

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NO IMUNOCONTEÚDO DO
RECEPTOR DE ADENOSINA A₁ EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DIETA
RICA EM ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* OU ÓLEO DE PALMA DESDE O PERÍODO
GESTACIONAL**

SABRINA MIORANZZA

Orientadora: Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry (*in memorian*)

**Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre, 2010.

AGRADECIMENTOS

À Professora Lisiane de Oliveira Porciúncula, que aceitou logo de início minha proposta de trabalho, mais ligada à Nutrição, pensando também no meu futuro profissional. Lisi, muito obrigada por tantos ensinamentos, conselhos, “puxões de orelha” e por acreditar no meu trabalho. Você é para mim uma amiga, uma irmã mais velha, um exemplo de mulher na ciência, dedicada e sempre presente, discutindo resultados, ouvindo opiniões, sugestões, angústias, e também dividindo uma garrafa de um bom vinho nas noites frias do inverno.

Ao Professor Marcos Luiz Santos Perry, por quem sempre terei uma imensa admiração e gratidão por ter me aceito como co-orientanda, e esteve sempre à disposição para esclarecimento de dúvidas e sugestões. Ao Professor Diogo Onofre de Souza, que me acolheu de braços abertos e me mostrou esse mundo maravilhoso e curioso que é a Neurociência.

Ao Grupo Purinas, meus amigos queridos que são meus irmãos daqui de Porto Alegre, sempre dispostos aos vários experimentos deste trabalho, e aos finais de semana com grandes revelações regadas com o maravilhoso café do Marcelo Costa. Marcelo e Paulo, os representantes masculinos do grupo que cumprem com êxito sua tarefa de proteger as colegas. Dani e Ana, que tanto ouviram minhas angústias e continuam presentes na minha vida, mesmo do outro lado do mundo. Às bolsistas Fezinha e Gabi, por serem grandes amigas, muitas vezes tendo que ouvir demais nos últimos meses. Às amigas Vanessa, Micheli e Jana, contribuições do ano passado, pela convivência e pelos papos-cabeça. Obrigada pela compreensão e companheirismo. Espero retribuir todo o apoio que vocês me deram durante esses anos de grupo.

Aos colegas do laboratório 28, em especial à Júlia, que para mim é um exemplo de nutricionista pesquisadora, e que desde o início, dos primórdios do blotting e quando quis trabalhar com dieta e acasalamento, me explicou tudo com muita atenção e paciência, e esclarecia minhas dúvidas sempre que eu precisava. Aos colegas do laboratório 24, pela convivência durante os diversos blottings.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pela competência em resolver nossos problemas e por serem acessíveis e prestativos.

À minha querida prima e melhor amiga de todos os tempos, Gabi. Obrigada por tantos anos de amizade, pelos três anos e meio de convivência diária, aturando minhas TPMs, me ouvindo e me dando conselhos, sempre. Às minhas grandes amigas Gabi, Cris e Nati, que sempre estiveram ao meu lado, compreenderam minhas ausências em alguns trabalhos da faculdade e pela paciência em me ouvir e me ajudar inúmeras vezes. Vocês são para mim minhas irmãs mais novas que a Nutrição me deu de presente! Às minhas amigas de Caxias, pelas faltas nos encontros e por desmarcar de última hora minhas idas a Caxias. A distância física não separa nossos corações, minhas eternas amigas!

À minha família querida, a base de toda minha vida. Pai, obrigada pela dedicação, pelo conselho precioso de terminar a faculdade de Farmácia para depois recomeçar nos estudos de Nutrição. À minha querida madrastra Leocádia, sempre presente quando eu mais precisei. Manos, obrigada por renunciarem muitas coisas para minha formação profissional. Mana, obrigada por sempre me ouvir e torcer por minha felicidade. Aos meus sobrinhos lindos e fofos, Maria Eduarda e Marco Antônio, que me mostraram a beleza de um amor de tia; e ao Francesco, que está chegando! Não tenho palavras para expressar o que sinto por vocês. Amo vocês!

Ao meu noivo Thiago, meu porto seguro. Obrigada por todo o apoio e compreensão nesses anos, por me mostrar a beleza de se fazer pesquisa básica, por me ouvir, por enxugar minhas lágrimas, por me fazer rir, por me sentir completa quando estou contigo. Com certeza essa é uma das diversas conquistas que compartilharemos juntos. À família Torres de Ávila, que me acolheu com tanto carinho desde o início. Tenho muito orgulho de fazer parte desta família linda, que eu amo demais!

*Dedico este trabalho à Ilda Costi Mioranza,
admirável lutadora e incansável mãe que me mostrou que
nada é impossível para quem tem amor à vida e à família.*

Mãe, te amo pra sempre!

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 04 |
| ABSTRACT..... | 05 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 06 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 08 |
| APRESENTAÇÃO..... | 10 |
| CAPÍTULO 1. Introdução..... | 11 |
| 1.1 Histórico..... | 12 |
| 1.2 Ácidos graxos <i>trans</i> na dieta..... | 13 |
| 1.2.1 Efeitos dos ácidos graxos <i>trans</i> na saúde..... | 16 |
| 1.2.2 Mecanismos de ação potenciais..... | 18 |
| 1.2.3 Alternativas para redução do consumo de gordura <i>trans</i> | 21 |
| 1.3 Óleo de palma..... | 23 |
| 1.4 Sistema Nervoso Central e Adenosina..... | 25 |
| 1.5 Objetivos..... | 29 |

CAPÍTULO 2. Artigo Científico

Sabrina Mioranza, Marcelo S. Costa, Paulo H. Botton, Vanessa Lague Matte, Diogo O.

Souza, Marcos L. S. Perry, Lisiane O. Porciúncula*. **Intake of *trans* fat diet or palm**

| | |
|--|-----------|
| oil diet during development may affect behavior, learning and memory and adenosine signaling in adult male rats..... | 30 |
| CAPÍTULO 3. Discussão Geral..... | 68 |
| CAPÍTULO 4. Conclusões..... | 77 |
| Perspectivas..... | 79 |
| CAPÍTULO 5. Referências Bibliográficas..... | 81 |

RESUMO

O processo de hidrogenação vegetal utilizado pelas indústrias alimentícias tem provocado o aumento no consumo de ácidos graxos *trans* (AGT). Estudos epidemiológicos confirmaram correlação positiva entre ingestão de AGT e risco de doenças cardiovasculares. Nesse contexto, surge como alternativa o óleo de palma, livre de AGT. Embora há evidências dos efeitos da ingestão de AGT no sistema cardiovascular, faltam estudos que avaliem o impacto do conteúdo lipídico da dieta no Sistema Nervoso Central. A adenosina é um neuromodulador que pela ligação nos seus receptores A_1 (inibitórios) e A_{2A} (facilitatórios) participa de vários sistemas de neurotransmissores, como dopamina, noradrenalina e glutamato. Nosso objetivo é verificar alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos adultos que receberam dieta normolipídica, contendo AGT ou óleo de palma, desde o período gestacional. Três grupos de ratas Wistar receberam dietas normolipídicas diferindo a fonte lipídica: óleo de soja (OS; controle); óleo de palma (OP); gordura hidrogenada/trans (GT). Após duas semanas de adaptação à dieta e acasalamento, as fêmeas receberam a mesma dieta até o final da lactação. No desmame, filhotes machos continuaram com a mesma dieta até 60 dias pós-natal. Para avaliar parâmetros de ansiedade e atividade locomotora nos ratos com 2 meses de idade, foram realizados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e arena em campo aberto (CA), respectivamente. Esquiva inibitória (EI) e reconhecimento de objetos (RO) foram realizados para teste de memória e aprendizado. Após 24h, os animais foram sacrificados e córtex, hipocampo e hipotálamo separados para análise da densidade de receptores A_1 por Western Blot. No LCE, os animais que receberam a dieta GT permaneceram mais tempo nos braços abertos em comparação aos grupos que receberam as dietas OS e OP. Os grupos OP e GT fizeram menor número de cruzamentos comparados ao grupo OS no CA. Os grupos OP e GT tiveram a memória de curta duração prejudicada na EI e no RO, comparados ao grupo OS. Houve um prejuízo na memória de longa duração somente no grupo OP na EI. Observou-se diminuição significativa de 39% na densidade do receptor A_1 no hipocampo de ratos que receberam GT ($P=0,0335$). No hipotálamo, ratos que consumiram a dieta OP apresentaram um aumento significativo de 15% na densidade do receptor A_1 , comparado ao grupo OS ($P=0,0031$). Não houve alterações neuroquímicas no córtex dos ratos submetidos às dietas do estudo. Nossos resultados revelaram que os filhotes submetidos à dieta rica em AGT desde o período intrauterino apresentaram menor ansiedade, menor atividade locomotora e declínio na memória de curta duração na idade adulta, enquanto os animais que receberam OP no mesmo período não alteraram o comportamento de ansiedade, mas tiveram menor atividade locomotora e declínio cognitivo na memória de curta e de longa duração. Também foram encontradas alterações no imunoconteúdo dos receptores de adenosina A_1 em diferentes estruturas cerebrais e conforme o tratamento dietético. Este estudo sugere a importância da qualidade lipídica da dieta oferecida desde o período gestacional, que pode estar relacionada a comportamento de ansiedade e desempenho cognitivo na idade adulta.

ABSTRACT

Dietary consumption of trans fatty acids (TFA) has increased during the 20th century, due to the increasing use of vegetal oil hydrogenation by food industries, which product is hydrogenated fat. Epidemiology studies have shown that TFA intake is correlated to risk for cardiovascular diseases. Thus, palm oil has emerged as an alternative to hydrogenated fat. Eventhough studies are advanced in cardiovascular research, the impact of dietary fat intake in Central Nervous System are still lacking. Adenosine is a neuromodulator which via its metabotropic receptors A_1 and A_{2A} participates in the neurotransmission of some neurotransmitters such as dopamine, noradrenaline and glutamate. The aim of the present study was to investigate whether intake of different diets from early pregnancy until adult life of offspring could promote behavioral and neurochemical alterations. Wistar female rats were divided into three groups and received isocaloric/normolipidic diets with soybean oil (SO, control diet), palm oil (PO) or hydrogenated-*trans* fat (TF) as a fat source, during pregnancy and lactation. After weaning, male pups continued receiving the same diet up to 60 days-old. Elevated plus-maze (EPM) was chosen to evaluate anxiety-like behavior and open field task (OF) to verify locomotor activity. For learning and memory analysis, we chose a non-aversive (Object Recognition Task, OR) and an aversive task (Inhibitory Avoidance, IA). The immunocontent of adenosine receptors in cortex, hippocampus and hypothalamus were studied by Western Blot. In EPM, rats receiving TF diet spent more time in the open arms, comparing to SO and PO groups. In OF, number of crossing was significantly lower both in TF and PO groups, comparing to SO group. We also found short-term memory impairment in both memory tasks in rats fed PO and TF diet, whereas long-term memory was modified only in animals receiving PO diet. Neurochemical alterations were found in adenosine receptor A_1 in hippocampus of animals fed TF diet, with a significant 39% decreasing in the immunocontent comparing with SO diet ($P=0,0335$); and in hypothalamus from PO group, with a significant 15% increasing in the immunocontent ($P=0,0031$). The offspring exposed to TF diet during development were less anxious, presented lower locomotor activity and impairment in short-term memory in adulthood, whereas PO group had similar alterations, except that of anxiety. We also found alterations of adenosine receptor immunocontent in different brain areas that were dependent of the type of fat source. This work suggests the importance of the quality of fat source during development up to adulthood, which may be related in anxiety behavior and cognitive performance in memory tasks.

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁: receptor de adenosina do subtipo A₁

A_{2A}: receptor de adenosina do subtipo A_{2A}

A_{2B}: receptor de adenosina do subtipo A_{2B}

A₃: receptor de adenosina do subtipo A₃

AA: Ácido Araquidônico

AAL: Ácido α -Linolênico

AC: Adenilato Ciclase

ADH: Ácido Docosa-Hexaenoico

ADK: Adenosina Cinase (do inglês *Adenosine Kinase*)

AGPI-CL: Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa

AL: Ácido Linoleico

ALC: Ácido Linoleico Conjugado

AMP: adenosina monofosfato

ApoA-I: apolipoproteína A-I

ApoB-100: apolipoproteína B-100

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

CCPA: 2-cloro-N⁶-ciclopentiladenosina

CETP: Proteína de Transferência de Éster de Colesterol (do inglês *Cholesteryl Ester Transfer Protein*)

EctoN: Ectonucleotidases

ENT: Transportador de nucleosídeos (do inglês *Equilibrative Nucleoside Transporter*)

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)

Gi/o: Proteína G inibitória

Gs: Proteína G estimulatória

GT: Gordura *trans*

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês *High-Density Lipoprotein*)

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês *Low-Density Lipoprotein*)

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

NMDA: N-metil-D-aspartato

OMS: Organização Mundial da Saúde

OP: óleo de palma

OS: óleo de soja

PAI-1: Inibidor subtipo-1 do ativador do plasminogênio (do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor-1*)

PPAR- γ : Receptor- γ do Proliferador Ativado do Peroxissoma (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*)

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês *Tumor Necrosis Factor- α*)

VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês *Very-Low-Density Lipoprotein*)

5'NT: 5' Nucleotidase

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. Introdução

- Figura 1.** Estrutura química dos ácidos graxos insaturados oléico (*cis*) e elaídico (*trans*), com 18 carbonos, e do ácido graxo saturado correspondente, ácido esteárico.....14
- Figura 2.** Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 (esquerda) e n-3 (direita).....21
- Figura 3.** Representação de uma sinapse excitatória de neurônios do estriado, mostrando as principais características da sinalização de adenosina no SNC.....27

CAPÍTULO 2. Artigo Científico

- Table 1.** Liver and white adipose tissue mass and %body weight from 60-day-old male rats receiving SO, PO or TF diet since intrauterine growth.....62
- Table 2.** Serum triacylglycerols, LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol and cholesterol/HDL-cholesterol ratio of adult rats receiving SO, PO or TF diet from gestational period up to adulthood.....63
- Fig. 1.** Body weight of male pups (A) and adult male rats (B) of SO, PO and TF groups.....64
- Fig. 2.** Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/*trans* fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine life up to adulthood in the open field task.....65

- Fig. 3.** Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/*trans* fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine life up to adulthood in the elevated plus-maze during five minutes.....65
- Fig. 4.** Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/*trans* fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine life up to adulthood in the object recognition task.....66
- Fig. 5.** Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/*trans* fat) since intrauterine life up to adulthood in the inhibitory avoidance task.....66
- Fig. 6.** Immunoblotting analysis of the adenosine A₁ receptor density in the cortex, hippocampus and hipotalamus from adult male rats receiving diets since intrauterine life, differing only on the fat source: soybean oil (white bars); palm oil (gray bars); or hydrogenated/*trans* fat (black bars).....67

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual está no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO GERAL** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DISCUSSÃO GERAL** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A presença da desnutrição, deficiência de micronutrientes, excesso de peso e outras doenças crônicas não transmissíveis coexistindo nas mesmas comunidades e, muitas vezes no mesmo domicílio, caracteriza a transição nutricional. Diversos estudos demonstram que o Brasil e também outros países em desenvolvimento convivem com a transição nutricional, determinada frequentemente pela má-alimentação (Batista Filho e Rissin, 2003; Drewnowski e Popkin, 1997; Monteiro et al., 1995). Ao mesmo tempo em que se assiste à redução contínua dos casos de desnutrição, são observadas prevalências crescentes de excesso de peso pelo aumento no consumo de alimentos processados, ricos em gordura, açúcar e sal. Esse aumento está associado ao menor gasto energético diário devido à redução da atividade física, contribuindo para as doenças crônicas não transmissíveis.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a hipertensão arterial e a obesidade correspondem os dois principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo. No Brasil, as doenças cardiovasculares correspondem à primeira causa de morte há pelo menos quatro décadas, acompanhada de um aumento expressivo da mortalidade por diabetes e ascensão de algumas neoplasias malignas (Coutinho, Gentil e Toral, 2008).

1.1 Histórico

A produção de substitutos da manteiga iniciou na Europa, em meados do século XIX, quando a pedido de Napoleão Bonaparte, um químico francês chamado Mege Mouries, produziu em 1869 um produto à base de tutano bovino, com boa consistência e

agradável ao paladar. Algumas décadas depois, em 1897, dois químicos franceses chamados Sabatier e Senderens descobriram que a diferença na consistência de óleos vegetais e da manteiga era explicada pela menor quantidade de átomos de hidrogênio. A descoberta baseou-se no uso de níquel como catalisador e permitiu o desenvolvimento de um processo que produzia gordura a partir de óleos vegetais e minerais. O processo de hidrogenação, cujo produto é denominado gordura vegetal hidrogenada, teve a sua primeira aplicação industrial em 1903 com a preparação de gorduras a partir de óleo de baleia. A partir da década de 30 houve um aumento considerável na sua produção, o que resultou no maior consumo de margarinas e gorduras hidrogenadas durante a Segunda Guerra Mundial. Em 1941, o órgão americano FDA (Food and Drug Administration) considerou a margarina como um “alimento popular” (Ghotra, Dyal e Narine, 2002).

No Brasil, a hidrogenação industrial surgiu em meados de 1950, e o desenvolvimento de técnicas de hidrogenação seletivas levou à produção de outros subprodutos com características específicas (margarina em bastão, creme de manteiga, entre outros), facilitando sua utilização e aumentando o consumo. O resultado foi uma substituição quase completa da gordura animal na alimentação da população brasileira (Martin et al., 2007).

1.2 Ácidos graxos *trans* na dieta

Os ácidos graxos contidos nos triglicerídeos constituem a principal classe de lipídios na dieta humana, sendo encontrados naturalmente na configuração *cis*, a qual os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos insaturados encontram-se no mesmo plano.

