

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

MARYANE GABRIELA TAVARES

**COMPORTAMENTOS SUGESTIVOS DE ANSIEDADE E DE  
MEMÓRIA EM RATOS: EFEITOS DO ÓLEO DE COCO  
VIRGEM, DO AMBIENTE ENRIQUECIDO E DA  
HIPERALIMENTAÇÃO PRECOCE**

RECIFE

2017

MARYANE GABRIELA TAVARES

**COMPORTAMENTOS SUGESTIVOS DE ANSIEDADE E DE  
MEMÓRIA EM RATOS: EFEITOS DO ÓLEO DE COCO  
VIRGEM, DO AMBIENTE ENRIQUECIDO E DA  
HIPERALIMENTAÇÃO PRECOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Nutrição do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Pernambuco, para obtenção do  
título de Mestre em Nutrição.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ângela Amâncio dos Santos

**Colaboradora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Manuella Batista-de-Oliveira Hornsby

RECIFE

2017

Catalogação na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

T231c	<p>Tavares, Maryane Gabriela. Comportamentos sugestivos de ansiedade e de memória em ratos: efeitos do óleo de coco virgem, do ambiente enriquecido e da hiperalimentação precoce / Maryane Gabriela Tavares. – 2017. 59 f.; il.; tab.; gráf.; 30 cm.</p> <p>Orientadora: Ângela Amâncio dos Santos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.</p> <p>Inclui referências, apêndices e anexos.</p> <p>1. Óleo de palmeira. 2. Hiperfagia. 3. Ansiedade. 4. Memória. I. Santos, Ângela Amâncio dos (Orientadora). II. Título.</p>	
	612.3      CDD (23.ed.)	UFPE (CCS2017-103)

MARYANE GABRIELA TAVARES

**COMPORTAMENTOS SUGESTIVOS DE ANSIEDADE E DE  
MEMÓRIA EM RATOS: EFEITOS DO ÓLEO DE COCO  
VIRGEM, DO AMBIENTE ENRIQUECIDO E DA  
HIPERALIMENTAÇÃO PRECOCE**

Dissertação aprovada em 21/02/2017

---

Prof.<sup>a</sup> Gisélia de Santana Muniz

Departamento de Nutrição / UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Raquel da Silva Aragão

Departamento de Educação Física e Ciências do Esporte / CAV / UFPE

---

Prof. Filipe Silveira Duarte

Departamento de Fisiologia e Farmacologia / UFPE

RECIFE

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, **Marinaldo e Severina**, por toda dedicação, apoio e amor  
ao longo da minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à **Deus** por todas as bênçãos derramadas em minha vida e pela certeza de ter a Vossa presença ao meu lado, me guiando e protegendo em todos os momentos;

Aos meu pais **Marinaldo e Severina**, por acreditar e investir em mim sem medir esforços. Desde sempre me incentivando aos estudos e me apoiando. São a minha base para alcançar cada um dos meus objetivos;

Aos meus irmãos, **Málysson e Pedro**, sempre ao meu lado quando preciso e se alegrando com minhas conquistas;

Ao meu noivo, **Antônio Augusto**, por seu apoio, ajuda, paciência, amor e capacidade de me trazer paz diante das preocupações;

À toda minha **família e amigos**, pelo incentivo e apoio constante;

Às orientadoras **Ângela Amâncio e Manuella Batista**, pela dedicação, orientação e ensinamentos para concretização deste trabalho.

Às “Sobreviventes”, **Débora, Camila e Regina**. Essa parceria, ajuda mútua e confiança de que tudo iria acabar bem tornou a caminhada mais alegre e as dificuldades menos pesadas;

Às estagiárias, **Camila Karina e Camila Vilela**, pela disponibilidade e ajuda durante todos os dias de experimento;

Ao professor **Rubem Guedes** e a todos do laboratório, pelo acolhimento e por disponibilizar o espaço físico e equipamentos do LAFINNT, que foi imprescindível para realização deste trabalho;

Ao professor **Eduardo Lira** e a **Humberto** pela parceria em trabalho desenvolvido;

Ao médico veterinário **Edeone França**, pelos ensinamentos sobre o cuidado com os animais de laboratório;

Ao Programa de Pós-graduação em Nutrição/UFPE e às secretárias do programa de pós-graduação, **Cecília e Neci**, pela disponibilidade;

Ao **CNPq**, pela concessão de bolsa de estudos durante os meses de realização deste trabalho.

*“Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo”*

Provérbios 16:3

## **RESUMO**

As fases iniciais da vida representam um período crítico no desenvolvimento do sistema nervoso. A hiperalimentação durante a lactação tem sido documentada com prejuízos tanto no crescimento inicial, como a saúde física e mental em longo prazo. A nutrição e estímulos decorrentes de vivências ambientais podem ser estratégias para atenuar ou reverter os possíveis efeitos negativos da hiperalimentação precoce. O estudo objetivou avaliar a influência da suplementação com óleo de coco virgem e do ambiente enriquecido em ratos *Wistar* submetidos à hiperalimentação no início da vida sobre parâmetros comportamentais e murinométricos. Foram formados dois grupos: nutrido (nove filhotes por ninhada) e hiperalimentado (H, três filhotes por ninhada). Entre o 7º ao 30º dia pós-natal, os grupos foram subdivididos em tratados com óleo de coco extra virgem (OCV, 10 ml/kg/dia, gavagem) ou veículo. Durante todo o período experimental foi aferido o peso corporal. As respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e à memória foram investigadas entre 31 a 35 e 65 a 70 dias de vida. Ao 36º dia de vida, foram selecionados animais do grupo veículo e submetidos, durante quatro semanas, à experiência em um ambiente enriquecido. Os resultados mostraram que a hiperalimentação alterou o peso corporal, provocando excesso de peso durante todo o período da pesquisa, aumento do índice de massa corpórea, índice de Lee e na relação circunferência abdominal/circunferência torácica. A hiperalimentação e a suplementação com OCV não alteraram o comportamento dos animais jovens. Os animais adultos que haviam sido hiperalimentados apresentaram comportamento semelhante a menor ansiedade; este efeito foi abolido pela suplementação com OCV. A hiperalimentação ocasionou déficits cognitivos, observados na memória de reconhecimento de objetos quanto a forma, em ambas faixas etárias. A suplementação com OCV esteve associada com prejuízo na memória espacial em ratos adultos hiperalimentados precocemente. A experiência no ambiente enriquecido não influenciou os testes de ansiedade, memória e parâmetros murinométricos avaliados. Os resultados indicam que a hiperalimentação reduz o comportamento sugestivo de ansiedade no animal adulto, contudo, leva a déficits cognitivos e altera o peso. O OCV não influencia os parâmetros murinométricos e esteve associado a comportamento semelhante à ansiedade e prejuízos na memória. O ambiente enriquecido parece não interferir nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Óleo de palmeira. Hiperfagia. Ansiedade. Memória.

## **ABSTRACT**

The early stages of life represent a critical period to the nervous system development. Overfeeding during lactation has been documented with impairments in both initial growth and long-term physical and mental health. The nutrition and stimulus from environmental experience may be strategies to mitigate or reverse the possible negative effects of early overfeeding. The objective of this study was to evaluate the influence of the supplementation with extra-virgin coconut oil (VCO) or enriched environment on the behaviour and murimetric parameters of Wistar rats submitted to overfeeding in early life. Animals formed two groups: nourished (nine pups per litter) and overfeeding (three pups per litter). At the post natal days 7<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup>, animals from both nutritional conditions were treated with VCO (10 ml/kg/d, gavage) or vehicle. Body weight measures were obtained overall experimental period. Behavioral responses related to anxiety and memory were investigated between 31 to 35 and 65 to 70 days of life. At 36<sup>th</sup> day of life, animals from the vehicle group were submitted during 4 weeks into an enriched environment. The results show that overfeeding altered body weight, caused overweight throughout the study, increased body mass index, Lee index and the ratio of waist circumference / chest circumference. Overfeeding and VCO supplementation did not alter the behavior of young animals. When adults, the overfeeding group showed a lower anxiety-like behavior, but VCO abolished such this effect. Overfeeding caused cognitive deficits presented in the recognition memory of the objects in terms of form, in both age groups. On the other hand, VCO supplementation was associated with impairing in spatial memory in adults previously overfed rats. The experience in the enriched environment did not influence anxiety, memory and the murimetric parameters evaluated. Results indicate that overfeeding reduces the anxiety-like behavior in the adult animal; however, it leads to cognitive deficits and increase in body weights. The VCO does not influence murimetric data and was associated with a anxiety-like behavior and an impairment of memory. The enriched environment does not seem to interfere with the evaluated parameters.

Keywords: Palm oil. Hyperphagia. Anxiety. Memory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Ambiente enriquecido provoca maior estimulação sensorial, cognitiva e motora .....	20
<b>Figura 2</b> - Distribuição dos grupos experimentais e cronograma experimental .....	26
<b>Figura 3</b> - Gaiola para o ambiente enriquecido .....	28
<b>Figura 4</b> - Alojamento dos animais em ambiente padrão de laboratório e enriquecido. ....	28
<b>Figura 5</b> - Ilustração do teste de reconhecimento de objetos.....	32
<b>Gráfico 1</b> - Evolução do peso corporal dos ratos amamentados em ninhadas com 9 e 3 filhotes .....	33
<b>Tabela 1</b> - Teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto em ratos jovens.....	34
<b>Gráfico 2</b> - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma e localização espacial em ratos jovens .....	35
<b>Tabela 2</b> - Teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto em ratos com 65 a 70 dias de vida.....	36
<b>Gráfico 3</b> - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma e localização espacial em ratos com 65 a 70 dias de vida .....	37
<b>Tabela 3</b> - Dados murinométricos em animais adultos.....	38
<b>Tabela 4</b> - Teste do Labirinto em Cruz elevado (LCE) e Campo Aberto (TCA) em ratos com experiências ambientais diferentes .....	39
<b>Gráfico 4</b> - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma e localização espacial em ratos com experiências ambientais diferentes ....	40
<b>Tabela 5</b> - Dados murinométricos em animais adultos com experiências ambientais diferentes .....	40

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AE** - Ambiente enriquecido

**CA** - Circunferência Abdominal

**CM** - Centímetros

**CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DP** - Desvio Padrão

**G** - Gramas

**H** - Hiperalimentado

**IL** - Índice de Lee

**IMC** - Índice de Massa Corpórea

**KG** - Quilograma

**LCE** - Labirinto em Cruz Elevado

**M** - Metros

**N** - Nutrido

**OCV** - Óleo de Coco Extra Virgem

**PC** - Peso Corporal

**S** - Segundos

**TCA** - Teste de Campo Aberto

**TRO** - Teste de Reconhecimento de Objetos

**UFPE** - Universidade Federal de Pernambuco

**V** - Veículo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	12
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	14
<b>2.1 Desenvolvimento do sistema nervoso .....</b>	14
<b>2.2 Alterações orgânicas causadas pela hiperalimentação.....</b>	15
<b>2.3 Suplementação com óleo de coco.....</b>	17
<b>2.4 Vivência em ambiente enriquecido .....</b>	19
<b>2.5 Memória e comportamento sugestivo de ansiedade .....</b>	20
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	23
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	24
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	24
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	24
<b>5 MÉTODOS.....</b>	25
<b>5.1 Aspectos éticos e delineamento experimental .....</b>	25
<b>5.2 Experimento 1 - Suplementação com óleo de coco extra virgem .....</b>	27
<b>5.3 Experimento 2 - Protocolo do ambiente enriquecido .....</b>	27
<b>5.4 Análise comportamental .....</b>	29
5.4.1 Labirinto em cruz elevado .....	29
5.4.2 Teste no campo aberto.....	30
5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos .....	30
<b>5.5 Avaliação do peso corporal e murinométrica .....</b>	32
<b>5.6 Análise Estatística.....</b>	32
<b>6 RESULTADOS .....</b>	33
<b>6.1 Peso corporal .....</b>	33
<b>6.2 Experimento 1 .....</b>	34
6.2.1 Animais jovens .....	34
6.2.2 Animais adultos .....	36
<b>6.3 Experimento 2 - Vivência em ambiente enriquecido .....</b>	38
6.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado e de Campo Aberto .....	38
6.3.2 Teste de Reconhecimento de objeto .....	39
6.3.3 Dados Murinométricos .....	40
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	41
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	48
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	49
<b>ANEXO .....</b>	59

## 1 INTRODUÇÃO

As fases iniciais da vida, gestação e lactação, representam um período crítico no desenvolvimento do sistema nervoso (DOBBING, 1990; BARKER, 1997). Caracterizam-se por divisão celular e desenvolvimento fisiológico ocorrendo com velocidades máximas, de forma que o sistema nervoso de mamíferos se torna mais vulnerável às demandas ambientais nessas etapas da vida (DOBBING, 1990; BARKER, 1997). Agressões orgânicas no início da vida podem ter efeitos negativos sobre a fisiologia, o metabolismo e, consequentemente, sobre a saúde do indivíduo (DOBBING, 1990; MORGANE et al., 1993). Esses insultos podem inclusive repercutir desfavoravelmente em momentos posteriores da vida. Assim, é relevante estabelecer estratégias que possam atenuar as possíveis consequências deletérias ocorridas no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso central.

Há evidências de que a ingestão alimentar excessiva (hiperalimentação) durante a lactação prejudica tanto o crescimento inicial, como a saúde física e mental em longo prazo (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010; MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012). Estudos realizados com roedores obesos mostraram que estes animais apresentam níveis elevados de citocinas inflamatórias e expressão reduzida do fator neurotrófico derivado do cérebro, principalmente em áreas envolvidas na regulação do humor e formação da memória, como o hipocampo (DINEL et al., 2011; MORRISA et al., 2014) e o córtex (PISTELL et al., 2010; MORRISA et al., 2014). Estes estudos mostram uma correlação positiva entre a expressão de citocinas e prejuízos no comportamento cognitivo e emocional, podendo refletir na memória (ANDRÉ et al., 2014).

Diversas estratégias têm sido sugeridas objetivando reverter os efeitos danosos da hiperalimentação ao organismo. Neste trabalho é proposta a suplementação dietética com óleo de coco extra virgem (OCV). O OCV possui um potencial para restabelecer o equilíbrio antioxidante, devido ao fato de ser rico em polifenóis. É sabido que os polifenóis contribuem para aumentar os níveis de enzimas antioxidantes (DEBMANDAL; MANDAL, 2011), o que reduziria a inflamação e a peroxidação lipídica (YEAP et al., 2015).

