.90$, $P < 0.005$]. No significant difference was observed between the groups in the number of fecal bolus during this task, neither in male nor in female animals.

Behavior in the plus maze - Results concerning the behavior of the animals in the elevated plus-maze are shown in Table 3. Marginally significant effects were observed in the total entries [interaction between diet and sex; $F(1,86)= 3.73$, $P = 0.056$], time in the open arms [$F(1,86)= 3.27$, $P = 0.073$ for sex effect], time in the closed arms (interaction between diet and sex [$F(1,86)= 3.00$, $P = 0.086$]), and a significant effect of sex in the entries in the closed arms [$F(1,86)= 108.11$, $P < 0.01$]. Since these results suggested differences in the effect of the diet between the sexes, males and females were analyzed separately. In males, an increased number of total entries was observed in stressed animals receiving palatable diet, evidenced by a significant interaction between diet and stress [$F(1,34)=5.04$, $P=0.040$. No other parameters showed significant

differences in males. In females, a marginally significant effect of chronic stress exposure was observed, decreasing time in the open arms [$F(1,52) = 3.97$, $P = 0.051$].

TRAP assay - Results are displayed in Table 4. The TRAP assay was used to detect variations on the level of non-enzymatic antioxidant defenses in hippocampus and striatum. In hippocampus, an ANOVA showed an effect of sex [$F(1,39) = 5.10$, $P < 0.05$] and a marginally significant effect of stress [$F(1,39) = 3.62$, $P = 0.06$]. In striatum, a clear effect of the diet was observed [$F(1,29) = 5.87$, $P < 0.05$]. In hippocampus, analyzing each sex, no difference was observed in any of these structures in males (two-way ANOVA, $P > 0.05$), while in females stress exposure showed a tendency to reduce TRAP, with a marginally significant effect [$F(1,13) = 3.90$, $P = 0.07$].

Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities - Figure 1 displays antioxidant enzymes activities in hippocampus and Figure 2 shows these activities in striatum. In hippocampus, an ANOVA showed an effect of sex on SOD activity [$F(1,49) = 15.18$, $P < 0.001$], while in striatum a significant interaction was observed between stress and sex [$F(1,48) = 7.18$, $P = 0.01$]. When each sex was analyzed separately, in the striatum of females, a two-way ANOVA showed an effect of chronic stress, decreasing SOD activity [$F(1,14) = 8.65$, $P = 0.011$]. In hippocampus, a similar tendency was observed, with a marginally significant effect [$F(1,15) = 4.04$, $P = 0.06$]. There were no statistical differences between groups on SOD activity in male rats in both structures (hippocampus and striatum, $P > 0.05$ in all cases). No effects of the diet or interactions were observed.

In hippocampus, an ANOVA showed effects of sex [$F(1,29) = 4.19$, $P < 0.05$] and of the diet [$F(1,29) = 9.52$, $P < 0.01$] on CAT activity, and a marginally significant interaction between stress and diet [$F(1,29) = 3.72$, $P = 0.06$]. No significant effect was observed in striatum ($P > 0.05$). Analyzing each sex, a significant effect of diet was observed on CAT activity in hippocampus of males, with the palatable diet decreasing this enzyme

activity [$F(1,15) = 17.87$, $P=0.001$]. No other effect was observed on CAT activity in females or males in this study ($P>0.05$).

Concerning GPx activity, an ANOVA showed an effect of the diet [$F(1,49) = 11.79$, $P < 0.01$] in hippocampus. No significant effect was observed in striatum ($P > 0.05$).

SOD/GPx and SOD/CAT ratios - SOD/GPx ratio (Table 5) showed a marginally significant effect of stress in striatum [$F(1,48) = 3.88$, $P = 0.054$], and no other effect was observed in this ratio. In hippocampus, SOD/CAT ratio (Table 6) showed effect of diet [$F(1,28) = 10.50$, $P < 0.01$], of sex [$F(1,28) = 43.37$, $P < 0.01$] and interaction between diet and sex [$F(1,28) = 4.88$, $P < 0.05$]. In striatum, just an effect of sex was observed [$F(1,24) = 4.45$, $P < 0.05$] on this ratio. Analyzing each sex separately, we observed that this ratio was increased with palatable diet in the hippocampus of male rats [$F(1,15) = 9.78$, $P < 0.01$], while in females there was a tendency of stress exposure to decrease this ratio [$F(1,13) = 4.02$, $P = 0.06$].

DNA breaks - As shown in Figure 3, chronic stress exposure increased DNA breaks index [$F(1,42) = 107.80$, $P < 0.001$ for hippocampus and $F(1,42) = 79.50$, $P < 0.001$ for striatum]. The consumption of a palatable diet also increased DNA breaks index [$F(1,42) = 80.78$, $P < 0.001$ for hippocampus and $F(1,42) = 27.08$, $P < 0.001$ for striatum]. An effect of sex was observed in hippocampus [$F(1,42) = 25.70$, $P < 0.001$], and significant interactions were observed: diet x stress [$F(1,42) = 10.60$, $P < 0.01$ for hippocampus and $F(1,42) = 64.88$, $P < 0.001$ for striatum]; diet x sex [$F(1,42) = 25.13$, $P < 0.001$ for hippocampus and $F(1,42) = 53.66$, $P < 0.001$ for striatum]; stress x sex [$F(1,42) = 56.81$, $P < 0.001$ for hippocampus and $F(1,42) = 7.57$, $P < 0.01$ for striatum]. In striatum, there was also no interaction between diet, stress and sex [$F(1,42) = 6.51$, $P < 0.05$]. When analyzing males and females separately, chronic stress had significant effect in both structures analyzed (hippocampus and striatum) in both males and

females [two-way ANOVA, $F(1,28)=186.3$; $P < 0.001$ for hippocampus in males; $F(1,28)=22.8$; $P < 0.001$ for striatum in males; $F(1,14) = 5.4$; $P = 0.036$ for hippocampus in females; $F(1,14) = 79.7$, $P < 0.001$ for striatum in females]. The consumption of a palatable diet (chow + chocolate) also induced increased breaks index in both structures in males [$F(1,28) = 9.2$, $P = 0.005$ for hippocampus; in striatum, $F(1,28) = 94.1$, $P < 0.001$]. Consumption of this palatable diet also induced increased DNA breaks index in hippocampus of females [$F(1,14) = 129.8$, $P < 0.001$]. Additionally, interactions between these factors were observed in both structures in males [$F(1,28) = 11.2$, $P = 0.002$ in hippocampus and $F(1,28) = 18.1$, $P < 0.001$ in striatum] and in striatum, in females [$F(1,14) = 65.8$, $P < 0.001$].

Discussion

The consumption of palatable food, rich in fat and carbohydrates, has been suggested to be used to decrease the stress response in chronically stressed rats ([Pecoraro et al., 2004](#)). The data of the present study demonstrated that both chronic stress exposure and free access to a palatable diet (chocolate) induced different biochemical and behavioral effects in male and female rats. The results showed increased DNA breaks and an imbalance in the activity of antioxidants enzymes CAT, GPx and SOD in the central nervous system (CNS). We should point as a limitation of the present study the fact that oxidative stress was not directly measured, nor was cortisol.

Some behavioral changes were also found indicating a possible anxiety-like behavior in chronically stressed females (time spent in the central squares of the open field), which was prevented by consumption of the palatable diet offered. Interestingly,

although chocolate consumption prevented these effects of chronic stress on females when exposed to the open field, the effects induced on antioxidant enzymes in the brain structures evaluated did not present significant interactions between stress and palatable diet consumption, with the exception of DNA breaks index: in females striatum, for example, chocolate consumption was able to partially prevent the increased DNA breaks induced by stress, although having an effect of its own.

No stress effect was observed in the consumption of chow or palatable food. These results contrast with studies where chronically stressed rats consume greater amounts of palatable foods (Pecoraro et al., 2004): Increased ingestion of calorically-dense lard and sucrose food are observed when animals are stressed by restraint during a period; however, in that study, the stress intensity was higher (3h of restraint) and the period in which stress was applied was of 5 days. In our study, with a much longer period of chronic stress and a mild stress intensity, no difference was observed in the consumption of palatable food by stressed and control animals. It is possible that consumption of sweet food may present different results with more intense stressors, such as electric shock exposure or social stressors, such as intruder protocols. It should be considered that this model used repeated exposure to the same aversive event during a long period, what can lead to a process of adaptation to that stimulus. Hence, chronically stressed animals do not show the same behavior and do not experience the consequences that animals exposed to acute stress do. However, we have previously measured corticosterone response in this same model and, although the animals exhibit a habituated corticosterone response, they still show an increase in plasma corticosterone levels after restraint (Torres et al., 2002), and/or increased adrenal weight (Fachin et al., 2008), indicating that they are still stressed. Additionally, the type of palatable food used may also be important in this absence of effect of stress on

consumption, since both stressed and control animals appear to eat a large amount of it (see Fachin et al., 2008, for details on the amounts of consumption of this type of diet). Additionally, although no effects of stress exposure were observed in the consumption of both rat chow and chocolate, females had a more marked reduction in the consumption of rat chow when they could choose between chow and chocolate. This higher preference for chocolate could be due to gonadal hormones. Gustatory and food habit changes have been observed during the menstrual cycle in women (Alberti-Fidanza et al., 1998), and the estral cycle in rats (Clarke & Ossenkopp, 1998), with sensitivity to sweet taste increasing with an increase of estradiol.

Both elevated plus maze and open field task have been used to assess neurobehavioral profiles of animals under the influence of anxiogenic/anxiolytic agents (Carobrez, & Bertoglio, 2005; Prut, & Belzung, 2003). In the present study, the open field task was used to assess locomotion capacity and anxiety-like behavior, analyzing the time spent in the central squares. In this task, stress and diet effects appear to be dependent on the sex of the animals, as evidenced by interactions between stress and sex and between diet and sex. Male rats did not show any behavioral changes in this task, but a significant effect of stress exposure was observed in female rats on the time spent in central squares, as well as an interaction between stress and diet, suggesting that chronic stress may increase anxiety in females, however access to a palatable diet may prevent this effect. An interaction between diet and stress was also observed when analyzing the number of crossings, since the palatable diet counteracted the effect induced by stress exposure. These results agree with the hypothesis that a reward-based eating would decrease the response to stress when animals have access to a palatable diet (Adam,& Epel, 2007; Pecoraro et al., 2004). The fact that access to a palatable diet, in addition to a regular rat chow, was able to counteract stress effects on females also

agree with a previous study, in which chocolate consumption prevented the increased adrenal gland weight after exposure to chronic stress, but only in females, suggesting a reduction of stress effects induced by palatable food consumption (Fachin et al., 2008).

In the plus-maze task, females showed a marginally significant effect of stress, increasing aversion to the open arms. Exposure to acute restraint stress has been reported to induce anxiety-like behavior in the plus maze task, both in males and females (Chakraborti, Gulati, Banerjee, & Ray, 2007); the absence of stress effect in males could be due to the fact that this model used repeated exposure to the same aversive event, what can lead to a process of adaptation to that stimulus. While we did not observe any effect of the diet on anxiety, a recent study (Souza, Moreira, Siqueira, Pereira, Rieger, & Souza, et al., 2007) showed that the consumption of high sucrose diet appears to induce anxiety-like behavior in male rats, evaluated using the light-dark transition test. In their study, however, the palatable diet was not a choice for the animal, and those authors used a more prolonged treatment (4 months). Therefore, we can not exclude the possibility that longer treatments with this type of diet would induce effects related to anxiety. In the previous cited paper from Chakraborti et al. (2007), those authors observed a relation between free radicals generation and anxiety responses to stress, which were more marked in males. In our study, however, the effects on anxiety were more marked in females, and this difference could be attributed to the fact that we used chronic stress. No clear relation between anxiety and oxidative parameters were observed.

