



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS

VIVIANE ALTERMANN TORRE

Modulação de memórias de diferentes graus de emocionalidade por alimentos confortantes durante o desenvolvimento.

Pelotas, 2016

VIVIANE ALTERMANN TORRE

Modulação de memórias de diferentes graus de emocionalidade por alimentos confortantes durante o desenvolvimento.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Comportamento.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rachel Krolow Bast

Pelotas, 2016

Modulação de memórias de diferentes graus de emocionalidade por alimentos confortantes durante o desenvolvimento.

BANCA EXAMINADORA

Conceito final: _____.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

1º Examinador: Profª. Drª. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

2º Examinador: Prof. Elemar Gomes Maganha

Orientadora: Profª. Drª. Rachel Krolow Bast

Coorientadora: Profª. Drª. Carla Dalmaz

Agradecimentos

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho; A UCPEL por proporcionar esse aperfeiçoamento e a CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro;

A todo o pessoal do Laboratório de Neurociências Clínicas, em especial as queridas Pâmela, Rafaely e Fabi que compartilharam comigo vários momentos de estudos e busca de conhecimento. A todos os meus colegas da turma de Mestrado 2015 e professores e funcionários do PPG em Saúde e Comportamento pelo carinho e ensinamentos;

Às minhas queridas colegas do laboratório de Neurobiologia do Estresse da UFRGS pelo auxílio nos experimentos e desenvolvimento do projeto, em especial a Danusa, Ana e Emily pela parceria e disponibilidade. A professora Dr^a.Carla Dalmaz por sua sabedoria e ensinamentos;

A minha querida orientadora, professora Dr^a.Rachel Krolow Bast pelo incentivo na seleção do Mestrado, por acreditar em mim, sempre com muita dedicação e paciência para me orientar, incentivando sempre com a famosa frase “Tudo vai dar Certo”;

Agradeço à minha família e amigos, por todo amor, carinho, incentivo e paciência;

Aos meus queridos pais Luiz Alberto e Vera, que sempre me incentivaram a sonhar e persistir, aos meus amados filhos Augusto e Felipe, pelo carinho e compreensão. Ao meu irmão Roberto pela disponibilidade e aos meus sogros pelo acolhimento.

Enfim ao meu amor André, que participou ativamente dessa jornada e sempre me apoiou para seguir em frente, entendendo todas as vezes que precisei me ausentar devido aos estudos.

“ Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint-Exupéry

Muito obrigada!

SUMÁRIO

PROJETO DE PESQUISA.....	7
1- INTRODUÇÃO	10
2- OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3- HIPÓTESES	12
4- REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1 Estratégias de Busca.....	13
4.2 Fundamentação Teórica.....	14
4.2.1 Período Neonatal: Fases do Desenvolvimento e Sistema Nervoso Central.....	14
4.2.2 Consumo de dietas palatáveis: comportamento emocional.....	15
4.2.3 Dietas palatáveis e memórias de diferentes graus de emocionalidade.....	16
4.2.4 Dietas palatáveis e biomarcadores envolvidos na memória.....	18
5- METODOLOGIA.....	20
5.1 Delineamento	20
5.2 Animais e Desenho Experimental.....	21
5.3 Cálculos do tamanho da amostra.....	23
5.4 Composição da Dieta Palatável:	24
5.5 Tarefas Comportamentais.....	23
5.5.1 Tarefa Reconhecimento de Objetos (RO) Troca de Objeto.....	23
5.5.2 Tarefa Reconhecimento de Objetos Troca de Lugar.....	23
5.5.3 Tarefa Y-maze.....	24
5.5.4 Tarefa Medo Condicionado.....	24
5.6 Análises Bioquímicas.....	25
5.7 Análise dos dados.....	26
5.8 Cronograma	26
5.9 Orçamento	28

6- REFERÊNCIAS	29
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
ANEXOS	33
Anexo A: Artigos selecionados para o projeto.....	34
ARTIGO.....	38

IDENTIFICAÇÃO

Título: Modulação de memórias de diferentes graus de emocionalidade por alimentos confortantes durante o desenvolvimento.