Quanto maior for o número de duplas ligações, maior é a curvatura do ácido graxo. Um notável papel desempenhado pela ligação *cis* ocorre nas membranas biológicas; como essas membranas são constituídas por lipídios que, na sua maioria, possuem ácidos graxos como constituintes estruturais, o número total de ligações *cis* em uma membrana vai influenciar na sua fluidez. Os ácidos graxos com uma ou mais insaturações na configuração *trans*, ou seja, com os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos insaturados em planos opostos, são denominados ácidos graxos *trans* (AGT) (Martin et al., 2007). A configuração *cis* resulta em uma conformação arqueada, ao passo que a *trans* resulta em uma conformação molecular linear, similar à de ácidos graxos saturados, uma vez que estando os átomos de hidrogênio em planos opostos não há dobramento de cadeia (Figura 1).

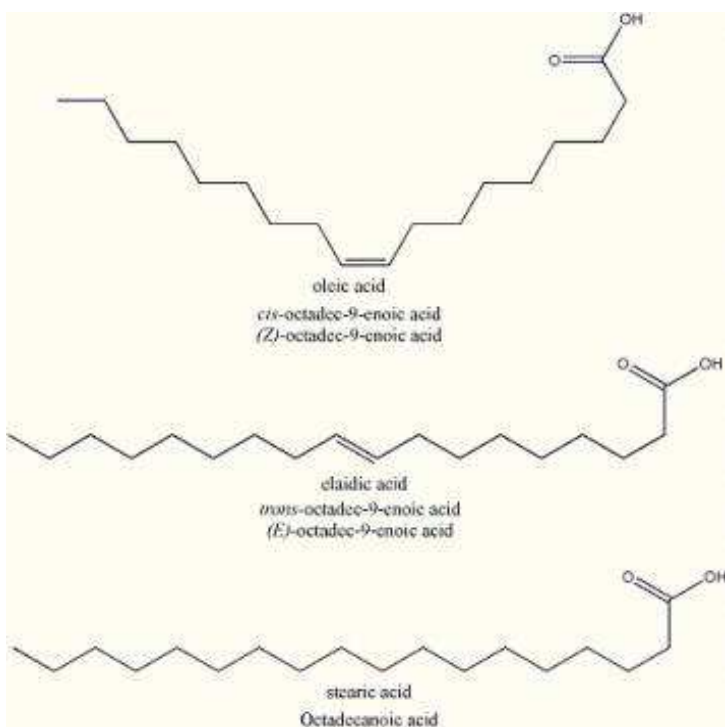


Figura 1. Estrutura química dos ácidos graxos insaturados oléico (*cis*) e elaídico (*trans*), com 18 carbonos, e do ácido graxo saturado correspondente, ácido esteárico (Stender e Dyerberg, 2004).

A hidrogenação de óleos vegetais baseia-se em uma reação dos ácidos graxos insaturados de óleos vegetais com um catalisador, geralmente o níquel, em pressão e temperatura controladas (Martin et al., 2007). O produto da hidrogenação é a gordura vegetal hidrogenada que se apresenta como semi-sólida que, por oferecer maiores características organolépticas e estabilidade dos produtos, favoreceu a produção de alimentos industrializados e de panificação. Durante o processo de hidrogenação, a ligação dupla pode se apresentar na configuração *cis* ou *trans*, e a proporção de ambas depende da temperatura, da pressão de hidrogênio e do tipo de catalisador empregado no processo. A alta seletividade do processo de hidrogenação, caracterizada pela utilização de baixa pressão de hidrogênio e elevadas temperaturas, favorece a formação de AGT e assim melhora as características físico-químicas e organolépticas dos produtos (Koletzko e Decsi, 1997).

A hidrogenação industrial de óleos vegetais é responsável pela maior parte da ingestão diária de AGT na dieta humana, sendo que o ácido elaídico (18:1 *trans*) é o mais abundante (80-90% do total de AGT nos alimentos). Entretanto, AGT também são encontrados naturalmente em baixas concentrações em carnes e produtos lácteos de animais ruminantes. Em animais que pertencem à subordem *Ruminantia*, a ação de microrganismos presentes no rúmen leva à isomerização de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico (C18:2 ω -6, *cis*; AL), resultando em dois produtos conjugados (18:2 *9cis*, *11trans* e 18:2 *10trans*, *12cis*), conhecido como ácido linoleico conjugado (ALC). Os ALCs podem ser absorvidos pelo trato digestivo do animal ou podem ser biohidrogenados formando ácido vaccênico (18:1 *11trans*). As fontes naturais de AGT contribuem com aproximadamente 0,5% da energia total proveniente dos lipídios da dieta (Koletzko e Decsi, 1997; Martin et al., 2007).

1.2.1 Efeitos dos ácidos graxos *trans* sobre a saúde

Os primeiros estudos sobre os efeitos do consumo de AGT levaram em consideração os níveis séricos de lipídios. Em uma análise sistemática de doze ensaios clínicos randomizados em que foi avaliada a substituição de ácidos graxos saturados ou insaturados na configuração *cis* por ácidos graxos *trans*, em ambos os casos os AGT provocaram um aumento nos níveis de LDL-colesterol, uma diminuição em HDL-colesterol e conseqüente aumento na razão colesterol total/HDL-colesterol, um preditor do risco de doenças coronarianas. Além disso, observou-se aumento nos níveis de triglicerídeos e lipoproteína (a) e partículas mais densas de LDL-colesterol, os quais são também considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças coronarianas (Judd et al., 2002; Lichtenstein et al., 1999). Nos países nórdicos europeus em que o consumo de AGT é elevado observou-se uma maior taxa de mortalidade por doenças coronarianas, ao passo que o Japão e países do Mediterrâneo, que apresentam menor consumo de AGT, houve menor taxa de mortalidade por essas doenças (Kromhout et al., 1995). Um estudo populacional prospectivo com 667 homens revelou que um acréscimo de 2% no consumo total diário de AGT resultou em um aumento de 29% no risco de incidência de doenças coronarianas (Oomen et al., 2001). Em uma meta-análise de 8 ensaios clínicos, a substituição isoenergética de AGT por carboidratos e ácidos graxos insaturados diminuiu a razão colesterol total/HDL-colesterol em 0,044 unidades, efeito equivalente à redução de 2% do valor energético proveniente do consumo de gordura saturada (Mensink et al., 2003). Além de alterar os níveis sanguíneos das lipoproteínas, o consumo de AGT também pode provocar o aumento de triglicerídeos (Mozzaffarian e Clarke, 2009) e a diminuição do tamanho da partícula de LDL-colesterol, este um fator de risco independente de doenças coronarianas (Mauger et al., 2003).

Os efeitos do consumo a longo prazo de AGT sobre o ganho de peso e a adiposidade foram avaliados em estudos experimentais, nos quais observou-se que animais que consumiram dieta enriquecida em AGT obtiveram um ganho de peso de 7,2% em seis anos, enquanto o grupo que recebeu dieta isocalórica com ácidos graxos monoinsaturados apresentou um aumento de peso de 1,8% no mesmo período (Kavanagh et al., 2007).

A diferença dos efeitos de AGT de origem natural (carnes e lácteos de animais ruminantes) ou produzidos industrialmente (gordura *trans*) sobre a saúde vem sendo avaliada em diversos estudos observacionais. No Estudo das Enfermeiras Americanas (Nurses' Health Study), quando o consumo total de AGT foi fracionado em fontes industriais e naturais, só foi constatada uma associação positiva entre a fonte industrial de AGT com o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas (Willett et al., 2003). Devido aos baixos níveis de AGT nos produtos alimentícios de animais ruminantes (geralmente < 6% dos ácidos graxos totais), o consumo de AGT de fontes naturais foi baixo na maioria das populações estudadas (< 1% da energia proveniente de lipídios da dieta). Assim, essa fonte de AGT na dieta não parece ser o principal fator que contribui para o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas (Mozzaffarian, Aro e Willett, 2009).

A relação entre consumo de ácidos graxos e a fase gestacional está sendo feita em diversos estudos. Um estudo onde a análise do peso ao nascer foi correlacionada inversamente com a ingestão de isômeros *trans* sugeriu que os ácidos graxos *trans* podem ser transferidos ao feto através da placenta (Koletzko e Müller, 1990). Em um estudo com ratas grávidas, os isômeros *trans* foram incorporados à estrutura da placenta e passaram por essa barreira, pois foram detectadas altas concentrações de AGT no fígado e no tecido adiposo do feto (Larqué, Zamora e Gil, 2001).

Além disso, como os AGT monoinsaturados e poli-insaturados podem inibir as enzimas δ -6 e δ -5 dessaturase, dificultando o metabolismo dos ácidos graxos essenciais, este processo em humanos provoca um impacto na fase gestacional por alterar o desenvolvimento intra-uterino pela inibição da síntese dos ácidos araquidônico e docosa-hexaenóico (Decsi e Koletzko, 1995). Outros estudos mostraram que ácidos graxos *trans* diminuem os níveis desses ácidos graxos de cadeia muito longa que são importantes para a função motora durante o desenvolvimento da criança (Booyens e van der Merwe, 1992).

Estudos experimentais que tiveram como objetivo avaliar o impacto do consumo de ácidos graxos *trans* na dieta materna durante a gestação e a lactação demonstraram que, na vida adulta da prole, estes ácidos graxos podem causar a diminuição do imunoconteúdo do receptor de insulina hipotalâmico (Albuquerque et al., 2006); a diminuição do transportador de glicose GLUT-4 no tecido cardíaco e conseqüentemente prejuízos na sinalização periférica da insulina (Osso et al., 2008); e maior expressão das adipocinas pró-inflamatórias PAI-1 e TNF- α no tecido adiposo (Pisani et al., 2008). O aumento da expressão de PAI-1 e TNF- α no tecido adiposo contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como diabetes, hipertensão e síndrome metabólica (Pisani et al., 2008).

1.2.2 Mecanismos de Ação Potenciais

Os ácidos graxos *trans* parecem afetar o metabolismo lipídico por diversas vias. Os AGTs alteram a secreção, a composição lipídica e o tamanho das partículas de apolipoproteína B100 (apoB-100) produzidas pelos hepatócitos (Mittmesser e Carr, 2005). Em consonância com estudos em humanos, os ácidos graxos *trans* reduzem o catabolismo de apoB-100 das moléculas de LDL-colesterol e aumentam o catabolismo de

apolipoproteína A-I (apoA-I) (Matthan et al., 2004). Além disso, o consumo de ácidos graxos *trans* aumenta a atividade plasmática da proteína CETP (do inglês, *cholesteryl ester transfer protein*), a enzima responsável pela transferência de ésteres de colesterol da molécula de HDL-colesterol para as moléculas de LDL e VLDL-colesterol (Lagrost, 1992; van Tol et al., 1995). O aumento da atividade de CETP pode explicar a diminuição dos níveis de HDL-colesterol e o aumento dos níveis de LDL e VLDL-colesterol, uma vez que essas alterações foram observadas em estudos experimentais e observacionais.

Outra alteração metabólica causada pelo consumo de ácidos graxos *trans* ocorre no metabolismo de ácidos graxos em adipócitos, o que resulta na diminuição da captação de triglicerídeos e da esterificação de colesterol recém-sintetizados, além do aumento na produção de ácidos graxos livres (Matthan et al., 2001). A oferta de dieta contendo ácidos graxos *trans*, a ratos Wistar logo após o desmame, provocou uma diminuição na expressão de PPAR- γ e um aumento na expressão de resistina (Saravanan et al., 2005), ambos resultados já correlacionados com resistência à insulina (Jazet, Pijl e Meinders, 2003; Willson, Lambert e Kliewer, 2001).

Estudos recentes indicam que os ácidos graxos *trans* podem causar um efeito inibitório sobre a atividade das enzimas δ -6-dessaturase e/ou δ -5-dessaturase, que atuam na dessaturação de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) das famílias n-3 e n-6 (comumente expressos como ω -3 e ω -6), cujos produtos finais da biossíntese são o ácido docosahexaenoico (ADH) e ácido araquidônico (AA), respectivamente (Figura 2). Essas enzimas apresentam maior afinidade com os substratos mais insaturados, resultando em uma maior probabilidade da síntese dos AGPI-CL da família n-3 (Brenner e Pelufo, 1966). Estudos realizados com animais demonstraram que os ácidos graxos *trans* monoinsaturados presentes nas gorduras parcialmente hidrogenadas são mais eficientes em

inibir δ -5-dessaturase (Mahfouz, Johnson e Holman, 1980). Em recém-nascidos verificou-se que as enzimas δ -5- e δ -6-dessaturases estão ativas, e até mesmo os bebês prematuros são capazes de produzir mesmo que em quantidades insuficientes o AA e o ADH, sendo necessária a ingestão pelo leite materno (Carnielli et al., 1996; Innis, 2003). O ADH (22:6n-3) tem importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, sendo predominantemente encontrado na maioria das membranas celulares desses órgãos. O AA está fortemente relacionado com o desenvolvimento do cérebro e da retina durante o período gestacional e os primeiros anos de vida. Embora seja encontrado no cérebro em quantidades menores que o ADH, os fosfolipídios associados aos neurônios são altamente enriquecidos em AA, o que tem sugerido o seu envolvimento na transmissão sináptica (Youdim, Martin e Joseph, 2000). O ácido araquidônico é um dos precursores dos prostanóides das séries 1, 2 e 3 e dos leucotrienos das séries 4, 5 e 6, respectivamente (Figura 2). Entre os prostanóides, a maior afinidade do AA pela ciclo-oxigenase resulta em uma maior probabilidade de obtenção das prostaglandinas e tromboxanos da série 2, que participam de inúmeros processos inflamatórios no organismo. Contudo, os seus correspondentes da série n-3 possuem propriedades antiinflamatórias (Martin et al., 2006).

Estima-se que a razão n-6/n-3 na dieta das pessoas que viveram no período que antecedeu a industrialização estava em torno de 1:1 a 2:1, devido ao consumo abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha contendo ácidos graxos n-3. Com a industrialização, ocorreu um aumento progressivo dessa razão pela produção de óleos refinados oriundos de espécies oleaginosas com alto teor de AL associada a uma diminuição da ingestão de frutas e verduras, resultando em dietas com quantidades inadequadas de ácidos graxos n-3. Nas últimas décadas tem-se determinado em diversos países que a ingestão média de ácidos graxos resulta em relações n-6/n-3 que estão entre

10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1. A necessidade de diminuir a razão n-6/n-3 nas dietas modernas também tem sido sugerida pelos resultados de alguns estudos clínicos realizados na última década. Dentre esses destacam-se: a diminuição de 70% na taxa de mortalidade em pacientes com doença cardiovascular quando a razão AL/AAL na dieta foi de 4:1; e a redução nas inflamações decorrentes da artrite reumatóide, quando a razão n-6/n-3 da dieta esteve entre 3 a 4:1, condição que foi alcançada pela suplementação com ADH e AAL (James e Cleland, 1997; Lorgeril et al., 1994).

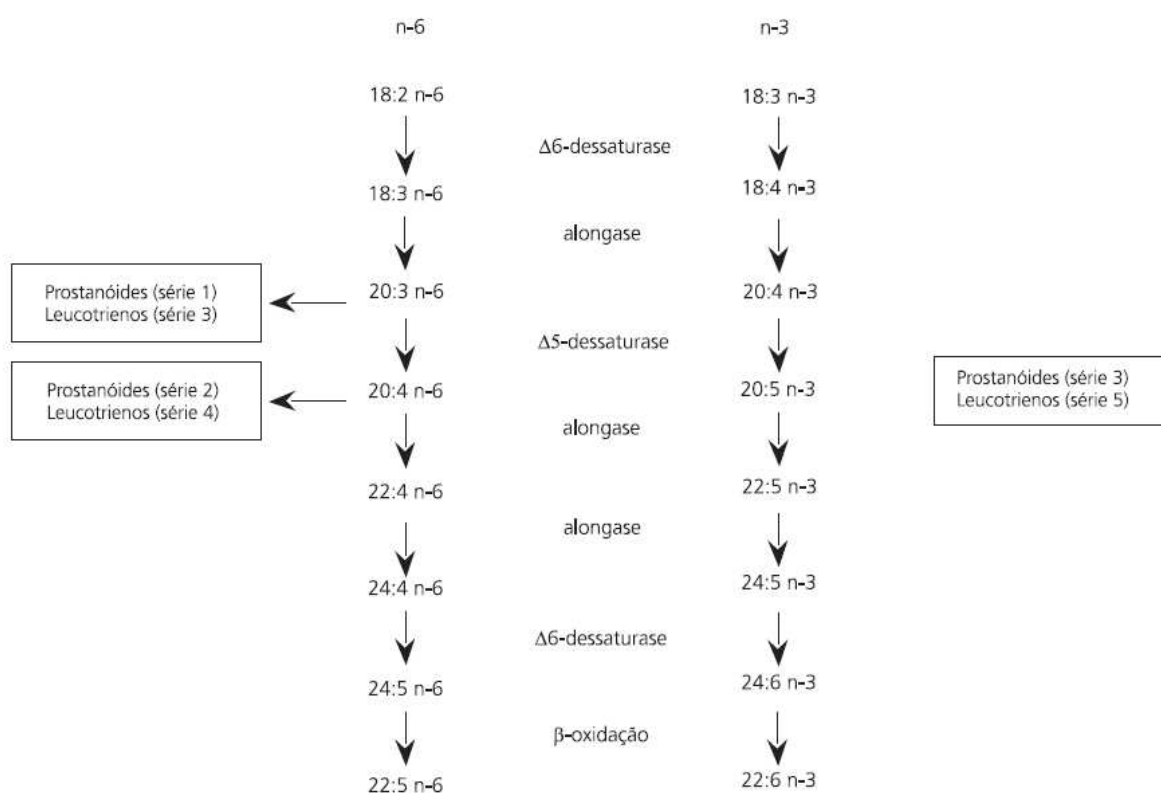


Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos das famílias n-6 (esquerda) e n-3 (direita) (Innis, 2003).