Excessive intake of fatty foods can lead to disturbances in the regulation of metabolism and also to breaks in cellular DNA (Muqbil et al., 2006; Higashimoto et al., 2009; Olivo-Marston et al., 2008; De Assis, Rieger, Dos Santos, Battu, Raymundi, Da Rocha, & Andreazza, et al., 2009), and stress exposure or high glucocorticoid levels have also been implicated in higher oxidative stress (You, Yun, Nam, Kang, Won, &

Lee, 2009; McIntosh, & Sapolsky, 1996; Fontella, Siqueira, Vasconcellos, Tabajara, Neto, & Dalmaz, 2005). Therefore, we measured some parameters related to oxidative stress and the index of DNA breaks. The nervous system is sensitive to oxidative damage, being rich in oxidizable substrates and having high oxygen tension and low antioxidant capacity (Metodiewa & Koska, 2000). Effects of both variables studied, stress exposure and access to the palatable diet, were observed on different parameters related to oxidative stress, however, some effects were sex-specific. Palatable diet reduced GPx activity in the hippocampus, and also decreased CAT activity. An interaction was observed between diet and sex in the SOD:CAT ratio in the hippocampus, since this ratio was only increased in males. This increased ratio, due to reduced CAT activity, may result on higher concentration of H₂O₂, and this ratio have been used as an indication of peroxide overload challenge (Pinho et al., 2006; Oliveira et al., 2007), since SOD converts superoxide to H₂O₂, but CAT is not able to metabolize it efficiently. An excess of H₂O₂ facilitates the production of hydroxyl radical (OH[·]), the most powerful oxidant molecule, through a reaction with iron or copper (Fenton chemistry) (Halliwell, 2006). In addition, it has been shown that administration of high fat or high caloric diets to rodents increase free radical generation in the brain (Zhang, Dong, Ren, Driscoll, & Culver, 2005). Elevated levels of plasma glucose have been considered an important source of free radicals production in glucose intolerant individuals (Brownlee, 2005), since high levels of glucose blocks the flux of electrons transport chain, generating elevated levels of superoxide (Nishikawa, Edelstein, Du, Yamagishi, Matsumura, Kaneda, & Yorek, et al., 2000; Brownlee, 2005). Our results agree with those studies, since the diet rich in fat and sugar may be causing oxidative stress. In the striatum, a structure involved in the consumatory behavior, the consumption of a palatable diet increased TRAP.

Restraint stress have been reported to result in the imbalance of antioxidant status which ultimately leads to increased oxidative stress, thereby resulting in oxidative damage (Madrigal, Olivenza, Moro, Lizasoain, Lorenzo, & Rodrigo , et al., 2001; Kovacheva-Ivanova et al ., 1994; Oishi et al., 1999; Radak et al ., 2001); superoxide and H₂O₂ production has also been reported to be enhanced after stress (Ward & Till, 1990). Furthermore a decrease in GPx activity in brain has been reported in response to immobilization stress (180 min/day for 15 days) (Sahin & Gumuslu, 2007a,b), and exposure to restraint stress decreases activity of antioxidant enzyme systems (Chakraborti, Gulati, & Ray, 2008). In our study, chronic restraint stress showed more marked effects on females: Analysis of SOD activity showed an interaction between chronic stress exposure and sex in striatum, which is explained by the fact that, in females, stress decreased SOD activity. This last result suggests an exacerbation of ROS production in this brain structure, which may be compensated by the increased TRAP. The differences concerning other studies from the literature could be due to different stress protocols.

The comet assay, under alkaline conditions, detects DNA single-and double-strand breaks, and alkali-labile sites (Tice et al., 2000). DNA strand breakage could be caused by nucleases activated by Ca²⁺ and/or by ROS, mainly OH· formed by reaction of H₂O₂ with DNA-bound metal ions (Darley-Usmar, & Halliwell, 1996). When the generation of ROS exceeds the capacity of the cellular antioxidant system, oxidative stress occurs; this leads to oxidative damage to biomolecules, including DNA (Winyard, Mody, & Hacob, 2005; Lovell, & Markesberry, 2007). Chronic stress exposure and free access to chocolate induced increased DNA breaks index in both structures analyzed (hippocampus and striatum) in both males and females. However, the increased breaks index caused by stress exposure in female striatum was partially prevented by the

consumption of a diet rich in calories, and females exposed to chocolate showed increased levels of TRAP in striatum.

In conclusion, we observed that female rats show higher susceptibility to the stress effects evaluated on behavior, and that access to a palatable diet was able to counteract some behavioral effects of stress, as well as to reduce stress effects on DNA breaks index (at least in striatum). However, this palatable diet also induced oxidative stress and increased DNA breaks. Therefore these study points to sex-specific effects of consuming palatable diet during stress exposure and to the potentially neuroendangerment of using food rich in carbohydrates and fat as a “comfort food” during periods of stress.

Acknowledgements

Financial support: National Research Council of Brazil (CNPq), FAPERGS-PRONEX, FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00 and CAPES/Brazil.

References

- Adam, T.C., & Epel, E.S, (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior*, 91, 449-58.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Alberti-Fidanza, A., Fruttini, D., Servili, M. (1998). Gustatory and food habit changes during the menstrual cycle. *International Journal Vit.. Nutrition Res.* 68 : 149–153.

- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications, a unifying Mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Bruinsma, K., & Taren, L.D. (1999). Chocolate: Food or drug?. *Journal of The American Dietetic Association*, 99,1249-1256.
- Carobrez, A.P., & Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29,1193–205.
- Carrasco, G.A., & Van de Kar, L.D (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal Pharmacology*, 463, 235–72.
- Chakraborti, A., Gulati, K., Banerjee ,B.D., & Ray, A.(2007). Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 179,321-5.
- Chakraborti, A., Gulati, K., & Ray, A. (2008). Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: modulation by antioxidants and nitroergic agents. *Behavioural Brain Research*, 194,86-91.
- Clarke, S.N., Ossenkopp, K.P. (1998). Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *American Journal of Physiology* 274:R718–R724.
- Collins, A., Dusinska, M., Franklin,M., Somorovká, M., Petrovská, H., Duthie, S., Filion, L., Panaviotidis, M., Raslová, K., , & Vaughan, N.. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Molecular Mutagenesis*, 30, 139-46.
- Darley-Usmar,V., & Halliwell, B. (1996). Blood Radicals :Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transitionmetal ions, and the vascular system. *Pharmaceutical Research*,13, 649–662.

De Assis, A.M, Rieger, A.L, Dos Santos, A.L, Battu, C, Raymundi, S, Da Rocha, R.F, Andreazza, A.C, Farina, M, Rotta, L.N, Gottfried,C, Gonçalves, C.A, Moreira, J.C, & Perry, M.L.S. (2009). High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats. *Experimental Biology and Medicine*. In press.

De Oliveira, M.R, Silvestrin, R.B, Souza, T.M, Moreira, J,C,F. (2007). Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neuro Toxicology*, 28, 1191-1199.

Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E, Dumon, M. F., Receveur, M.C., Le Bras, M.. & Clerc, M.(1995). Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clinical Biochemistry* ,28,163–169.

Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, J.B., Gamaro, G.D., Xavier, M.H., Michalowski, M.B., Catelli, D., Rosat, R. Ferreira, M.B.C. & Dalmaz, C. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & Behavior*, 61, 395-398.

Epel, E., Lapidus R., McEwen, B., & Brownell, K. (2001). Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior, *Psychoneuroendocrinology*, 26, 37–49.

Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S. & Lissi, E.A. (2001). Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives Biochemistry Biophysics*, 388,261–266.

- Fachin, A., Silva, R.K., Noschang, C.G., Pettenuzzo, L., Bertinetti, L., Billodre, M.N., Peres, W., Busnello, F., & Dalmaz, C. (2008). Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite*, 51, 592-8.
- Fontella, F.U., Siqueira, I.R., Vasconcellos, A.P., Tabajara, A.S., Netto, C.A., & Dalmaz, C. (2005). Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 30, 105-11.
- Gamaro, G.D., Prediger, M.E., Lopes, J.B., & Dalmaz, C. (2003). Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 76, 327-33.
- García-Prieto, M.D., Tébar, F.J., Nicolás, F., Larqué, E., Zamora, S., & Garaulet, M. (2007). Cortisol secretary pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clinical Endocrinology*, 66, 185-91.
- Gluck, M.E., Gelbter, A., Hung, J., & Yahav, E. (2004). Cortisol, hunger, and desire to binge eat following a cold stress test in obese women with binge eating disorder. *Psychosomatic Medicine*, 66, 876-81.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634-1658.
- Higashimoto, M., Isoyama, N., Ishibashi, S., Inoue, M., Takiguchi, M., Suzuki, S., Ohnishi, Y., & Sato, M. (2009). Tissue-dependent preventive effect of

- metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint. *Life Sciences*, 84,569-75.
- Kovacheva-Ivanova, S., Bakalova, R., & Ribavov, S.R. (1994). Immobilization stress enhances lipid peroxidation in the rat lungs. Materials and methods. *General Physiology Biophysics*, 13,469–482.
- Lackschewitz, H., Huther, G., & Kroner-Herwig, B. (2008). Physiological and psychological stress responses in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Psychoneuroendocrinology*, 33,612-24.
- Liang, S, Byers, D.M, Irwin. L.N.(2007). Chronic mild stressors and diet affect gene expression differently in male and female rats. *Journal Molecular Neuroscience*, 33, 189-200.
- Lovell, M.A., & Markesberry, W.R. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research*, 35, 7497–7504.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193,265–275.
- Macri, S., Pasquali, P., Bonsignore, L.T., Pieretti ,S., Cirulli ,F., Chiarotti ,F., & Laviola, G. (2007). Moderate neonatal stress decreases within-group variation in behavioral, immune and HPA responses in adult mice. *PLoS ONE*, 2,1-9.
- Madrigal, J.L, Olivenza, R., Moro ,M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., Leza, J. C. (2001).Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* ,24,420–9.
- McEwen, B.S.(2006). Protecting and damaging effects of stress mediators: central roleof the brain. *Dialogues Clinical Neuroscience*, 8,367–81.

- McIntosh, L., & Sapolsky R. (1996). Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induce toxicity in neuronal culture. *Experimental Neurology*, 141,201–206.
- Mello e Souza, T., Rohden ,A., Meinhardt, M., Gonçalves, C.A., & Quillfeldt, J.A. (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiology & Behavior*, 71, 29-33.
- Metodiewa, D., & Koska, C. (2000) .Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotoxicity Research*, 1,197–233.
- Mitra, R., Vyas, A., Chatterjee, G., & Chattarji, S. (2005). Chronic stress induced modulation of different states of anxiety like behaviour in female rats. *Neuroscience Letters*, 383, 278–83.
- Muqbil, I., Azmi, A.S., Banu, N. (2006). Prior exposure to restraint stress enhances 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced DNA damage in rats. *FEBS Letters.*, 580, 3995-3999.
- Newman, E., O'Connor,D.B., & Conner, M. (2007). Daily hassles and eating behaviour: the role of cortisol reactivity status. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 25-32.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek ,M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404,787–790.
- Oishi, K., Yokoi, M., Maekawa, S., Sodeyama, C., Shiraishi, T., Kondo, R., Kuriyama, T., & Machida, K.(1999). Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, 165, 65–69.