Além da nutrição, estímulos positivos decorrentes de vivência em ambiente enriquecido podem induzir a aprimoramentos da memória e da capacidade de aprendizagem (SAMPEDRO-PIQUERO; BEGEGA; et al., 2013). O ambiente enriquecido, na experimentação animal, pode ser definido como uma condição experimental que consiste em

relações sociais, de exercício físico e de interações com objetos estimulantes de forma mais intensa (SAMPEDRO-PIQUERO; BEGEGA; et al., 2013; SAMPEDRO-PIQUERO; ZANCADA-MENENDEZ; et al., 2013; WIDMAN; ROSELLINI, 1990). Isto permite que os animais mudem o seu comportamento para se adaptar ao ambiente (HIRASE; SHINOHARA, 2014), favorecendo mudanças neuroquímicas e neuroanatômicas mensuráveis (MÁRMOL et al., 2015). Os benefícios do ambiente enriquecido são bem documentados no hipocampo e no córtex, áreas cerebrais envolvidas com a memória e a ansiedade (GREENWOOD; PARASURAMAN, 2010; SAMPEDRO-PIQUERO; ZANCADA-MENENDEZ; et al., 2013; MÁRMOL et al., 2015).

Portanto, visto as evidências descritas anteriormente acerca de repercussões fisiológicas da hiperalimentação sobre a saúde, é relevante investigar a relação entre a hiperalimentação e as possíveis alterações comportamentais relacionadas à memória e ansiedade. Por outro lado, é mister indicar estratégias de combate aos prováveis danos fisiológicos decorrentes da hiperalimentação. Nesse contexto, o presente trabalho se propôs a investigar a influência do OCV e a vivência em um ambiente enriquecido sobre parâmetros cognitivos e emocionais de animais induzidos à hiperalimentação durante a lactação.

A realização deste trabalho permitiu ainda a elaboração do artigo “Influência do óleo de coco e do ambiente enriquecido na hiperalimentação precoce sobre a memória e parâmetros murinométricos” que será submetido ao periódico “Life Sciences” conforme objetivo proposto pela presente dissertação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento do sistema nervoso

A ontogenia normal do desenvolvimento neural em roedores é diferente daquela dos seres humanos. Os roedores têm um desenvolvimento considerável no período pós-natal; enquanto que nos humanos, a maturação do sistema nervoso é mais intensa na fase pré-natal (MORGANE et al., 1993; RICE; BARONE JR, 2000). Contudo, as três primeiras semanas de vida pós-natal em ratos pode ser comparada aos últimos meses do período pré-natal em humanos (BAYER et al., 1993). Pois, a sequência do desenvolvimento não varia entre as diferentes espécies de mamíferos (MORGANE et al., 1993; RICE; BARONE JR, 2000).

O encéfalo passa por um enorme crescimento que se inicia na gestação e continua no período pós-natal (MORGANE et al., 1993; RICE; BARONE JR, 2000). Os precursores das células do encéfalo e da medula espinhal, que compõem o sistema nervoso central, começam a se desenvolver cedo na embriogênese através do processo chamado neurulação (RICE; BARONE JR, 2000). As áreas específicas do sistema nervoso central começam a se formar com a neurogênese e migração de células no encéfalo anterior, mesencéfalo e encéfalo posterior (RICE; BARONE JR, 2000). Segue-se uma sequência de processos de desenvolvimento, incluindo a proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e mielinização (RICE; BARONE JR, 2000).

Alterações ocorridas nessa fase podem gerar impactos muito maiores e mais duradouros do que se ocorressem em etapas posteriores da vida. Isto conduziu ao conceito de períodos críticos para o desenvolvimento (BARKER, 1997; DOBBING, 1990; MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012; POPLI; GLADWELL; TSUCHIYA, 2013). No período crítico, ocorrem primeiros alterações permanentes na estrutura; e, em consequência, são afetadas as funções dos órgãos (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012). Há vários exemplos, em modelos de roedores, que comprovam que o ambiente de desenvolvimento pode influenciar de forma persistente a estrutura e função do encéfalo (BOURET, 2010; PLAGEMANN, 2005; SAMUELSSON et al., 2008).

Praticamente todos os animais podem alterar seu comportamento com base em experiência anterior (HOFER et al., 2006). Isso se deve à plasticidade sináptica, que permite o armazenamento e a recuperação de informações; faz com que as conexões existentes entre os neurônios sejam fortalecidas ou enfraquecidas; e, que sinapses sejam formadas ou removidas

(HÜBENER; BONHOEFFER, 2014). A capacidade de plasticidade sináptica e, por consequência, para a aprendizagem e memória não é constante ao longo da vida; normalmente apresenta picos logo após o nascimento e, em seguida, parece reduzir com o passar dos anos (HOFER et al., 2006; HÜBENER; BONHOEFFER, 2014). No entanto, apesar de a plasticidade neuronal ocorrer de forma mais intensa no encéfalo em desenvolvimento, ela não é restrita exclusivamente a esse período (HÜBENER; BONHOEFFER, 2014; RICE; BARONE JR, 2000).

Fatores dietéticos têm sido reconhecidos como importantes modificadores da função e plasticidade cerebral e da saúde mental (BHATIA et al., 2011). Há evidências sobre como a nutrição durante a vida pós-natal pode influenciar a saúde em longo prazo. Tanto a subnutrição, como a hiperalimentação precoce demonstraram ter efeitos prejudiciais sobre o organismo (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012). Uma abordagem para alterar a nutrição durante a vida pós-natal precoce é aumentando ou diminuindo a quantidade de leite consumida por cada filhote. Isto pode resultar em alterações permanentes no peso corporal e nos mecanismos fisiológicos do indivíduo (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012; PLAGEMANN; HARDER, 2005), como descrito a seguir.

## **2.2 Alterações orgânicas causadas pela hiperalimentação**

Nos roedores, o ambiente pós-natal precoce tem consequências fisiológicas e comportamentais ao longo da vida (SPENCER; TILBROOK, 2009). Estudos demonstraram que as condições de aleitamento decorrentes de tamanhos de ninhada extremamente pequenas (3-4 filhotes por ninhada) (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010); ou extremamente grandes (16-18 filhotes por ninhada) (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2012), podem induzir alterações permanentes nos perfis metabólicos de ratos adultos.

Ratos criados em pequenas ninhadas, com apenas três filhotes, são considerados modelo experimental para estudar, tanto em curto, como em longo prazo, as consequências da ingestão alimentar excessiva no início da vida (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010). As ninhadas de tamanho padrão possuem em torno de nove animais. Segundo Mcmillen e cols. (2005), ratos não controlam a ingestão alimentar até o 14º-16º dia de vida pós-natal; eles ingerem leite até atingir o máximo da capacidade do trato gastrointestinal (HOUPT; EPSTEIN, 1973). Esta ingestão abundante pode levar o animal à hiperalimentação, visto que o controle hipotalâmico no início da vida pós-natal ainda não está totalmente estruturado (POZZO MILLER; AOKI, 1992).

Geralmente, esse modelo de redução de ninhada está associado com rápido aumento da deposição de gordura na vida neonatal, seguido por persistência de excesso de peso e hiperfagia ao longo da vida (PLAGEMANN; HARDER, 2005). Na idade adulta, esses animais apresentam tolerância reduzida à glicose, dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e aumento da pressão arterial (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010). Ou seja, a hiperalimentação neonatal se traduz em alterações funcionais e metabólicas complexas, com características semelhantes àquelas da síndrome metabólica em humanos (PLAGEMANN et al., 2010). Hipotetiza-se que este fenótipo complexo pode ser devido à "má programação" dos sistemas neuropeptidérgicos hipotalâmicos, os quais estão envolvidos na regulação do peso corporal e do metabolismo ao longo da vida (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010).

A hiperalimentação e o excesso de peso muitas vezes estão associados a prevalência elevada de alterações emocionais e disfunções cognitivas. Isto frequentemente evolui para prejuízos comportamentais tais como dificuldades de memorização e aumento do comportamento tipo ansiedade (ANDRÉ et al., 2014). Essas disfunções foram observadas tanto em humanos quanto em roedores (MORRISA et al., 2014). Resultados recentes tem associado a obesidade com déficits cognitivos na infância e que parecem persistir ao longo da vida, interferindo no comportamento de escolha, na memória e na tomada de decisão (DAVIDSON; BOUTELLE, 2015; KHAN et al., 2015; ROSS et al., 2015). Além disso, tem-se sugerido que patologias cerebrais que conduzem a doença de Alzheimer e outros tipos de demência cognitiva na velhice podem ter suas origens em fases iniciais da vida (DAVIDSON; BOUTELLE, 2015).

Adicionalmente, estudos experimentais com animais tem mostrado que a obesidade provoca uma inflamação no encéfalo, particularmente nas áreas envolvidas na formação de memória, como o hipocampo (DINEL et al., 2011; MORRISA et al., 2014) e o córtex (MORRISA et al., 2014; PISTELL et al., 2010). Da mesma forma, estudo clínico também tem encontrado uma associação entre a obesidade, inflamação e declínio cognitivo (SWEAT et al., 2008). Estes resultados são importantes, pois o hipocampo não está apenas envolvido na aprendizagem e na memória, mas também no controle da alimentação. Os danos no hipocampo podem aumentar a ingestão de alimentos e resultar em ganho de peso corporal (MORRISA et al., 2014). De fato, a hiperalimentação pode prejudicar a função hipocampal, visto que contribui para o ganho de peso corporal, interferindo com processos de aprendizagem e de memória, podendo criar um ciclo vicioso (MORRISA et al., 2014).

Tem sido também relatado associação entre sobrepeso/obesidade e distúrbios de ansiedade, e que insultos ambientais durante a infância podem predispor ao aparecimento dessa condição (LYKOURAS; MICHOUPOULOS, 2011). Os transtornos de ansiedade estão se tornando prevalente na população mundial (KESSLER; WANG, 2008). Eles estão relacionados a altas taxas de morbimortalidade e a prejuízos na qualidade de vida (LYKOURAS; MICHOUPOULOS, 2011). Apesar disso, os mecanismos fisiológicos e comportamentais associados a esta condição ainda não estão claros (LYKOURAS; MICHOUPOULOS, 2011). Alguns pesquisadores têm encontrado associações positivas entre obesidade e transtornos relacionados à ansiedade (PETRY et al., 2008; ZHAO et al., 2009). Outros relatam não haver qualquer ligação (EJIKE, 2013). A heterogeneidade e multifatoriedade tanto da ansiedade, como da obesidade, podem ser algumas das principais razões para estes resultados controversos (LYKOURAS; MICHOUPOULOS, 2011). Assim, é de extrema relevância estudar a relação causal entre hiperalimentação, desregulação do peso corporal e alterações comportamentais, bem como medidas terapêuticas que possam atenuar os efeitos deletérios decorrentes desses fatores. Abaixo estão descritas duas dessas medidas.

### **2.3 Suplementação com óleo de coco**

O óleo de coco produzido através do método úmido é conhecido como óleo de coco virgem, comercializado, recentemente, como óleo funcional (MARINA; CHE MAN; AMIN, 2009). Testes realizados para determinar o teor de compostos fenólicos no OCV revelaram que estes continham maior teor destes compostos totais em comparação com o óleo de coco refinado (MARINA et al., 2009). O teor fenólico total de VCO (7,78-29,18 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de óleo) é significativamente superior ao do óleo de coco refinado (6,14 mg de equivalentes de ácido gálico / 100 g de óleo) (KRISHNA et al., 2010; DAUQAN et al., 2011; FERNANDO et al., 2015). Ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafético, ácido vanílico, ácido sirígeo, ácido protocatecuico e ácido catequina são os principais ácidos fenólicos encontrados no óleo de coco (MARINA et al., 2009). Além disso, o óleo de coco virgem é rico em ácidos graxos de cadeia média (ASSUNÇÃO et al., 2009; MARINA et al., 2009; YEAP et al., 2015), apresentando diferenças na sua absorção, transporte e catabolismo em relação aos ácidos graxos de cadeia longa (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006). É constituído principalmente pelo ácido graxo saturado láurico (ASSUNÇÃO et al., 2009) e possui boa digestibilidade (MARINA et al., 2009).

Estudos relataram inúmeros benefícios do consumo do coco, incluindo efeitos antiulcerogênico, anti-inflamatório, anti-hipercolesterolêmico, antimicrobiano e hepatoprotetor (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Adicionalmente, os ácidos graxos de cadeia média demonstraram exercer efeito antidepressivo em roedores submetidos ao estresse de natação forçada (SHINOHARA et al., 2013; YEAP et al., 2015). Isto foi observado pela redução significativa no tempo de imobilidade, sugerindo um valor potencial do óleo de coco virgem no combate aos sintomas semelhantes a estresse e depressão (SHINOHARA et al., 2013; YEAP et al., 2015).

Não há diferença significativa no teor de ácidos graxos entre OCV e óleo de coco refinado, todos contendo 92% de ácidos graxos saturados, 6% de ácidos graxos insaturados monoinsaturados e 2% de ácidos graxos insaturados poli-insaturados (FERNANDO et al., 2015). No entanto, o VCO mostrou efeitos benéficos maiores do que o óleo de coco refinado na redução dos níveis de lipídios no soro e nos tecidos e na redução da oxidação de LDL por oxidantes fisiológicos. Esta propriedade de VCO pode ser atribuída aos componentes biologicamente ativos de polifenóis presentes no óleo (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004). Outros trabalhos têm evidenciado que o óleo de coco virgem é capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes quando suplementado em dietas de roedores (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Foi sugerido que o conteúdo de compostos fenólicos do OCV pode contribuir para o aumento do nível sérico da enzima antioxidante superóxido dismutase no soro e encéfalo (YEAP et al., 2015) e à redução da peroxidação lipídica no soro, coração, fígado e rim (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; YEAP et al., 2015). A restauração de níveis de antioxidantes no encéfalo pode ajudar a evitar danos neuroniais (BORSONELO; SUCHECKI; CALIL; et al., 2011; YEAP et al., 2015). Considerando que OCV é capaz de aumentar a concentração de omega-6 e omega-9 no córtex cerebral e hipocampo de ratos, esse óleo parece apresentar, também, propriedades neuroprotetoras (BORSONELO; SUCHECKI; GALDURÓZ, 2011).

Em adição, investigações têm sugerido que compostos fenólicos existentes em alimentos, como aqueles presentes no óleo de coco virgem e extra virgem, podem ajudar a diminuir a ansiedade e a melhorar a memória e a cognição em roedores (JOSEPH; SHUKITT-HALE; CASADESUS, 2005; SÖNMEZ et al., 2007) e em humanos (JOSEPH et al., 2005; KRIKORIAN et al., 2012; SÖNMEZ et al., 2007). Pois, o estresse oxidativo induz a danos em regiões como hipocampo e córtex, as áreas responsáveis pela ansiedade e memória, causando prejuízos comportamentais (PATKI et al., 2015).