1.2.3 Alternativas para redução do consumo de gordura *trans*

Deve-se levar em consideração os riscos e benefícios à saúde para a determinação de um nível ótimo de consumo de um dado nutriente. Nos últimos anos tornou-se evidente

o risco potencial à saúde do consumo de gordura *trans* mesmo em baixas quantidades de ingestão. Esse risco foi observado pelos efeitos adversos nos níveis séricos de lipídios e de outros fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares que o seu consumo foi capaz de provocar. Mesmo a gordura *trans* originada da hidrogenação de óleos vegetais não possui nenhum benefício à saúde além de seu elevado valor calórico. Assim, torna-se recomendável o consumo mínimo de produtos industrializados e outras fontes de gordura *trans*, na tentativa de minimizar seus efeitos deletérios para a saúde (Mozzaffarian et al., 2006).

A ingestão diária de gordura *trans* pode ser diminuída pela seleção de alimentos livre dessa gordura observando as informações nutricionais presentes nos rótulos dos alimentos. No entanto, se a porção do alimento tiver valores inferiores a 200 mg de gordura *trans*, é permitido conter no rótulo a informação “zero *trans*” ou “não contém *trans*” na quantidade de alimento referida (RDC nº 360, de 23/12/2003 – ANVISA). Sendo assim, é importante verificar os ingredientes detalhados na embalagem, pois quando houver os termos “gordura hidrogenada” ou “gordura vegetal” há ácidos graxos *trans* na composição do produto.

Em uma conferência sobre gordura *trans* da *American Heart Association*, as alternativas para substituir a gordura vegetal hidrogenada incluem óleos naturais com baixos teores de ácido linolênico (óleo de milho e óleo de algodão); gorduras animais (manteiga); gordura interesterificada; gorduras que sofreram modificação do processo de hidrogenação (altas temperaturas, baixa pressão); mistura de gordura hidrogenada e óleos vegetais; e o uso de óleos tropicais (óleo de palma, óleo de coco) (Eckel et al., 2007). Esta

última alternativa vem sendo amplamente utilizada nas indústrias alimentícias brasileiras por apresentar menor custo e manter as características organolépticas da gordura *trans* nos produtos.

1.3 Óleo de Palma

Na tentativa de minimizar os efeitos deletérios dos AGT na alimentação, a indústria de alimentos está substituindo a gordura hidrogenada pelo óleo de palma, conhecido no Brasil como óleo de dendê.

O óleo de palma é extraído dos frutos da palmeira (*Elaeis guineensis*), que contém entre 45% e 55% de óleo. Uma vez que esse óleo não é submetido ao processo de hidrogenação ele não apresenta AGT e substitui com vantagens a gordura hidrogenada. Dois óleos distintos são obtidos, o óleo de palma que é extraído da polpa (mesocarpo) do fruto e o óleo de palmiste que é extraído da semente (amêndoa), este último com características similares ao óleo de coco. Ambos são utilizados na indústria alimentícia em produtos de confeitaria, sorvetes e como substituto da manteiga de cacau em chocolates (Edem, 2002). O óleo de palma contém uma proporção elevada de ácido palmítico (40 – 50%), além dos ácidos oléico e linoleico, o que confere uma concentração maior de ácidos graxos insaturados (aproximadamente 40%) do que o óleo de coco. Entretanto, o óleo de palma refinado é o mais utilizado pelas indústrias alimentícias, pois contém baixas concentrações de ácido linoleico, o que explica sua maior estabilidade em tratamentos térmicos como frituras (Cottrell, 1991).

Mesmo com o elevado teor de ácidos graxos saturados no óleo de palma, estudos recentes mostraram efeito benéfico do óleo de palma, comparativamente a outras fontes

lipídicas da dieta, como gordura *trans*, em relação ao perfil lipídico sanguíneo (Muller et al., 1998) e à diminuição de fenômenos relacionados à incidência de doenças coronarianas (Muller et al., 2001). No entanto, um estudo com voluntários adultos hiperlipidêmicos submetidos a quatro tipos de dieta diferindo apenas na fonte lipídica obteve resultados semelhantes no perfil lipídico após dieta contendo óleo de palma ou gordura *trans*, isto é, observou-se aumento nos níveis de colesterol total e LDL-colesterol (Veja-López et al., 2006). Desta forma, a substituição por óleo de palma pode não ser uma alternativa benéfica à saúde. Estudos experimentais revelaram que o consumo de óleo de palma durante a lactação provoca um aumento de peso e de tecido adiposo visceral (Silva et al., 2005). Estudos que avaliaram a substituição da gordura *trans* pelo óleo de palma revelaram mudanças no perfil lipídico, com diminuição dos níveis de LDL-colesterol e da razão LDL/HDL-colesterol e aumento da apolipoproteína AI, reduzindo assim as lipoproteínas e apolipoproteínas associadas ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sundram et al., 1992). No entanto, ainda não foi investigado o impacto dessa substituição no comportamento alimentar, na composição corporal e no desempenho cognitivo.

No SNC, animais adultos que receberam óleo de palma por um longo período de tempo tiveram um menor desempenho em tarefas de memória espacial, além de apresentarem alterações na fluidez da membrana sináptica (Suzuki et al., 1998). Há poucos estudos experimentais com ênfase no SNC sobre o efeito da composição lipídica da dieta, principalmente a qualidade da fonte lipídica.

1.4 Adenosina e Sistema Nervoso Central

A adenosina é uma purina ribonucleosídeo essencial para a atividade celular tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto nos órgãos periféricos (Benarroch, 2008; Cunha, 2001). A adenosina é considerada um neuromodulador endógeno, pois embora não possa ser armazenada em vesículas sinápticas como os neurotransmissores clássicos, ela influencia muitas funções no SNC tais como o controle da liberação de neurotransmissores e da excitabilidade neuronal (Fredholm et al., 2005). As duas fontes de adenosina extracelular são: do transporte do compartimento intracelular pelo transportador de nucleosídeos; e da conversão extracelular de adenosina trifosfato (ATP) pela ação das ectonucleotidases (Benarroch, 2008).

Foram clonados quatro receptores de adenosina, denominados de A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos os receptores estão acoplados à proteína G; os receptores A_1 e A_3 estão acoplados a uma proteína G inibitória (G_i/o), enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados à proteína G estimulatória (G_s). A sinalização intracelular desencadeada pela ligação de adenosina a esses receptores envolve canais iônicos como o de Ca^{2+} e o de K^+ e a ativação de proteínas envolvidas na via da MAPK (Burnstock, 2007). No Sistema Nervoso Central, os receptores A_1 e A_{2A} são os mais expressos no encéfalo (Figura 3). O receptor A_1 está amplamente localizado nas zonas ativas pré-sinápticas e nas densidades pós-sinápticas, sendo altamente expressos no neocórtex, hipocampo, tálamo, estriado e cerebelo. No estriado, este receptor inibe a adenilato ciclase, aumenta a condutância de K^+ e inibe os canais pré-sinápticos de Ca^{2+} , o que inibe a liberação de glutamato e as respostas pós-sinápticas mediadas pelo receptor de glutamato NMDA (Benarroch, 2008). Já o receptor A_{2A} é enriquecido no estriado e também está presente nas paredes das artérias, responsável

pelo efeito vasodilatador de adenosina no encéfalo. No estriado, os receptores A_{2A} pré-sinápticos antagonizam o efeito inibitório dos receptores A_1 na liberação de glutamato. Além disso, na densidade pós-sináptica, estimulam a adenilato ciclase e podem formar heterodímeros com os receptores dopaminérgicos do tipo D_2 (Benarroch, 2008; Cunha, 2001).

Estudos com antagonistas de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} sugeriram o envolvimento desses receptores no comportamento relacionado à ansiedade, no teste de labirinto em cruz elevado em roedores, cujo resultado foi dependente da dose administrada (Kulkarni, Singh e Bishnoi, 2007). Além disso, a atividade locomotora também é influenciada pelo consumo de cafeína, este efeito também sendo dose-dependente (El Yacoubi et al., 2000).

A influência da dieta no sistema adenosinérgico tem sido amplamente estudada com a cafeína, um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} . A cafeína é o psicoestimulante mais consumido no mundo, tendo como principais fonte alimentar o café, mas também pode ser encontrada no chá verde, no guaraná, no chimarrão, em refrigerantes à base de cola e em chocolates. O café pode fornecer de 40 a 180 mg de cafeína a cada 150 mL de bebida, dependendo do modo de preparo e do tipo de grão utilizado (Barone e Roberts, 1996).

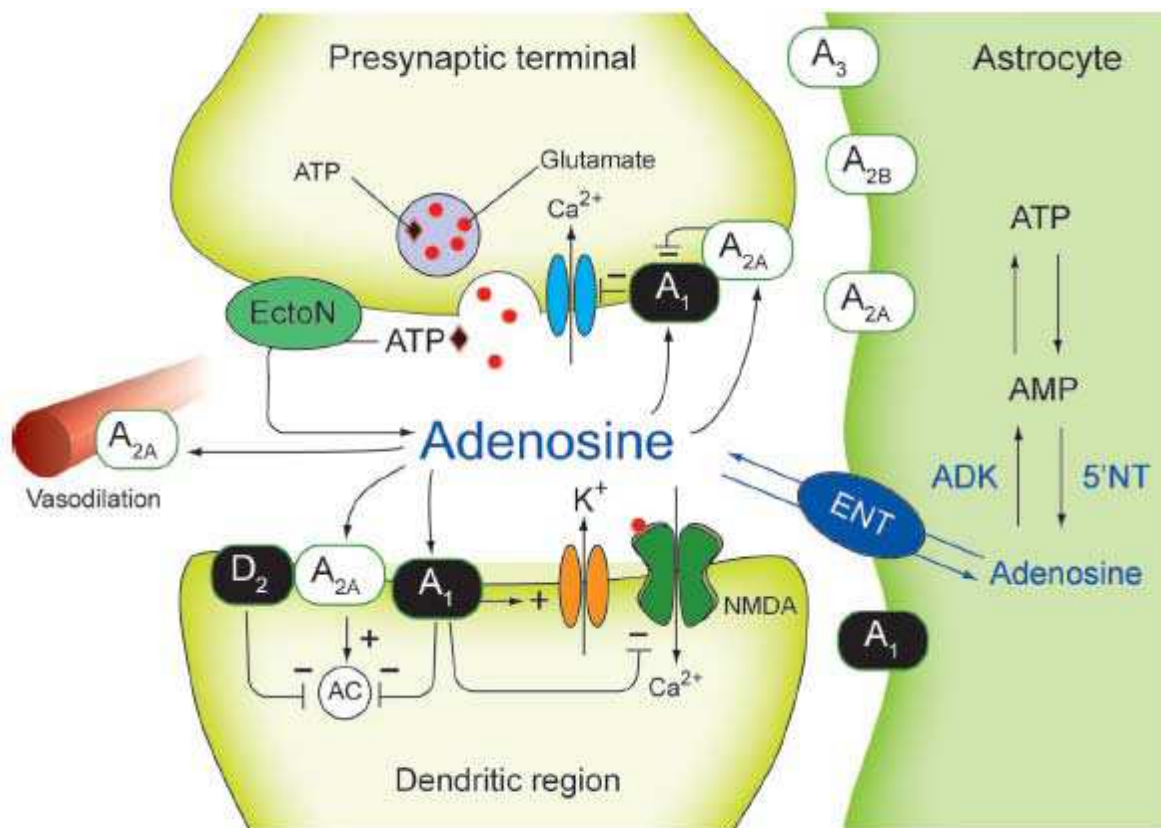


Figura 3. Representação de uma sinapse excitatória de neurônios do estriado, mostrando as principais características da sinalização de adenosina no SNC. 5'NT: 5' nucleotidase; AMP: adenosina monofosfato; AC: adenilato ciclase; ADK: adenosina cinase; ATP: adenosina trifosfato; EctoN: ectonucleotidasas; ENT: transportador de nucleosídeos; NMDA: N-metil-D-aspartato (Benarroch, 2008).

Já foi relatado o efeito anorexígeno da cafeína em tratamento agudo, principalmente pelo efeito de redução da ingestão calórica (Tremblay et al., 1988). Após 40 dias de consumo de cafeína na água de beber em ratos adultos, houve uma diminuição no consumo de alimentos hiperpalatáveis em testes de preferência alimentar, sendo esse efeito mais acentuado nas fêmeas. Entretanto, não foi observada mudança no peso corporal dos animais (Pettenuzzo et al., 2008). Em modelos animais de obesidade, o consumo de erva-mate, que também contém cafeína, levou à redução do peso corporal e ao aumento da expressão de proteínas desacopladoras envolvidas no processo de termogênese (Pang, Choi e Park, 2008). Em um estudo randomizado realizado com mulheres em sobrepeso na pré-

menopausa, o tratamento com suplemento contendo baixas doses de cafeína e efedrina durante nove meses mostrou-se seguro e efetivo na redução de peso corporal e no percentual de gordura, bem como na maior sensibilidade à insulina e no perfil lipídico (redução de colesterol total, de LDL-colesterol e da razão colesterol total/HDL-colesterol) (Hackmann et al, 2006).

Os receptores de adenosina também são expressos em regiões cerebrais responsáveis pela regulação do apetite, como o hipotálamo, cuja inibição de receptores A_{2A} reduziu o apetite e a ingestão calórica (El Yacoubi et al., 2003; Nagel et al., 2003). O receptor A_1 parece não estar envolvido na preferência pelo consumo de bebidas cafeinadas, mas tem um importante papel na homeostase dos fluidos corporais, uma vez que é necessária a inibição desses receptores renais para a resposta diurética das metilxantinas, como a cafeína (Rieg, Schnermann e Vallon, 2007). Além disso, o receptor A_1 participa ativamente do mecanismo celular responsável pela resistência à insulina (Dong, Ginsberg e Erlanger, 2001).

Os estudos envolvendo modificações no sistema adenosinérgico foram realizados em modelos animais de patologias associadas às dietas ricas em lipídios (Dhalla et al., 2007; Duarte et al., 2006), mas a relação direta entre o efeito da composição da dieta sobre os receptores de adenosina ainda precisa ser investigada. Dada a importância da adenosina como um neuromodulador no SNC, torna-se imperativo o conhecimento das modificações que o sistema adenosinérgico possa sofrer pela ingestão por um longo período de uma dieta rica em ácidos graxos *trans* e, a proposta de sua substituição, o óleo de palma.

1.5 Objetivos

Considerando que o óleo de palma vem sendo utilizado como uma substituição da gordura *trans* nos alimentos e os seus efeitos sobre a saúde ainda são pouco estudados, este projeto tem o objetivo principal comparar as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos Wistar adultos que receberam dieta contendo óleo de soja, óleo de palma ou gordura *trans*.

Os objetivos específicos do estudo utilizando ratos Wistar machos submetidos desde o período gestacional até os sessenta dias de idade aos três tipos de dieta são:

- avaliar o perfil lipídico dos filhotes machos na idade adulta;
- acompanhar o crescimento dos filhotes machos desde o nascimento até a idade adulta;
- avaliar as alterações comportamentais em parâmetros de ansiedade e de locomoção;
- comparar com a utilização de tarefas com componente aversivo e não aversivo o aprendizado e memória desses animais;
- detectar possíveis alterações no imunocontéudo do receptor de adenosina mais expresso no SNC – o receptor A_1 - no hipotálamo, hipocampo e córtex desses animais.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito a ser submetido à revista The Journal of Nutritional Biochemistry.

INTAKE OF *TRANS* FAT DIET OR PALM OIL DIET SINCE EARLY PREGNANCY
MAY AFFECT BEHAVIOR AND ADENOSINE SIGNALING IN ADULT MALE
RATS.

Sabrina Mioranza, Marcelo S. Costa, Paulo H. Botton, Vanessa L. Matte, Diogo O. Souza,
Marcos L. S. Perry, Lisiane O. Porciúncula*.

Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute,
Department of Biochemistry, Graduation Program in Biological Sciences – Biochemistry,
Laboratory of Studies on the Purinergic System, Porto Alegre/RS, Brazil 90035-003.

*Correspondence should be addressed to Lisiane O. Porciúncula

Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute,
Department of Biochemistry, Laboratory of Studies on the Purinergic System,
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, Bairro Santana, Porto Alegre/RS
Brazil 90035-003.

Phone.: + 55 51 3308 5556

Fax.: + 55 51 3308 5540

e-mail.: loporciuncula@yahoo.com

Abstract

Hydrogenated fat, which contains *trans* fatty acid (TFA), has emerged as butter substitute. Epidemiology studies showed positive correlation between TFA and risk for cardiovascular diseases. Palm oil is used as an alternative to hydrogenated fat. The effect of TFA in cardiovascular system is well known, but investigation through the impact of dietary fat source in central nervous system is still lacking. Adenosine is a neuromodulator which via its metabotropic receptors A_1 and A_{2A} participates in the neurotransmission of some neurotransmitters such as dopamine, noradrenaline and glutamate. The aim of the present study was to investigate whether intake of different diets from early pregnancy until adult life of offspring could promote behavioral and neurochemical alterations. Wistar female rats weighing 150 g were divided into three groups and received isocaloric/normolipidic diets with soybean oil (SO), palm oil (PO) or hydrogenated-*trans* fat (TF) as a fat source, during pregnancy and lactation. After weaning, male pups continued receiving the same diet up to 60 days old. Elevated plus-maze (EPM) was chosen to evaluate anxiety-like behavior and open field task (OF) to verify locomotor activity. For learning and memory analysis, we chose a non-aversive (Object Recognition Task, OR) and an aversive task (Inhibitory Avoidance, IA). The immunocontent of adenosine receptors in cortex, hippocampus and hypothalamus were studied by Western Blot. Results were presented as mean \pm standard error. In EPM, rats receiving TF diet spent more time and had more entries in the open arms, comparing to SO and PO groups. In OF, number of crossing was significantly lower both in TF and PO groups, comparing to SO group. None of the diet groups recognize the novel object in 90-minutes test session. Step-down latency in IA from PO group in 90-minutes test session did not differ from training; TF group learned but at lower performance comparing to SO group. Memory decline was found only in PO group in 24-hours test session. Neurochemical alterations were found in adenosine receptor A_1 in hippocampus of animals fed TF diet, with a significant 39% decreasing in the immunocontent comparing with SO diet ($P=0,0335$); and in hypothalamus from PO group, with a significant 15% increasing in the immunocontent ($P=0,0031$). The offspring exposed to TF diet were less anxious, presented lower locomotor activity in adulthood, whereas PO group had similar alterations, except that of anxiety. The offspring exposed to TF diet had deficit in short-term memory, whereas PO diet caused damage also in long-term memory. We also found alterations of adenosine receptor immunocontent in different brain areas that were dependent of the type of fat source. Replacing hydrogenated fat to palm oil has no benefits in cognitive performance.