- Olivo-Marston, S.E., Zhu, Y., Lee, R.Y., Cabanes, A., Khan, G., Zwart, A., Wang, Y., Clarke, R., Hilakivi-Clarke, L. (2008). Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low-fat and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. *Cancer Prevention Research (Philadelphia)*, 7, 532-45.
- Parker, G., Parker, I., & Brotchie, H. (2006). Mood state effects of chocolate. *Journal of Affective Disorders*, 92, 149–159
- Pebles R., Wilson J.L., & Lock J.D. (2006). How do children with eating disorders differ from adolescents with eating disorders at initial evaluation? *Journal of Adolescent Health*, 6, 800-5.
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., & Dallman, M.F.(2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*, 145, 3754-3762.
- Pecoraro, N., Gomez, F., & Dallman, M.F. (2005). Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 815-825.
- Pellow, S., & File, S.E, (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24,525-9.
- Pinho, R.A, Andrades, M.E, Oliveira, M.R, Pirola, A.C, Zago, M.S, Silveira, P.C.L, Dal-Pizzol, F, Moreira, J.C.F.(2006). Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*, 30, 848-8.
- Prut, L., & Belzung ,C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal Pharmacology*, 463, 3–33.

- Radak , Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Kaneko, T., Ohno, H., & Goto, S. (2001). Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International*, 39, 33–38.
- Ray, A., & Henke, P.G. (1990) Enkephalin-dopamine interactions in the central amygdalar nucleus during gastric stress ulcer formation in rats. *Behavioural Brain Research*, 36, 179–83.
- Sahin, E., & Gumuslu, S. (2007a). Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology: CBP*, 144, 342–347.
- Sahin, E., & Gumuslu, S. (2007b). Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34, 425–431.
- Silveira, P.P., Xavier, M.H., Souza, F.H., Manoli, L.P., Rosat, R.M., Ferreira, M.B., Dalmaz, C. (2000). Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 33, 1343-50.
- Silveira, P.P., Portella, A.K., Clemente, Z., Gamaro, G.D., & Dalmaz, C. (2005). The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23, 93–99.
- Souza, C.G., Moreira, J.D., Siqueira, I.R., Pereira, A.G., Rieger, D.K. , Souza, D.O., Souza, T.M., Portela, L.V., & Perry, M.L.S. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*, 81, 198–203.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu ,J-C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Torres I.L.S., Gamaro G.D., Vasconcellos A.P., Silveira R., & Dalmaz C.(2002).Effects of chronic stress on feeding behavior and monoamine levels in different brain structures in rats. *Neurochemical Research*, 27, 519-525.
- Valko, M., Leibfritz ,D., Moncol, J., Cronin, M. T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77,325–333.
- Wing, L.Y, Chen, Y.C, Shih, Y.Y, Cheng ,J.C, Lin, Y.J, Jiang, M.J. (2009). Effects of oral estrogen on aortic ROS-generating and -scavenging enzymes and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Experimental Biological Medicine*, 234, 1037-46.
- Winyard, P.G., Mody, C.J.,& Hacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochemistry. Sciences*, 30, 453–461.
- Wurtman, R.J., & Wurtman, J.J. (1995). Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. *Obesity Research* , 4, 477S-480S.
- You, J.M., Yun, S.J, Nam, K.N., Kang, C., Won, R., & Lee, E.H. (2009). Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87, 440-7.

Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll , M.J., & Culver, B. (2005). High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*, 191, 318–325.

Table 1: Nutritional composition/100g of the food used in the studies performed.

Food	Energy (kcal)	Total protein (g)	Total carbohydrate (g)	Total fat (g)
Chocolate	544	4.4	64	30.4
Neugebauer®				
Rat chow	348	22	55	4.5
Nuvital®				

Table 2. Effect of chronic restraint stress and chronic palatable diet consumption on behavior in the open field. Data expressed as mean \pm S.E.M.

	Group	Time in central squares (s)	Crossings	Fecal bolus
Males	Control	8.36 \pm 2.85	48.20 \pm 7.49	3.40 \pm 0.68
	Stressed	10.03 \pm 2.67	53.44 \pm 9.57	3.88 \pm 1.07
	Chocolate	7.34 \pm 2.19	39.73 \pm 8.17	3.54 \pm 0.79
	Stressed+chocolate	6.35 \pm 1.44	54.89 \pm 5.45	2.77 \pm 0.86
Females	Control	7.59 \pm 1.86	37.36 \pm 11.6	1.50 \pm 0.55
	Stressed	2.53 \pm 0.94*	24.4 \pm 7.6	2.13 \pm 0.43
	Chocolate	7.96 \pm 1.22	37.8 \pm 11.2	1.93 \pm 0.65
	Stressed+chocolate	7.58 \pm 1.75	46.3 \pm 15.7	1.79 \pm 0.72

In females (N = 12-15), a significant effect of stress exposure was observed in the time in central squares (Two-way ANOVA, P < 0.05), as well as an interaction between stress and diet (P < 0.02); in the number of crossings, an effect of diet was observed (P<0.001), as well as interaction between diet and stress (P < 0.005). No effect was observed in males (N = 9-11/group). * Significantly different from their controls groups receiving chow (Duncan multiple range test, P < 0.05).

Table 3. Effect of chronic restraint stress and chronic palatable diet consumption on behavior in the plus-maze test. Data expressed as mean \pm SEM.

Diet	Chow		Chow + chocolate	
Group	Control	Stressed	Control	Stressed
Males				
Time in the open arms (s)	117.6 \pm 17.3	130.8 \pm 23.3	117.4 \pm 7.4	107.5 \pm 16.0
Time in the closed arms (s)	131.0 \pm 15.2	126.4 \pm 13.7	142.1 \pm 8.5	168.6 \pm 16.6
Entries in the open arms	7.4 \pm 0.9	8.9 \pm 1.0	9.0 \pm 0.7	9.1 \pm 1.5
Entries in the closed arms	8.7 \pm 0.8	7.8 \pm 0.9	10.5 \pm 1.0	9.2 \pm 1.2
Total entries	16.7 \pm 1.6	16.2 \pm 2.1	16.8 \pm 0.6	23.5 \pm 2.0
Percent time in open arms	46.8 \pm 6.2	48.4 \pm 7.75	45.3 \pm 2.9	39.0 \pm 5.8
Percent time in closed arms	53.2 \pm 6.2	51.6 \pm 7.7	54.6 \pm 2.9	61.0 \pm 5.8
Females				
Time in the open arms (s)	105.1 \pm 15.3	99.4 \pm 11.3	119.3 \pm 10.3	77.7 \pm 10.4
Time in the closed arms (s)	154.6 \pm 12.4	154.3 \pm 9.9	138.6 \pm 8.1	163.0 \pm 13.3
Entries in the open arms	7.6 \pm 1.3	8.7 \pm 0.8	8.2 \pm 0.7	6.6 \pm 0.6
Entries in the closed arms	11.1 \pm 0.7	11.4 \pm 0.6	10.7 \pm 0.5	11.7 \pm 0.9
Total entries	18.7 \pm 1.4	20.1 \pm 1.1	18.9 \pm 0.7	18.3 \pm 0.8
Percent time in open arms	39.6 \pm 5.5	38.8 \pm 4.0	45.8 \pm 3.5	32.5 \pm 4.2
Percent time in closed arms	60.4 \pm 5.5	61.2 \pm 4.0	54.2 \pm 3.5	67.5 \pm 4.2

In males, there was an effect of the diet (two-way ANOVA, P=0.034) and an interaction between diet and stress (P=0.040) in the total entries. In females, stress exposure showed a marginally significant decrease in the time in the open arms (P = 0.051). N = 9-15 animals per group.

Table 4. Effects of chronic consumption of palatable food and chronic stress on the Total radical-trapping potential (TRAP) assay in hippocampus and striatum of rats.

	Group	Males	Females
Hippocampus	Control	100.2 \pm 10.1	100.0 \pm 16.4
	Stressed	100.6 \pm 12.3	53.6 \pm 11.3
	Chocolate	110.4 \pm 16.0	91.2 \pm 20.9
	Stressed+chocolate	98.3 \pm 11.8	67.1 \pm 18.0
Striatum	Control	99.9 \pm 9.6	92.7 + 27.6
	Stressed	128.2 \pm 27.2	120.6 \pm 20.2
	Chocolate	133.9 \pm 14.4	152.2 \pm 14.6
	Stressed+chocolate	131.1 \pm 28.0	200.8 \pm 55.5

Data are expressed as percent of the respective control (mean \pm S.E.M. for each parameter). N=4-10/group. A three-way ANOVA showed a significant effect of the diet in striatum ($P < 0.05$); in hippocampus, stressed females showed a tendency to a reduction in TRAP ($P = 0.07$).

Table 5. Effect of chronic restraint stress and chronic palatable diet consumption on SOD/GPx ratio. Data expressed as mean \pm SEM.

	Group	Males	Females
Hippocampus	Control	0.062 \pm 0.02	0.180 \pm 0.010
	Stressed	0.065 \pm 0.019	0.052 \pm 0.020
	Chocolate	0.152 \pm 0.053	0.102 \pm 0.045
	Stressed+chocolate	0.127 \pm 0.032	0.159 \pm 0.065
Striatum	Control	0.057 \pm 0.006	0.072 \pm 0.025
	Stressed	0.052 \pm 0.010	0.037 \pm 0.006
	Chocolate	0.076 \pm 0.014	0.076 \pm 0.017
	Stressed+chocolate	0.068 \pm 0.011	0.038 \pm 0.002

No significant effects were observed ($P > 0.05$).

Table 6. Effect of chronic restraint stress and chronic palatable diet consumption on SOD/CAT ratio. Data expressed as mean \pm SEM.

	Group	Males	Females
Hippocampus	Control	1.53 \pm 0.32	0.55 \pm 0.14
	Stressed	1.79 \pm 0.55	0.37 \pm 0.09
	Chocolate	3.27 \pm 0.50*	1.09 \pm 0.40
	Stressed+chocolate	3.04 \pm 0.52*	0.40 \pm 0.15
Striatum	Control	0.82 \pm 0.10	0.96 \pm 0.13
	Stressed	0.64 \pm 0.06	1.01 \pm 0.23
	Chocolate	0.62 \pm 0.25	1.22 \pm 0.31
	Stressed+chocolate	0.53 \pm 0.11	0.58 \pm 0.11

In males, there was an effect of diet consumption in the hippocampus (Two-way ANOVA, P < 0.01). N = 4 - 5/group. * Significantly different from their controls groups receiving chow (Duncan multiple range test, P < 0.05).

Legends to figures

Figure 1

Effects of chronic restraint stress and chronic consumption of chocolate on antioxidant enzymes activities in male (A, C, E) and female (B, D, F) hippocampus. (A, B) SOD (expressed as U/mg protein), (C, D) CAT (micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein) and (E, F) GPx (expressed % of control). Data is expressed as mean \pm S.E.M. N = 4-5/group. * Significantly different from their controls groups receiving chow (Duncan multiple range test, P < 0.05).

Figure 2

Effects of chronic restraint stress and chronic consumption of chocolate on antioxidant enzymes activities in male (A, C, E) and female (B, D, F) striatum. (A, B) SOD (expressed as U/mg protein), (C, D) CAT (micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein) and (E, F) GPx (expressed as pmol NADPH oxidized per minute per mg protein). Data is expressed as mean \pm S.E.M. N = 4-5/group. In females, a two-way ANOVA showed an effect of chronic stress on SOD activity (P=0.011). In males, a significant effect of diet on GPx activity was observed (P < 0.05).

Figure 3

DNA breaks in hippocampus assessed by the Comet Assay in stressed and non-stressed male (A, C) and female (B, D) hippocampus (A, B) and striatum (C, D). Data is expressed as mean \pm S.E.M. N = 4-5/group. Chronic stress exposure increased DNA breaks in both structures analyzed (hippocampus and striatum) in both males and females (two-way ANOVA, P < 0.05). The consumption of a palatable diet (chow +

chocolate) increased breaks index in both structures in males and in hippocampus of females ($P < 0.05$). Interactions between these factors were observed in both structures in males and in striatum, in females ($P < 0.05$).

* Significantly different compared to the control group receiving chow; # Significantly different compared to other groups (Duncan multiple range test, $p < 0.05$).