Responsável: Viviane Altermann Torre

Orientadora: Prof Dra Rachel Krolow Bast

Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

Curso: Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento

Linha de Pesquisa: Neurociências Clínicas

Data: dezembro de 2016

RESUMO

As variações das condições ambientais nas fases iniciais do desenvolvimento, como o consumo excessivo de dietas ricas em açúcar durante o desenvolvimento, podem produzir uma série de alterações neurofisiológicas no hipocampo levando a prejuízos na aprendizagem e memória. Além disso, a exposição a uma dieta palatável pode alterar o amadurecimento do hipocampo e causar perturbações na memória emocional. Neste estudo avaliou-se o efeito da dieta palatável crônica na memória e foi medido imunocontéudo de biomarcadores no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos Wistar. Os parâmetros comportamentais de memória foram avaliados pela tarefa de Reconhecimento de Objetos, Tarefa de alternância espontânea Y-maze e Tarefa de medo condicionado na idade adulta. Os parâmetros bioquímicos que foram avaliados foram atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e por *Western Blotting* o imunocontéudo de biomarcadores, como sinaptofisina (SYP), neurabina, óxido nítrico sintase neuronal (nNos), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), receptor de neurotrofina da família tirosina cinase (Trkb), e a cascata de sinalização da proteína cinase B (AKT) e sua forma fosforilada (p-AKT), no hipocampo dos animais em diferentes fases do desenvolvimento. Foram utilizados 62 ratos *Wistar*, divididos em 2 grupos: A (grupo controle ração padrão) e B (grupo ração + Dieta palatável). Neste estudo, a exposição a uma dieta crônica palatável induziu um comprometimento na memória de diferentes graus de emocionalidade. Adicionalmente, o consumo de dieta palatável aumentou a atividade da enzima Na^+, K^+ -Atpase no hipocampo no dia 28 pós-natal (28 PND) e continuou a aumentar até à idade adulta. Alterações nos marcadores sinápticos, como a sinaptofisina, o fator BDNF, AKT, p-AKT, foram reduzidas no hipocampo no 28 PND após o acesso à dieta. Entretanto, no dia 75 pós-natal (75 PND), a dieta palatável aumentou os níveis hipocampais de sinaptofisina, spinofilina/neurabin-II e diminuiu BDNF e nNos em ratos adultos. Em conclusão, este estudo apoia a ideia de que o aumento do consumo de uma dieta palatável durante os estádios de desenvolvimento está fortemente associado ao comprometimento da memória de diferentes graus de emocionalidade. A análise das proteínas e memória relacionadas à plasticidade apresentou resultados diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento avaliado. Estas diferenças encontradas nestes marcadores envolvidos na aprendizagem e na memória podem ser atribuídas a um processo adaptativo ou a uma falha na poda das espinhas dendríticas no hipocampo do animal.

Palavras-chave: alimentos confortantes; memória emocional; hipocampo; BDNF; nNos

Abstract

Variations of environmental conditions in the early stages of development, such as excessive consumption of sugar-rich diets during development, can produce a number of neurophysiologic changes without hippocampus leading to impairments in learning and memory. In addition, exposure to a palatable diet may alter the maturation of the hippocampus and cause disturbances in emotional memory. In addition, exposure to a palatable diet can alter the ripening of the hippocampus and cause disturbances in emotional memory. In this study the effect of the chronic palatable diet was evaluated in memory and immunocontent of biomarkers in the hippocampus was measured during development in Wistar rats. The memory behavioral parameters were evaluated by the task of Object Recognition, Y-maze spontaneous alternation task and Conditioned fear task in adulthood. The biochemical parameters that were evaluated were Na^+, K^+ -ATPase enzyme activity and Western blotting the immunocontent of biomarkers such as synaptophysin (SYP), neurabin, neuronal nitric oxide synthase (nNos), brain derived neurotrophic factor (BDNF), receptor (Trkb), and the protein kinase B (AKT) signaling cascade and its phosphorylated form (p-AKT) in the hippocampus of animals at different stages of development. Wistar rats were divided into two groups: A (control diet) and B (diet + palatable diet). In this study, exposure to a chronic palatable diet induced a memory impairment of varying degrees of emotionality. Additionally, the consumption of palatable diet increased Na^+, K^+ -Atpase enzyme activity in the hippocampus at day postnatal 28 (PND 28) and continued to increase until adulthood. Changes in synaptic markers, such as synaptophysin, BDNF factor, AKT, p-AKT, were reduced in the hippocampus in 28 PND after access to the diet. However, at postnatal period 75 (PND 75), the palatable diet increased the hippocampal levels of synaptophysin, spinofloxin /neurabin-II, and decreased BDNF and nNos in adult rats. In conclusion, this study supports the idea that increased consumption of a palatable diet during the developmental stages is strongly associated with impairment of memory of different degrees of emotionality. The analysis of proteins and memory related to plasticity presented different results depending on the stage of development evaluated. These differences found in these markers involved in learning and memory can be attributed to an adaptive process or a failure in pruning of dendritic spines in the animal's hippocampus.