1. Introduction

Lifestyle changes have led to an increase in the intake of processed food, the main source of hydrogenated fat. Hydrogenation is based on the reaction of unsaturated fatty acids of either vegetable or marine oil in the presence of a catalyst, in general nickel. The objective is to increase the oxidative stability of oils by reducing the concentration of more unsaturated fatty acids and changing their physical properties, thus extending their application [1]. As a consequence, different proportions of *cis* unsaturated fatty acids are transformed to (a) saturated fatty acids, (b) positional isomers with altered locations of double bonds within the molecules and (c) geometric isomers, i.e. *trans* fatty acids (TFA). The amount of *trans* isomeric fatty acids produced depends on both the chemical composition of the vegetable or fish oil hydrogenated and on the technical conditions (heat, pressure, catalyst) of the hydrogenation [2].

In recent years, the concern about the intake of foods containing high TFA amounts has grown mainly due to the hazardous effects of these lipids on plasma lipoproteins that increase low density lipoprotein (LDL-c) and lipoprotein a(Lp[a]) levels and decrease the levels of high density lipoprotein (HDL-c). This condition contributes to the increase of the LDL-c/HDL-c ratio, which is considered an important indicator of the risk for the development of cardiovascular diseases [3]. It has been reported that *trans* fatty acid intake is associated with an increased risk of developing type 2 diabetes [4], a metabolic disease that is currently considered a public health problem due to nutritional transition and the high incidence of non-communicable chronic diseases.

The use of palm oil by the food industry has increased since the mandate by the Food and Drug Administration to include *trans* fatty acids on the Nutrition Facts panel of all

packaged food and concerns about adverse effects of hydrogenated fat [5]. Food manufacturers favor the palm oil over other vegetable oils because of its higher melting point (34.2 °C) and resistance to oxidative changes resulting from its higher content of saturated fatty acids [6]. One study has shown that dietary red palm oil (RPO) supplementation (7g RPO/kg) in Wistar rats for six weeks improves functional recovery in hearts subjected to ischaemia/reperfusion-induced injury with involvement of PI3-Kinase pathway [7]. Interestingly, monoaminergic neurotransmission and behavior in rats were affected by a fish/palm oil enriched diet [8]. Another study revealed that mice fed during one year with sardine oil diet presented better performance in maze-learning ability than mice fed with 5% palm oil [9].

Dietary fat has shown to play an important role in responses to stress [10, 11, 12] and food preference [13], as well as behavior [14]. A great number of studies in this issue are related to high-fat diet protocols, but it is essential to evaluate the quality of the fat source. Besides, studies consider mostly the consequences of diet intake in peripheric and local systems. Some studies have already revealed changes in central signalling of insulin in adulthood of rats fed *trans* fat diet during development [15].

The hypothalamus is an integral part of the limbic system and contains several small nuclei that are involved in a variety of functions, including feeding and drinking, sexual behavior and reproduction, and temperature regulation. Evidence suggests that extracellular ATP and its metabolic products are involved in regulating these hypothalamic functions by activating adenosine and/or purinergic receptors [16].

Adenosine is a ubiquitous chemical messenger that modulates cellular activity in both Central Nervous System (CNS) and peripheral organs [17, 18]. Four different adenosine-activated receptors have been cloned, termed A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R and A₃R. These receptors signal mainly through adenylyl cyclase; A₁R and A₃R are negatively coupled to adenylyl cyclase through pertussis toxin-sensitive Gi/o, whereas A_{2A}R and A_{2B}R are positively coupled through cholera toxin-sensitive Gs. The intracellular pathways triggered by these receptors include Ca_v channels and inwardly rectifying K⁺ (K_{ir}) channels, and activation of proteins involved in MAP kinase signaling [19]. In the hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus supplies a clock for day–night information, and neurons in this nucleus express A₁Rs, which contribute to control of the circadian clock to light [16]. As a neuromodulator, adenosine participates in the neurotransmission of some neurotransmitters such as dopamine, noradrenaline and glutamate. The adenosine A₁ receptors are predominantly located in the presynaptic active zones and in postsynaptic densities and are highly expressed in the neocortex, hippocampus, thalamus, striatum, cerebellum and spinal cord. The A_{2A} receptors are mainly expressed in the striatum, and are also present in blood vessels to mediate the vasodilator effect of adenosine in the brain and periphery [17]. There is ample experimental evidence that adenosine is involved in anxiety behavior in rodents; both anxiogenic and anxiolytic effect depends on which receptor is activated or antagonized [20, 21, 22, 23].

Considering the importance of dietary fat intake on central signaling, the role of neuromodulation may be an essential pathway to understand the mechanism on which fat profile modify behavior and central signaling. We aimed to study whether intake of different diets during development of male rats could promote behavior and neurochemical

changes in adulthood. The specific objectives include analysis of anxiety behavior and locomotor activity by the elevated plus maze and open field tasks, respectively; the impact of different diets on learning and memory process by a non-aversive task (object recognition) and an aversive task (inhibitory avoidance); the consequences in density of A₁ receptors in brain areas such as hippocampus, hypothalamus and cortex in adult male rats submitted to diets differing on the fat source during development up to adulthood.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Female Wistar rats with 60-day-old were obtained from the Central Animal House of our Department. They were maintained in standard cages under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.), at a room temperature of 22±2 °C. All experimental procedures were performed according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals in compliance with Brazilian Society for Neuroscience and Behaviour (SBNeC) recommendations for animal care.

2.2 – Diet composition

All diets were prepared according to recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN) and were normocaloric and normolipidic. In palm oil group (PO) and *trans* fat group (TF), 2% soybean oil were added to achieve AIN recommendations for essential fatty acid content. The macronutrient composition of all diets was 23% protein, 67% carbohydrates (75% of which was corn starch), and 10% fat. The diets were prepared

once a week in our laboratory and stored at 4°C to avoid rancidity. Food was freshly dispensed every 2–3 d and remaining and spilled foods were removed.

2.3 – Diet administration

Female rats were divided into three groups and received normocaloric and normolipidic diet, differing only the fat source: soybean oil group (SO, control); palm oil group (PO); and hydrogenated/*trans* fat group (TF). After 2 weeks of adaptation period, one 90-day-old male rat was kept on each cage for 5 days to mate. Pregnant rats were housed in individual cages, continuing the diet throughout pregnancy and lactation. After birth, pups from the same diet group were adjusted to eight per dam. After weaning postnatal day 21 (PN 21), male pups receiving the same diet were grouped (five per cage) and maintained up to 60 day old, with free access to water. Body mass of the pups was recorded on PN 1, 5, 15, 21, 30, 45 and 60.

2.4 – Plasma lipid determinations and liver and adipose tissue weight

Twenty-four hours after the end of behavioral tests, the rats were fasted for 12 hours and were killed by cervical displacement. Blood samples were collected and plasma was obtained at 5.000 x g for 10 minutes at 4° C. Total cholesterol, HDL-cholesterol and triacylglycerols were determined using enzymatic commercial kits specific for each test (Labtest/Brazil), according to the manufacturer's instructions. The non-HDL cholesterol was calculated by subtracting HDL-cholesterol from total cholesterol. After blood collection, the chest and abdomen were opened to collect liver and intrabdominal adipose tissue, which were immediately weighed for further analysis and discarded.

2.5 – Open field

The open field task was performed according to previously reported [24]. The apparatus consisted of a painted wood small chamber with the following dimensions: 50 × 50 cm (length × width) with a 5×3 square grid clearly drawn on the surface. The platform was placed on the floor of a quiet, slightly dimmed room and the test rat placed in the center of the grid. An observer blind to treatment measured the number of line crossings and the number of rearing (when the rat was supported by only two paws) during five minutes. The apparatus was cleaned with 70 % ethanol solution between trials.

2.6 – Elevated Plus-Maze

The plus maze apparatus which is a pharmacologically validated anxiety measure in rodents [25] consisted of four arms, each 40 cm long and 10 cm wide, arranged in a plus/cross design and elevated 51 cm above the floor. Two arms were open and two arms sheltered (closed arms) by black aluminum walls, 40 cm high. The floor of the apparatus was covered by a black rubber mat. All sessions were conducted under dim red light. Each rat was placed in the central square facing an open arm. Number of entries and time spent in each arm (when all four paws had entered the arm) were recorded for 5 min. Number of rearing (when the rat was supported by only two paws) were considered as an exploratory behavior. The apparatus was cleaned with 70 % ethanol solution between trials.

2.7 – The object recognition task

The object recognition task was performed according to previously reported [26] and to the guidelines previously recommended [27]. The apparatus consisted of a painted wood small chamber with the following dimensions: 50 × 50 cm (length × width). Rats had

been acclimated in the apparatus during ten minutes twenty-four hours before training session (T1). The training session (T1) consisted of placing the rat in the apparatus containing two similar objects and allowed it to explore for 5 minutes. The objects were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the wall. Each rat was always placed in the apparatus facing the wall. Test session was performed 90 minutes after T1 (namely T2), or 24 hours after T1 (namely T3). In both cases, dissimilar objects were present, the familiar (one of the objects used in T1) and a novel one. Both objects presented similar textures, colors and sizes, but different shapes in T2 and T3 sessions. The objects and the apparatus were cleaned with 70 % ethanol solution between trials. Exploration was defined as directing the nose to the object at a distance of no more than 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. Sitting or leaning on the object without focused was not considered as exploratory behavior. Discrimination ratio for each mouse was expressed by $TN / (TN + TF)$ ratio [TF = time spent exploring familiar object; TN = time spent exploring the novel object]. Time spent in the familiar object and total time exploration was also used for statistical analysis.

2.8 – Inhibitory avoidance task

The inhibitory avoidance task was performed according to previously reported [28] and was assessed in an apparatus consisted of an acrylic box (50 × 25 × 25 cm) whose floor contains parallel caliber stainless-steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. The box contained a high platform, without stainless-steel bars, where the rat was placed. In the training session, the latency to step-down on the floor with the four paws was measured with an automatic device; immediately after stepping-down the rat received a 0.5 mA, 3 s footshock. In the test sessions, carried out 90 minutes or 24 hours after training, time to

step-down was recorded, with no footshock afterwards. The stepdown latency (180 s ceiling) was chosen as a measure of retention.

2.9 - SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide*) immunoblotting

Twenty-four hours after behavioral tests, the rats were killed by cervical displacement; hippocampus, cortex and hypothalamus were dissected out and immediately homogenized in 5 % SDS with a protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo/Brazil) and frozen at -70° C. After defrost, the protein content was determined by Bicinchoninic acid assay using bovine serum albumin (BSA) as standard (Pierce, São Paulo/Brazil). Sample extracts were diluted to a final protein concentration of $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in SDS-PAGE buffer. Aliquots corresponding to 40 micrograms of hippocampus and hypothalamus samples and 20 micrograms of cortex samples and the prestained molecular weight standard (Bio-Rad, Porto Alegre/Brazil) were separated by SDS-PAGE (12 % running gel with a 4 % concentrating gel) and electro-transferred to nitrocellulose membranes ($0.45\ \mu\text{m}$, from Amersham). After blocking with Tris-buffered saline 0.1 % Tween-20 (TBS-T) containing 5% milk solution for one hour, the membranes were incubated for 24 hours at 4° C with adenosine A_1 receptor anti-rabbit antibody (1:1000; Affinity Bioreagents, U.S.A). The membranes were then washed with T-TBS three times for 15 minutes each and incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody for 2 h at room temperature and developed with chemiluminescence ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). Membranes were re-probed for β -tubulin immunoreactivity. Briefly, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with a 0.1 M glycine buffer (pH 2.0), then blocked as

previously described before incubation with an anti- β -tubulin antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Brazil). The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody as described above. The autoradiographic films were scanned and densitometric analyses were performed using public domain NIH Image Program (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). The data used in statistical analysis were obtained from adenosine A₁ receptor density/ β -tubulin density ratio.

2.10 - *Statistical analysis*

For inhibitory avoidance task differences within groups were analyzed by Wilcoxon paired t-test. Differences between groups were analyzed by Mann Whitney test, which is a non-parametric statistic analysis. The other data were performed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. The statistical significance was considered for $P < 0.05$.

2. Results

2.1. The influence of dietary fat intake in body mass and visceral adipose tissue

During the whole feeding period there was differences in the body mass gain between diets. The pups fed PO diet seemed to gain less weight comparing to the other diets (Fig 1a). However, we found a significant increase in body mass in PND 30, in the first week after weaning. After that, the body mass of rats fed PO diet was similar to SO diet in adulthood (Fig 1b).

We also analysed liver weight and the proportion of body mass contributed to fat in adult male rats submitted to different diets since gestational period (Table 1). Rats fed TF diet had lower liver weight comparing to the other diets. Male rats receiving TF diet since intrauterine growth presented the lowest percentage of body mass contributed to epididymal and intrabdominal adipose tissue. Conversely, PO group had the highest body fat content in all visceral compartments, comparing to SO and TF groups.

2.2. Modifications of lipid profile in plasma of adult male rats fed different diets

Table 2 represents lipid profile in plasma of rats submitted to diets isocaloric and normolipidic, differing only on the fat source since gestational period up to adulthood. There were no differences between groups on total cholesterol, non-HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides levels in fasting plasma. However, levels of HDL-cholesterol were diminished in rats fed TF diet compared to rats fed with SO diet.

2.3. Dietary fat source alters locomotor activity in the open field task

In the open field test, number of crossings were significantly lower both in TF and PO groups, comparing to SO group (Fig. 2a), which implies locomotor activity diminished by different fat sources. Additionally, PO group showed number of rearings significantly lower than SO and TF groups (Fig. 2b), suggesting a decrease in the exploratory activity.

2.4. Behavioral changes in elevated plus-maze of adult rats fed different dietary fat sources

The effects of dietary fat intake were also evaluated in the elevated plus-maze. Adult male rats fed TF diet spent more time in the open arms, comparing to SO and PO

groups (Fig. 3a). In addition, TF group had a lower number of entries in closed arms (Fig. 3b).

2.5. Performance of adult rats fed SO, PO or TF diet in the object recognition task

Adult male rats fed SO, PO or TF diet from intra-uterine growth up to 60 days-old were submitted to object recognition task, a non-aversive task which evaluates short- and long-term memory (90 minutes and 24 hours after training, respectively). None of the groups of diet recognize the novel object in 90-min test session (Fig 4). Furthermore, the best object recognition index in all groups was found 24 hours after the training session, which indicates that they could differ the familiar object from the novel one.

2.6. Memory decline in inhibitory avoidance

We also verify memory assignment using an aversive and prototypical task, the inhibitory avoidance (Fig. 5). The group receiving SO diet has reached the maximum latency to step-down in both test sessions, showing that this diet profile did not influence learning and memory process. However, adult rats fed PO diet since intrauterine growth showed memory decline in adulthood both in short- and long-term memory. Latency to step-down in 90-minutes test session did not differ from the latency in the training session, which indicates that PO group did not learn the task. The latency in 24-hours test session is significantly different from training session, but they had a lower performance in the task when comparing to the other groups. The group fed TF diet had higher latencies in both tasks comparing to training session, but test session 90 minutes after training presented lower performance comparing to SO group.

2.7. A₁ adenosine receptor immucontent is influenced by dietary fat source in different brain areas

Since adenosine play an important role as a neuromodulator in many systems of neurotransmission, we chose to study the A₁ adenosine receptor, which is widely expressed in CNS. Adult male rats fed TF diet showed 27.2 % and 30 % reduction in hippocampal A₁ density compared to SO and PO diets, respectively (Fig 6). Conversely, PO diet provoked an increase of 15 % and 26 % in hypothalamic A₁ density comparing to SO and TF diet, respectively (Fig 6). No differences were found in adenosine A₁ receptor immunocontent in the cortex compared to all diet groups.

3. Discussion

The findings of this study have shown that dietary fat composition affects anxiety behavior, locomotor activity and some aspects of learning and memory. Besides, A₁ adenosine receptor density was modify in some brain areas, and such effects may be related to dietary intake since intrauterine growth up to adulthood.

Control of body weight during growth and development is essential, as it was already known that low birth weight may lead to several health disturbance such as diabetes [29, 30], hypertension [31] and obesity [32]. Here we found that animals receiving PO diet had lower birth weight compared to SO group. Animals receiving a diet with 5% PO since lactation up to 45 days old had higher gain weight and central adiposity than those receiving diet with 6% TF, with soybean oil added to accomplish essential fatty acid intake in both diets [33]. Our results are in line with it, since animals fed PO diet had increased the

percentage of body weight from white adipose tissue. Another study has shown that comparing different dietary fat source given during lactation and until 45 days of life (soybean oil, canola oil, palm oil or hydrogenated fat), the animals fed palm oil or hydrogenated fat presented higher body weight and lipid content in epididymal adipose tissue [34]. However, this effect was not observed in animals receiving TFA in adult life [35], suggesting that the response to dietary fat on body weight and adiposity is age-related.