Figure1

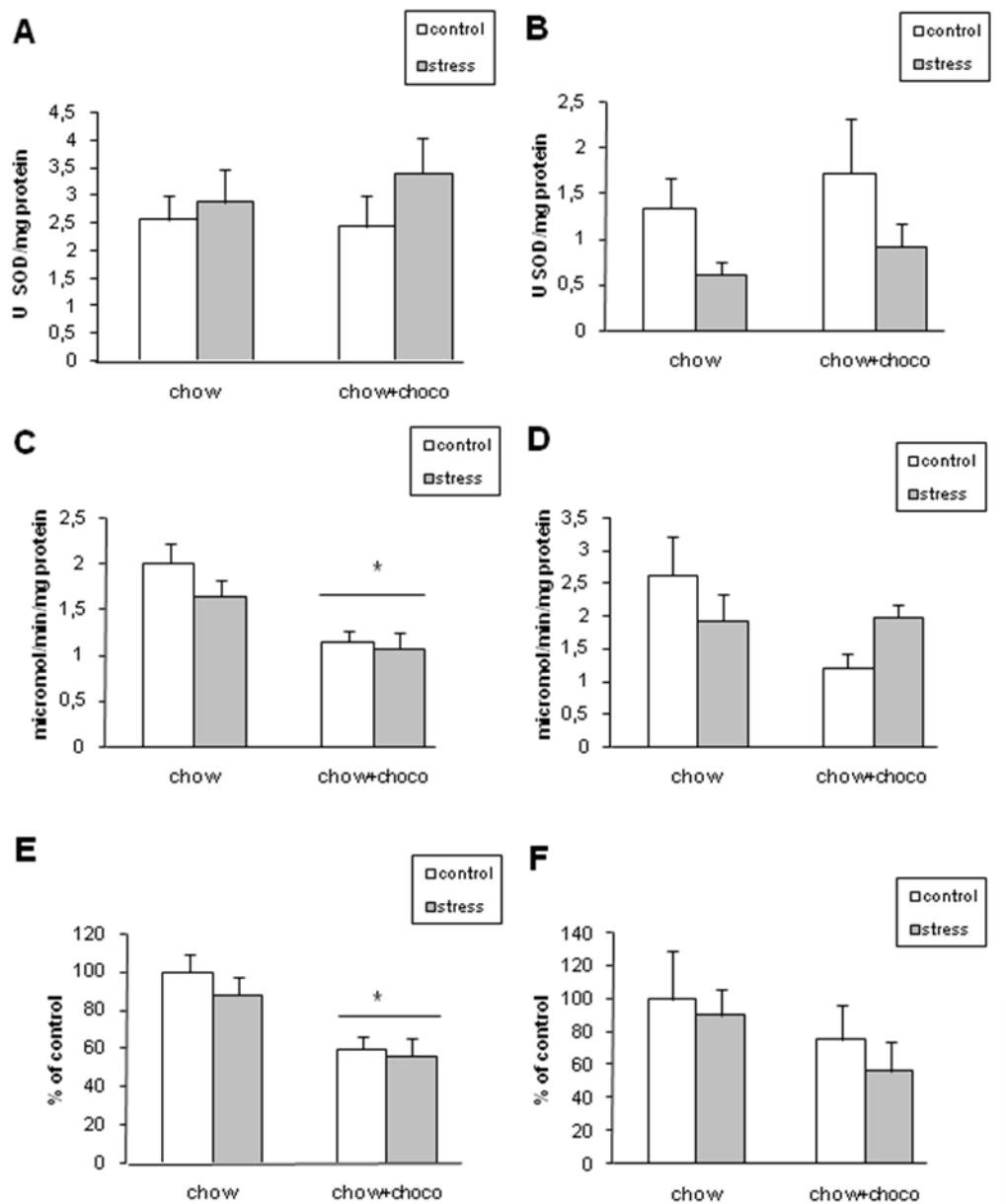


Figure2

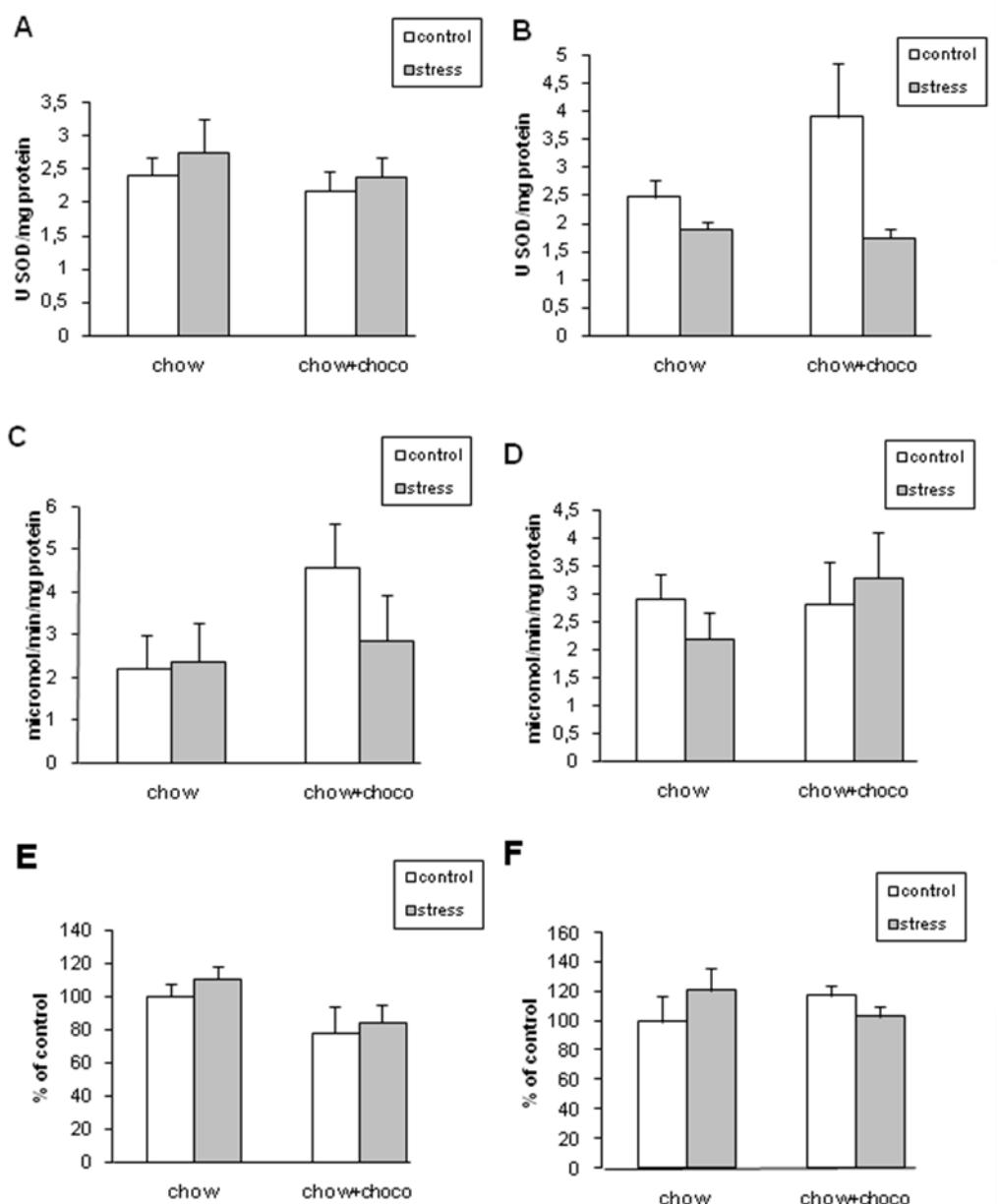
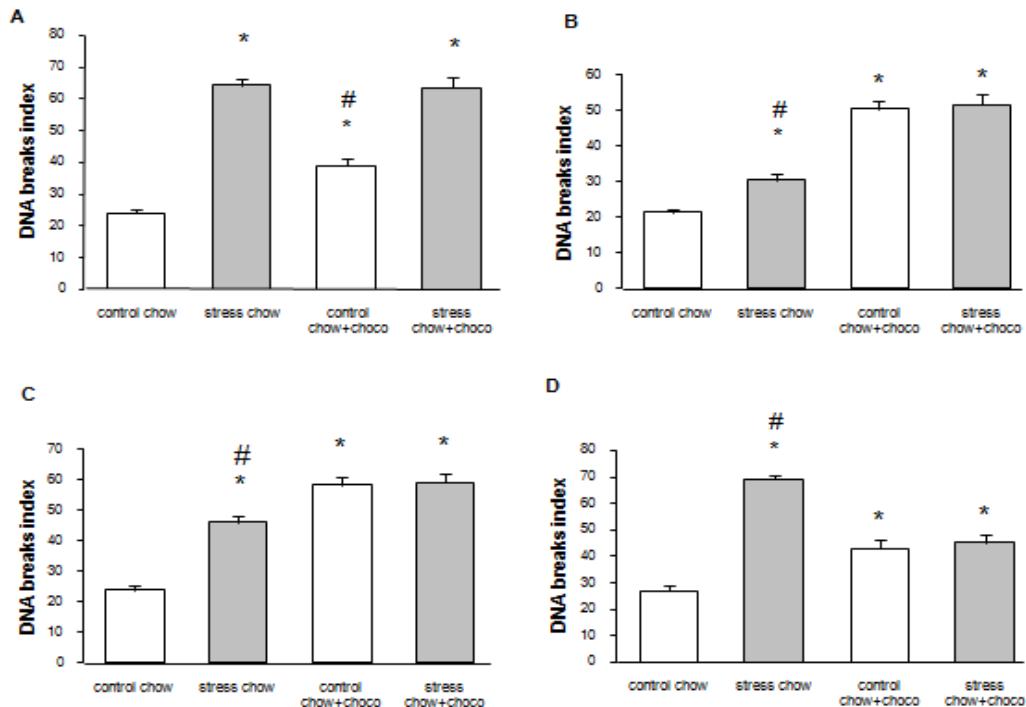


Figure 3



3.2 Parte2

Efeito da exposição ao estresse crônico sobre a memória espacial e a produção de óxido nítrico em hipocampo de ratos na vigência ou não de uma dieta hiperpalatável

Tendo em vista que o estresse pode alterar o aprendizado e a memória, ou por facilitá-los (OITZL ET AL., 2001) ou por estar associado com um prejuízo no desempenho cognitivo em certas situações (JOELS, PU e WIEGERT, 2006), torna-se relevante para nosso estudo verificar como estaria a memória destes animais que foram submetidos ao estresse crônico e a alimentos palatáveis. Será que este alimento palatável pode estar contribuindo ou prejudicando as funções cognitivas destes animais submetidos ou não ao estresse?

O óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pelas óxido-nítrico-sintases (nNOS, iNOS, eNOS). Como um gás, ele é capaz de se difundir através da água e das membranas lipídicas para dentro de suas células-alvo. Nessas células, ele exerce seus efeitos fisiológicos pela ligação de alta afinidade ao Fe-heme na enzima guanilato-ciclase, desse modo ativando uma cascata de transdução de sinal, agindo como mensageiro celular. A importância do óxido nítrico na potenciação de longa duração (LTP) hipocampal tem sido relatada (BOM ET AL., 1992; BOM e GARTHWAITE, 2003). Esse fenômeno tem sido tomado como modelo de processos plásticos no sistema nervoso, entre eles aqueles relacionados com a formação de

memórias (RICHTER-LEVIN ET AL., 1995; ABUSH e AKIRAV, 2009). Estudos relacionando óxido nítrico e LTP têm mostrado que, se bloqueada a óxido nítrico sintase usando inibidores, a indução da LTP também é bloqueada e, com isso, é prejudicada a memória (BOM ET AL., 1992; BOM e GARTHWAITE, 2003).