Keywords: comfort foods; Emotional memory; hippocampus; BDNF; nNos.

1-INTRODUÇÃO:

Uma das principais características do sistema nervoso é a sua plasticidade. Durante o período pós-natal o sistema nervoso possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta ao ambiente circundante, em que as células estão se diferenciando e os tecidos estão em maturação(1). Esta plasticidade pode ser adaptativa ou tornar o cérebro mais vulnerável a insultos externos. Nesse contexto, as variações das condições ambientais nas fases iniciais do desenvolvimento, como a exposição à dieta rica em açúcar pode alterar a fisiologia e o desenvolvimento de diferentes estruturas no Sistema Nervoso Central (SNC), como hipocampo, podendo prejudicar a trajetória da maturação neural e assim, induzir um prejuízo na memória emocional (2).

A modulação da memória depende de uma sequência de reações bioquímicas, as quais são vulneráveis a intervenções ambientais diversas, como o consumo de alimentos altamente calóricos (3). Embora pesquisas recentes tenham chamado a atenção para o desenvolvimento do cérebro nas fases iniciais da vida (4-5), existem poucos estudos sobre como a preferência por alimentos palatáveis pode afetar o cérebro e a memória durante a pré-puberdade e a adolescência a fim de aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e demências na idade adulta.

Os estímulos ambientais como dieta, podem afetar significativamente a neurogênese em múltiplos níveis, mostrando efeitos sobre a cognição, humor e memória (6). Alguns estudos sugerem que a ingestão de dietas ocidentais, ricas em gordura e açúcar, está associada com prejuízos cognitivos na aprendizagem e em memórias dependentes de hipocampo (7). Num contraponto, um estudo recente traz evidências significativas e sugere que uma exposição a dieta de restrição calórica em algum período a partir da adolescência, melhora a memória espacial e aumenta os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em ratos adultos (8).

Tem-se discutido os obstáculos envolvidos nos efeitos da dieta sobre a plasticidade do cérebro, como visto em estudos com modelos animais, e em seres humanos, com intuito de prevenir o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta. Considerando que o consumo deliberado de alimentos palatáveis está ligado a diversas alterações neuroquímicas e comportamentais, o conhecimento dos mecanismos que desencadeiam esse comportamento é importante para identificação de possíveis alterações na memória emocional. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar como o consumo de alimentos confortantes durante as fases do desenvolvimento, pode modular memórias de diferentes espectros emocionais em ratos wistar na idade adulta. Corroborando com estes achados, as análises de marcadores biológicos, no hipocampo, tornam-se uma questão relevante de estudo, visto que, esta estrutura está intimamente envolvido com a memória e a cognição (9).

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos de uma dieta hiperpalatável sobre a modulação de memórias de diferentes graus de emocionalidade, avaliando proteínas sinalizadoras envolvidas com a memória e a cognição no hipocampo de ratos wistar durante as fases do desenvolvimento.

2.2 Específicos

- Avaliar memórias de diferentes graus de emocionalidade através de tarefas comportamentais de memória neutra, intermediária e aversiva em ratos Wistar adultos, submetidos a uma dieta hiperpalatável durante o desenvolvimento;
- Verificar em qual tipo de tarefa comportamental avaliada, os animais que receberam alimento confortante apresentarão maior prejuízo na memória;

- Investigar possíveis alterações nos biomarcadores: Na⁺K⁺-ATPase, Trkb, BDNF, AKT, p-AKT, sinaptofisina, nNOS, Neurabina no hipocampo de ratos Wistar durante as fases do desenvolvimento e verificar em qual destas fases ocorrerá alterações.
- Correlacionar os biomarcadores alterados com as tarefas comportamentais de diferentes graus de emocionalidade.