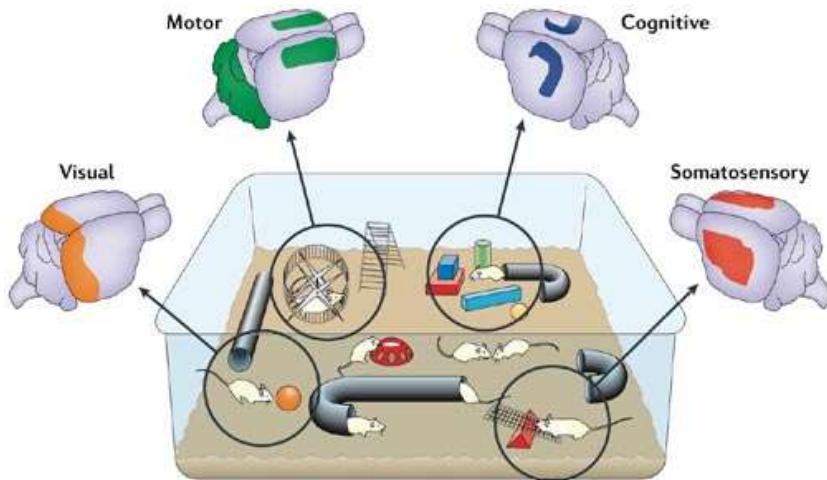
No entanto, há também estudo que indica que o consumo de dietas ricas em gordura pode estar associado com inflamação no cérebro, com aumento da expressão das citocinas inflamatórias no hipotálamo (MARIC; WOODSIDE; LUHESHI, 2014). Isto está diretamente relacionado com o conteúdo de gordura saturada da alimentação (MARIC; WOODSIDE; LUHESHI, 2014). Em relação à memória, Granholm et al. (2008) sugerem que a gordura saturada (óleo de coco hidrogenado) pode afetar a memória e a morfologia do hipocampo. Ratos que ingeriram o óleo de coco hidrogenado cometem mais erros quando avaliados pelo teste do labirinto aquático radial (GRANHOLM et al., 2008). Isto pode estar associado ao fato de que dietas ricas em gordura dão origem a níveis mais baixos do fator neurotrófico derivado do cérebro na formação do hipocampo e do córtex cerebral (GRANHOLM et al., 2008). O fator neurotrófico também tem demonstrado exercer efeitos anti-inflamatórios diretos no sistema nervoso central (GRANHOLM et al., 2008).

#### **2.4 Vivência em ambiente enriquecido**

Alterações permanentes no comportamento também podem ser produzidas por experiências vividas, muitas das quais podem ter ocorrido em determinados períodos críticos do desenvolvimento (HALL; PERONA, 2012; KOLB et al., 2013). Uma maneira simples de manipular essa experiência é comparando animais colocados em ambientes diferentes, sendo o modelo do ambiente enriquecido considerado útil para o estudo da plasticidade cerebral (HALL; PERONA, 2012; KOLB et al., 2013).

A plasticidade e a adaptação comportamental são profundamente influenciadas pelas experiências vivenciadas no período perinatal (HIRASE; SHINOHARA, 2014). O ambiente enriquecido pode induzir mudanças comportamentais significativas, assim como alterações neuroquímicas e neuroanatômicas, produzindo melhorias duradouras em tarefas de memória e de aprendizagem (MÁRMOL et al., 2015). Incorpora maior estimulação sensorial, cognitiva e motora; além de exercer efeito ansiolítico (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Figura 1.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 1 - Ambiente enriquecido provoca maior estimulação sensorial, cognitiva e motora.**  
Fonte: Nithianantharajah and Hannan. Nature Reviews Neuroscience 7, 697–709 (September 2006) | doi:10.1038/nrn1970.

O hipocampo e o córtex, regiões envolvidas com diversas funções cognitivas, são algumas das áreas mais susceptíveis aos efeitos do ambiente enriquecido (MÁRMOL et al., 2015). Isto demonstra que a substituição da habitação padrão de laboratório por gaiolas maiores, contendo número maior de roedores e objetos estimulantes, está relacionada a alterações em estruturas neurais e melhora de desempenho (GREENWOOD; PARASURAMAN, 2010). Estudo avaliando os efeitos antioxidantes produzidos por ambiente enriquecido, encontraram que este protocolo reduz marcadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex cerebral, e otimiza as ações antioxidantes (MÁRMOL et al., 2015).

## 2.5 Memória e comportamento sugestivo de ansiedade

Há consenso na literatura sobre o papel do hipocampo de mamíferos nos processos de aprendizagem e de memória (SQUIRE, 1992). A memória pode ser classificada como memória de curta e de longa duração. A memória de curto prazo detém uma capacidade muito limitada para armazenar informações; enquanto que a de longo prazo possui capacidade essencialmente ilimitada (EYSENCK, 1988). A memória de longa duração pode ser dividida em memória não-declarativa (implícita) e memória declarativa (explícita) (SQUIRE, 1992). A memória não-declarativa está relacionada ao processo de aquisição de habilidades, sobretudo motoras e ao desenvolvimento de hábitos de estímulo-resposta (SALMON; BUTTERS, 1995). A memória declarativa inclui memória para rostos, *layouts* espaciais, trazendo uma

imagem lembrada à mente ao invés de verbalizar (SQUIRE, 1992). O tipo de memória espacial envolve o conhecimento da localização dentro de um contexto ambiental, com a capacidade de codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas (BANNERMAN et al., 2014; KESSELS et al., 2001).

Em 1987, Ennaceur e Delacour desenvolveram uma tarefa de reconhecimento de objeto com base na tendência espontânea e natural do animal para explorar a novidade (ENNACEUR; DELACOUR, 1987). O teste não envolve o uso de reforço e não requer qualquer treinamento, o que torna muito prático para uma variedade de estudos. Essa tarefa envolve a memória, que se compara à observada na vida cotidiana humana (ENNACEUR et al., 2005). Nesta tarefa, os ratos são colocados, individualmente, em uma arena aberta e expostos por um período limitado de tempo a dois objetos idênticos (fase de amostra); depois, voltam para sua gaiola. Decorrido um determinado tempo, os ratos retornam à arena. Dessa vez, eles são expostos a dois objetos diferentes (fase de escolha), um idêntico àquele anteriormente encontrado na fase de amostra (objeto familiar); e, o outro, diferente (representa a novidade). Em outra versão da tarefa, é avaliada a memória de reconhecimento de objeto quanto à localização. Nesta tarefa, os ratos estão expostos, na fase de escolha, a dois objetos idênticos. Da segunda vez que os animais são colocados na arena, os objetos permanecem os mesmos, mas um deles terá sido movido para uma nova localização dentro da arena (ENNACEUR; DELACOUR, 1987; ENNACEUR et al., 2005).

A ansiedade é definida como uma resposta normal, adaptativa, que evolui de modo a impedir que o indivíduo se envolva em situações potencialmente perigosas. É a resposta primária a um perigo (BANNERMAN et al., 2014; CRYAN; HOLMES, 2005). Diferencia-se do medo, que é a resposta a um perigo iminente, uma ameaça real. A ansiedade está associada a um conflito ou insegurança, e surge quando o indivíduo está diante de uma concorrência entre objetivos ou escolhas de resposta (BANNERMAN et al., 2014).

Visto que os mesmos sistemas neurobiológicos medeiam a ansiedade normal e patológica, modelos animais de transtornos de ansiedade têm aproveitado o conhecimento dos padrões de comportamento naturais de roedores para desenvolver tarefas comportamentais (CRYAN; HOLMES, 2005). Os roedores possuem uma aversão inata para exposição a espaços bem iluminados, originada da defesa contra a predação. Essa área aversiva assume diferentes formas em diferentes testes: braços elevados abertos (labirinto em cruz elevado), quadrantes elevados abertos (labirinto em zero elevado), um compartimento de luz (teste de

exploração claro/escuro), ou a área central de um campo aberto iluminado (teste de campo aberto); sendo esse último também útil para avaliar atividade locomotora (CRYAN; HOLMES, 2005; KALUEFF; TUOHIMAA, 2004).

No teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é bem demonstrado o conflito emocional existente. Consiste em um labirinto em forma de cruz, elevado do solo, formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos perpendiculares aos primeiros. Nele, o animal é obrigado a escolher se deseja explorar os braços abertos do labirinto, que são potencialmente perigosos, mas também potencialmente gratificantes; ou, ficar em segurança, nos braços fechados (BANNERMAN et al., 2014). De forma semelhante, o teste de campo aberto (TCA), constituído por uma arena com seu contorno fechado por paredes e região central livre, oferece liberdade ao animal de explorá-la. A preferência do animal pela periferia do campo aberto, ou seja, próximo às paredes, ao invés da área central (mais exposta), é considerada como comportamento sugestivo de ansiedade (SIMPSON; KELLY, 2011). Em ambos os testes, outro parâmetro indicador de comportamento sugestivo de ansiedade é o elevado número ou volume de bolos fecais (SIMPSON; KELLY, 2011).

Diante das evidências de que a hiperalimentação na infância provoca alterações fisiológicas que perduram em fases posteriores da vida, tem-se questionado sobre as possíveis alterações comportamentais associadas. Concomitantemente, há relatos de que o consumo do OCV beneficia o funcionamento encefálico, embora pouco se saiba sobre o seu papel em aprimorar o comportamento animal. Quanto ao ambiente enriquecido, há vários estudos, mas poucos se dedicaram a investigar seus efeitos na vigência de hiperalimentação precoce. Portanto, a abordagem proposta neste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com OCV e a vivência em um ambiente enriquecido sobre parâmetros comportamentais sugestivos de ansiedade e memória em ratos precocemente hiperalimentados.

### 3 HIPÓTESE

A hiperalimentação durante o aleitamento pode aumentar as medidas murinométricas, provocar comportamento semelhante à ansiedade e comprometimentos na memória de ratos. A suplementação com óleo de coco extra virgem (OCV) ou a exposição a um ambiente enriquecido podem atenuar ou reverter os possíveis efeitos deletérios da hiperalimentação precoce sobre aqueles aspectos físicos e comportamentais. Quanto a este último fator, o OCV e o ambiente enriquecido podem induzir ações ansiolíticas e benefícios à memorização.

## 4 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar as possíveis influências da suplementação com o óleo de coco extra virgem ou de um ambiente enriquecido em ratos *Wistar* jovens e adultos submetidos à hiperalimentação no início da vida sobre parâmetros comportamentais sugestivos de ansiedade e memória.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos da hiperalimentação, do óleo de coco extra virgem ou do ambiente enriquecido sobre parâmetros murinométricos;
- Analisar os comportamentos semelhantes à ansiedade e a memória em ratos jovens e adultos hiperalimentados durante o aleitamento e suplementados com óleo de coco extra virgem;
- Observar os comportamentos semelhantes à ansiedade e a memória em animais adultos submetidos à hiperalimentação durante o aleitamento e a habitação em um ambiente enriquecido.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Aspectos éticos e delineamento experimental

Os cuidados com os animais foram realizados de acordo com o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, respeitando as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os experimentos foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE, processo nº 23076.048535/2015-78 (Anexo A).

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Esses animais foram mantidos sob condições padrão de biotério, em sala com temperatura controlada ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ), submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando-se às 18:00 h e terminando às 6:00 h), com acesso livre à água e à comida. Inicialmente, após o nascimento, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos nutricionalmente distintos: 1) **Nutridos** (N), constituído por ninhadas de tamanho padrão, contendo 9 (nove) filhotes; 2) **Hiperalimentados** (H), cada ninhada era formada por 3 (três) filhotes (Figura 2). A metodologia usada para a redução da ninhada (obtenção do grupo hiperalimentado) foi baseada na descrição de Plagemann e Harder (2005). De acordo com estes autores, é necessário um período de três dias para a rata ajustar a produção lactífera ao tamanho da sua ninhada, que geralmente é maior do que três filhotes. Ela mantém essa produção durante todo o aleitamento. Assim, quando a ninhada é reduzida após esse período, os filhotes têm uma disponibilidade de leite aumentada. Durante a lactação, cada ninhada permanecia com o número de animais estipulados. Caso o número de filhotes machos fosse insuficiente, a ninhada era completada com fêmeas durante a lactação, permanecendo apenas os machos após o desmame. Posteriormente, os animais de cada condição N e H foram subdivididos nos demais grupos experimentais, conforme apresentado na Figura 2.