Assim, com base em alguns estudos que demonstraram a importância do óxido nítrico (NO) na plasticidade sináptica contribuindo para memória e o aprendizado em diversas áreas cerebrais, incluindo principalmente o hipocampo por este ter um papel crítico no processo da informação espacial (RICHTER-LEVIN ET AL., 1995; SILVA ET AL., 1998; ABUSH e AKIRAV, 2009), neste estudo avaliamos o efeito da exposição de ratos machos ao estresse crônico por contenção na vigência ou não de acesso a uma dieta palatável (chocolate) sobre a memória espacial através da tarefa de labirinto aquático de Morris, sendo também realizada a avaliação dos metabólitos estáveis da produção do óxido nítrico no hipocampo.

3.2.1 Material e métodos

Animais

Formam utilizados 38 ratos Wistar adultos machos de 60 dias, pesando entre 250-300g. Os animais foram mantidos em caixas-moradia plásticas (65 X 25 X 15 cm) em grupos de 8 a 10, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas. Eles tinham livre acesso à comida (ração padrão ou ração padrão mais chocolate) e à água, exceto para os animais estressados, durante o período em que a contenção foi aplicada. Os animais foram tratados de acordo com o recomendado pela SBNeC e com as recomendações do “International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)”,

buscando sempre minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais utilizados.

Modelo de estresse crônico e consumo de dieta hiperpalatável

Foram feitos conforme descrito no Capítulo 1.

Labirinto Aquático de Morris

Após os 40 dias de exposição ao estresse crônico, os animais foram submetidos ao teste da memória espacial no labirinto aquático de Morris (MORRIS ET AL., 1982). Este teste era realizado em uma piscina circular de fundo preto com 180 cm de diâmetro, (água à temperatura de 23° C, profundidade de 40 cm) situada em uma sala com dicas espaciais. A plataforma transparente com 10 cm de diâmetro encontra-se submersa 2cm abaixo da superfície da água. A piscina é virtualmente dividida em quatro quadrantes e tem quatro pontos designados para iniciar a tarefa (N, S, L e O). Os ratos foram submetidos a cinco dias de treino e o sexto dia foi considerado o dia do teste. Cada sessão diária de treino consistia de 4 tentativas com 10 minutos de intervalo entre cada tentativa. O animal era colocado na piscina em uma das quatro posições (N, S, L e O) sucessivamente. A ordem dessas posições variava entre os dias de treino. Após ser colocado na piscina, o animal tinha 60s para achar a plataforma; caso contrário, era conduzido gentilmente até ela, onde permanecia por 10s. Após retirado do labirinto, o animal era seco com uma toalha e recolocado em sua caixa-moradia. No dia do teste, a plataforma era removida. O teste consistia em apenas uma tentativa, e o tempo gasto para chegar ao local onde estava anteriormente à plataforma foi tomado como índice de memória para esse teste.

Medida de nitritos e nitratos

Os animais foram sacrificados por decapitação, os hipocampos dissecados sobre placa gelada e congelados a -70° C até a realização das análises. A produção de óxido nítrico foi determinada pela medida de seus metabólitos, os nitritos, baseado no método de MIRANDA ET AL. (2001). Oitenta µL de cloreto de vanádio foram adicionados a 80 µL de amostra homogeneizada (1:10) com tampão fosfato de potássio 50 mM contendo EDTA 1 mM; a amostra foi então centrifugada a 4000 rpm por 10 min a 4 ° C, desproteinizada com TCA 25% e novamente centrifugada. A seguir, o pH do sobrenadante foi neutralizado com bicarbonato de potássio. Então, 80 µL do reagente de Greiss (uma mistura 1:1 de diidrocloreto de N-1-naftilelenodiamina e sulfanilamida) foram adicionados, e a mistura foi incubada por 45 minutos a 37° C em banho-maria no escuro. A coloração rosa obtida foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. O valor da produção de óxido nítrico foi calculado como nmol de nitrito/mg de proteína.

Análise das proteínas

Conforme descrito no Capítulo 1.

Análise estatística

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas para análise da latência média para alcançar a plataforma nos dias de treino e ANOVA de 2 vias no caso do dia do teste para analisar a latência para achar a plataforma e também para a análise da produção de óxido nítrico, usando como fatores dieta e estresse.

3.2.2 Resultados

Labirinto aquático de Morris

- Latência média para alcançar a plataforma durante as sessões de treino:

Como mostrado na Figura 4, o consumo de chocolate determinou um melhor aprendizado, reduzindo o tempo para achar a plataforma nas sessões de treino [$F(1,32) = 7,21; P < 0,05$]. ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre dieta e tempo de treinamento e um efeito facilitador da dieta (chocolate) durante as sessões de treino [$F(4,128) = 3,28; P < 0,05$].

- Latência para achar o local da plataforma no teste:

Os resultados estão mostrados na Figura 5. Após os vários dias de treino, todos os grupos apresentaram, no teste, desempenho semelhante. ANOVA de duas vias, usando como fatores estresse e dieta, não mostrou diferenças significativas entre os grupos durante o teste ($P > 0,05$ em todos os casos).

Determinação dos nitritos no hipocampo

A produção de óxido nítrico foi medida através do seu metabólito estável, os nitritos. Anova de duas vias, usando como fatores dieta e estresse, mostrou que a exposição ao estresse crônico teve uma tendência a aumentar [$F(1,14) = 4,28; P=0,057$], enquanto o consumo crônico da dieta hiperpalatável (chocolate) [$F(1,14) = 6,82; P < 0,05$] mostrou uma diminuição do conteúdo de nitritos na amostra (Figura 6).

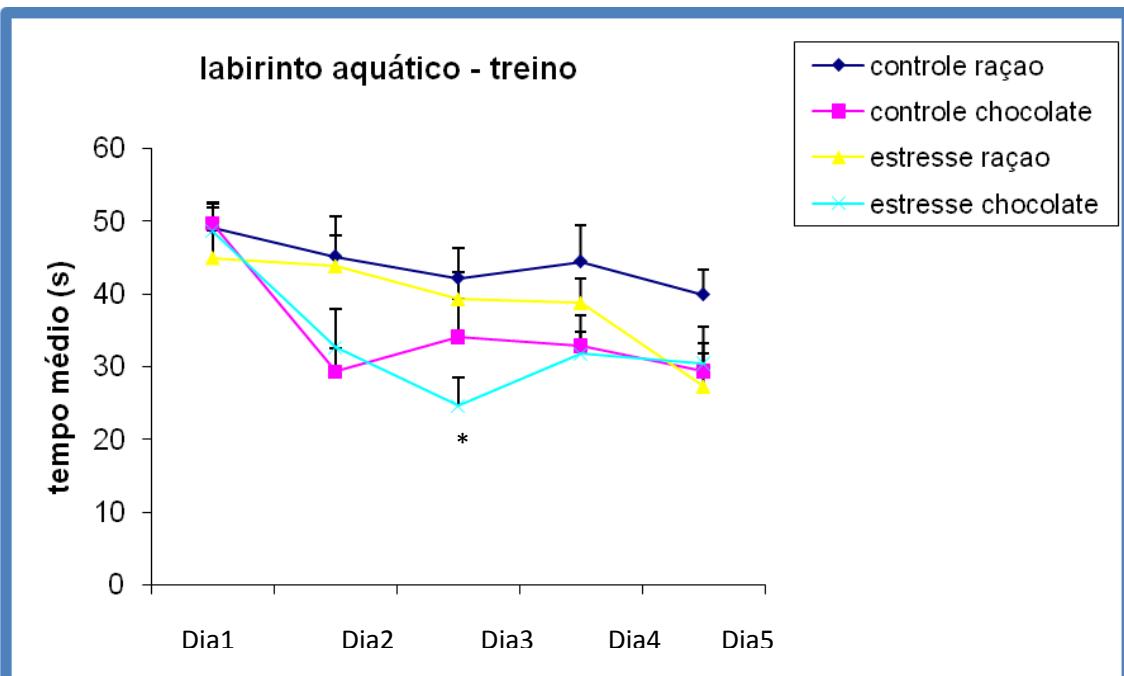


Figura 4 Efeito do estresse crônico na vigência ou não de dieta palatável sobre o aprendizado de uma tarefa espacial, avaliando a latência média para alcançar a plataforma durante as sessões de treino. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Efeito da dieta (ANOVA de duas vias, $P<0,05$). * Significativamente diferente dos grupos controles. (Teste de Tukey, $P<0,05$).

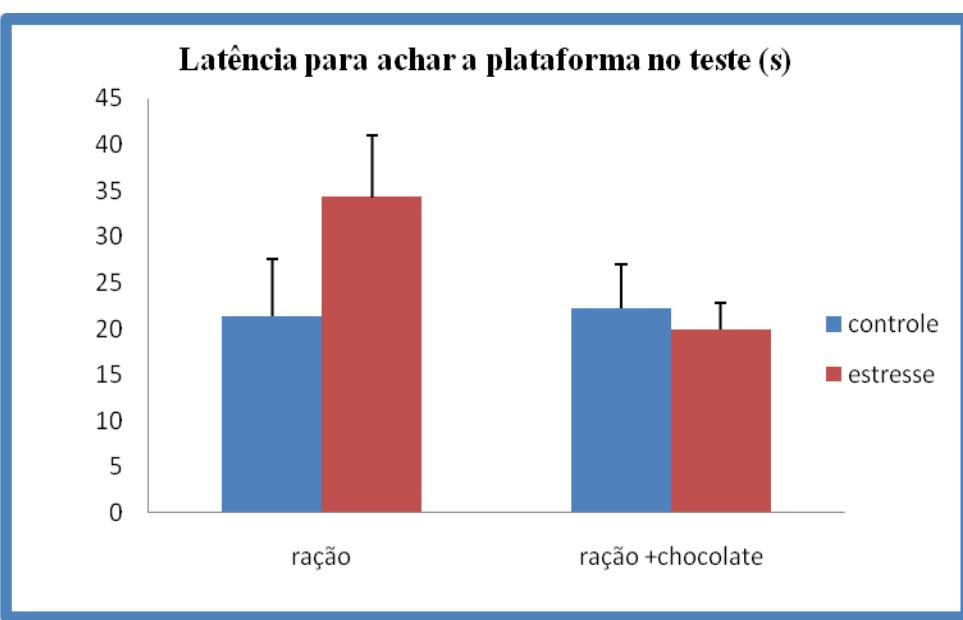


Figura 5 Efeito do estresse crônico na vigência ou não de dieta palatável sobre a memória espacial, avaliando latência para achar a plataforma no teste (s). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferença significativa (Anova de duas vias $P > 0,05$).

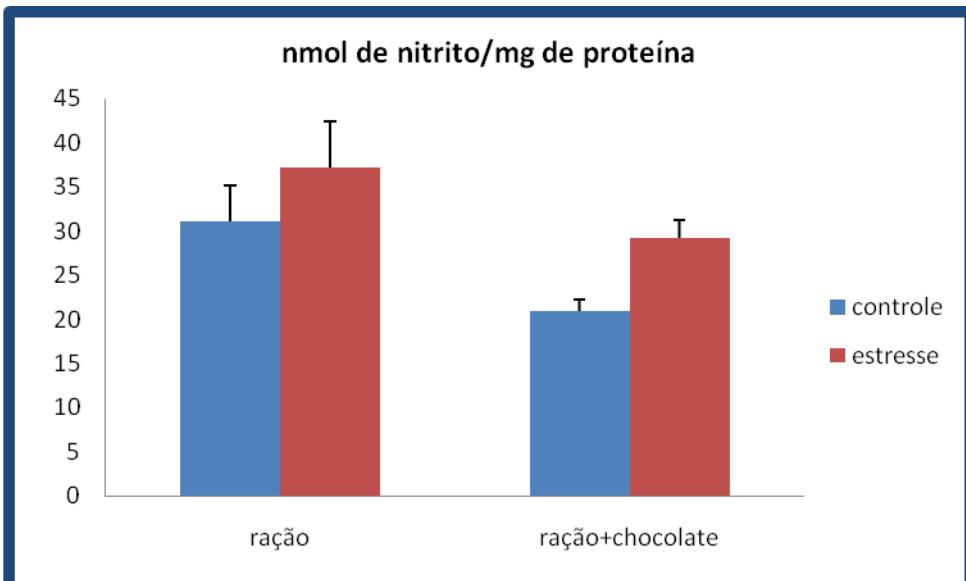


Figura 6 Efeito do estresse crônico na vigência ou não de dieta palatável sobre a produção de óxido nítrico. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Efeito do chocolate (Anova de duas vias $P < 0,05$).