Several studies have verified that consuming high amounts of TFAs increases blood cholesterol, LDL-cholesterol and triacylglycerols and decreases blood high-density lipoprotein cholesterol, increasing the risk of metabolic syndrome [36, 37]. Male pups submitted to TF diet, containing 7% hydrogenated fat and 1% soybean oil, during intrauterine growth and lactation had higher blood cholesterol and triacylglycerols and lower HDL-cholesterol levels at weaning comparing with 8% soybean oil control diet. Consequently, the cholesterol/HDL-cholesterol ratio was 2.5 units higher in TF group comparing with control group [38]. We found similar results, except that no significant difference was found on cholesterol and triacylglycerol, the latter showed a tendency to be higher in TF group. Besides, a long-term high lard diet, rich in saturated fatty acid, increased offspring serum cholesterol and LDL-cholesterol levels and affected the fatty acid composition of brain in adult male rats [39]. Although palm oil is another fat source of saturated fatty acids, which has been well established to modify lipid metabolism [40], we could not find any alterations in lipid profile in adult male rats fed PO since gestational period.

The open field test is widely used to study the reaction to novelty and it also provides some insight for the state of anxiety in rodents. Given that reaction to novelty is

mostly characterized by increased aspects of motor and exploratory activity such as moving and rearing behavior [40, 41], our findings denote an impaired, to some extent, reaction to novelty for the PO and TF groups, as indicated by the reduced number of crossing lines of these animals. The animals fed PO diet also showed reducing in rearing, another parameter indicating less exploratory activity in this group. According to Wainwright et al. (1994), animals receiving high saturated fat diet during development had shown lower locomotor activity in open field when they reached adulthood [42]. In addition, high fat intake alters locomotor activity, and this may be related to striatal adenosine receptor A_{2A} [43]. Even if we did not study high fat intake since development, this shows evidence that dietary fat may affect locomotion in animal models.

The elevated plus maze (EPM) is a test of anxiety-like behavior utilizing rodents' aversion for unprotected areas: a high preference for the open arms (associated with risk) of the maze over the closed arms (sheltered) is interpreted as a low level of anxiety-behavior, that is the risk taking is inversely associated with anxiety-like behavior [13]. Here we showed that adult male rats fed *trans* fat diet spent more time in the open arms, suggesting less anxiety in these animals, comparing to the other groups. It has also been found a decrease in anxiety response in male adult rats on a high-fat diet for seven days [44]. An adverse early environment induced by maternal separation during lactation caused anxiety- and depression-like behaviours at weaning in male pups, which was normalized by provision of high-fat diet at weaning [45]. Considering this, after early life stress such as maternal separation, high fat intake could minimize the anxiety behavior of the animals. However, other authors have found anxiogenic effect in diet-induced obese rats [46], which

emphasizes the important of the fat source used in this diet, since we found different behavior in EPM of rats fed PO or TF diet.

The novel object recognition task is based on the observation that rats prefer to explore novel objects relative to familiar ones. Following a training trial in which two similar objects are presented, a test trial in which one of the previously presented object and a novel object is provided. It is assumed that animals form a memory of the familiar object, and therefore spend more time exploring the novel object than the familiar object during the test trial [26, 27]. Our results showed impairment in learning and memory in all groups, but we found some differences between short and long-term memory. None of the rats presented higher object recognition index in all groups 90 minutes after the training session, which implies that the short-term memory may be impaired. However, the long-term memory was not affected by SO or TF diets, as the object recognition index in this test session was higher than in the training session; rats submitted to PO diet did not improve their performance even 24 hours after training session. Memory for a novel object was examined in young adult male rats fed a standard chow and either a 32% sucrose solution or high-fat with hydrogenated vegetable fat (trans fat group). The animals receiving sucrose solution spent less time in the novel object in a 60-minutes test session, whereas no difference was found in trans-fat group, comparing with the group fed standard chow [47].

Learning and memory process was also evaluated by inhibitory avoidance task, an aversive task widely used to compare the latency to step-down the platform in the training and test sessions. Here we chose 90 minutes after training to analyse short-term memory and 24 hours after training for long-term memory. More time spent in the platform in the test session means the animal remembered the shock taken in the training session when it

has stepped down the platform. Soybean oil did not interfere in learning and memory process in both test sessions, as their latencies reached the ceiling of 180 s. On the other hand, the latencies of the rats fed PO diet in 90-minutes test session did not differ from the training session, showing no learning in the task. As observed in the object recognition task, this group of diet presented an impairment of the short-term memory. Besides, TF group had significant difference in latency in 24-hours test session, but had lower performance when comparing its latency with that of SO group. Moreover, only rats submitted to PO diet has had an impairment of the long-term memory, in 24 hours test session; they had learned the task, but in a less extension than in SO group. Rats fed TF did not show any memory impairment in 24-hours test session. In animal studies, rats fed a high fat diet showed widespread cognitive deficit on several tasks related to learning and memory [48, 49, 50, 51, 52]. Spatial learning in Morris Water Maze was assessed in male and female mice at 6, 16 and 32 weeks of age receiving trans-fat diet (28% fat) and monosodium glutamate additioned in drinking water since the beginning of the experiments. This combination lead to increased central adiposity and dyslipidemia, together with impaired cognitive performance in the water maze challenge [53].

Moreover, Western blot analysis of adenosine A₁ receptor from specific brain areas of rats receiving different diets since development has shown variances between fat diet intake and immunocontent of this adenosine receptor. Rats from TF group had a diminished number of adenosine A₁ receptors in hippocampus in adult life, comparing to SO and PO groups. Additionally, TF group also presented an anxiolytic-like effect in EPM, as the time spent in open arms was higher then the other groups. This is in accordance to previous studies [54], on which the anxiolytic-like effect, tested on EPM and ligh/dark tasks, of the

selective adenosine A₁ receptor agonist 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine (CCPA) in CD1 mice was mediated by centrally located adenosine A₁ receptors. Previous studies have also found a reduction in hippocampal adenosine A₁ receptor immunoreactivity after injuries, as in streptozotocin-induced diabetic rats [55] and in kindled rats [56]. It seems that reducing adenosine A₁ receptors may play a role in neuroprotection process. This might explain why we did not find any impairment in long-term memory in rats fed TF diet both in an aversive and non-aversive memory task (inhibitory avoidance and object recognition tasks, respectively). However, we could not apply the same to PO group, because no difference was found in hippocampal adenosine A₁ receptor density comparing to SO group. Conversely, in the hypothalamus, we found increasing in adenosine A₁ receptor immunoccontent in rats fed PO diet, comparing to SO and TF diets.

Conclusions

The current study revealed that dietary fat intake since intrauterine growth influence behavioral and neurochemical modifications later in life. Once the diets were isocaloric ando normolipidic, the type of dietary fat source, especially considering its fatty acid composition, may play an important role in anxiety behavior, locomotor activity and learning and memory process. More research is needed to evaluate if central adenosine receptor may participate in modulating this alterations. Although palm oil replacement may present positive effects on serum lipid profile comparing with hydrogenated/trans fat, we revealed some memory impairment and behavior alterations. In our diet protocol, palm oil intake since gestational period promoted cognitive decline in learning and memory tasks, along with locomotor activity alterations in adult life of the offspring. In addition, animals receiving palm oil diet had increased adenosine receptor A₁ density in hypothalamus, which

implies more research through the impact of this replacement in adenosine central signaling. Furthermore, our results revealed anxiolytic behavior in adult male rats fed *trans* fat diet since intrauterine growth, and also lower locomotor and exploratory activity. Besides, short-term memory was impaired in learning and memory tasks; we found a decrease in adenosine receptor A₁ density in hippocampus, which emphasizes the involvement of dietary fat intake on adenosine central signaling. Altogether, the replacement of palm oil in food has no benefits in learning and memory process and in locomotor activity. More research is needed to evaluate the impact of dietary fat in central nervous system, especially in adenosine signaling.

Acknowledgment

This research was supported by CAPES, FAPERGS (PROADE III), CNPq (Proc. N8 472832/2007-7, Lisiane O. Porciúncula), Brazilian Neuroscience Network (IBNnet). Paulo H. Botton and Vanessa L. Matte are recipients from FAPERGS fellowship.

References

- [1] Martin CA, Milinsk MC, Visentainer JV, Matsushita M, Souza NE. Trans fatty acid-forming processes in foods: a review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2007;79(2):343-350.
- [2] Koletzko B, Decsi, T. Metabolic aspects of trans fatty acids. *Clinical Nutrition* 1997;16:229-237.
- [3] Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *New England J Med* 1999;340:1994-1998.

- [4] Salmeron J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1019–1026.
- [5] Vega-López S, Ausman LM, Jalbert SM, Erkkilä AT, Lichtenstein AH. Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006;84:54-62.
- [6] Edem DO. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 2002;57:319–341.
- [7] Engelbrecht AM, Odendaal L, Du Toit EF, Kupai K, Csont T, Ferdinandy P, van Rooyen J. The effect of dietary red palm oil on the functional recovery of the ischaemic/reperfused isolated rat heart: the involvement of the PI3-Kinase pathway. *Lipids Health Dis* 2009;29:8-18.
- [8] Chalon S, Delion-Vancassel S, Belzung C, Guilloteau D, Leguisquet AM, Besnard JC, Durand G. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *J Nutr* 1998;128(12):2512-2519.
- [9] Suzuki H, Park SJ, Tamura M, Ando S. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech Ageing Dev* 1998;101(1-2): 119-128.

- [10] An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297(4):F895-903.
- [11] Ribeiro MCP, Barbosa NBV, Almeida TM, Parciannelo LM, Perottoni J, Ávila DS, Rocha JBT. High-fat diet and hydrochlorothiazide increase oxidative stress in brain of rats. *Cell Biochem Funct* 2009;27:473-478.
- [12] Trottier G, Koski KG, Brun T, Toufexis DJ, Richard D, Walker C-D. Increased fat intake during lactation modifies hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness in developing rat pups: a possible role for leptin. *Endocrinology* 1998;139(9):3704-3711.
- [13] Alsiö J, Roman E, Olszewski PK, Jonsson, P.; Fredriksson, R.; Levine, A.S.; Meyerson, B.J.; Hulting, A.L.; Lindblom, J. and Schiöth, H.B. Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2. *Genes, Brain and Behavior* 2009;8:193-202.
- [14] Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, Souza TM, Portela LV, Perry MLS. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences* 2007;81:198-203.
- [15] Albuquerque KT, Sardinha FLC, Telles MM, Watanabe RLH, Nascimento CMO, Carmo MGT, Ribeiro EB. Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring. *Nutrition* 2006;22:820-829.

- [16] Stojilkovic, SS. Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(9):460-468.
- [17] Benarroch, EE. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 2008;70:231-236.
- [18] Cunha, RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001;38:107-125.
- [19] Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972;24:509-581.
- [20] El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;148:153-163.
- [21] Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña A, Pekny M, Johansson B. Mice lacking the adenosine A_1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 2002;16:547-550.
- [22] Jain N, Kemp N, Adeyemo O, Buchanan P, Stone TW. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 1995;116:2127-2133.
- [23] Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hårdemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic

- neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9407–9412.
- [24] Ghisleni G, Kazlauckas V, Both FL, Pagnussat N, Mioranza S, Rocha JB, Souza DO, Porciúncula LO. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABA_A and 5HT receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32(6):1508-1505.
- [25] File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 2001;125:151–157.
- [26] Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO, Porciúncula LO. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem Int* 2008;53:89-94.
- [27] Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006;1:1306-1311.
- [28] Porciúncula LO, Schmidt AP, Coitinho AS, Vinadé L, Izquierdo I, Rocha JB, Souza DO. Intrahippocampal infusion of ebselen impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;451(2):165-169.
- [29] Inoue T, Kido Y, Asahara S, Matsuda T, Shibutani Y, Koyanagi M, Kasuga M. Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass. *Biomed Res* 2009;30(6):325-30.

- [30] Brufani C, Grossi A, Fintini D, Tozzi A, Nocerino V, Patera PI, Ubertini G, Porzio O, Barbetti F, Cappa M. Obese children with low birth weight demonstrate impaired beta-cell function during oral glucose tolerance test. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(11):4448-52.
- [31] Chatzi L, Plana E, Daraki V, Karakosta P, Alegkakis D, Tsatsanis C, Kafatos A, Koutis A, Kogevinas M. Metabolic syndrome in early pregnancy and risk of preterm birth. *Am J Epidemiol* 2009;170(7):829-36.
- [32] Donahue SM, Kleinman KP, Gillman MW, Oken E. Trends in birth weight and gestational length among singleton term births in the United States: 1990-2005. *Obstet Gynecol* 2010;115(2 Pt 1):357-364.
- [33] Silva AP, Nascimento L, Osso F, Mizurini D, Campos D, de Martinez AMB, do Carmo MGT. Plasma fatty acids, lipid metabolism and lipoproteins in rats fed on palm oil and partially hydrogenated soybean oil. *Rev Nutr* 2005;18(2):229-237.
- [34] Silva AP, Guimarães DE, Mizurini DM, Maia IC, Ortiz-Costa S, Sardinha FL, do Carmo MGT. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids* 2006;41:535-541.
- [35] Colandré ME, Diez RS, Bernal CA. Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model. *Br J Nutr* 2003;89:631-639.
- [36] Grundy SM, Abate N, Chandalia M. Diet composition and the metabolic syndrome: what is the optimal fat intake? *Am J Med* 2002;113(suppl 9B):255-259.

- [37] Lichtenstein AH, Erkkila AT, Lamarche B, Schwab US, Jalbert SM, Ausman LM. Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2003;171:97-107.
- [38] Pisani LP, Oyama LM, Bueno AA, Biz C, Albuquerque KT, Ribeiro EB, do Nascimento CMO. Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine m-RNA in 21 day-old-rats. *Nutrition* 2008;24:255-261.
- [39] Yu H, Bi Y, Ma W, He L, Yuan L, Feng J, Xiao R. Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int J Dev Neurosci* In Press, Uncorrected Proof, Available online 16 December 2009.
- [40] van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, Hoelen DW, Heijligenberg R, Bromhaar MG, de Groot LC, de Vries JH, Müller M, Afman LA. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2009;90(6):1656-1664.
- [40] Piazza PV, Deminiere JM, Maccari S, Mormede P, Le Moal M, Simon H. Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol* 1990;1:339–345.
- [41] Thiel CM, Muller CP, Huston JP, Schwarting RK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioral, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 1999;93:243–251.

- [42] Wainwright PE, Huang YS, Bulman-Fleming B, Lévesque S, McCutcheon D. The effects of dietary fatty acid composition combined with environmental enrichment on brain and behavior in mice. *Behav Brain Res* 1994;60(2):125-136.
- [43] Pritchett CE, Pardee AL, McGuirk SR, Will MJ. Role of nucleus accumbens adenosine-opioid interaction in mediating palatable food intake. *Brain Research* 2010;1306:85-92.
- [44] Soulis G, Papalexi E, Kittas C, Kitraki E. Early impact of a fat-enriched diet on behavioral responses of male and female rats. *Behav Neurosci* 2007;121:483–490.
- [45] Maniam J, Morris MJ. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* In Press, Corrected Proof, Available online 24 November 2009.
- [46] Buchenauer T, Behrendt P, Bode FJ, Horn R, Brabant G, Stephan M, Nave H. Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol Behav* 2009;98(5):563-569.
- [47] Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 2009;96:1-5.
- [48] Baran SE, Cambell AM, Kleen JK, Foltz CH, Wright RL, Diamond DM, Conrad CD. Combination of high fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites. *Neuroreport* 2005;16:39-43.
- [49] Greenwood CE, Winocur G. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a specific effect of saturated fatty acid intake. *Behav Neurosci* 1996;110(3):451-459.

- [50] Winocur G, Greenwood CE. The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. *Behav Brain Res* 1999;101:153-161.
- [51] Wu A, Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2003;119:365-375.
- [52] Yehuda S. Omega-6/Omega-3 ratio in brain-related functions. *World Rev Nutr Diet* 2003;92:37-56.
- [53] Collison KS, Makhou NJ, Inglis A, Al-Johi M, Zaidi MZ, Maqbool Z, Saleh SM, Bakheet R, Mondreal R, Al-Rabiah R, Shoukri M, Milgram NW, Al-Mohanna FA. Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory. *Physiol Behav* 2010;99:334-342.
- [54] Florio C, Prezioso A, Papaioannou A, Vertua R. Adenosine A₁ receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1998;136:311–319.
- [55] Duarte JM, Oliveira CR, Ambrósio AF, Cunha RA. Modification of adenosine A₁ and A_{2A} receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int* 2006;48(2):144-150.
- [56] Rebola N, Coelho JE, Costenla AR, Lopes LV, Parada A, Oliveira CR, Soares-da-Silva P, de Mendonça A, Cunha RA. Decrease of adenosine A₁ receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur J Neurosci* 2003;18(4):820-828.

Legends and Figures

Table 1. Liver and white adipose tissue mass and %body weight from 60-day-old male rats receiving SO, PO or TF diet since intrauterine growth. Data are means \pm SEM of 7-9 animals/group. Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group; † $P < 0.05$, significantly different from palm oil group

Table 2. Serum triacylglycerols, LDL-cholesterol, total cholesterol, HDL-cholesterol and cholesterol/HDL-cholesterol ratio of adult rats receiving SO, PO or TF diet from gestational period up to adulthood. Data are means \pm SEM of 7-9 animals/group, in duplicate. Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group; † $P < 0.05$, significantly different from palm oil group

Fig. 1. Body weight of male pups (A) and adult male rats (B) of SO, PO and TF groups. Data represent means \pm SEM of 10-15 animals. Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. Different letters mean statistical difference ($P < 0.05$) between diet groups, in the same day group (PN1, PN5, PN21, PN30, P45 and P60).