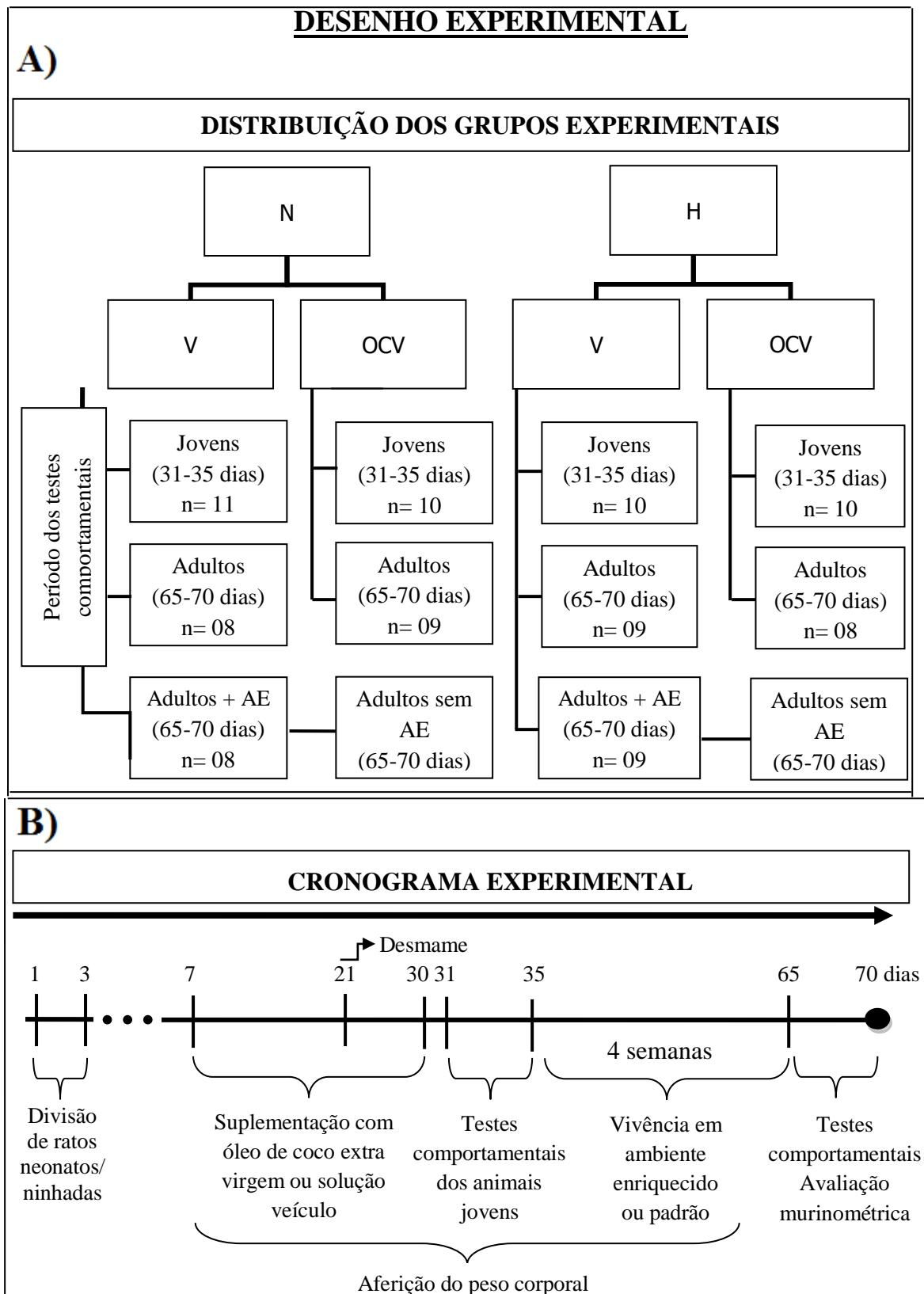


Figura 2 – Distribuição dos grupos experimentais (A) e cronograma experimental (B). Os animais foram distribuídos em grupo Nutrido (N), formado por ninhadas de 9 filhotes/rata; e grupo Hiperalimentado (H), obtido por redução da ninhada para 3 filhotes/rata. Em cada condição nutricional, os filhotes foram subdivididos em suplementados por gavagem com óleo de coco extra virgem (OCV) ou solução veículo (V). Esse tratamento ocorreu do 7º ao 30º dia de vida. Ao término,

foram realizados os testes comportamentais nos animais jovens. Em seguida, foram selecionados animais dos subgrupos V para uma vivência em ambiente enriquecido (AE) durante quatro semanas. Após esse período, todos os grupos de animais adultos foram submetidos a testes comportamentais e a avaliação murinométrica.

### **5.2 Experimento 1 - Suplementação com óleo de coco extra virgem**

A partir do 7º até o 30º dia de vida, em cada grupo experimental (N ou H), os filhotes foram submetidos a tratamentos diários de suplementação por gavagem com óleo de coco extra virgem (OCV; 10 ml/kg/dia do óleo; COPRA®, Maceió, Alagoas) ou com solução veículo (V). Conforme informações da COPRA® (Maceió, Alagoas), a composição do óleo de coco extra virgem é a mesma do óleo de coco virgem, diferenciando apenas a região do coco onde é feita a extração. A dose de OCV (10 ml/kg/dia) foi escolhida com base em estudos prévios que mostravam que esta dose foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em ratos hipertensos (ALVES et al., 2015); apresentou ação hepatoprotetora (ZAKARIA et al., 2011); além de ser a única, segundo nossa pesquisa da literatura, que estava relacionada com teste comportamental (YEAP et al., 2015). No trabalho de Yeap et al. (2015), foi demonstrado que essa dose de suplementação com OCV promovia efeito anti-estresse durante o teste de natação forçada. O veículo consistia de uma solução aquosa de cremophor a 0,009% (Sigma), solvente orgânico utilizado para preparo da solução à base de óleo de coco (diluição na proporção OCV:V de 1:1). O OCV é constituído dos seguintes ácidos graxos saturados em %/100g: C 6:0 caprônico (0,38), C 8:0 caprílico (5,56), C 10:0 cáprico (4,99), C 12:0 láurico (45,78), C 14:0 mirístico (18,56), C 16:0 palmítico (8,85), C 18:0 esteárico (3,39); e ácidos graxos poli-insaturados: C 18:1 Ômega 9 – oleico (5,65) e C 18:2 Ômega 6 – linoleico (0,94).

### **5.3 Experimento 2 - Protocolo do ambiente enriquecido**

A partir do 36º dia de vida, animais de ambas as condições nutricionais (N e H) e tratados com o veículo foram submetidos ao protocolo do ambiente enriquecido. Foi utilizada uma gaiola enriquecida (Figura 3) que consistia em uma caixa de acrílico grande (100 cm de comprimento x 60 cm de largura x 35 cm de altura), com um primeiro andar, alojando oito animais (ANDIN et al., 2007). Os animais passavam um período de três horas, durante quatro semanas nessa gaiola, conforme adaptado da metodologia descrita por Widman e Rosellini (1990) e Sampedro-Piqueiro e cols. (2013). O alimento e a água foram ofertados no andar superior e térreo, respectivamente. As gaiolas possuíam vários objetos estimulantes como brinquedos, roda de corrida, casa de brinquedo, bolas, tubos de plástico de diferentes

diâmetros, entre outros (Figura 4). Para assegurar a presença de um componente novo, a configuração das gaiolas era modificada uma vez por semana. Os demais animais que não foram submetidos ao ambiente enriquecido permaneceram em gaiolas padrão para roedores, de polietileno, com dimensões 45 cm de comprimento x 30 cm de largura x 15 cm de altura, alojando três ou quatro ratos (Figura 4). Após as quatro semanas em que os animais viveram a experiência em ambiente enriquecido, esses e todos os demais animais foram submetidos a realização aos testes comportamentais.



Figura 3 – Gaiola para o ambiente enriquecido.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 4 – Alojamento dos animais em ambiente padrão de laboratório e enriquecido.

A – Ambiente padrão para ratos. B – Ratos em sessão com ambiente enriquecido.

\*Escala no canto inferior esquerdo da imagem: 30 cm. Fonte: AE elaborada pela autora.

## 5.4 Análise comportamental

No dia de cada experimento, os animais foram colocados na sala experimental e permaneceram por 30 minutos antes do início do teste, para adaptação ao novo ambiente. As análises comportamentais foram realizadas em dois momentos, o primeiro quando jovens (entre 31-35 dias de vida) e o segundo na idade adulta (entre 65 e 70 dias de idade). Em cada momento foram seguidas as mesmas sequências dos testes descritos abaixo.

Os testes foram sempre realizados no horário da manhã, em conformidade com o ciclo de iluminação do biotério. A intensidade da luminosidade no teste de labirinto em cruz elevado foi: 205 lux nos braços abertos, 53 lux nos braços fechados e 135 lux no centro do aparato. No teste de campo aberto, intensidade da luminosidade foi de 151 lux.

### 5.4.1 Labirinto em cruz elevado

O teste consistiu em colocar o animal em um labirinto em cruz elevado (LCE), construído todo de madeira, 55 cm erguido do solo, contendo dois braços fechados por paredes e dois abertos perpendiculares aos primeiros. Ambos os braços possuem 49 cm de comprimento e 10 cm de largura, os braços fechados possuem 45 cm de altura; a dimensão da área central foi de 10 x 10 cm (DA SILVA FRANCISCO; GUEDES, 2015).

O animal foi colocado no centro do aparato com o focinho voltado para um dos braços abertos, sendo permitida a exploração livre por 5 minutos. Após cada teste, utilizou-se álcool a 70% para eliminação de pistas olfativas. Nesse teste foram avaliados o número de entradas e o tempo gasto pelo animal nos braços abertos e fechados. Esses parâmetros comportamentais foram utilizados como os principais indicadores de comportamentos relacionados à ansiedade. Quanto menor o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, maior o comportamento do tipo ansioso (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW & FILE, 1986).

As sessões foram filmadas com uma câmara de vídeo instalada no teto e em seguida analisadas as categorias comportamentais identificadas e registradas através do programa *ANY MAZE*, que consistiu em:

- Distância percorrida (m)
- Tempo de imobilidade (s)
- Número de entradas nos braços abertos e fechados (foi considerada uma entrada quando o animal entrou com as quatro patas no braço);

- d) Tempo gasto nos braços abertos (s);
- e) Tempo gasto na área central (s).

#### 5.4.2 Teste no campo aberto

O procedimento foi realizado 48 horas após a realização do teste LCE. Para esse teste, os animais foram colocados, individualmente, por 5 minutos, em uma arena circular. O aparato consiste em um campo aberto (89 cm de diâmetro e 52 cm de altura), cujas paredes de madeira formam um círculo e a superfície é dividida em 3 zonas: central, intermediária e periferia. Durante os 5 minutos de teste, foram avaliadas medidas de locomoção e de atividades exploratórias, tais como: distância percorrida (m), tempo de imobilidade (s), número de entradas no centro da arena, tempo de permanência no centro da arena (s) (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004; LISTER, 1990; SIMPSON; KELLY, 2011)

O comportamento foi registrado utilizando uma câmera de vídeo e analisado com o auxílio do programa ANY MAZE. A cada intervalo entre testes de diferentes animais, utilizou-se álcool a 70% na superfície da arena com o intuito de eliminar quaisquer pistas olfativas.

#### 5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos

Após 24 h de realização do teste de campo aberto, os animais realizaram o teste de reconhecimento de objetos (TRO). Foram avaliadas as diferenças entre os grupos quanto à capacidade de identificação de objetos. O teste foi feito em dois dias consecutivos; no primeiro dia foi investigada a distinção de objetos em relação à sua forma e no segundo dia quanto à sua localização espacial na arena.

A primeira etapa do TRO consistiu em colocar animais para explorar por 5 minutos o ambiente com dois objetos idênticos. Passados 50 minutos, os animais foram novamente colocados na mesma arena por 5 minutos. Nessa segunda etapa, a capacidade do animal em reconhecer a forma ou a localização espacial dos objetos foram avaliadas, trocando-se um dos objetos por outro novo, com características diferentes. Se diante dos dois objetos, um conhecido (da etapa anterior) e outro “novo” (seja na forma ou na posição), o rato reconhecer o objeto apresentado na primeira análise, ele, então, passará mais tempo explorando o objeto “desconhecido (novo)”, demonstrando assim reconhecimento de objetos “familiar versus novo” (VIANA et al., 2013). Para minimizar a influência de preferências naturais para determinados objetos ou materiais foram escolhidos objetos feitos de vidro, com

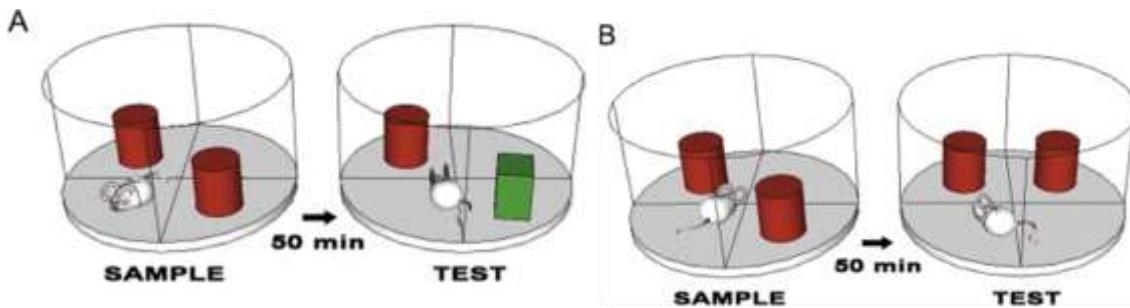
características semelhantes, tais como, cheiro, textura, grau de transparência, peso, comprimento. Entre cada etapa, os objetos e o campo aberto foram limpos com álcool 70% para remover pistas olfativas que pudessem interferir no ensaio seguinte.

No primeiro dia foi avaliada a discriminação da forma: dois objetos idênticos (A e B) foram posicionados na arena para a primeira análise. Após 50 minutos, os animais foram recolocados no campo aberto (segunda sessão) com o mesmo objeto A (conhecido), porém, o objeto B substituído por outro C (desconhecido), da mesma cor, tamanho e cheiro do objeto A, mas com uma forma diferente. O animal, então, diferenciará as formas quando, nessa segunda sessão, passar mais tempo explorando o objeto com a forma desconhecida (VIANA et al., 2013) (Figura 5A).

No segundo dia, foi analisada a capacidade de localização espacial: dois objetos idênticos (A e B) foram colocados em determinadas posições no campo aberto. Passados 50 minutos, os animais foram novamente colocados no campo aberto (segunda sessão) na presença dos mesmos objetos (A e B), todavia, neste segundo momento a posição de A se manteve (posição conhecida), e a localização de B foi modificada. O animal distingue uma posição desconhecida quando ele gasta mais tempo explorando o objeto nessa posição (VIANA et al., 2013) (Figura 5B).

Para a análise do comportamento no reconhecimento de objeto, foram utilizados dados referentes ao índice de discriminação (%), fundamentado no tempo de exploração do objeto novo (quanto à forma ou localização) dividido pelo tempo total gasto na exploração de ambos os objetos (antigo e novo). Fórmula: índice de discriminação (%) = [tempo no objeto novo ÷ (tempo no objeto antigo + novo)] × 100 (AKKERMAN et al., 2012; GAINESY et al., 2016).

Após a realização dos testes, os vídeos foram analisados com o auxílio do programa “ANY MAZE” e a exploração ativa de um objeto foi definida quando o animal cheirava ou tocava o objeto com o focinho e/ou com as patas dianteiras. Caso o animal sentasse sobre o objeto ou o derrubasse, não foi considerado como um comportamento exploratório (DERE et al., 2005; O’CALLAGHAN, et al., 2007; MELLO et al., 2008).



**Figura 5** - Ilustração do teste de reconhecimento de objetos. Foram avaliadas as diferenças na capacidade de identificação de objetos. **A** - Primeiro dia em relação à sua forma. **B** - Segundo dia em relação à localização na arena.

Fonte: Viana et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: Stereological analysis and three dimensional morphometry. *Neuroscience*, v. 238, p.280–296, 2013.

### 5.5 Avaliação do peso corporal e murinométrica

O peso corporal foi obtido semanalmente, a partir do sétimo dia de vida pós-natal até o final o experimento. Utilizou-se balança eletrônica de semi-precisão (FILIZOLA - Balança MF 3/1-, Brasil).