3.3 Parte 3

Efeito do estresse agudo em ratos machos submetidos a uma dieta hiperpalatável sobre parâmetros do desbalanço oxidativo e dano ao ADN celular

Vários fatores como idade, sexo e estado emocional são fundamentais para conduzir a natureza dos eventos aversivos no sistema biológico (GULATI ET AL., 2008; CHAKRABORTI ET AL., 2007), sendo grandemente relevantes na regulação às respostas do estresse (RAY ET AL., 1991). Além disso, o tipo, a duração ou a gravidade do estresse podem provocar diferentes respostas no comportamento alimentar (HARGREAVES,1990; MARTI e ARMARIO,1994). De acordo com os resultados obtidos no Capítulo 1, os ratos machos mostraram serem mais vulneráveis ao desequilíbrio oxidativo no hipocampo quando submetidos ao um estresse crônico por contenção e também ao consumo crônico de uma dieta palatável. Contudo, nos questionamos se a exposição a um estresse psicológico (por contenção), mas de forma aguda e também na vigência de uma dieta palatável por um curto período, levaria à mesma vulnerabilidade hipocampal. Sendo assim, analisamos os mesmos parâmetros oxidativos como descritos no Capítulo 1.

3.3.1 Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar adultos machos de 60 dias, pesando entre 250-300g. Os animais foram mantidos em caixas-moradia plásticas (65 X 25 X 15 cm) em grupos de 5, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas. Eles tinham livre acesso à comida (ração padrão ou ração + chocolate) e à água, exceto para os animais estressados, durante o período em que a contenção foi aplicada. Os animais foram tratados de acordo com o recomendado pela SBNeC e com as recomendações do “International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)”, buscando sempre minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais utilizados.

Consumo da dieta hiperpalatável e modelo do estresse agudo

Ratos machos Wistar foram divididos em 2 grupos, segundo a dieta [ração apenas e chocolate mais ração (sendo que para o segundo grupo os animais podiam escolher livremente entre ração e chocolate) *ad libitum*], e foram após subdivididos em estressados e controles. Usou-se estresse por contenção (1h). Estes animais, antes de sofrerem o estresse, receberam a oferta de chocolate por uma semana. Após oito horas da exposição ao estresse agudo os animais foram mortos por decapitação e o hipocampo foi dissecado para posterior análise das enzimas antioxidantes e do dano ao ADN.

Métodos para avaliação do dano ao ADN e das atividades das enzimas antioxidantes

Conforme descritos no Capítulo 1.

3.3.2. Resultados

Quebras no ADN

Os resultados estão mostrados na Figura 7. A exposição ao estresse agudo foi capaz de aumentar as quebras do ADN no hipocampo de ratos machos, medidas 8 h após a exposição ao estresse por contenção. O consumo da dieta hiperpalatável não apresentou diferenças significativas, no entanto. ANOVA de duas vias usando dieta e estresse como fatores mostrou que o estresse aumentou as quebras do ADN [$F(1,14)=15,52; P < 0,05$].

Atividade das Enzimas Antioxidantes

ANOVA de duas vias mostrou uma tendência do estresse em aumentar a atividade da SOD [$F(1,16)= 4,16; P =0,052$]. Por sua vez, o consumo da dieta hiperpalatável diminuiu a atividade da SOD [$F(1,16)=37,71; P < 0,05$]. Além disso, houve uma interação entre estresse e dieta [$F(1,16)=6,8; P < 0,05$], ou seja, quando combinados os dois fatores, a dieta diminui ainda mais a atividade da SOD (ver Figura 8).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para a atividade catalase (Figura 9) ou para a glutationa peroxidase (Figura 10) (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$ em todos os casos).

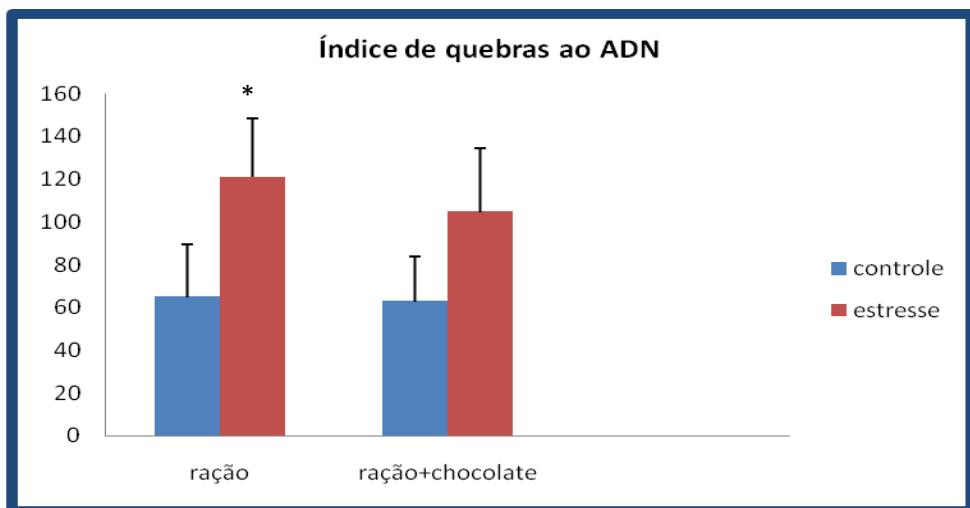


Figura 7 Efeito do estresse agudo na vigência ou não de acesso a uma dieta palatável sobre o índice de quebras no ADN no hipocampo. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Efeito do estresse agudo (ANOVA de duas vias, $P < 0,05$).* Diferente significativamente dos grupos não estressados. (Teste de Tukey $P,0,05$).

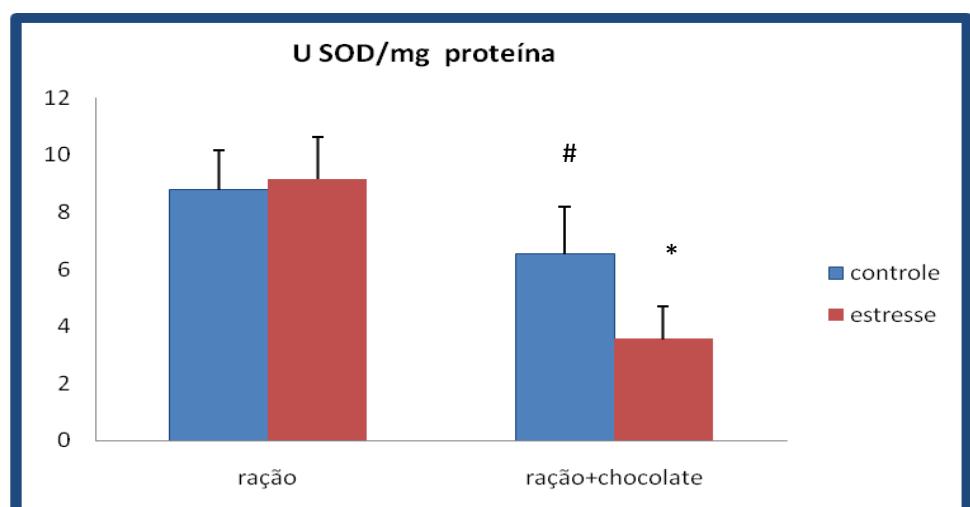


Figura 8 Efeito do estresse agudo na vigência ou não de acesso a uma dieta palatável sobre a atividade da superóxido dismutase no hipocampo. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Houve efeito da dieta e interação entre estresse e dieta (ANOVA de duas vias, $P < 0,05$).* Diferente significativamente em relação aos demais grupos.(Teste de Tukey, $P<0,05$); # Diferente do grupo ração+estresse.(Teste de Tukey, $P<0,05$).

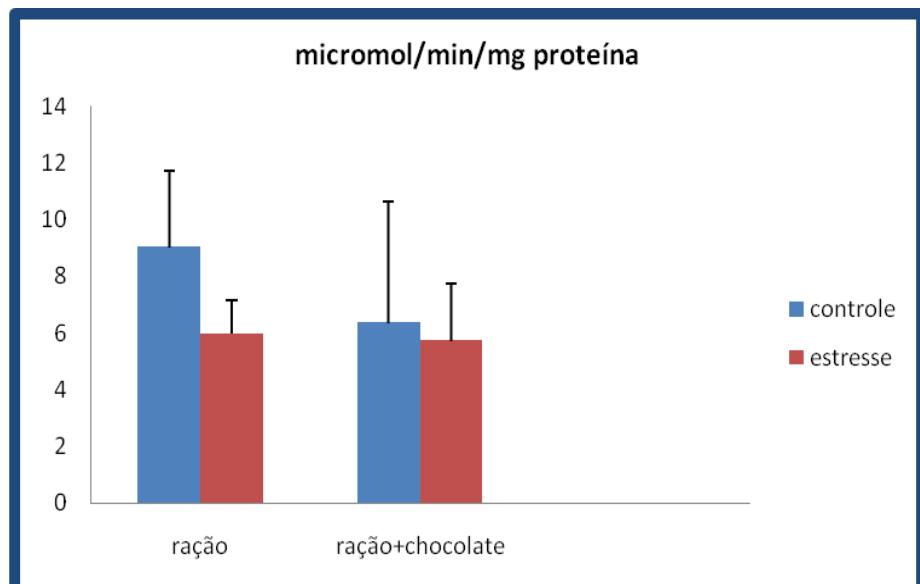


Figura 9 Efeito do estresse agudo na vigência ou não de acesso a uma dieta palatável sobre a atividade da catalase no hipocampo (micromol/min/mg proteína). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

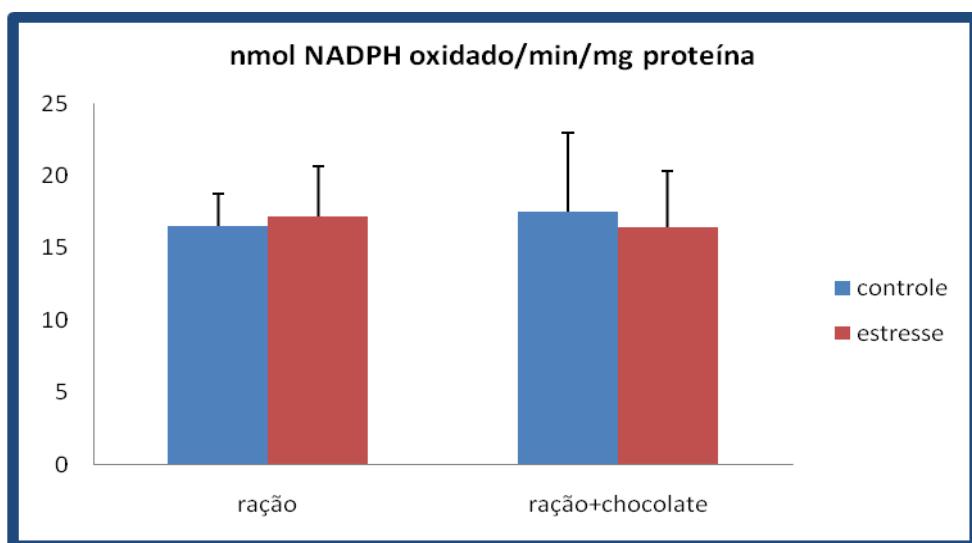


Figura 10 Efeito do estresse agudo na vigência ou não de acesso a uma dieta palatável sobre a atividade da glutationa peroxidase no hipocampo (nmol NADPH oxidado/min/mg proteína). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Não houve diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