Fig. 2. Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/trans fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine growth up to adulthood in the open field task. **(A)** - Data are means \pm S.E.M. of the number of crossing. **(B)** - Data are means \pm S.E.M. of the number of rearing. Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test (n = 12-15 animals per group). * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group; # $P < 0.05$, significantly different from hydrogenated/trans fat group.

Fig. 3. Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/trans fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine growth up to adulthood in the elevated plus-maze during five minutes. **(A)** - Data are means \pm S.E.M. of the time spent in the arms. **(B)** - Data are means \pm S.E.M. of number of entries in the arms. Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test (n = 12-15 animals per group). * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group.

Fig. 4. Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/trans fat corresponding to white, gray or black bars, respectively) since intrauterine growth up to adulthood in the object recognition task. Data are means \pm S.E.M. of object recognition index in the training and test session (n = 10-12 animals per group). Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. * $P < 0.05$, significantly different from training session, in the same group.

Fig. 5. Performance of adult male rats fed normocaloric and normolipidic diet differing only on the fat source (soybean oil, palm oil or hydrogenated/trans fat) since intrauterine growth up to adulthood in the inhibitory avoidance task. Data are Median \pm interquartile range of the latency to step-down in the training session (white bars), 90 min test session (gray bars) and 24 h test session (black bars). Differences within groups were analyzed by Wilcoxon paired t-test. Differences between groups were analyzed by Mann Whitney test. * $P < 0.05$, significantly different from training session, in the same group. a, $P < 0.05$, significantly different between PO and SO test session. b, $P < 0.05$, significantly different between TF and SO test session.

Fig. 6. Immunoblotting analysis of the adenosine A₁ receptor density in the cortex, hippocampus and hipotalamus from adult male rats receiving diets since intrauterine growth, differing only on the fat source: soybean oil (white bars); palm oil (gray bars); or hydrogenated/trans fat (black bars). Data are means \pm S.E.M of density unit lines obtained for adenosine A₁ receptor/tubulin ratio. * $P < 0.05$, means significant difference between palm oil or hydrogenated/trans fat and soybean oil groups.

Table 1. Liver, white adipose tissue mass and % body weight from 60-day-old male rats receiving SO, PO or TF diet since intrauterine growth.#

| | SO | PO | TF |
|-----------------------------------|--------------|----------------|----------------|
| Liver (g) | 10.35 ± 0.24 | 11.16 ± 0.40 | 7.92 ± 0.18 *† |
| %body weight | 3.32 ± 0.10 | 3.68 ± 0.19 * | 2.44 ± 0.04 *† |
| Epididymal adipose tissue (g) | 2.47 ± 0.27 | 2.32 ± 0.11 | 1.94 ± 0.07 * |
| %body weight | 0.78 ± 0.07 | 0.76 ± 0.04 | 0.60 ± 0.02 *† |
| Intrabdominal adipose tissue (g) | 13.46 ± 1.07 | 17.81 ± 1.24 * | 10.88 ± 0.71 † |
| %body weight | 4.30 ± 0.31 | 5.82 ± 0.39 * | 3.34 ± 0.20 *† |
| Total visceral adipose tissue (g) | 14.95 ± 0.76 | 20.13 ± 1.26 * | 12.81 ± 0.73 † |
| %body weight | 5.08 ± 0.34 | 6.40 ± 0.39 * | 4.68 ± 0.27 † |

PO, palm oil; SO, soybean oil; TF, trans fat

Data are means ± SEM of 7-9 animals/group

Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group; † $P < 0.05$, significantly different from palm oil group.

Table 2. Serum triacylglycerols, LDL cholesterol, cholesterol, HDL cholesterol and Cholesterol/HDL cholesterol ratio from 60-day-old male rats receiving SO, PO or TF diet since intrauterine growth.#

| | SO | PO | TF |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Triacylglycerols (mg/dL) | 112.8 ± 13.81 | 178.7 ± 15.41 | 203.3 ± 45.34 |
| LDL cholesterol (mg/dL) | 169.1 ± 16.9 | 168.3 ± 7.27 | 180.6 ± 22.5 |
| Cholesterol (mg/dL) | 98.21 ± 14.02 | 92.11 ± 9.83 | 109.1 ± 15.5 |
| HDL cholesterol (mg/dL) | 48.3 ± 3.19 | 40.42 ± 3.33 | 30.86 ± 3.29 * |
| Cholesterol/HDL cholesterol | 2.05 ± 0.26 | 2.4 ± 0.34 | 3.8 ± 0.64 *† |

PO, palm oil; SO, soybean oil; TF, trans fat

Data are means ± SEM of 7-9 animals/group

Statistical comparison was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. * $P < 0.05$, significantly different from soybean oil group; † $P < 0.05$, significantly different from palm oil group.

Fig. 1

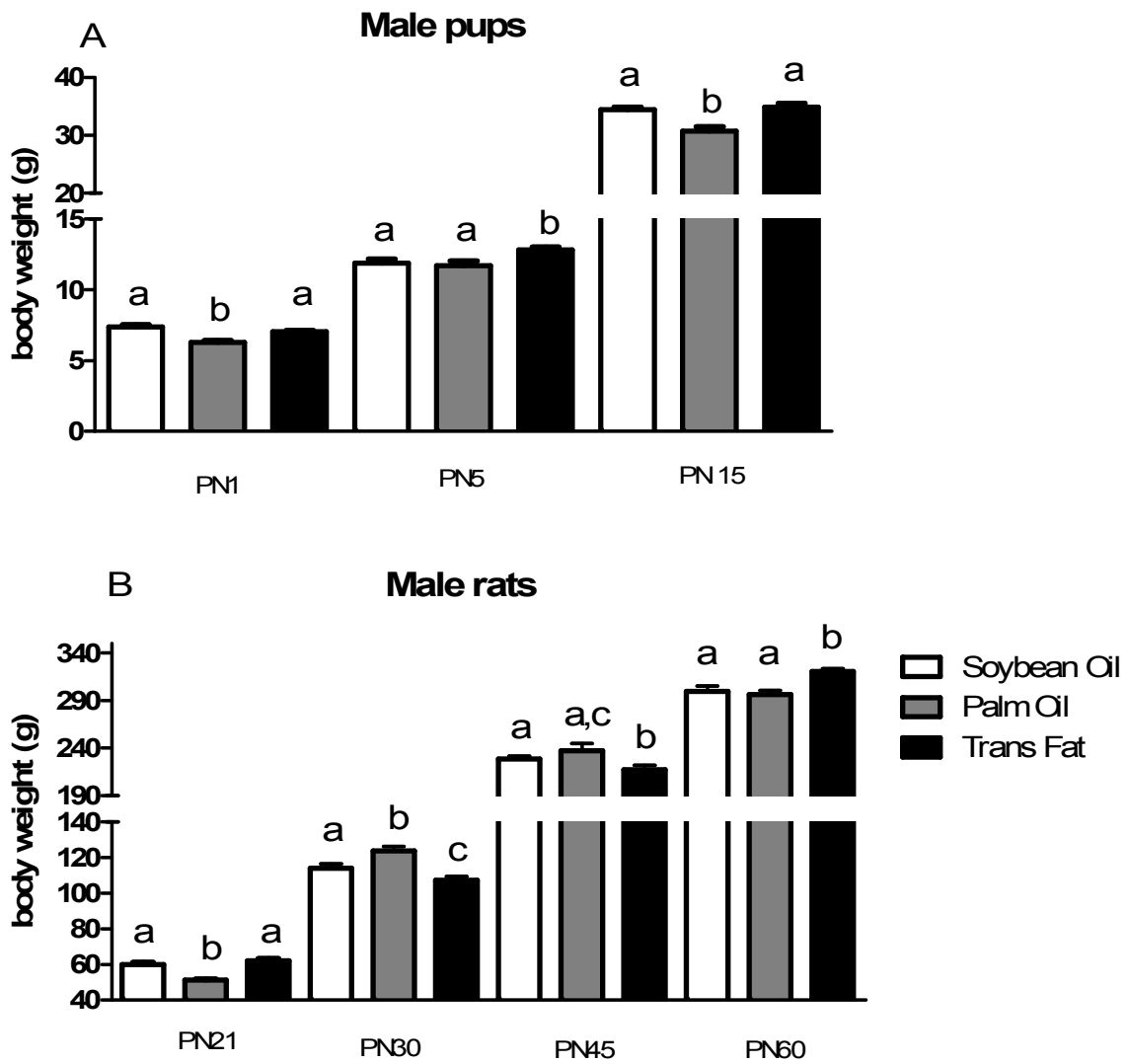


Fig. 2

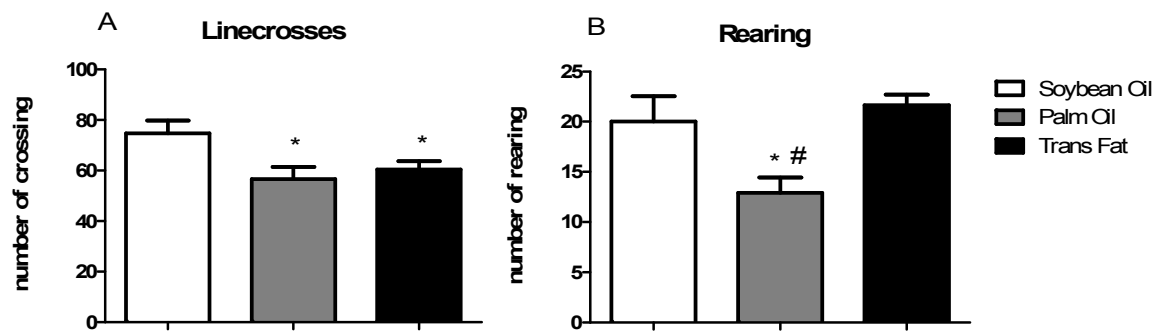


Fig. 3

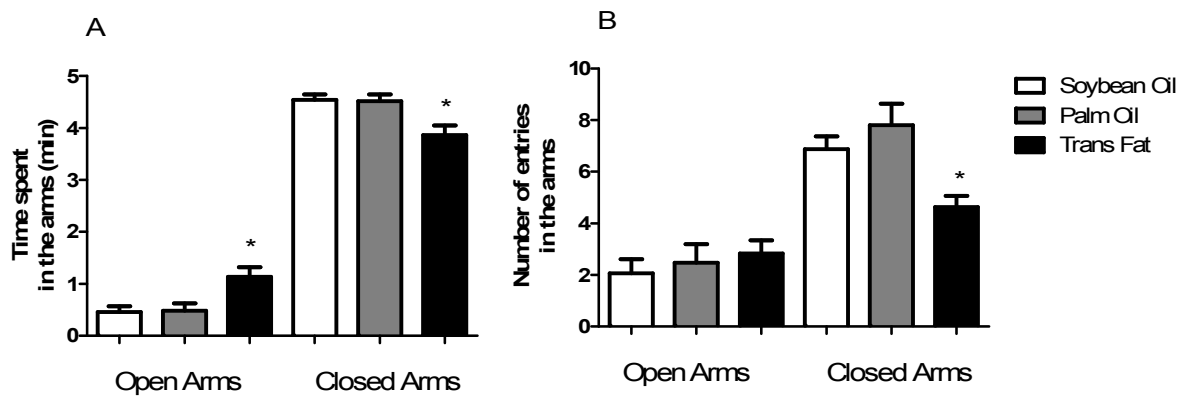


Fig. 4

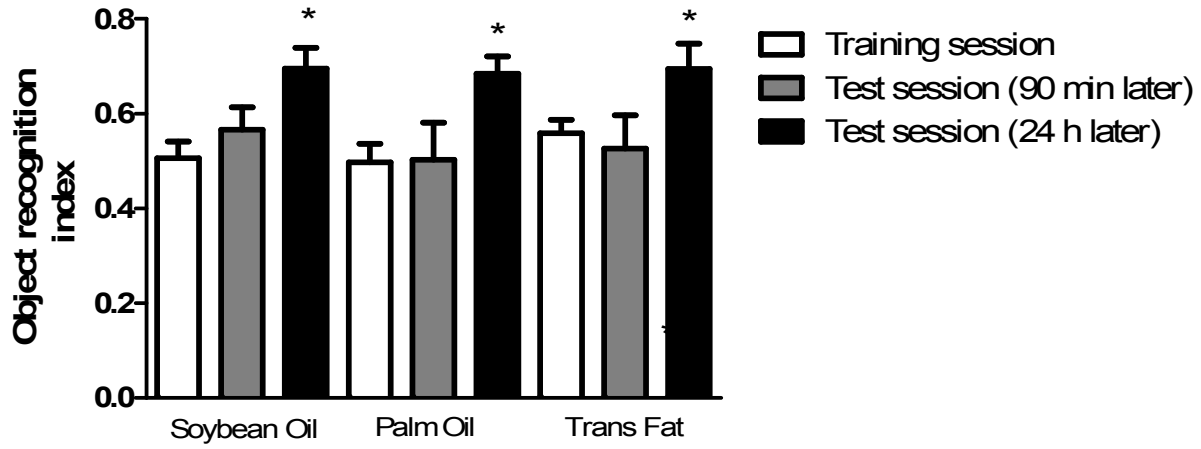


Fig. 5

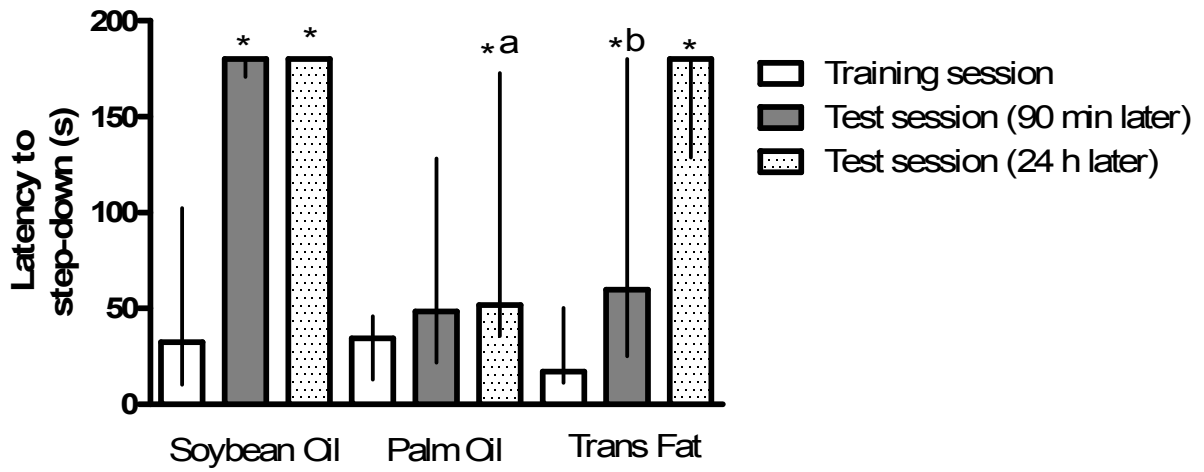
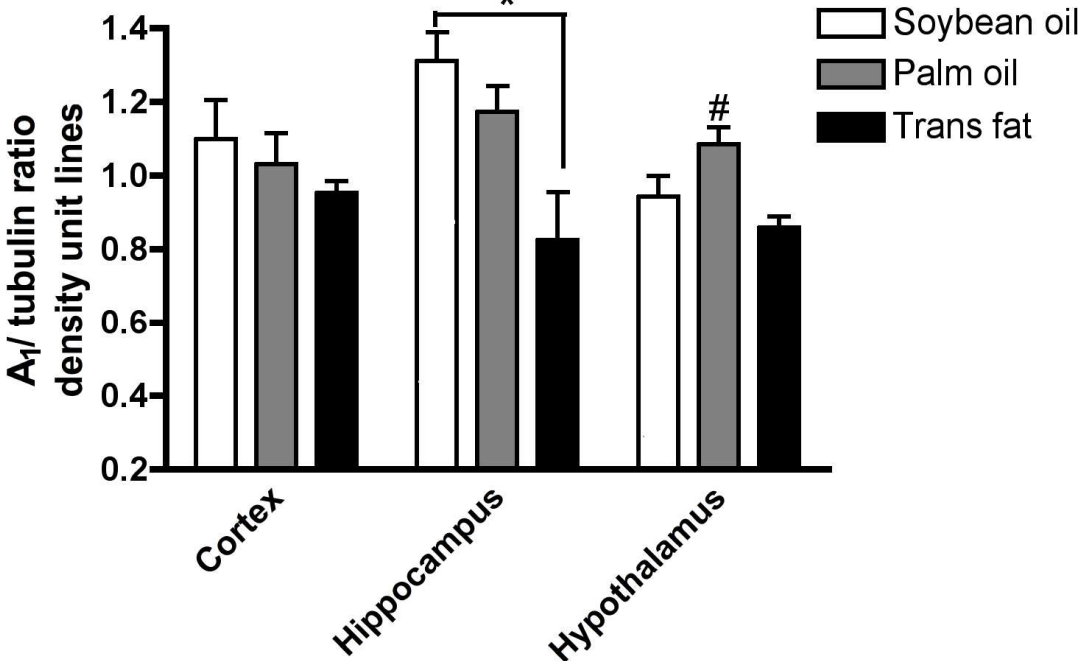


Fig. 6



CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL

3. DISCUSSÃO GERAL

Nossos resultados demonstraram que a composição lipídica da dieta afeta o comportamento dos animais em parâmetros de ansiedade e na atividade locomotora, bem como no processo de aprendizado e memória em testes aversivos e não-aversivos. Além disso, a dieta oferecida desde o período gestacional até a idade adulta também pode estar relacionada a alterações no imunoconteúdo de receptores de adenosina A₁ em algumas áreas do encéfalo.