Após a finalização dos testes comportamentais dos animais adultos, o comprimento corpóreo (focinho-anal), a circunferência torácica (CT) e abdominal (CA) foram aferidos com uma fita métrica para análise de parâmetros murinométricos, conforme descrito a diante:

- Índice de Massa Corpórea (IMC): peso corporal (g) / comprimento corpóreo<sup>2</sup> (cm<sup>2</sup>) (NOVELLI et al., 2007).
- Índice de Lee: raiz cúbica do peso corporal (g) /comprimento corpóreo (cm) (NOVELLI et al., 2007).
- Relação CA/CT (cm) (NOVELLI et al., 2007).

Os parâmetros acima foram utilizados como um instrumento de avaliação da gordura corporal em ratos, bem como um indicador de alterações lipêmicas (NOVELLI et al., 2007).

### 5.6 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e analisados estatisticamente utilizando o software SigmaStat 3.5. Os dados murinométricos, a avaliação dos comportamentos tipo ansiedade e memória foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foram analisados através da ANOVA de duas vias,

seguida do teste para comparações múltiplas Holm-Sidak. As diferenças foram estatisticamente significantes quando  $P<0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Peso corporal

Nos quatro grupos, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do tamanho da ninhada sobre o peso corporal ao longo do tempo. Os animais H apresentaram pesos corporais maiores em comparação ao grupo N nos seguintes dias: 7 ( $F_{(3,43)} = 19,249$ ;  $P<0,001$ ), 14 ( $F_{(3,43)} = 81,977$ ;  $P<0,001$ ), 21 ( $F_{(3,43)} = 108,222$ ;  $P<0,001$ ), 30 ( $F_{(3,43)} = 50,790$ ;  $P<0,001$ ) e 60 ( $F_{(3,43)} = 10,780$ ;  $P=0,002$ ). Os grupos que receberam suplementação com OCV não apresentaram alteração no peso corporal nas idades avaliadas (Gráfico 1).

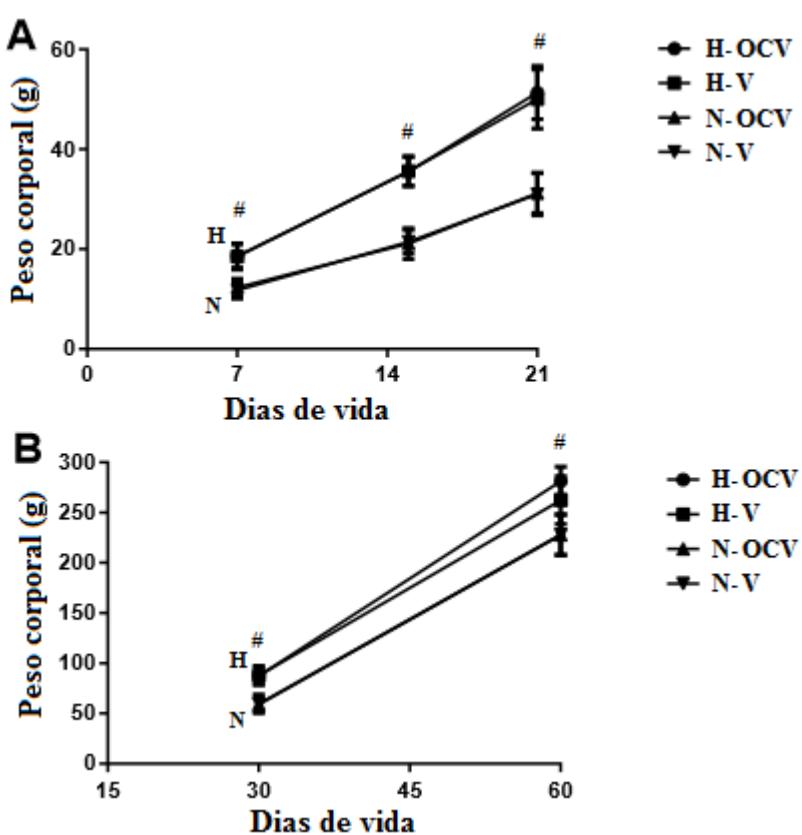


Gráfico 1. Evolução do peso corporal dos ratos amamentados em ninhadas com 9 e 3 filhotes (condição N e H, respectivamente). (A) Peso corporal do 7º ao 21º dia de vida. (B) Peso corporal do 30º ao 60º dia de vida. Os dados estão representados em média ± DP (10 ratos/grupo). #Diferença entre os grupos N e H (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem 10 ml/kg/dia. V: solução veículo.

## 6.2 Experimento 1

### 6.2.1 Animais jovens

#### 6.2.1.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado e de Campo Aberto

O comportamento dos ratos jovens no LCE não foi afetado significativamente pelo tamanho da ninhada durante o período de lactação, nem pela suplementação. Contudo, não houve interação entre os dois tratamentos. Em relação ao TCA, os ratos do grupo N-OCV apresentaram menor atividade locomotora, a julgar pela menor distância percorrida em relação ao N-V ( $F_{(3,37)} = 10,017; P=0,003$ ; Tabela 1).

Tabela 1 - Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e de campo aberto (TCA) em ratos jovens. Os animais foram provenientes de ninhadas com 9 ou 3 filhotes (N e H, respectivamente) e subdivididos em suplementados com óleo de coco extra virgem (10 ml/kg/dia, por gavagem) ou veículo. Os dados são representados em média ± DP. \*Diferença entre suplementação com V e OCV (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem. V: solução veículo.

Testes comportamentais	Grupos experimentais			
	N - V (n=11)	H - V (n=10)	N - OCV (n=10)	H - OCV (n=10)
<b>LCE</b>				
Distância total percorrida (m)	13,37 ±1,23	13,30 ±2,22	11,38 ±1,03	11,54 ±1,11
Tempo de imobilidade (s)	35,58 ±16,64	35,03 ±8,07	47,72 ±13,92	40,45 ±11,74
Nº de entradas no braço aberto	8,64 ±3,04	7,50 ±2,27	8,90 ±2,47	8,70 ±1,70
Tempo no braço aberto (s)	50,53 ±15,13	32,55 ±9,28	48,19 ±14,79	44,21±8,16
Tempo no centro (s)	33,98 ±11,58	36,61 ±9,83	36,93 ±5,60	49,81±12,44
Nº de entradas no braço fechado	11,82 ±2,89	13,30 ±2,26	9,50 ±2,42	9,30 ±2,11
<b>TCA</b>				
Distância total percorrida (m)	28,50 ±4,06	28,16 ±3,59	23,45 ±2,46*	30,39 ±4,28
Tempo de imobilidade (s)	28,09 ±18,32	17,04 ±6,54	21,96 ±7,80	15,56 ±5,67
Nº de entradas na área central	8,18 ±3,97	9,20 ±2,53	6,60 ±2,95	7,40 ±1,26
Tempo na área central (s)	18,92 ±8,27	18,76 ±4,08	15,13 ±4,82	16,65 ±6,61

m - metros; s - segundos.

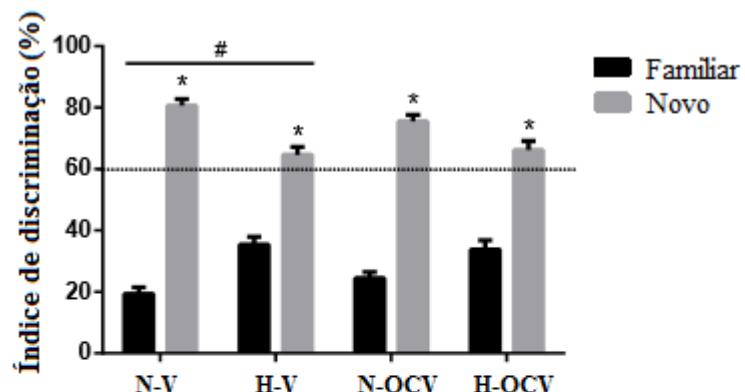
#### 6.2.1.2 Teste de Reconhecimento de objeto

No que se refere ao desempenho dos animais nos testes relacionados à memória, a análise demonstrou que os animais tiveram a memória preservada, apresentando um índice de discriminação acima de 60%, exceto o grupo H-V em relação à memória espacial (Gráfico

2B). Mesmo assim, todos os grupos exploraram mais o objeto novo/deslocado *versus* familiar/estacionário ( $P<0,0001$ ).

Na tarefa de reconhecimento do formato do objeto, a análise indicou diferença quanto ao objeto novo entre os grupos com tamanhos da ninhada distintos. O grupo H-V apresentou um prejuízo no reconhecimento do objeto alterado em relação ao controle (H-V ( $66,03 \pm 7,59\%$ ) *versus* N-V ( $80,66 \pm 6,96\%$ ),  $F_{(3,37)} = 6,407$ ;  $P=0,016$ ). Gráfico 2A.

#### A) Reconhecimento de formato



#### B) Reconhecimento de localização espacial

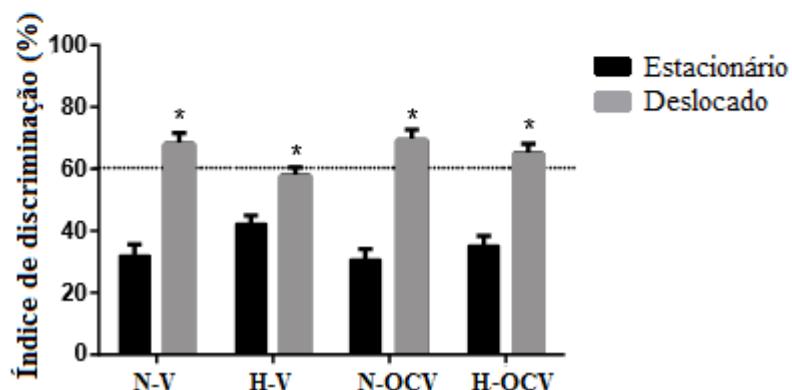


Gráfico 2 - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma (A) e localização espacial (B) em ratos jovens. Os animais foram amamentados em condições normais (N) ou de indução à lactação excessiva (H) e suplementados, por gavagem, com óleo de coco extra virgem (10 ml/kg/dia), ou veículo. Os dados são representados em média  $\pm$  DP. #Diferença intergrupo (N-V *versus* H-V). \*Diferença intragrupo (novo *versus* familiar e estacionário *versus* deslocado) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem. V: solução veículo.

## 6.2.2 Animais adultos

### 6.2.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado e de Campo Aberto

Ao 65º dia de vida, o comportamento dos ratos no LCE foi afetado significativamente pelo estado nutricional, induzido por alteração no número de filhotes por ninhada. O grupo H apresentou comportamento de menor grau de ansiedade, observado pelo maior número de entradas nos braços abertos (*N-V versus H-V*,  $F_{(3,30)} = 14,102$ ;  $P<0,001$ ). Entretanto, ratos H-OCV apresentaram um número de entradas nos braços abertos menor que os H-V ( $F_{(3,30)} = 14,102$ ;  $P<0,001$ ). Também foi evidenciado um menor número de entradas nos braços fechados no grupo N-OCV em relação ao N-V e H-OCV ( $F_{(3,30)} = 13,117$ ;  $P=0,001$ ). No TCA, não foram observadas diferenças significativas. Os dados comportamentais estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e de campo aberto (TCA) em ratos com 65 a 70 dias de vida. Durante a lactação os ratos foram amamentados em ninhadas com 9 ou 3 filhotes (condição N e H, respectivamente) e subdivididos conforme a suplementação, por gavagem, com óleo de coco extra virgem (10 ml/kg/dia) ou veículo. Os dados são representados em média  $\pm$  DP. #Diferença entre as condições N e H.

\*Diferença entre suplementação com V e OCV (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ).

N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem. V: solução veículo.

Testes comportamentais	Grupos experimentais			
	N - V (n=08)	H - V (n=09)	N - OCV (n=09)	H - OCV (n=08)
<b>LCE</b>				
Distância total percorrida (m)	10,79 $\pm$ 1,61	11,79 $\pm$ 1,75	8,09 $\pm$ 1,48	8,92 $\pm$ 1,26
Tempo de imobilidade (s)	49,41 $\pm$ 20,61	58,52 $\pm$ 24,35	100,80 $\pm$ 21,41	107,84 $\pm$ 14,37
Nº de entradas no braço aberto	6,13 $\pm$ 1,89	10,33 $\pm$ 2,45*	7,44 $\pm$ 3,75	5,13 $\pm$ 0,99*
Tempo no braço aberto (s)	44,78 $\pm$ 14,51	61,67 $\pm$ 25,28	33,04 $\pm$ 13,54	29,84 $\pm$ 9,80
Tempo no centro (s)	52,31 $\pm$ 15,50	48,47 $\pm$ 13,22	41,51 $\pm$ 17,82	33,60 $\pm$ 11,68
Nº de entradas no braço fechado	14,38 $\pm$ 3,42	13,67 $\pm$ 3,12	8,22 $\pm$ 2,11*	15,38 $\pm$ 3,85*
<b>TCA</b>				
Distância total percorrida (m)	20,90 $\pm$ 2,36	24,37 $\pm$ 2,50	20,58 $\pm$ 3,50	22,73 $\pm$ 4,51
Tempo de imobilidade (s)	47,85 $\pm$ 21,20	27,98 $\pm$ 13,91	34,27 $\pm$ 17,92	31,79 $\pm$ 24,83
Nº de entradas na área central	3,13 $\pm$ 2,59	3,33 $\pm$ 1,80	4,67 $\pm$ 2,92	2,25 $\pm$ 1,49
Tempo na área central (s)	11,70 $\pm$ 9,89	11,87 $\pm$ 5,77	11,87 $\pm$ 8,05	6,96 $\pm$ 1,24

m - metros; s - segundos.

### 6.2.2.2 Teste de Reconhecimento de objeto

Na tarefa de reconhecimento do formato do objeto, não houve diferença entre os grupos (Gráfico 3A). Quanto ao teste de memória espacial, o grupo H-OCV ( $51,89 \pm 13,18\%$ ) reconheceu menos o objeto deslocado em relação aos grupos N-OCV ( $64,59 \pm 4,48\%$ ) e H-V ( $70,95 \pm 10,31\%$ ) ( $F_{(3,30)} = 4,365; P= 0,045$ ) (Gráfico 3B).

Com exceção do grupo H-OCV, que apresentou um índice de discriminação abaixo de 60% e não diferiu na exploração objeto deslocado *versus* estacionário no teste de memória espacial, todos os animais apresentaram a memória preservada ( $P<0,0001$ ). Dados apresentados no Gráfico 3B.