4. Discussão

De acordo com os achados deste trabalho, foi observado que não houve efeito do estresse no consumo de ração ou dieta palatável, apenas fêmeas apresentaram uma maior redução no consumo de ração quando era oferecido chocolate em adição à ração. O comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse crônico e o aumento no número de cruzamentos apresentaram uma interação entre dieta palatável e estresse e foram sexo-específicos, pois foram encontrados apenas nas fêmeas. Já quanto à memória espacial, analisada apenas nos ratos machos, foi observado um efeito facilitador da dieta. Além desses resultados comportamentais, essa dissertação apresenta resultados relacionados ao desbalanço oxidativo, onde foi observado um aumento no dano ao ADN no hipocampo e estriado em ambos os sexos, tanto pelo estresse crônico quanto pelo consumo crônico de uma dieta palatável. Com relação à atividade de enzimas antioxidantes, foram encontradas alterações dependentes da estrutura cerebral e do sexo. A dieta palatável diminui a atividade da GPx e CAT e uma interação entre dieta e sexo foi observada na relação SOD:CAT no hipocampo, sendo que essa alteração na razão SOD: CAT foi mais marcante em ratos machos. No estriado, o consumo da dieta palatável aumentou o TRAP. Já quanto aos efeitos da exposição ao estresse crônico, observamos que houve um efeito do estresse e uma interação entre estresse e sexo na atividade da SOD no estriado, explicado pelo fato de que em fêmeas o estresse diminui a atividade da SOD. Quanto à produção de óxido nítrico, observamos o conteúdo dos seus metabólitos estáveis e encontramos uma tendência do estresse aumentando o conteúdo de nitritos enquanto que a dieta diminuiu.

Além de verificar os efeitos do estresse crônico e consumo crônico de chocolate, analisamos também os ratos machos submetidos ao estresse agudo por contenção e o consumo de chocolate por um curto período. Neste trabalho, encontramos um aumento das quebras ao ADN no hipocampo provocados pelo estresse agudo e alterações nas enzimas antioxidantes também foram observadas. O estresse agudo mostrou uma tendência em aumentar a atividade da SOD, enquanto que o consumo da dieta hiperpalatável diminuiu a atividade da SOD. Além disso, houve uma interação entre estresse e dieta, ou seja, quando combinados os dois fatores, a dieta diminuiu ainda mais a atividade da SOD.

Conforme descrito no Capítulo 1, nenhuma alteração comportamental no campo aberto e no labirinto em cruz elevado nos ratos machos foi observada. No entanto, as fêmeas diminuíram o tempo gasto nos quadrados centrais após estresse crônico, e houve uma interação entre dieta e estresse, sugerindo que o estresse crônico pode aumentar o comportamento do tipo ansioso e o consumo da dieta palatável pode prevenir este efeito. Além disso, houve uma interação entre dieta e estresse quando analisado os números de cruzamentos. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que alimentos baseados na recompensa possam diminuir a resposta ao estresse quando estes animais têm livre acesso a uma dieta palatável (ADAM e EPEL, 2007; PECORARO ET AL., 2004). No teste do labirinto em cruz elevado houve apenas um efeito marginal do estresse, aumentando o comportamento do tipo ansioso nas fêmeas. Alguns estudos mostraram que a exposição ao estresse agudo por contenção induz comportamento do tipo ansioso tanto em machos quanto em fêmeas (CHAKRABORTI ET AL., 2007). A ausência dos efeitos nos ratos machos pode ser devido ao tipo de modelo usado, de exposição repetida ao mesmo evento aversivo, que pode estar levando a um processo de adaptação para este estímulo. Já as fêmeas pareceram ser mais vulneráveis aos efeitos

do estresse. Estudos mostram que a ovariectomia, por remoção da fonte primária de estradiol, os ovários, aumenta a ansiedade e o comportamento depressivo (BERNARDI ET AL., 1989; BOWMAN ET AL., 2002). No presente estudo, o ciclo estral não foi monitorado e provavelmente as fêmeas foram testadas em diferentes fases do ciclo, o que pode influenciar o comportamento destes animais.

Além de verificar os efeitos do estresse crônico e o consumo crônico da dieta palatável sobre parâmetros comportamentais como ansiedade e atividade locomotora, este trabalho também verificou os efeitos destes fatores sobre parâmetros do desbalanço oxidativo em estruturas cerebrais. Para avaliar o dano oxidativo utilizamos o ensaio cometa (para avaliar o dano ao ADN). Esta técnica foi realizada no hipocampo e no estriado de ratos machos e fêmeas. Tem sido demonstrado que a exposição ao estresse repetido induz ao desequilíbrio oxidativo, especialmente no hipocampo (FONTELLA ET AL., 2005), onde a produção de ERO, como peróxidos, radical hidroxila e superóxido, pode levar ao dano oxidativo celular pelas quebras ao ADN (MUQBIL ET AL., 2006). No entanto, as quebras do ADN surgem a partir do dano oxidativo, mas também a partir de processos de reparo do ADN (HALLIWELL e WHITTEMAN, 2004).

De acordo com os resultados discutidos no Capítulo 1, tanto o estresse quanto a dieta aumentaram índice de quebras ao ADN no hipocampo e estriado de ratos machos e fêmeas. Tal resultado, contudo, não significa que o dano observado nas estruturas cerebrais seja um dano permanente. O aumento do índice de quebras causado pela exposição ao estresse no estriado de fêmeas foi parcialmente prevenido pelo consumo de uma dieta rica em calorias, e a exposição das fêmeas ao chocolate mostrou um aumento nos níveis de TRAP também no estriado, de modo que esses dois fatores podem estar relacionados.

A avaliação das enzimas antioxidantes nos mostrou que, no hipocampo, a dieta palatável diminuiu a atividade da GPx, diminui a atividade da CAT e aumentou a razão SOD:CAT, sendo que esses efeitos foram mais marcantes em ratos machos, isso porque quando analisamos os sexos separadamente encontramos efeitos mais expressivos da dieta sobre a atividade das enzimas antioxidantes no hipocampo dos ratos machos. O aumento dessa razão com consequente redução da GPx e CAT pode resultar em um aumento das concentrações de H₂O₂, o qual pode levar à produção do radical hidroxila, sendo muito danoso para a célula (HALLIWELL ET AL., 2006).

No estriado das fêmeas, o estresse diminuiu a atividade da SOD e a dieta aumentou o TRAP, indicando que o chocolate parece ter um efeito antioxidante nesta estrutura. Esse desequilíbrio das enzimas antioxidantes pode estar relacionado a resultados de um estudo que mostrou que as dietas ricas em gordura e calorias, quando administradas em roedores, induzem aumento da geração de radicais livres no cérebro (ZHANG ET AL., 2005).

Os resultados apresentados no Parte1 sugerem a distinta vulnerabilidade das estruturas cerebrais e também as diferenças entre os sexos, pois mostram que o consumo crônico da dieta palatável afetou expressivamente as enzimas antioxidantes no hipocampo dos ratos machos, enquanto que nas fêmeas o estresse apenas alterou a atividade da SOD e não houve um efeito marcante da dieta sobre as enzimas antioxidantes. Esses resultados sugerem um possível efeito do estradiol como protetor contra o dano oxidativo, podendo estar envolvido nesses efeitos menos marcados das enzimas antioxidantes em fêmeas (BAKOV, KO e RICHARDSON, 2009; WING CHEN, 2009).

Visto que o consumo crônico da dieta hiperpalatável parece ter sido mais prejudicial para os ratos machos, procuramos avaliar também como estaria à memória espacial destes animais estressados cronicamente e submetidos a uma dieta palatável. A avaliação no labirinto aquático de Morris mostrou que, durante os dias de treino, os animais que receberam a dieta palatável levaram menos tempo para encontrar a plataforma, indicando um efeito facilitador da dieta ao longo dos dias sobre o aprendizado de uma tarefa espacial, ou seja, aprenderam mais rapidamente a tarefa. Já os animais estressados cronicamente não apresentaram nenhum prejuízo com a tarefa. Sabendo da importância do óxido nítrico como um mensageiro celular e do seu forte envolvimento com a memória espacial, tornou-se relevante para o nosso estudo avaliar os metabólitos estáveis da produção do óxido nítrico. O estresse teve uma tendência em aumentar os nitritos e a dieta os diminuiu. Esse resultado foi surpreendente, pois há relatos acerca da importância da produção de óxido nítrico (NO) para a formação de memórias (BOM ET AL., 1992; BOM e GARTHWAITE, 2003). Deve-se, porém, ressaltar que avaliamos, indiretamente, a produção basal de óxido NO e não sua produção nos períodos-chave de plasticidade, nos momentos de aquisição/consolidação do traço de memória. Além disso, há evidências de que, em certas condições, a produção de óxido nítrico e as suas funções fisiológicas são reduzidas por causa da inativação oxidativa, pelo excesso da produção do ânion superóxido (KOJDA e HARRISON, 1999). Ambos, superóxido e óxido nítrico, são altamente reativos e podem, juntos, formar peroxinitrito e com isso, levar ao dano celular (MARECHAL ET AL., 2007). Isto pode ser uma explicação plausível para esta diminuição dos nitritos provocada pelo consumo de uma dieta rica em gordura e açúcar, já que o consumo dessa dieta aumenta o metabolismo aeróbico e com isso leva a uma super-estimulação da respiração mitocondrial, aumentando a produção de superóxidos. Como visto no

capítulo anterior, a dieta perturbou o equilíbrio dos sistemas antioxidantes enzimáticos e também contribuiu para o dano ao ADN no hipocampo de ratos machos. Além disso, outros estudos mostram que efeitos da exposição ao estresse podem ser regulados pelo óxido nítrico, mas que a modulação nitrégica das respostas ao estresse depende da duração e intensidade do estressor. Níveis fisiológicos de óxido nítrico, bem como seu potencial antioxidant, agem de forma protetora contra o estresse. O excesso da formação deste gás, provavelmente por uma super-estimulação da enzima óxido nítrico sintase induzível, pode combinar-se com forças oxidativas deletérias. Nos nossos achados, o estresse crônico induziu um aumento marginal dos nitritos, indicando um possível aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase com aumento de seus metabólitos, podendo estar agindo como uma resposta adaptativa, visto que alguns trabalhos sugerem essa explicação para este aumento (GULATI, CHAKRABORTI e RAY., 2008).

Analizando os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, percebemos que tanto o estresse quanto a dieta perturbaram a homeostasia do hipocampo de ratos machos. Com base nisso, nos perguntamos se estes animais já sofreriam essas alterações nas enzimas antioxidantes e também no ADN se submetidos ao um estressor agudo quando houvesse (ou não) acesso a uma dieta palatável, mas por um período mais curto. De acordo com os nossos achados, o estresse agudo por contenção já foi capaz de levar a quebras no ADN e também a um aumento marginal da atividade da SOD no hipocampo. Já a dieta palatável diminuiu a atividade da SOD, e quando combinados os dois fatores houve uma interação entre eles, mostrando uma diminuição ainda maior da atividade desta enzima.