O controle do peso corporal durante a fase de crescimento e desenvolvimento é essencial, uma vez que o baixo peso ao nascer está relacionado a diversas alterações metabólicas na vida adulta, tais como diabetes (Inoue, 2009; Brufani et al., 2009), hipertensão (Chatzi et al., 2009) e obesidade (Donahue et al., 2010). Neste trabalho, os animais que consumiram as dietas OP apresentaram menor peso ao nascer quando comparados aos animais que receberam a dieta OS ou GT, padrão que foi mantido até o desmame. Após esse período, o ganho de peso do grupo OP foi maior do que a do grupo GT, mas este último apresentou o maior peso corporal nos sessenta dias de idade. Essas observações estão de acordo com um estudo recente, onde foi observado maior ganho de peso e obesidade central nos animais alimentados com dieta contendo 5 % de óleo de palma durante a lactação até 45 dias de vida do que nos animais que receberam uma dieta com 6% de gordura trans (Silva et al., 2005). Ainda de acordo com nossos resultados, o grupo óleo de palma obteve um maior percentual de tecido adiposo. Em outro estudo que comparou diferentes fontes dietéticas oferecidas desde a lactação até 45 dias de idade, os grupos que receberam óleo de palma ou gordura vegetal hidrogenada apresentaram maior conteúdo lipídico no tecido adiposo epididimal com maior ganho de peso corporal (Silva et al.,

2006). No entanto, esse efeito não foi observado em animais que receberam AGT na vida adulta (Colandré, Diez e Bernal, 2003), o que sugere que a resposta metabólica à gordura da dieta pode ser dependente da idade dos animais.

Diversos estudos revelaram que o consumo de altas concentrações de AGT aumenta os níveis sanguíneos de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos, além de diminuir os níveis séricos de HDL-colesterol, todos esses efeitos aumentando o risco de síndrome metabólica (Grundy, Abate and Chandalia, 2002; Lichtenstein et al., 2003). Filhotes submetidos à dieta contendo 7% de gordura hidrogenada durante o período de desenvolvimento e lactação apresentaram maiores níveis sanguíneos de colesterol total e triglicerídeos e baixos níveis séricos de HDL-colesterol, comparados ao grupo contendo 8% de óleo de soja (Pisani et al., 2008), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Além disso, dieta rica em gordura saturada consumida por um longo período de tempo apresentou alterações nos níveis séricos e na composição de ácidos graxos do encéfalo na vida adulta (Yu et al., 2009). Mesmo que o óleo de palma seja uma fonte de ácidos graxos saturados, não foram observadas alterações no perfil lipídico de ratos adultos que receberam OP em nosso estudo.

No presente estudo, a ingestão de gordura *trans* ou óleo de palma durante o desenvolvimento até a idade adulta ocasionou alterações comportamentais, no aprendizado e memória e no receptor de adenosina A₁ na fase adulta dos filhotes machos.

A arena de campo aberto é um teste amplamente utilizado para avaliar a reação à novidade e a atividade locomotora dos animais submetidos a um tratamento específico, neste caso a dietas específicas desde a vida intra-uterina. Sabendo que a reação à novidade

é caracterizada pelo aumento dos parâmetros que medem atividade locomotora e exploratória, como número de cruzamentos e número de *rearings* (Piazza et al., 1990; Thiel et al., 1999), nossos resultados denotaram um prejuízo na reação ao ambiente novo nos grupos OP e GT, indicado pelo menor número de cruzamentos quando comparados ao grupo que recebeu a dieta OS. Os animais que receberam dieta contendo óleo de palma também apresentaram diminuição na atividade exploratória, devido ao menor número de *rearings* deste grupo quando comparado aos outros. Wainwright e colaboradores (1994) observaram que animais que receberam dieta rica em gordura saturada durante o desenvolvimento tiveram menor atividade locomotora na arena de campo aberto quando atingiram a idade adulta (Wainwright et al., 1994). Além disso, há relatos de que uma dieta rica em lipídios altera a atividade locomotora, e que este comportamento pode estar relacionado aos receptores de adenosina A_{2A} do estriado (Pritchett et al., 2010). Mesmo que não tenha sido utilizada dieta hiperlipídica, também foi evidenciado que os lipídios da dieta provocaram alterações na locomoção dos animais.

O labirinto em cruz elevado é um teste que analisa o comportamento de ansiedade pela aversão nata dos roedores por áreas desprotegidas: a preferência pelos braços abertos (associado ao risco) aos braços fechados (proteção) é interpretada como baixo nível de ansiedade, isto é, o risco é inversamente associado ao comportamento ansioso (Alsiö et al., 2009). Em nosso trabalho, ratos adultos que receberam GT desde o período gestacional permaneceram mais tempo nos braços abertos, o que sugere menor comportamento ansioso nesses animais quando comparados aos outros grupos. Resultado semelhante foi encontrado em ratos adultos que consumiram dieta enriquecida em lipídios durante sete dias (Soulis et al., 2007). Em ratos que tiveram um período de separação maternal no início da vida

apresentaram comportamento de ansiedade na vida adulta, o que foi revertido após oferta de dieta hiperpalatável (Maniam e Morris, 2010). Nesse contexto, observa-se que após uma situação estressante como a separação maternal durante o desenvolvimento, a dieta rica em lipídios conseguiu amenizar o comportamento ansioso dos animais. No entanto, outros autores que utilizaram dieta hiperlipídica encontraram comportamento ansiogênico nos ratos (Souza et al., 2007); assim como ratos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica (Buchenauer et al., 2008). Além disso, os resultados com dieta contendo óleo de palma foram semelhantes aos obtidos pelo grupo que recebeu óleo de soja; nesse caso, o óleo de palma teve vantagens sobre a gordura *trans*, uma vez que aquele não apresentou alterações no comportamento de ansiedade dos ratos.

Roedores possuem a tendência natural de explorar novidades em um ambiente previamente conhecido. Essa característica vem sendo explorada por pesquisadores para estudar a memória de reconhecimento. Um protocolo já conhecido e empregado para estudar esse tipo de memória é a tarefa de reconhecimento de objetos. Nessa tarefa os animais são expostos a um ambiente onde durante tempo definido são expostos a dois objetos iguais. Avalia-se a memória de curta e longa duração expondo os animais novamente a esse ambiente, porém com a troca de um dos objetos. Esse novo objeto é diferente na forma e o animal naturalmente reconhece esse objeto por gastar mais tempo explorando-o. Portanto, nessa tarefa é mensurável o tempo gasto no objeto novo e no objeto familiar. O parâmetro que avalia a diferença de comportamento entre os grupos é o índice de reconhecimento de objeto, calculado pela razão entre tempo gasto no objeto novo sobre o tempo total de exploração em ambos objetos, também conhecido como índice de reconhecimento (Bevins and Besheer, 2006). Nossos resultados mostraram que houve um

declínio no desempenho da tarefa com todas as dietas, mas com algumas diferenças entre memória de curta e de longa duração. Na memória de curta duração, avaliada no teste 90 minutos após o treino, os grupos OP e GT não obtiveram um índice de reconhecimento maior do que no treino, o que indica que não souberam diferenciar os objetos entre o familiar e o novo. No entanto, este desempenho permaneceu no teste de longa duração somente nos animais que receberam a dieta OP. A memória de reconhecimento de um novo objeto foi estudada em ratos machos adultos jovens que consumiram somente a dieta padrão, dieta padrão e solução de sacarose a 32% ou dieta hiperlipídica rica em gordura trans. Os animais que ingeriram a solução de sacarose apresentaram o menor desempenho no teste 1 hora após o treino, pois passaram menor tempo explorando o objeto novo. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais que receberam dieta padrão e aqueles com dieta hiperlipídica (Jurdak e Kanarek, 2009).

O processo de aprendizado e memória também foi avaliado pelo teste da esquiua inibitória, um teste aversivo que compara a latência para descer da plataforma entre as sessões de treino e teste, após o animal levar um choque que causa somente desconforto. A latência entre treino e teste é medida e se o animal aprende a latência entre as sessões aumenta. Para esta tarefa, há um tempo máximo de latência de 180 minutos nos testes. Os animais que receberam dieta OS não apresentaram nenhum prejuízo na memória, uma vez que a latência entre o treino e os testes (90 minutos e 24 horas) foi diferente. Esse resultado sugere que os animais lembraram do choque que receberam no treino e portanto nas sessões de teste permaneceram mais tempo na plataforma. Entretanto, os animais que receberam a dieta com o óleo de palma não lembraram do choque recebido quando o teste foi feito 90 minutos após o treino. Para a memória de longa duração testada vinte e quatro horas após o

treino os animais apresentaram maior retenção, mas quando comparadas as latências de vinte e quatro horas com a dieta com OS o desempenho foi menor. Portanto, a dieta com óleo de palma prejudica completamente a consolidação da memória de curta duração e provoca menor desempenho na de longa duração. As latências apresentadas entre o treino e teste para os animais com a dieta com gordura *trans* foram diferentes entre as sessões, porém quando o desempenho foi menor na sessão de teste realizada 90 minutos após o treino do que a dieta com OS. Portanto, a dieta com gordura *trans* também prejudica a consolidação da memória de curta duração. Os efeitos das dietas com modificação na composição lipídica já foram verificados em combinação com outros fatores e situações ambientais. Em estudos com dieta hiperlipídica e estresse crônico, essa combinação levou à diminuição da ramificação dos dendritos apicais na região CA3 do hipocampo de ratos machos adultos (Baran et al., 2005). Yehuda e colaboradores (2003) relacionaram o consumo de dieta hiperlipídica com obesidade e diabetes, o que pode aumentar o estresse, que por sua vez provoca alterações estruturais no SNC (menor número de dendritos, diminuição da sinaptogênese, entre outros) e nos níveis de hormônios e mediadores inflamatórios, levando ao declínio cognitivo. Em ratos adultos submetidos à dieta com 20% de lipídios por 3 meses, observou-se um menor aprendizado no teste de *variable interval delayed alternation* (VIDA) quando comparados aos animais que receberam uma dieta padrão. Quando estes animais foram alocados em ambiente enriquecido, o déficit cognitivo foi revertido nos animais com dieta hiperlipídica (Winocur and Greenwood, 1999). O desempenho cognitivo em tarefas de memória espacial foi estudado em camundongos machos e fêmeas com 6, 16 e 32 semanas de vida, recebendo dieta hiperlipídica rica em gordura *trans* e glutamato monossódico adicionado à água de beber dos animais. Essa combinação levou a um aumento na obesidade central, além de um menor desempenho na

tarefa de labirinto aquático (Collison et al., 2010). Também foram evidenciadas alterações nos mecanismos moleculares do aprendizado e memória. Em ratos adultos submetidos à dieta hiperpalatável por 4 semanas e após injúria cerebral, ocorreu a diminuição da expressão de BDNF, um fator neurotrófico essencial na plasticidade neuronal envolvido no processo de aprendizado e memória (Wu et al., 2003).

A análise do imunoconteúdo dos receptores A_1 em diferentes regiões do encéfalo dos ratos que receberam dietas normocalóricas e isolipídicas, variando a fonte lipídica, mostrou alterações conforme o tipo de dieta consumida. Os ratos que consumiram GT desde o desenvolvimento até os sessenta dias de vida apresentaram menor densidade do receptor A_1 desses receptores somente no hipocampo, com uma redução de 39% quando comparados à densidade dos receptores hipocâmpais do grupo OS. Por outro lado, houve um aumento no imunoconteúdo do receptor de adenosina A_1 em animais que receberam dieta com óleo de palma. Ainda são necessárias as determinações do imunoconteúdo dos receptores de adenosina do tipo A_{2A} para verificar se esse receptor também poderia sofrer modificações no seu imunoconteúdo conforme a dieta.

Na literatura existem alguns trabalhos com ênfase nos receptores de adenosina nas patologias associadas às manipulações da dieta como diabetes. No entanto, a maioria dos trabalhos não investigou modificações sobre os receptores de adenosina no sistema nervoso central. Um dos poucos trabalhos que teve esse enfoque observou que no hipocampo de animais submetidos ao modelo de diabetes tipo 1 por administração sistêmica de estreptozotocina houve uma diminuição do imunoconteúdo do receptor A_1 no hipocampo (Duarte et al., 2006). Nesse mesmo modelo foi observado um aumento na expressão dos receptores de adenosina A_{2A} e A_{2B} no fígado desses animais sem modificações no receptor

A₁ (Grden et al., 2007). Quando o tecido cardíaco foi analisado houve uma diminuição no imunocontéudo do receptor A₁ sem alteração na sua expressão em cardiomiócitos isolados desse modelo de diabetes tipo 1 (Grden et al., 2005). Nesse mesmo estudo a expressão do receptor A_{2A} aumentou no coração e diminuiu nos cardiomiócitos sem alterações significativas no seu imunocontéudo (Grden et al., 2005). Apesar desses estudos ainda não existem investigações sobre as modificações que esses receptores podem sofrer em modelos de diabetes tipo 2 que estão mais relacionados às diferentes manipulações de dietas. No que diz respeito às alterações desses receptores por manipulações de diferentes dietas ainda permanecem totalmente desconhecidas especialmente nas enriquecidas com óleo de palma e gordura *trans*.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, a qualidade da gordura da dieta recebida desde o período de desenvolvimento intrauterino provocou alterações comportamentais na vida adulta. Considerando que as dietas utilizadas eram isocalóricas e normolipídicas, a composição de ácidos graxos da fonte lipídica modifica o comportamento relacionado a ansiedade, a atividade locomotora e desempenho cognitivo em processos de aprendizado e memória. Os resultados desse trabalho também revelam que os receptores de adenosina em áreas específicas do encéfalo são afetados pela manipulação dos lipídios na dieta. Estudos mais detalhados são necessários para inferir se as modificações observadas na densidade do receptor de adenosina A₁ estão implicadas nas alterações comportamentais. Mesmo que a substituição da gordura *trans* pelo óleo de palma amplamente empregada pelas indústrias alimentícias possa ter efeitos positivos no perfil lipídico, muito pouco ainda se sabe sobre outros efeitos dessa substituição. No protocolo de administração usado neste trabalho, a administração de óleo de palma desde o período gestacional até a idade adulta promoveu declínio cognitivo nas tarefas de aprendizado e memória e também alterações na atividade locomotora dos animais. No sistema adenosinérgico, os animais que receberam óleo de palma tiveram a densidade dos receptores A₁ aumentada no hipotálamo, o que mostra novamente que mais estudos devem ser feitos para avaliar o impacto dessa substituição na dieta. Nossos resultados revelaram que os ácidos graxos *trans* além de provocar danos cardiovasculares já relatados na literatura, provocam comportamento ansiolítico em ratos adultos que receberam dieta contendo AGT desde o desenvolvimento, diminuem a atividade locomotora e exploratória e prejudicam a memória de curta duração em tarefas de aprendizado e memória. No hipocampo desses ratos, houve uma diminuição dos receptores

de adenosina A_1 , enfatizando o envolvimento da composição lipídica da dieta na sinalização central de adenosina.

Perspectivas

O protocolo de administração das dietas será mantido, e as amostras coletadas para as análises abaixo descritas serão obtidas dos ratos machos de 60 dias, com exceção da análise ontogenética, que será avaliada durante o desenvolvimento pós-natal.

- Análise ontogenética dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} , além das proteínas sinápticas sinaptobrevina, syntaxina, sinaptotagmina e sinapsina, responsáveis pelo ancoramento e fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica. As estruturas para análise serão obtidas de animais com 1, 7, 15, 21, 30, 45 e 60 dias pós-natal.

- Análise da densidade dos receptores de adenosina A_{2A} no hipocampo, córtex e hipotálamo de ratos machos de 60 dias que receberam as dietas desde o período gestacional, por *Western Blot*.

- Ligação de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} com os ligandos [3H] DPCPX (antagonista do receptor A_1) e [3H] CGS 21860 (agonista do receptor A_{2A}) em membranas sinápticas.

- Análise da expressão dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} e das proteínas sinápticas sinaptobrevina, syntaxina, sinaptotagmina e sinapsina nas estruturas cerebrais acima descritas por PCR em tempo real.

- Análise comportamental: Os ratos adultos de 60 dias serão treinados na tarefa de esquiva inibitória utilizando diferentes intensidades de choque (0,2, 0,4 e 0,6 mA), para identificar em quais dessas intensidades os animais apresentarão diferentes tempos de latência entre

treino e teste. A persistência da memória de longa duração será avaliada de acordo com trabalhos anteriores cujo teste foi feito 2, 7 ou 15 dias após o treino. Como medida de memória espacial os ratos adultos serão submetidos à análise comportamental labirinto em Y.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, K.T.; Sardinha, F.L.C.; Telles, M.M.; Watanabe, R.L.H.; Nascimento, C.M.O.; do Carmo, M.G.T.; Ribeiro, E.B. **Intake of *trans* fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring.** *Nutrition* 22: 820-829, 2006.

Alsö, J.; Roman, E.; Olszewski, P.K.; Jonsson, P.; Fredriksson, R.; Levine, A.S.; Meyerson, B.J.; Hulting, A.L.; Lindblom, J.; Schiöth, H.B. **Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2.** *Genes, Brain and Behavior* 8: 193-202, 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059>.

Baran, S.E.; Cambell, A.M.; Kleen, J.K.; Foltz, C.H.; Wright, R.L.; Diamond, D.M.; Conrad, C.D. **Combination of high fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites.** *Neuroreport* 16: 39-43, 2005.

Barone, J.J.; Roberts, H.R. **Caffeine consumption.** *Food Chem Toxicol* 34: 119-129, 1996.

Batista Filho, M.; Rissin, A. **A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais.** *Cad Saúde Pública* 19(1):S181-91, 2003.

Benarroch, E.E. **Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease.** *Neurology* 70: 231-236, 2008.

Booyens, J.; van der Merwe, C.F. **Margarines and coronary artery disease.** *Medical Hypotheses* 37: 241-244, 1992.