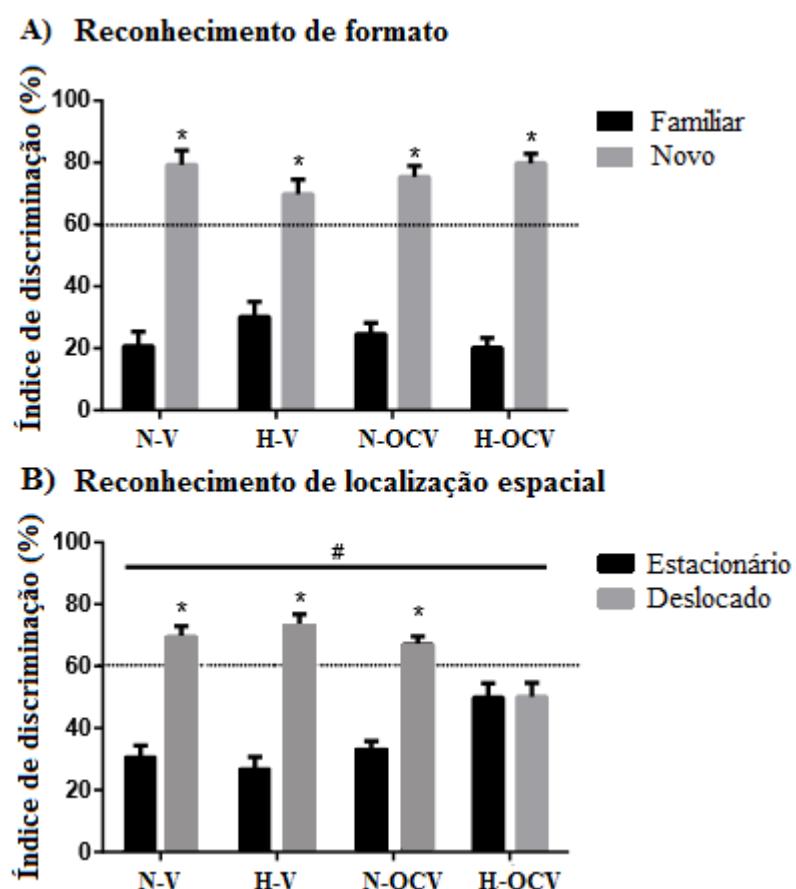


Gráfico 3 - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma (A) e localização espacial (B) em ratos com 65 a 70 dias de vida. Durante a lactação foram divididos em ninhadas com 9 ou 3 filhotes (condição N e H, respectivamente) e subdivididos conforme a suplementação, por gavagem, com óleo de coco extra virgem (10 ml/kg/dia) ou veículo. Os dados são representados em média  $\pm$  DP. #Diferença intergrupo (N-V *versus* H-V; H-V *versus* H-OCV; N-OCV *versus* H-OCV). \*Diferença intragrupo (novo *versus* familiar e estacionário *versus* deslocado) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem. V: solução veículo.

### 6.2.2.3 Dados murinométricos

A suplementação com o OCV realizada no período crítico da vida pós-natal, não modificou de maneira significativa os dados murinométricos nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, os animais dos grupos hiperalimentados mostraram alterações nos parâmetros murinométricos. Foi observado que os grupos H-V e H-OCV apresentaram maior relação CA/CT ( $F(1,26) = 17.37$   $P=0.0003$ ) e maior IMC ( $F(1,34) = 18.65$   $P=0.0001$ ) ao serem comparados com seus respectivos controles. Quanto ao índice de Lee foi observado que o grupo H-OCV apresentou um maior índice em relação ao N-OCV ( $F(1,32) = 14.86$   $P=0.0005$ ). Dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados murinométricos em animais adultos, divididos previamente em grupos com condições normais de amamentação ou favorável para lactação excessiva (respectivamente, em ninhadas com 9 e 3 filhotes) e subdivididos conforme a suplementação, por gavagem, com óleo de coco extra virgem (10 ml/kg/dia) ou veículo. <sup>#</sup>Diferença entre as condições N e H. Os dados são representados em média ± DP (ANOVA de duas vias). N: nutrido. H: hiperalimentado. OCV: óleo de coco extra virgem. V: solução veículo.

Grupo experimental	Dados murinométricos		
	CA/CT	IL	IMC
N -V (n=08)	1,07±0,04	0,326±0,007	0,69±0,04
H - V (n=09)	1,15±0,04 <sup>#</sup>	0,335±0,008	0,77±0,05 <sup>#</sup>
N-OCV (n=09)	1,10±0,03	0,329±0,007	0,68±0,05
H-OCV (n=08)	1,18±0,08 <sup>#</sup>	0,341±0,011 <sup>#</sup>	0,77±0,08 <sup>#</sup>

CA/CT - relação circunferência abdominal/torácica; IL (g/cm) - índice de Lee; IMC (g/m<sup>2</sup>) - índice de massa corporal.

### 6.3 Experimento 2 - Vivência em ambiente enriquecido

#### 6.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado e de Campo Aberto

No LCE e TCA não houve interferência da experiência ambiental em relação a comportamentos sugestivos de ansiedade nos parâmetros avaliados (ANOVA duas vias,  $P>0,05$ ). Em relação à locomoção, os animais do grupo H-AE realizaram mais entradas nos braços fechados em relação ao grupo H-S/AE e N-AE ( $F_{(3,30)} = 7,258$ ;  $P=0,011$ ). Dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teste do Labirinto em Cruz elevado (LCE) e de Campo Aberto (TCA) em ratos com experiências ambientais diferentes. Os animais foram amamentados em ninhadas com 9 ou 3 filhotes (condição N e H, respectivamente). A partir do 36º dia de vida foram subdivididos em vivência no AE e sem AE por quatro semanas. Os dados são representados em média ± DP. #Diferença entre as condições N e H. \*Diferença entre condições de habitação S/AE e AE (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. S/AE: habitação padrão. AE: ambiente enriquecido.

<b>Testes comportamentais</b>	<b>Grupos experimentais</b>			
	<b>N - S/AE</b> (n=08)	<b>H - S/AE</b> (n=09)	<b>N - AE</b> (n=08)	<b>H - AE</b> (n=09)
<b>LCE</b>				
Distância total percorrida (m)	10,79±1,61	11,79±1,75	12,03±1,64	13,45±2,18
Tempo de imobilidade (s)	49,41±20,61	58,52±24,35	82,13±14,33	84,70±17,33
Nº de entradas no braço aberto	6,13±1,89	10,33±2,45	7,00±2,45	10,78±2,49
Tempo no braço aberto (s)	44,78±14,51	61,67±25,28	46,76±25,44	37,33±17,83
Tempo no centro (s)	52,31±15,50	48,47±13,22	47,83±11,95	52,73±11,91
Nº de entradas no braço fechado	14,38±3,42	13,67±3,12	12,25±0,71	16,89±3,30**
<b>TCA</b>				
Distância total percorrida (m)	20,90±2,36	24,37±2,50	20,97±2,50	21,91±2,67
Tempo de imobilidade (s)	47,85±21,20	27,98±13,91	56,28±18,37	33,28±8,42
Nº de entradas na área central	3,13±2,59	3,33±1,80	7,25±2,71	10,33±5,39
Tempo na área central (s)	11,70±9,89	11,87±5,77	13,95±3,85	21,83±12,95

m - metros; s - segundos.

### 6.3.2 Teste de Reconhecimento de objeto

No que se refere ao desempenho dos animais nos testes relacionados à memória, a análise demonstrou que os animais tiveram a memória preservada, apresentando um índice de discriminação acima de 60% ( $P<0,0001$ ).

Ao comparar com os animais em habitação padrão, o ambiente enriquecido não influenciou os testes de memória realizados. Gráfico 4.

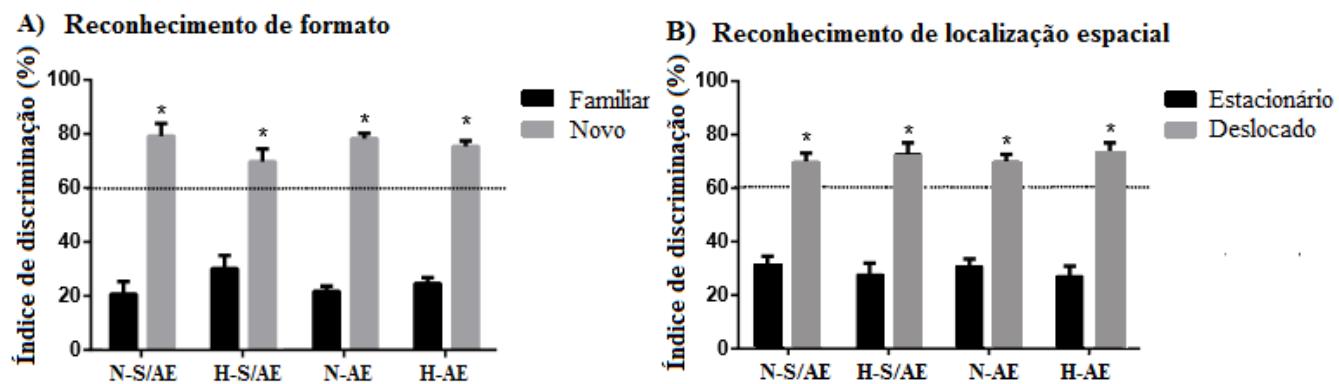


Gráfico 4 - Índices de discriminação para os testes de reconhecimento de objeto quanto à sua forma (A) e localização espacial (B) em ratos com experiências ambientais diferentes. Os animais foram amamentados em ninhadas com 9 ou 3 filhotes (condição N e H, respectivamente). A partir do 36º dia de vida foram subdivididos em vivência no AE e sem AE por quatro semanas. Os dados são representados em média  $\pm$  DP. \*Diferença intragrupo (novo *versus* familiar e estacionário *versus* deslocado) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Holm-Sidak,  $P<0,05$ ). N: nutrido. H: hiperalimentado. S/AE: habitação padrão. AE: ambiente enriquecido.

### 6.3.3 Dados Murinométricos

A experiência de vivência no ambiente enriquecido não influenciou os dados murinométricos em relação ao controle. Tabela 5.

Tabela 5 - Dados murinométricos em animais adultos com experiências ambientais diferentes. Os ratos foram amamentados em ninhadas com 9 ou 3 filhotes (N e H, respectivamente). A partir do 36º dia de vida foram subdivididos em vivência no AE e sem AE por quatro semanas. Os dados são representados em média  $\pm$  DP (ANOVA de duas vias). N: nutrido. H: hiperalimentado. N: nutrido. H: hiperalimentado. S/AE: habitação padrão. AE: ambiente enriquecido.

Grupo experimental	Dados murinométricos		
	CA/CT	IL	IMC
N - S/AE (n=08)	1,13 $\pm$ 0,08	0,327 $\pm$ 0,006	0,70 $\pm$ 0,03
H - S/AE (n=09)	1,11 $\pm$ 0,05	0,328 $\pm$ 0,010	0,72 $\pm$ 0,06
N - AE (n=08)	1,13 $\pm$ 0,08	0,333 $\pm$ 0,006	0,73 $\pm$ 0,04
H - AE (n=09)	1,11 $\pm$ 0,06	0,337 $\pm$ 0,006	0,76 $\pm$ 0,03

CA/CT – relação circunferência abdominal/torácica; IL (g/cm) – índice de Lee; IMC (g/m<sup>2</sup>) – índice de massa corporal.

## 7 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi investigado se a hiperalimentação induzida pela redução da ninhada, a suplementação com OCV, em uma dose diária de 10 ml/kg/dia, durante o período crítico do desenvolvimento e a vivência em um ambiente enriquecido podem influenciar parâmetros murinométricos, o comportamento semelhante à ansiedade nos testes do LCE e TCA e, ainda, a memória através do TRO.

A criação de ratos em pequenas ninhadas, em comparação com ninhadas de tamanho padrão, é considerada um modelo animal para o estudo em curto ou longo prazo das consequências de um excesso alimentar no início da vida (PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010). A redução da ninhada ao terceiro dia de vida proporciona aos filhotes maior disponibilidade ao leite da mãe, devido a uma redução na competição pelo alimento; pois, é feito um ajuste inicial da produção do leite materno em função do número total de filhotes nascidos, antes da redução da prole (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2001). Além disso, o desenvolvimento do controle hipotalâmico sobre a regulação do apetite ocorre predominantemente após o nascimento, em roedores; de forma que não há domínio completo da ingestão até o 15º-16º dia de vida pós-natal (MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005). Assim, quando há grande oferta de leite, os filhotes se alimentam até atingirem a plenitude do intestino (HOUPP; EPSTEIN, 1973; PLAGEMANN et al., 1999; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; PLAGEMANN; HARDER, 2005). Todos esses estudos convergem para o fato de que a redução da ninhada é uma técnica eficiente em promover hiperalimentação durante o período de aleitamento e reforçam o desenho experimental utilizado nesse estudo.

Em nosso trabalho, o peso corporal dos animais foi avaliado durante todo o período experimental para verificar se haveria influência da alimentação precoce sobre o crescimento normal. Observamos que os animais do grupo H apresentaram peso corporal maior do que os controles, corroborando com a hipótese de uma persistência de alteração corporal provocada pela hiperalimentação neonatal. Adicionalmente, foi encontrado maior IMC, índice de Lee e relação CA/CT nos animais dos grupos H. Os resultados reforçam dados de outros estudos que evidenciaram que uma ingestão calórica aumentada durante a lactação está associada com rápido aumento de deposição de gordura, persistência de excesso de peso e hiperfagia ao longo da vida (PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010). Diante disso, a indução do excesso alimentar perinatal tem sido

relacionada à alterações funcionais e metabólicas complexas semelhantes àquelas que acontecem quando a síndrome metabólica afeta seres humanos (PLAGEMANN et al., 2010).

Recentemente, o OCV vem sendo conhecido e comercializado como um óleo funcional (MARINA et al., 2009). Na literatura, pode-se encontrar inúmeras propriedades medicinais do coco, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antidermatites, antioxidante, hipoglicemizante, hepatoprotetora, imunoestimulante, antidepressiva, entre outras (DEBMANDAL; MANDAL, 2011; YEAP et al., 2015). No entanto, não há consenso de que a ingestão de derivados do coco promova modificações na composição corporal dos indivíduos. Pesquisa experimental realizada com mulheres obesas constatou que o consumo de óleo de coco promoveu redução da circunferência abdominal (ASSUNÇÃO et al., 2009). Em nosso trabalho, a suplementação com OCV nos roedores não influenciou o peso corporal de forma significativa, nem as medidas murinométricas, independentemente do estado nutricional. Hamsi et al. (2015) também não encontraram diferenças no peso corporal dos ratos que receberam OCV em relação ao grupo controle. Sugere-se, portanto, que o conteúdo de ácidos graxos de cadeia média presente no OCV o torna de fácil digestão e absorção, apesar do seu elevado teor em ácidos graxos saturados. Desta forma, ele não favorece o acúmulo de gordura corporal quando consumido fresco (HAMSI et al., 2015).