Dietas ricas em açúcar estimulam a respiração mitocondrial, a qual é uma das principais fontes produtoras de superóxidos, o que pode levar a um desequilíbrio dos

sistemas antioxidantes enzimáticos. Além disso, a exposição a situações estressantes parece prejudicar as defesas antioxidantes, levando ao dano oxidativo por alterar o equilíbrio entre os fatores antioxidantes e oxidantes (MCINTOSH, CORTOPASSI e SAPOLSKY, 1998) e com isso causar dano ao ADN.

Os resultados apresentados no Capítulo 3 mostraram que, já em uma única exposição ao estresse por contenção, ocorreram quebras do ADN celular no hipocampo e que uma exposição por uma semana a uma dieta palatável, rica em calorias, parece já perturbar as defesas antioxidantes enzimáticas, sinalizando um possível desequilíbrio no hipocampo destes animais.

5. CONCLUSÕES

- ❖ Ambos, o consumo de dieta palatável e a exposição ao estresse crônico, induziram diferentes efeitos comportamentais e bioquímicos em ratos machos e fêmeas.
- ❖ As fêmeas diminuíram mais intensamente o consumo de ração quando lhes foi oferecido ração e chocolate. Quando submetidas ao estresse crônico, apresentaram na tarefa do campo aberto, um comportamento do tipo ansioso e uma interação entre dieta e estresse, sugerindo um possível efeito protetor da dieta com relação aos efeitos do estresse. Além disso, houve também uma interação entre dieta e estresse quando analisada a atividade locomotora, mostrando que a dieta também supriu os efeitos adversos do estresse.
- ❖ Ratos machos não apresentaram alterações comportamentais na tarefa do campo aberto, mas no labirinto aquático de Morris mostraram um rápido aprendizado da tarefa ao longo dos dias de treino quando submetidos à dieta palatável, pois os animais que receberam a dieta apresentaram um efeito facilitador.
- ❖ O estresse repetido por contenção e o consumo de uma dieta rica em calorias induziram um estado de maior susceptibilidade ao desbalanço oxidativo em algumas estruturas cerebrais, considerando a atividade alterada das enzimas antioxidantes.
 - A dieta palatável diminuiu a atividade da GPx e da CAT e aumentou a razão SOD:CAT; esses efeitos, foram mais marcantes em hipocampo de ratos machos. Além desses efeitos também encontramos no hipocampo de ratos machos uma tendência do estresse crônico em aumentar os nitritos enquanto que a dieta os diminuiu.
 - O estresse crônico diminuiu a atividade da SOD; também houve uma interação entre estresse e sexo no estriado. Esse efeito foi mais marcante em fêmeas quando analisamos os sexos separadamente, pois o estresse diminuiu a atividade

da SOD no estriado de fêmeas. No entanto, a dieta aumentou o TRAP nessa estrutura, sugerindo um possível efeito antioxidante do chocolate.

- ❖ A exposição ao estresse crônico e o livre acesso ao chocolate induziram um aumento no índice de quebras no ADN nas estruturas analisadas (hipocampo e estriado) em ambos os sexos. O estresse agudo também induziu um aumento das quebras no ADN no hipocampo de ratos machos.
- ❖ O consumo de uma dieta palatável rica em gordura durante um período relativamente curto (uma semana) induziu a diminuição da atividade da SOD no hipocampo, enquanto que a exposição ao estresse por contenção de forma aguda apresentou uma tendência em aumentar a atividade da SOD. Já CAT e Gpx não tiveram diferenças significativas em relação a atividade entre os grupos.

Desse modo, nossos resultados sugerem que as fêmeas têm maior susceptibilidade para os efeitos do estresse quando avaliados parâmetros comportamentais e que o livre acesso ao chocolate foi capaz de contrapor os efeitos do estresse, bem como reduzir os efeitos do estresse nas quebras do ADN, como observado no estriado. No entanto esta dieta também induziu alterações na atividade das enzimas antioxidantes e aumento das quebras do ADN em ratos machos. Além disso, uma exposição ao estresse por um período mais curto mostrou já ser capaz de causar quebras no ADN, além da dieta ter causado uma diminuição da SOD no hipocampo de ratos machos. Todos esses resultados indicam a distinta vulnerabilidade do SNC e as diferenças sexo-específicas quando estes animais são expostos ao estresse e a dieta palatável em diferentes períodos (agudo ou crônico).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSH H, AKIRAV I. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity.
Hippocampus. 2009. [Epub ahead of print]

ADAM TC, & EPEL ES. Phys Behav. 91: 449-458; 2007.

BERNARDI M, VERGONI AV, SANDRINI M, TAGLIAVINI S, BERTOLINI A.
Physiol Behav. 45:1067-81;989.

BOKOV AF, KO D, RICHARDSON A. End Res. 34: 43-58; 2009.

BON C, BOHME GA, DOBLE A, STUTZMANN JM, BLANCHARD JC. Euro J
Neurosc. 4: 420-424; 1992.

BON CL, GARTHWAITE J. J Neurosci. 23: 1941-1948; 2003.

BOWMAN RE, FREGUSON D, LUINE VN. Neuroscience. 113: 401-410; 2002.

CAROBREZ AP & BERTOGLIO LJ. Neurosci Biobehav Rew. 29: 1193-205; 2005.

CHAKRABORTI A, GULATI K, BANERJEE BD, RAY A. Behav Brain Res.
179:321-5;2007.

CRITCHLOW RA, LIEBELT M, BAR- SELA W, MOUNTCASTLE, LIPSCOMB HS.
Am J Physiol. 205: 807-815; 1963.

DALMAN MF, PECORARO NC, LA FLEUR SE, GOMEZ F, HOUSHYAR H, ET AL
.Proc Natl Acad Sci USA.2003; 100: 11696-701.

D'AQUILA PS, BRAIN P, WILLNER P. Physiol Behav. 56:861-7;1994.

ELY DR, DAPPER V, MARASCA J, CORREA JB, GAMARO GD, XAVIER MH,
MICHALOWSKI MB, CATELLI D, ROSAT R, FERREIRA MB, DALMAZ C.
Physiol Behav. 61:395-8;1997.

EPEL E, LAPIDUS R, MCEWEN B, BROWNELL K. Phychoneuoend. 26: 37-49;
2001.

FACHIN A, SILVA RK, NOSCHANG CG, PETTENUZZO L, BERTINETTI L,
BILLODRE MN, PERES W, BUSNELLO F, DALMAZ C. Appetite. 51: 592-8; 2008.

FONTELLA FU, SIQUEIRA IR, VASCONCELLOS AP, TABAJARA AS, NETTO
CA, DALMAZ C. Neurochem Res. 30:105-11;2005.

FREEMAN LM, GIL KM. Int J Eat Disord.2004;36:204-12.

GULATI K, CHAKRABORTI A, RAY A. Behav Brain Res. 183: 226-230; 2007.

GULATI K, CHAKRABORTI A, RAY A. Pharmacol. Biochem.Behav.92:272-276; 2008.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Trends Neurosci. 8:22-6;1985.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. BR J Pharmacol. 142: 231-235; 2004.

HALLIWELL B. J Neurochem. 97: 1634-1658; 2006.

HANDLEY S.L, MC BLANE J.W, CRITCHLEY M.A, NJUNG' E K. Behav Brain Res. 58: 203-210; 1993.

HARGREAVES KM. Anesth Prog. 37:99-105;1990.

JOELS M, PU Z, WIEGERT O, OITZL MS, KRUGERS HJ. TRENDS Cogn. Sci.10:152-8;2006.

LING PR, SMITH RJ, BISTRIAN BR. Crit Care Med. 35: 555-560; 2007.

KAMARA K, ESKAY R, CASTONGUAY T. Physiol Behav. 1998; 64: 1-6.

KEHRER JP. Toxicology. 149:43-50;2000.

KOJDA G, HARRISON D. Cardiovascular Rs . 43: 562-571; 1999.

KOVACHEVA- IVANOVA S, BAKALOVA R, RIBAVOV SR. Gener Phys Biophy.
13: 469-482; 1994.

LIANG S, BYRES DM, IRWIN LN. J Molec Neurosci. 33: 189-200; 2007.

MACIAS – GONÇALEZ M, CARDONA F, QUEIPO-ORTUNO M, BERNAL R,
MARTIN M, TINAHONES FJ. J Nutr. 138: 903-907; 2008.

MACNEIL G, SELA Y, MCINTOSH J, ZACHARKO RM. Pharmacol Biochem Behav.
58:737-46;1997.

MADRIGAL JL, OLIVENZA R, MORO MA, LIZASOAIN I, LORENZO P,
RODRIGO J, LEZA JC. Neuropsychopharmac. 24: 420-9; 2001.

MARECHAL A, MATTIOLI TA, STUERHR DJ, SANTOLINI J. J Biol Chem. 282:
14102-1412; 2007.

MIRANDA KM, ESPEY MG, WINK DA. Nitric Oxid. 5: 62-71; 2001.

MARTI O, MARTI J, ARMARIO A. Physiol Behav. 55:747-53;1994.

MCINTOSH LJ, CORTOPASSI KM, SAPOLSKY RM. Brain Res. 791:215-22;1998.

MCINTOSH L, SAPOLSKY R. Exp Neurol. 141:201-6;1996.

MORILAK DA, CECCHI M, KHOSHBOUEI H. Life Sci. 73:715-26;2003.

MORRIS RGM, GARRUD JPN, RAWLINS JO. Nature. 297: 681-3; 1982.

MUQBIL I, AZMI AS, BANU N. FEBS Lett. 580:3995-9;2006.

OISHI K, YOKOI M, MAEKAWA S, SODEYAMA C, SHIRAI SHI T, KONDO R, KURIYAMA T, MACHIDA K. Acta Physi Scand. 165: 65-69; 1999.

OITZL MS, REICHARDT HM, JOËLS M, DE KLOET ER. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:12790-5;2001.

PBLES R, WILSON JL, LOCK JD. J Adol Health. 6: 800-5; 2006.

PECORARO N, REYES F, GOMEZ F, BHARGAVA A, DALLMAN MF. 145: 3754-3762; 2004.

PRUT L & BELZUNG C. *Europ J Pharmacol.* 463: 3-33; 2003.

RADAK Z, SASVARI M, NYAKAS C, KANEKO T, OHNO H, GOTO S. *Neurochem Int.* 39: 22-38; 2001.

RAY A & HENKE PG. *Behav Brain Res.* 36: 179-183; 1990.

RICHTER-LEVIN G, CANEVARI L, BLISS TV. *Behav Brain Res.* 66: 37-40; 1995.

ROBERTS CK, BARNARD RJ, SINDHU RK, JURCZAK M, EHDAIE A, VAZIRI ND. *Metabolism.* 55: 928-934; 2006.

SAPOLSKY RM, KREY LC, MCEWEN BS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:6174-7;1984.

SILVA AJ, GIESE KP, FEDOROV NB, FRANKLAND PW, KOGAN JH. *Neurobiol Learn Mem.* 70: 44-61; 1998.

SILVEIRA PP, Da SILVA BENETTI C, AYRES C, PEDREIRA FQ, PORTELLA AK, LUCION AB, DALMAZ C. Behav Brain Res 80: 739-745; 2004.

SOUZA CG, MOREIRA JD, SIQUEIRA IR, PEREIRA AG, RIEGER DK, SOUZA DO, SOUZA TM, PORTELA LV, PERRY MLS. Life Scienc. 81: 198-203; 2007.

TANNEBAUM BM, BRINDLEY DN, TANNENBAUM GS, DALLMAN MF, MCARTHUR MD, MEANEY MJ. Am J Physiol. 1997; 273: 1168-77.

TSIGOS C, CHROUSOS GP. J Psychosom Res. 53:865-71;2002.

ZHANG X, DONG F, REN J, DRISCOLL MJ, CULVER B. Exprim Neuro. 191: 318-325; 2005.

WING LY, CHEN YC, SHIH YY, CHENG JC, LIN YJ, JIANG MJ. Experiment Biol Med. 234: 1037-1046; 2009.