Brenner, R.R.; Pelufo, R.O. Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation *in vitro* of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. *J Biol Chem* 241(22): 5213-5219, 1966.

Brufani, C.; Grossi, A.; Fintini, D.; Tozzi, A.; Nocerino, V.; Patera, P.I.; Ubertini, G.; Porzio, O.; Barbetti, F.; Cappa, M. **Obese children with low birth weight demonstrate impaired beta-cell function during oral glucose tolerance test.** *J Clin Endocrinol Metab* 94(11):4448-52, 2009.

Buchenauer, T.; Behrendt, P.; Bode, F.J.; Horn, R.; Brabant, G.; Stephan, M.; Nave, H. **Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats.** *Physiol Behav* 98(5): 563-569, 2009.

Carnielli, V.P.; Wattimena, D.J.; Luijendijk, I.H.; Boerlage, A.; Degenhost, H.J.; Sauer, P.J. **The very low birthweight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids.** *Pediatr Res* 40(1): 169-174, 1996.

Chatzi, L.; Plana, E.; Daraki, V.; Karakosta, P.; Alegkakis, D.; Tsatsanis, C.; Kafatos, A.; Koutis, A.; Kogevinas, M. **Metabolic syndrome in early pregnancy and risk of preterm birth.** *Am J Epidemiol* 170(7):829-36, 2009.

Colandré, M.E.; Diez, R.S.; Bernal, C.A. **Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model.** *Br J Nutr* 89: 631-639, 2003.

Collison, K.S.; Makhou, N.J.; Inglis, A.; Al-Johi, M. Zaidi, M.Z.; Maqbool, Z.; Saleh, S.M. Bakheet, R.; Mondreal, R.; Al-Rabiah, R.; Shoukri, M.; Milgram, N.W. ; Al-Mohanna, F.A. **Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory.** *Physiol Behav* 99: 334-342, 2010.

Cottrell, R.C. **Nutritional aspects of palm oil.** *Am J Clin Nutr* 53: 989S-1009S, 1991.

Coutinho, J.G.; Gentil, P.C.; Toral, N. **Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda.** *Cad Saúde Pública* 24(2): S332-S340, 2008.

Cunha, R.A. **Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.** *Neurochem Int* 38: 107-125, 2001.

Dhalla, A.K.; Wong, M.Y.; Voshol, P.J.; Belardinelli, L.; Reaven, G.M. **A₁ adenosine receptor partial agonist lowers plasma FFA and improves insulin resistance induced by high-fat diet in rodents.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(5): E1358-1363, 2007.

Decsi, T.; Koletzko, B. **Do *trans* fatty acids impair linoleic acid metabolism in children?** *Ann Nutr Metab* 39(1):36-41, 1995.

Demmelmair, H.; Festl, B.; Wolfram, G.; Koletzko, B. ***Trans* fatty acid contents in spreads and cold cuts usually consumed by children.** *Z Ernährungswiss* 35: 235-240, 1996.

Donahue, S.M.; Kleinman, K.P.; Gillman, M.W.; Oken, E. **Trends in birth weight and gestational length among singleton term births in the United States: 1990-2005.** *Obstet Gynecol* 115(2 Pt 1): 357-364, 2010.

Dong, Q.; Ginsberg, H.N.; Erlanger, B.F. **Overexpression of the A₁ adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance.** *Diabetes, obesity and metabolism* 3: 360-366, 2001.

Drewnowski, A.; Popkin, B. **The nutrition transition: new trends in the global diet.** *Nutr Rev* 55(2): 31-43, 1997.

Duarte, J.M.; Oliveira, C.R.; Ambrósio, A.F.; Cunha, R.A. **Modification of adenosine A₁ and A_{2A} receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats.** *Neuroch Int* 48:144-150, 2006.

Eckel, R.H.; Borra, S.; Lichtenstein, A.H.; Yin-Piazza, S.Y. **Understanding the complexity of *trans* fatty acid reduction in the american diet: American Heart Association Trans Fat Conference 2006: report of the Trans Fat Conference Group.** *Circulation* 115: 2231-2246, 2007.

Edem, D.O. **Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review.** *Plant Foods Hum Nutr* 57(3-4):319-41, 2002.

El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.-M. **The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists.** *Psychopharmacology* 148: 153-163, 2000.

El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.-M. **Reduced appetite for caffeine in adenosine A_{2A} receptor knockout mice.** *Eur J Pharmacol* 519: 290-291, 2005.

Fredholm, B.B.; Chen, J.F.; Cunha, R.A.; Svenningsson, P.; Vaugeois, J.M. **Adenosine and brain function.** *Int Rev Neurobiol* 63: 191-270, 2005.

Ghotra, B.S.; Dyal, S.D.; Narine, S.S. **Lipid shortenings: a review.** *Food Res Inter* 35: 1015– 1048, 2002.

Grden, M.; Podgórska, M.; Szutowicz, A.; Pawełczyk, T. **Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver.** *Exp Mol Pathol.* 83(3): 392-398. 2007.

Grden, M.; Podgórska, M.; Szutowicz, A.; Pawełczyk, T. **Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat.** *J Physiol Pharmacol.* 56(4): 587-597. 2005.

Grundy, S.M.; Abate, N.; Chandalia, M. **Diet composition and the metabolic syndrome: what is the optimal fat intake?** *Am J Med* 113(suppl 9B): 255-259, 2002.

Hackman, R.M.; Havel, P.J.; Schwartz, H.J.; Rutledge, J.C.; Watnik, M.R.; Noceti, E.M.; Stohs, S.J.; Stern, J.S.; Keen, C.L. **Multinutrient supplement containing ephedra and caffeine causes weight loss and improves metabolic risk factors in obese women: a randomized controlled trial.** *Int J Obes (Lond)* 30(10): 1545-1556, 2006.

Innis, S.H. **Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids.** *J Pediatr* 143 (S4): S1-S8, 2003.

Inoue, T.; Kido, Y.; Asahara, S.; Matsuda, T.; Shibutani, Y.; Koyanagi, M.; Kasuga, M. **Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass.** *Biomed Res* 30(6):325-30, 2009.

James, M.L.; Cleland, L.G. **Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 27(2): 85-97, 1997.

Jazet, I.M.; Pijl, H.; Meinders, A.E. **Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance.** *Netherlands Journal of Medicine* 61: 194-212, 2003.

Judd, J.T.; Baer, D.J.; Kris-Etherton, P.; Muesing, R.A.; Iwane, M. **Dietary cis and trans monounsaturated and saturated fatty acids and plasma lipids and lipoproteins in men.** *Lipids* 37: 123-131, 2002.

Jurdak, N.; Kanarek, R.B. **Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats.** *Physiol Behav* 96: 1-5, 2009.

Kavanagh, K.; Jones, K.L.; Sawyer, J.; Kelley, K.; Carr, J.J.; Wagner, J.D. et al. **Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys.** *Obesity (Silver Spring)* 15, 1675–1684, 2007.

Koletzko, B.; Decsi, T. **Metabolic aspects of trans fatty acids.** *Clinical Nutrition* 16: 229-237, 1997.

Koletzko, B.; Müller, J. **Cis- and trans- fatty acids in plasma lipids of newborn infants and their mothers.** *Biology of the Neonate, Basel* 57(3/4): 172-178, 1990.

Kromhout, D.; Menotti, A.; Bloemberg, B.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Dontas, A.S.; Fidanza, F.; Giampaoli S.; Jansen, A. **Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries study.** *Prev Med* 24: 308-315, 1995.

Kulkarni, S.K.; Singh, K.; Bishnoi, M. **Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours.** *Indian Journal of Experimental Biology* 45(5):439-43, 2007.

Larqué, E., Zamora, S.; Gil, A. **Dietary trans fatty acids in early life: a review.** *Early Human Dev* 65: S31-S41, 2001.

Lichtenstein, A.; Ausman, L.; Jalbert, S.; Schaefer, E. **Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels.** *N Engl J Med* 25: 1930-1940, 1999.

Lichtenstein, A.H.; Erkkila, A.T.; Lamarche, B.; Schwab, U.S.; Jalbert, S.M.; Ausman, L.M. **Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like**

particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 171: 97-107, 2003.

Lorgeril, M.; Renaud, S.; Mamelle, N.; Salen, P.; Martin, J.L. Monjaud, I.; et al. **Mediterranean alpha-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease.** *Lancet* 343(8911): 1454-1459, 1994.

Mahfouz, M.M.; Johnson, S.; Holman, R.T. **The effect of isomeric trans-18:1 acids on the desaturation of palmitic, linoleic and eicosa-8,11,14-trienoic acids by liver microsomes.** *Lipids* 15(2): 100-107, 1980.

Maniam, J.; Morris, M.J. **Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment.** *Psychoneuroendocrinology In Press, Corrected Proof, Available online 24 November 2009.*

Martin, C.A.; Almeida, V.V.; Ruiz, M.R.; Visentainer, J.E.L.; Matsushita, M.; de Souza, N.E.; Visentainer, J.V. **Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods.** *Rev Nutr* 19(6): 761-770, 2006.

Martin, C.A.; Milinsk, M.C.; Visentainer, J.V.; Matsushita, M.; Souza, N.E. **Trans fatty acid-forming processes in foods: a review.** *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 79 (2): 343-350, 2007.

Matthan, N.R.; Welty, F.K.; Barret, P.H.; Haraus, C.; Dolnikowski, G.G.; Parks, J.S.; Eckel, R.H.; Schaefer, E.J.; Lichtenstein, A.H. **Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1092-1097, 2004.

Mauger, J.F.; Lichtenstein, A.H.; Ausman, L.M.; Jalbert, S.M.; Jauhainen, M.; Ehnolm, C.; Lamarche, B. **Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size.** *Am J Clin Nutr* 78: 370-375, 2003.

Mensink, R.P.; Zock, P.L.; Kester, A.D.; Katan, M.B. **Effect of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a metaanalysis of 60 controlled trials.** *Am J Clin Nutr* 77: 1146-1155, 2003.

Mitmesser, S.H.; Carr, T.P. **Trans fatty acids alter the lipid composition and size of apoB-100-containing lipoproteins secreted by HepG2 cells.** *J Nutr Biochem* 16: 178-183, 2005.

Monteiro, C.A.; Mondini, L.; de Souza, A.L.; Popkin, B.M. **The nutrition transition in Brazil.** *Eur J Clin Nutr* 49: 105-113, 1995.

Mozzaffarian, D.; Aro, A.; Willett, W.C. **Health effects of trans fatty acids: experimental and observational evidence.** *Eur J Clin Nutr* 63: S5-S21, 2009.

Mozzaffarian, D.; Clarke, R. **Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils.** *Eur J Clin Nutr* 63(S2): S22-S33, 2009.

Mozzaffarian, D.; Katan, M.B.; Ascherio, A.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. **Medical progress: trans fatty acids and cardiovascular disease.** *N Eng J Med* 354(15): 1601-1613, 2006.

Muller, H.; Jordal, O.; Kierulf, P.; Kirkhus, B.; Pederson, J.I. **Replacement of partially hydrogenated soybean oil by palm oil in margarine without unfavorable effects on serum lipoproteins.** *Lipids* 33(9): 879-887, 1998.

Muller, H.; Seljeflot, I.; Solvoll, K.; Pederson, J.I. **Partially hydrogenated soybean oil reduces postprandial T-Pa activity compared with palm oil.** *Atherosclerosis* 155(2): 467-476, 2001.

Nagel, J.; Schladebach, H.; Koch, M.; Schwienbacher, I.; Müller, C.E.; Hauber, H. **Effects of an adenosine A_{2A} receptor blockade in the nucleus accumbens on locomotion, feeding, and prepulse inhibition in rats.** *Synapse* 49(4): 279-286, 2003.

Oomen, C.M.; Ocke, M.C.; Feskens, E.J.; van Erp-Baart, M.A.; Kok, F.J.; Kromhout, D. **Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study.** *Lancet* 357: 746-751, 2001.

Osso, F.S.; Moreira, A.S.B.; Teixeira, M.T.; Pereira, R.O.; do Carmo, M.G.T.; Moura, A.S. **Trans fatty acid in maternal milk lead to cardiac insulin resistance in adult offspring.** *Nutrition* 24: 727-732, 2008.

Pan, J.; Choi, Y.; Park, T. **Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue.** *Arch Biochem Biophys* 476(2): 178-185, 2008.

Pettenuzzo, L.F.; Noschang, C.; Toigo, E.v.P.; Fachin, A.; Vendite, D.; Dalmaz, C. **Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior in rats.** *Physiol Behav* 95: 295-301, 2008.

Piazza, P.V.; Deminiere, J.M.; Maccari, S.; Mormede, P.; Le Moal, M.; Simon, H. **Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration.** *Behav Pharmacol* 1:339-345, 1990.

Pisani, L.P.; Oyama, L.M.; Bueno, A.A.; Biz, C.; Albuquerque, K.T.; Ribeiro, E.B.; do Nascimento, C.M.O. **Hydrogenated fat intake during pregnancy and lactation modifies serum lipid profile and adipokine m-RNA in 21 day-old-rats.** *Nutrition* 24: 255-261, 2008.

Pritchett, C.E.; Pardee, A.L.; McGuirk, S.R.; Will, M.J. **Role of nucleus accumbens adenosine-opioid interaction in mediating palatable food intake.** *Brain Research* 1306: 85-92, 2010.

Rebola, N.; Coelho, J.E.; Costenla, A.R.; Lopes, L.V.; Parada, A.; Oliveira, C.R.; Soares-da-Silva, P.; de Mendonça, A.; Cunha, R.A. **Decrease of adenosine A₁ receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats.** *Eur J Neurosci* 18(4): 820-828, 2003.

Rieg, T.; Schnermann, J.; Vallon, V. **Adenosine A₁ receptors determine effects of caffeine on total fluid intake but not caffeine appetite.** *Eur J Pharmacol* 555: 174-177, 2007.

Saravanan, N.; Haseeb, A.; Ehtesham, N.Z.; Ghafoorunissa, X. **Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue.** *Eur J Endocrinol* 153: 159-165, 2005.

Siemelink, M.; Verhoef, A.; Dormans, J.A.M.A.; Span, P.N.; Piersma, A.H. **Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring.** *Diabetologia* 45: 1397-1403, 2002.

Silva, A.P.; Guimarães, D.E.; Mizurini, D.M.; Maia, I.C.; Ortiz-Costa, S.; Sardinha, F.L.; do Carmo, M.G.T. **Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats.** *Lipids* 41: 535-541, 2006.

Silva, A.P.; Nascimento, L.; Osso, F.; Mizurini, D.; Campos, D.; de Martinez, A.M.B.; do Carmo, M.G.T. **Plasma fatty acids, lipid metabolism and lipoproteins in rats fed on palm oil and partially hydrogenated soybean oil.** *Rev Nutr* 18(2): 229-237, 2005.

Soulis, G.; Papalexli, E.; Kittas, C.; Kittraki, E. **Early impact of a fat-enriched diet on behavioral responses of male and female rats.** *Behav Neurosci* 121:483-490, 2007.

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, 2007.

Stender, S.; Dyerberg, J. **Influence of trans fatty acid on health.** *Ann Nutr Metab* 48(2): 61-66, 2004.

Sundram, K.; Hornstra, G.; von Houwelingen, A.C.; Kester, A.D. **Replacement of dietary fat with palm oil: effect on human serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins.** *Br J Nutr* 68(3): 677-692, 1992.

Suzuki, H.; Park, S.J.; Tamura, M.; Ando, S. **Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet.** *Mech Ageing Dev* 60(3): 267-274, 1991.

Thiel, C.M.; Huston, J.P.; Schwarting, R.K. **Hippocampal acetylcholine and habituation learning.** *Neuroscience* 85:1253-1262, 1998.

Tremblay, A.; Masson, E.; Leduc, S. Houde, A.; Despres, J.P. **Caffeine reduces spontaneous energy intake in men but not in women.** *Nutr Res* 8: 553-558, 1988.

van Tol, A.; Zock, P.L.; van Gent, T.; Scheek, L.M. and Katan, M.B. **Dietary *trans* fatty acids increase serum cholesteryl ester transfer protein activity in man.** *Atherosclerosis* 115: 129-134, 1995.

Vega-López, S.; Ausman, L.M.; Jalbert, S.M.; Erkkila, A.T.; Lichtenstein, A.H. **Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects.** *Am J Clin Nutr* 84: 54-62, 2006.

Wainwright, P.E.; Huang, Y.S.; Bulman-Fleming, B.; Lévesque, S.; McCutcheon, D. **The effects of dietary fatty acid composition combined with environmental enrichment on brain and behavior in mice.** *Behav Brain Res* 60(2): 125-136, 1994.

Willett, W.C.; Stampfer, M.J.; Manson, J.E.; Colditz, G.A.; Speizer, F.E.; Rosner, B.A.; Sampson, L.A.; Hennekens, C.H. **Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women.** *Lancet* 341: 581-585, 1993.

Willson, T.M.; Lambert, M.H.; Kliewer, S.A. **Peroxisome proliferator activated receptor gamma and metabolic disease.** *Annual Review of Biochemistry* 70: 341-367, 2001.

Winocur, G.; Greenwood, C.E. **The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats.** *Behav Brain Res* 101: 153-161, 1999.

Wu, A.; Molteni, R.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. **A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor.** *Neuroscience* 119:365-375, 2003.

Yehuda, S. **Omega-6/Omega-3 ratio in brain-related functions.** *World Rev Nutr Diet* 92: 37-56, 2003.

Youdim, K.A.; Martin, A.; Joseph, J.A. **Essential fatty acids and the brain: possible health implications.** *Int J Dev Neurosci* 18(4/5): 383-399, 2000.

Yu, H.; Bi, Y.; Ma, W.; He, L.; Yuan, L.; Feng, J.; Xiao, R. **Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice.** *Int J Dev Neurosci* 28(3): 271-276, 2010.