A hiperalimentação muitas vezes está associada a alta prevalência de alterações emocionais e disfunções cognitivas (ANDRÉ et al., 2014). O LCE é um teste comportamental amplamente utilizado que permite avaliar o comportamento do tipo ansiedade e os efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos de diferentes drogas ou procedimentos experimentais (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW & FILE, 1986; CONTRERAS et al., 2014). O teste permite a exploração do conflito entre o comportamento natural dos roedores em explorar novos espaços e evitar espaços abertos/iluminados (CONTRERAS et al., 2014). É evidenciado um comportamento semelhante à ansiedade quando, geralmente, os animais apresentam menor tempo gasto nos braços abertos (HANDLEY & MITHANI, 1984; PELLOW & FILE, 1986). Atualmente, a tendência é utilizar mais de um modelo para determinar as ações ansiolíticas, incluindo o teste do campo aberto (CONTRERAS et al., 2014).

Quando adultos, o grupo H-V apresentou comportamento sugestivo de menor grau de ansiedade, como demonstrado pelo maior número de entradas no braço aberto do LCE, em relação ao seu controle N-V. Corroborando com nossos dados, Spencer & Tilbrook (2009)

demonstraram que pequenas ninhadas durante a lactação, além de aumentar o peso corporal, induz a um comportamento semelhante à redução de ansiedade na idade adulta. Uma possível explicação para esse efeito seria uma menor concorrência pela atenção materna (SPENCER; TILBROOK, 2009). É comprovado na literatura que a atenção materna, através de cuidados mais intensos e de higiene durante o desenvolvimento, pode ter efeitos pronunciados em longo prazo sobre o comportamento do animal (FRANCIS; MEANEY, 1999; FISH et al., 2004; CARVALHO et al., 2016). Tem sido descrito que as ratas dispendem um período de tempo determinado na frequência de cuidados e de limpeza de seus filhotes. Este tempo independe do tamanho da ninhada. Assim, quanto menor o número de filhotes, maior atenção cada um deles recebe (CHAMPAGNE et al., 2003). Ademais, ratos criados com maior atenção materna apresentam melhor exploração a novos ambientes (CALDJI et al., 1998).

Entretanto, quando associado a hiperimentação com a suplementação com OCV, a suplementação foi capaz de reverter o efeito ansiolítico observado no grupo H. Apesar de o OCV ser considerado um alimento funcional devido ao seu conteúdo em compostos fenólicos e ação antioxidante (MARINA et al., 2009), nossos achados não encontraram benefícios quanto à ansiedade. Há relatos na literatura de que uma mistura artificial de ácidos graxos presentes no líquido amniótico humano produz efeitos ansiolíticos similares aos do diazepam em ratos *Wistar* adultos (CONTRERAS et al., 2011; GARCÍA-RÍOS; RODRÍGUEZ-LANDA; CONTRERAS, 2013). Esta mistura de ácidos graxos, composta pelos ácidos lúrico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, elaídico e linoleico, assemelha-se àquela encontrada no OCV (CONTRERAS et al., 2013). Como se pode notar, os achados de Contreras et al (2013) diferem dos nossos. Essa discrepância pode ser justificada pelas diferenças nas concentrações dos constituintes da mistura de ácidos graxos *versus* do OCV.

Dentre aqueles ácidos graxos presentes no OCV está o ácido mirístico. Estudo relata que esse ácido graxo exerce ações semelhantes à de depressores do sistema nervoso central, quando presente em doses mais elevadas do que aquela encontrada no líquido amniótico humano (CONTRERAS et al., 2014). Isto produziria hipoatividade motora, comportamento similar ao que foi encontrado em nossa pesquisa; pois os animais jovens nutridos tratados com OCV apresentaram menor atividade locomotora em relação ao controle. Dessa forma, é plausível inferir que o OCV na dose administrada possa exercer um certo efeito sedativo, mais do que ansiolítico. Contudo, essa hipótese precisa ser investigada com maior propriedade através de estudos do tipo dose-resposta.

O OCV também promoveu prejuízos nos processos mnemônicos, o que diverge do encontrado na literatura. É demonstrado que os polifenóis presentes no OCV, como o ácido ferúlico, podem exercer ações anti-inflamatória e prevenir a agregação do peptídeo beta-amiloide ( $A\beta$ ), envolvidos na patogênese de distúrbios de memória (FERNANDO et al., 2015). A suplementação com OCV no período crítico do desenvolvimento ocasionou comprometimento no reconhecimento do objeto deslocado em animais adultos hiperalimentados no início da vida. Isto é, os ratos passaram menor tempo explorando os objetos, cuja localização se encontrava modificada em relação aos seus controles. Na literatura é documentado que animais normais demonstram uma tendência para exploração maior da novidade em detrimento do que lhe é familiar (ENNACEUR et al., 2005). A preferência por um objeto novo significa que a apresentação do objeto familiar existe na memória dos animais (ENNACEUR, 2010); entretanto, pode haver algumas ocasiões em que o oposto pode ocorrer (ENNACEUR et al., 2005).

Nos ratos adultos, todos os grupos apresentaram memória preservada a julgar pelos índices de discriminação maior do que 60% na tarefa de reconhecimento de objetos quanto à forma. No entanto, no teste de memória espacial o grupo H-OCV apresentou deficiência, com uma taxa de discriminação abaixo da probabilidade de 60% (VIANA et al., 2013) e não diferiu o tempo de exploração deslocado *versus* estacionário. Fatores genéticos ou ontogênicos, bem como algumas intervenções farmacológicas podem levar os animais a passar mais tempo em um objeto familiar ou em um local familiar do que em um objeto novo ou em um novo local (ENNACEUR et al., 2005). Nessas situações, a interpretação dos resultados pode envolver ansiedade, atenção e memória (ENNACEUR et al., 2005).

No que se refere à relação alimentação precoce e memória, o grupo H-V apresentou prejuízo mnemônico quando jovem. Este grupo apresentou um menor índice de discriminação no teste de reconhecimento de forma do objeto em relação ao seu controle N-V, além de apresentar uma taxa de discriminação abaixo da probabilidade de 60% no teste de memória espacial. A dieta no início da vida tem um grande impacto na programação de mecanismos fisiológicos em longo prazo (PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN; HARDER, 2005; PLAGEMANN et al., 2010). A hiperálimentação pós-natal pode estimular o estabelecimento de um perfil pró-inflamatório crônico (DE LUCA, S. et al., 2015; DE LUCA et al., 2016). Dietas com alto teor de gordura induzem microgliose; isto resulta em remodelação sináptica, apoptose neuronal e prejuízos à neurogênese no hipotálamo. Adicionalmente, interrompe a conectividade hipotalâmica com regiões cerebrais importantes na função cognitiva, como o

hipocampo e o córtex (DE LUCA et al., 2016). Processo semelhante pode ocorrer com a hiperalimentação precoce; pois, a microglia ainda está amadurecendo neste período, o que a torna suscetível a alterações permanentes (DE LUCA et al., 2016). A microgliose no hipocampo pode ser encontrada após apenas 14 dias de hiperalimentação e persistir na idade adulta (DE LUCA et al., 2016).

Quando adultos, não houve diferenças entre os grupos experimentais no teste de reconhecimento do formato do objeto, independentemente do fator hiperalimentação ou OCV. De Luca et al. (2015; 2016) observaram que ratos hiperalimentados no início da vida apresentavam déficits na memória de reconhecimento de objeto. Entretanto, achados da literatura também mostram que filhotes que recebem uma atenção materna maior podem apresentar um melhor desenvolvimento sináptico dos sistemas neurais que medeiam os processos cognitivos, bem como aumento da sobrevivência de neurônios hipocampais (FISH et al., 2004). Isto é refletido em benefícios comportamentais e fisiológicos persistentes (LIU et al., 2000; MEANEY, 2001; BREDY et al., 2003; FISH et al., 2004; CARVALHO et al., 2016). Em nosso estudo, o cuidado materno possivelmente maior na ninhada de tamanho reduzido pode ter superado o efeito deletério da hiperalimentação. Contudo, essa resposta foi observada apenas quando os animais atingiram a idade adulta, o que pode ser reflexo da necessidade de uma maior maturação neuronal.

É amplamente reconhecido que o hipocampo está associado a vários processos comportamentais. Esta região cerebral e o córtex, incluindo córtex entorrinal, perirrinal e para-hipocampal, desempenham um papel importante na memória (AGGLETON et al., 2010; BAXTER, 2010; ANTUNES; BIALA, 2012). A região do córtex perirrinal está envolvida no reconhecimento de objetos, com informações básicas sobre familiaridade ou novidade de um objeto (HAMMOND; TULL; STACKMAN, 2004). Quando há algum dano nessa estrutura cerebral, o desempenho nas tarefas de memória de reconhecimento pode ser prejudicado (ALBASSER et al., 2009). Em nosso estudo, não foi possível avaliar a morfologia das regiões envolvidas com a formação de memórias. Contudo, a administração de OCV durante o período de desenvolvimento do encéfalo pode ter modificado estrutural ou funcionalmente essas regiões.

Outra estrutura encefálica que merece destaque em investigações comportamentais é o hipocampo. Ele é subdividido funcionalmente nas regiões dorsal e ventral. Cada uma dessas regiões está associada a um conjunto distinto de comportamentos (BANNERMAN et al.,

2004). O hipocampo dorsal está mais associado à aprendizagem e memória, principalmente a aprendizagem espacial (BANNERMAN et al., 2004). Está envolvido na memorização de objetos, codificando informações sobre a experiência do objeto (HAMMOND; TULL; STACKMAN, 2004). Em especial, a área CA1 (*Cornu ammonis 1*) está relacionada com a comparação de memórias anteriores e informações recebidas do ambiente (SCHLICHTING; ZEITHAMOVA; PRESTON, 2014), podendo sinalizar a presença de novidade (LARKIN et al., 2014; SCHLICHTING; PRESTON, 2015). O hipocampo ventral relaciona-se mais com o comportamento do tipo ansiedade (BANNERMAN et al., 2004). É possível que a hiperalimentação precoce e/ou a suplementação com OCV tenham alterado funcionalmente o hipocampo, ocasionando as mudanças comportamentais observadas em nosso estudo nos animais jovens.

Concernente à interação ambiente enriquecido e estado nutricional, observamos que o ambiente enriquecido não influenciou os parâmetros murinométricos. Mosaferi et al. (2015) encontraram aumento do peso corporal em ratos que habitavam um ambiente enriquecido em comparação com aqueles que viviam isolados, mas não entre os que permaneceram em gaiolas padrão. E essa diferença desapareceu quando todos os animais passaram a conviver na gaiola padrão (MOSAFERI et al., 2015). É demonstrado na literatura que gaiolas simples geram uma reação de estresse nos ratos; condição que pode ser minimizada pelo ambiente enriquecido (MOSAFERI et al., 2015). Outro estudo também evidenciou que ratos machos alojados em condições enriquecidas durante seis semanas ganharam mais peso do que os que viveram em condição isolada (KONKLE et al., 2010). No nosso estudo, os animais que não foram para o ambiente enriquecido permaneceram em gaiolas padrão, o que pode ter gerado resultados divergentes quando comparados aos dados da literatura.

Tem sido documentado que o ambiente enriquecido favorece respostas neuroprotetoras. Hipotetiza-se que esse efeito seja decorrente de ações antioxidantes promovidas pelo ambiente; pois, a vivência em um ambiente enriquecido é capaz de reduzir marcadores de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex cerebral (MÁRMOL et al., 2015). Há discrepâncias nos achados da literatura quanto à condição de criação e o comportamento de ansiedade em roedores. Estudos mostram que o ambiente enriquecido exerce um papel ansiolítico, enquanto outros relatam não existir efeito sobre o comportamento ansioso (MOSAFERI; BABRI; EBRAHIMI; et al., 2015). Em nosso trabalho, não evidenciamos alteração no comportamento entre os animais que tiveram vivências ambientais diferentes. Existem relatos de que ratos vivenciados em ambiente enriquecido apresentam atividade

locomotora menor no TCA e uma habituação mais rápida em comparação com controles, o que indica melhor adaptação a um novo ambiente (BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009; SIMPSON; BREE; KELLY, 2012; MOSAFERI; BABRI; EBRAHIMI; et al., 2015).

Em relação ao teste no LCE, alguns estudiosos sugerem existir um efeito ansiolítico, enquanto outros relatam que o ambiente enriquecido não apresenta influência sobre o comportamento (BRENES; PADILLA; FORNAGUERA, 2009; SIMPSON; BREE; KELLY, 2012; SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013; MOSAFERI; BABRI; EBRAHIMI; et al., 2015). Semelhantemente ao nosso estudo, Brenes e cols. (2009) encontraram que as condições de criação não afetaram o comportamento relacionado à ansiedade no LCE, observando apenas maior entrada nos braços fechados pelos ratos que vivenciaram um ambiente enriquecido.

A exposição ao ambiente enriquecido está relacionada com um aumento da neurogênese na região do hipocampo e um aprimoramento da memória espacial (NILSSON et al., 1999). É considerado um modelo experimental indutor de plasticidade cerebral (HIRASE; SHINOHARA, 2014), podendo ocasionar alterações neuroquímicas e neuroanatômicas, e produzindo melhorias duradouras em tarefas de memória e de aprendizagem (MÁRMOL et al., 2015). Em nosso estudo, encontramos que os grupos AE discriminaram corretamente o objeto novo e o deslocado nos testes; no entanto, não diferiram dos grupos controles. Ueda, Shakakibara & Yoshimoto (2005) também não observaram diferenças no teste de memória espacial em ratos adultos em gaiolas padrão e em enriquecimento ambiental. Entretanto, no teste de reconhecimento da forma do objeto, o estudo de Kazlauckas et al. (2011) demonstrou que o ambiente enriquecido melhorou o desempenho dos animais com um aumento da razão de discriminação em relação ao controle.

Desse modo, evidenciamos que as intervenções nutricionais no início da vida são capazes de influenciar a composição corporal, bem como comportamentos do tipo ansiedade e memória. É importante destacar que a suplementação com OCV durante o desenvolvimento do sistema nervoso, na dose de 10 ml/kg/dia, parece ser uma estratégia pouco eficaz contra a ansiedade, à redução de medidas corporais e ao aprimoramento cognitivo. Quanto à vivência em ambiente enriquecido, ela demonstrou não exercer efeitos substanciais sobre o comportamento.

## 8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que a hiperalimentação, induzida pela redução da ninhada durante o período de aleitamento, produz déficits cognitivos nos animais jovens, mas seus efeitos não persistem até a idade adulta. Além disso, os animais hiperalimentados apresentam comportamento sugestivo de menor ansiedade quando adultos. Contudo, a hiperalimentação neonatal altera o peso corporal em curto e longo prazos, bem como os parâmetros murinométricos. Todos esses achados demonstram o papel crucial da alimentação no início da vida sobre o funcionamento e o metabolismo normal do organismo.

Sobre o OCV, constatamos que a suplementação no início da vida não influencia os parâmetros murinométricos. Adicionalmente, deve-se ter precaução quanto ao seu consumo, principalmente se associado à hiperalimentação precoce. O óleo esteve associado a comportamento semelhante à ansiedade e a prejuízos na memória. São necessárias investigações adicionais para melhor compreensão do papel do OCV no organismo.

Por fim, o ambiente enriquecido parece não interferir em comportamentos do tipo ansiedade, na memória, nem na composição corporal. Todavia, ele pode representar uma boa estratégia de neuroproteção.

## REFERÊNCIAS

- AGGLETON, J. P. et al. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behavioral neuroscience*, v. 124, n. 1, p. 55, 2010.
- AKKERMAN, S. et al. Object recognition testing: statistical considerations. **Behavioural brain research**, v. 232, n. 2, p. 317-322, 2012.
- ALBASSER, M. M. et al. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behavioral neuroscience*, v. 123, n. 1, p. 115, 2009.
- ALVES, N. F. et al. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 4, p. 393-400, 2015.
- ANDIN, J. et al. Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. **Brain research**, v. 1174, p. 18-27, 2007.
- ANDRÉ, C. et al. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2, 3-dioxygenase activation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 41, p. 10-21, 2014.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.
- ASSUNÇAO, M. L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, v. 44, n. 7, p. 593-601, 2009.
- BANNERMAN, D. et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.
- BANNERMAN, D. M. et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nature reviews neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 181-192, 2014.
- BARKER, D. J. P. Maternal Nutrition, Fetal Nutrition, and Disease in Later Life. **Nutrition** v. 13 n. 9 p. 807-812, 1997.
- BAYER, S. A. et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 83-144, 1993.

BAXTER, M. G. "I've seen it all before": Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al.(2010). 2010.

BHATIA, H. S. et al. Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28451, 2011.

BORSONELO, E. C. et al. Supplementation with fish oil and coconut fat prevents prenatal stress-induced changes in early postnatal development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 521-527, 2011.

BORSONELO, E. C.; SUCHECKI, D.; GALDURÓZ, J. C. F. Effect of fish oil and coconut fat supplementation on depressive-type behavior and corticosterone levels of prenatally stressed male rats. **Brain research**, v. 1385, p. 144-150, 2011.

BOURET, S. G. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 3, p. 653-657, 2010.

BREDY, T. et al. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 571-576, 2003.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behavioural brain research**, v. 197, n. 1, p. 125-137, 2009.

CALDJII, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5335-5340, 1998.

CARVALHO, A. L. O. et al. Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 53, p. 75-82, 2016.

CASARRUBEA, M. et al. The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central platform of the elevated plus maze. **Behavioural brain research**, v. 281, p. 55-61, 2015.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.

CONTRERAS, C. M. et al. Amniotic fluid elicits appetitive responses in human newborns: fatty acids and appetitive responses. **Developmental Psychobiology**, v. 55, n. 3, p. 221-231, 2013.

CONTRERAS, C. M. et al. Myristic acid produces anxiolytic-like effects in Wistar rats in the elevated plus maze. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

CONTRERAS, C. M. et al. Anxiolytic-like effects of human amniotic fluid and its fatty acids in Wistar rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 22, n. 7, p. 655-662, 2011.

CRUZ, A.; FREI, F.; GRAEFF, F. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005.

DA SILVA FRANCISCO, E.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino acids**, v. 47, n. 11, p. 2437-2445, 2015.

DAUQAN, E. M. et al. Fatty acids composition of four different vegetable oils (red palm olein, palm olein, corn oil and coconut oil) by gas chromatography. 2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 2011. p.29-31.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. **Neuroreport**, v. 12, n. 15, p. 3201-3204, 2001.

DAVIDSON, T. L.; BOUTELLE, K. N. Special issue of Appetite: The proceedings of the American University Symposium on Childhood Obesity and Cognition. **Appetite**, v. 93, p. 1-2, 2015.

DE LUCA, S. et al. Early-life overnutrition influences spatial memory and hippocampal microgliosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 49, p. e43-e44, 2015.

DE LUCA, S. N. et al. Early life overfeeding impairs spatial memory performance by reducing microglial sensitivity to learning. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 112, 2016.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 3, p. 241-247, 2011.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; SILVA, M. A. D. S. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain research protocols**, v. 16, n. 1, p. 10-19, 2005.

DINEL, A.-L. et al. Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24325, 2011.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: (Ed.). **Brain, behaviour, and iron in the infant diet**: Springer, 1990. p.1-17. ISBN 1447117689.

EJIKE, C. E. Association between anxiety and obesity: A study of a young-adult Nigerian population. **Journal of neurosciences in rural practice**, v. 4, n. Suppl 1, p. S13, 2013.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural brain research**, v. 215, n. 2, p. 244-254, 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. Effect of combined or separate administration of piracetam and choline on learning and memory in the rat. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 58-67, 1987.

ENNACEUR, A. et al. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behavioural brain research**, v. 159, n. 2, p. 247-266, 2005.

EYSENCK, M. Models of memory: information processing. In: (Ed.). **Benzodiazepine Receptor Ligands, Memory and Information Processing**: Springer, 1988. p.3-11. ISBN 3642732909.

FERNANDO, W. et al. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. **The British journal of nutrition**, v. 114, n. 1, p. 1, 2015.

FISH, E. W. et al. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1036, n. 1, p. 167-180, 2004.

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress responses. **Current opinion in neurobiology**, v. 9, n. 1, p. 128-134, 1999.

GAINESY, S. J. et al. Short-term high-fat diet (HFD) induced anxiety-like behaviors and cognitive impairment are improved with treatment by glyburide. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, 2016.

GARCÍA-RÍOS, R. I.; RODRÍGUEZ-LANDA, J. F.; CONTRERAS, C. M. Anxiolytic-like actions of fatty acids identified in human amniotic fluid. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

GRANHOLM, A.-C. et al. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 14, n. 2, p. 133, 2008.

GREENWOOD, P. M.; PARASURAMAN, R. Neuronal and cognitive plasticity: a neurocognitive framework for ameliorating cognitive aging. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 2, 2010.

HALL, F. S.; PERONA, M. T. Have studies of the developmental regulation of behavioral phenotypes revealed the mechanisms of gene–environment interactions? **Physiology & behavior**, v. 107, n. 5, p. 623-640, 2012.

HAMMOND, R. S.; TULL, L. E.; STACKMAN, R. W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 82, n. 1, p. 26-34, 2004.

HAMSI, M. A. et al. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 51, n. 1, p. 53-63, 2015.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HIRASE, H.; SHINOHARA, Y. Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 280, p. 282-298, 2014.

HOFER, S. B. et al. Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 127-132, 2006.

HOUPT, K. A.; EPSTEIN, A. N. Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 225, n. 1, p. 58-66, 1973.

HÜBENER, M.; BONHOEFFER, T. Neuronal Plasticity: Beyond the Critical Period. **Cell** v. 159, n. 6, p. 727-737, 2014.

JOSEPH, J. A.; SHUKITT-HALE, B.; CASADESUS, G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 313S-316S, 2005.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Experimental modeling of anxiety and depression. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 64, n. 4, p. 439-448, 2004.

KAZLAUCKAS, V. et al. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. **Physiology & behavior**, v. 102, n. 5, p. 475-480, 2011.

KESSELS, R. P. et al. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Reviews**, v. 35, n. 3, p. 295-303, 2001.

KESSLER, R. C.; WANG, P. S. The Descriptive Epidemiology of Commonly Occurring Mental Disorders in the United States\*. **Annu. Rev. Public Health**, v. 29, p. 115-129, 2008.

KHAN, N. A. et al. The relation of saturated fats and dietary cholesterol to childhood cognitive flexibility. **Appetite**, 2015.

KOLB, B. et al. Brain plasticity in the developing brain. **Prog Brain Res**, v. 207, p. 35-64, 2013.

KONKLE, A. et al. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 427-436, 2010.

KRIKORIAN, R. et al. Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5736-5742, 2012.

KRISHNA, A. G. et al. Coconut oil: chemistry, production and its applications-a review. **Indian Coconut Journal**, v. 53, n. 3, p. 15-27, 2010.

LARKIN, M. C. et al. Hippocampal output area CA1 broadcasts a generalized novelty signal during an object - place recognition task. **Hippocampus**, v. 24, n. 7, p. 773-783, 2014.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.

LYKOURAS, L.; MICHOPoulos, J. Anxiety disorders and obesity. **Psychiatriki**, v. 22, n. 4, p. 307-313, 2011.

MARIC, T.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G. N. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 36, p. 35-45, 2014.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in food science & technology**, v. 20, n. 10, p. 481-487, 2009.

MÁRMOL, F. et al. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. **Brain research**, v. 1613, p. 120-129, 2015.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, p. 85–92, 2012.

MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MÜHLHÄUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 9-17, 2005.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 1161-1192, 2001.

MELLO, P. B. et al. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 2, p. 301-309, 2008.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain, behavior, and immunity**, v. 42, p. 10-21, 2014.

MOON, M. L. et al. The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. **Metabolism**, v. 63, n. 9, p. 1131-1140, 2014.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MORRIS, M. J. et al. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2014.

MOSAFERI, B. et al. Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive-and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. **Physiology & behavior**, v. 142, p. 131-136, 2015.

MOSAFERI, B. et al. Post-weaning environmental enrichment improves BDNF response of adult male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 108-114, 2015.

NEVIN, K.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 830-835, 2004.

NEVIN, K.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food chemistry**, v. 99, n. 2, p. 260-266, 2006.

NILSSON, M. et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **Journal of neurobiology**, v. 39, n. 4, p. 569-578, 1999.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697-709, 2006.

NOVELLI, E. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

O'CALLAGHAN, R. M.; OHLE, R.; KELLY, Á. M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial-and non-spatial learning. **Behavioural brain research**, v. 176, n. 2, p. 362-366, 2007.

PATKI, G. et al. Grape powder treatment prevents anxiety-like behavior in a rat model of aging. **Nutrition Research**, 2015.

PELOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PETRY, N. M. et al. Overweight and obesity are associated with psychiatric disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Psychosomatic medicine**, v. 70, n. 3, p. 288-297, 2008.

PISTELL, P. J. et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **Journal of neuroimmunology**, v. 219, n. 1, p. 25-32, 2010.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiology & behavior**, v. 86, n. 5, p. 661-668, 2005.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T. Breast Feeding and the Risk of Obesity and Related Metabolic Diseases in the Child. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 3, n. 3, p. 222-232, 2005.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain research**, v. 836, n. 1, p. 146-155, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of perinatal medicine**, v. 38, n. 4, p. 393-400, 2010.

POPLI, G.; GLADWELL, D.; TSUCHIYA, A. Estimating the critical and sensitive periods of investment in early childhood: A methodological note. **Social Science & Medicine**, v. 97 p. 316-324, 2013.

POZZO MILLER, L. D.; AOKI, A. Postnatal development of the hypothalamic ventromedial nucleus: neurons and synapses. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 121-129, 1992.

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. Suppl 3, p. 511, 2000.

RODGERS, R.; JOHNSON, N. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.

ROSS, N.; YAU, P. L.; CONVIT, A. Obesity, fitness, and brain integrity in adolescence. **Appetite**, 2015.

SALMON, D. P.; BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Current opinion in neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 184-190, 1995.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Age-dependent effects of environmental enrichment on brain networks and spatial memory in Wistar rats. **Neuroscience**, v. 248, p. 43-53, 2013.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **Brain research bulletin**, v. 98, p. 1-9, 2013.

SAMUELSSON, A.-M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance A novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 383-392, 2008.

SCHLICHTING, M. L.; PRESTON, A. R. Memory integration: neural mechanisms and implications for behavior. **Current opinion in behavioral sciences**, v. 1, p. 1-8, 2015.

SCHLICHTING, M. L.; ZEITHAMOVA, D.; PRESTON, A. R. CA1 subfield contributions to memory integration and inference. **Hippocampus**, v. 24, n. 10, p. 1248-1260, 2014.

SHINOHARA, H. et al. Medium-chain fatty acid-containing dietary oil alleviates the depression-like behaviour in mice exposed to stress due to chronic forced swimming. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 601-606, 2013.

SIMPSON, J.; BREE, D.; KELLY, J. P. Effect of early life housing manipulation on baseline and drug-induced behavioural responses on neurochemistry in the male rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 37, n. 2, p. 252-263, 2012.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats— behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 246-264, 2011.

SÖNMEZ, Ü. et al. Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. **Neuroscience letters**, v. 420, n. 2, p. 133-137, 2007.

SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1133-1143, 2009.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, n. 2, p. 195, 1992.

SWEAT, V. et al. C-reactive protein is linked to lower cognitive performance in overweight and obese women. **Inflammation**, v. 31, n. 3, p. 198-207, 2008.

VIANA, L. C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280-296, 2013.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 1, p. 57-62, 1990.

YEAP, S. K. et al. Antistress and antioxidant effects of virgin coconut oil in vivo. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 9, n. 1, p. 39-42, 2015.

ZAKARIA, Z. A. et al. Hepatoprotective activity of dried-and fermented-processed virgin coconut oil. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, 2011.

ZHAO, G. et al. Depression and anxiety among US adults: associations with body mass index. **International journal of obesity**, v. 33, n. 2, p. 257-266, 2009.

## ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade Federal de Pernambuco**  
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
[www.ccb.ufpe.br](http://www.ccb.ufpe.br)

Recife, 15 de junho de 2016.

Ofício nº 60/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.<sup>a</sup> Manuella Batista de Oliveira Hornsby

Departamento de Nutrição

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.048535/2015-78

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **"Influência da suplementação com óleo de coco virgem e do ambiente enriquecido sobre ansiedade e memória em ratos submetidos à ingestão alimentar excessiva no período de lactação"**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos; Idade: 3-120 dias; Peso: 15-400g; O processo encontra-se aprovado, mas houve solicitação de mais 48 animais para continuidade do projeto. Desta forma, o nº total de animais da pesquisa é de 108 ratos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
Presidente da CEUA / CCB - UFPE  
SUAPE 1801584