3. HIPÓTESES

- Os animais submetidos ao consumo crônico de um alimento confortante terão um prejuízo na memória, observado na realização das tarefas comportamentais de distinto grau de emocionalidade como, neutro, intermediário e aversivo;
- O maior prejuízo da memória induzido pelo consumo crônico de alimentos confortantes será observado na tarefa aversiva do medo condicionado por avaliar uma memória com alto grau de emocionalidade.
- O consumo de dieta hiperpalatável irá induzir uma diminuição nos níveis dos marcadores moleculares estudados no hipocampo de animais;
- Será observada uma redução nos níveis dos marcadores biológicos a partir da adolescência e permanecerão reduzidos na idade adulta;
- A redução nos níveis do BDNF no hipocampo desde o período da adolescência, será diretamente correlacionada com o prejuízo da memória, observado nos animais expostos ao consumo de alimentos confortantes durante o desenvolvimento.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Estratégias de busca

A base de dados consultada foi PUBMED. O quadro abaixo apresenta os descritores utilizados, o número de resumos encontrados e selecionados, bem como o número de artigos incluídos até o momento.

Os critérios de inclusão foram: idioma inglês e português, modelo pré-clínico, memória relacionada à exposição da dieta palatável.

DESCRITORES	PUBMED	ARTIGOS SELECIONADOS
Caloric Diet AND HPA	26	3
Caloric Diet AND Neural Development	41	3
Caloric diet AND Memory	144	2
Palatable Diet AND Memory	14	2
Sucrose Diet AND Memory	77	1
Caloric Diet AND BDNF	49	1
Caloric Diet AND Emotional memory	10	1
Artigos encontrados nas referências de artigos		33
Total de artigos selecionados		46

No ANEXO A, apresenta-se um quadro resumido com os principais artigos utilizados na elaboração deste projeto.

4.2-Fundamentação teórica:

4.2.1 Período Neonatal: Fases do Desenvolvimento e Sistema Nervoso Central

Existem períodos sensíveis no desenvolvimento, como por exemplo, o período neonatal, a infância e a adolescência, os quais são fases específicas quando processos dependentes da genética e de fatores ambientais interagem para estabelecer características funcionais (10). Durante esses períodos iniciais da vida, o encéfalo está passando por diversos processos fundamentais como organização funcional das redes neurais, proliferação neural, migração, diferenciação, além de gliogênese e mielinização (11).

Cronologicamente nos roedores podemos considerar o período neonatal logo após a gestação, compreendendo até o 21º dia de vida pós-natal. Logo após o desmame, a partir do 21º até 30º dia de vida pós-natal o animal está na fase pré-púbere a qual antecede a maturação dos hormônios gonadais (12). Do 30º ao 45º dia de vida pós-natal os roedores estão na adolescência, período importante para o pico da maturação dos hormônios sexuais (13). Por volta do 60º dia de vida pós-natal, o animal inicia sua fase adulta. Durante as fases da prépuberdade e adolescência os animais estão em constantes transformações comportamentais e neurobiológicas, tais como aumento da força, da função imune e das habilidades cognitivas (14). Além disso, esses períodos precoces do desenvolvimento são marcados pela maturação dos comportamentos sociais como aumento do comportamento de brincadeira e do comportamento exploratório (13, 15).

Durante o período pós-natal, o sistema nervoso é caracterizado por um intenso e constante remodelamento cerebral sendo modificado e moldado pela experiência, a fim de ajustá-lo para o ambiente específico em que o animal vai viver. Esta plasticidade promove mudanças de adaptação, mas também torna o cérebro mais vulnerável a insultos. Cabe ressaltar que a maturação e a plasticidade durante o desenvolvimento são altamente variáveis em diferentes regiões cerebrais, incluindo aquelas envolvidas no processamento e na regulação do estresse e da emoção: o córtex pré-frontal, por exemplo, possui uma maturação tardia (16), e o hipocampo

apresenta um aumento na neurogênese e densidade dos espinhos dendríticos antes da puberdade, o que diminui na idade adulta (10, 17). Além disso, a composição de proteínas sinalizadoras no hipocampo também é alterada entre o desmame e a idade adulta (17). Muitos sistemas de neurotransmissores, incluindo o sistema dopaminérgico e o glutamatérgico, apresentam uma maturação durante estes estágios iniciais do desenvolvimento (18).

Baseado no exposto acima, intervenções ambientais precoces durante essas fases de intensa maturação cerebral podem influenciar a susceptibilidade a doenças ou a resiliência na idade adulta (19). Foi demonstrado recentemente que a exposição a fatores externos, como uma dieta altamente calórica, nas fases iniciais do desenvolvimento, levou ao prejuízo da neurogênese em ratos adolescentes e causou déficits na memória espacial na idade adulta (4). Estes efeitos a longo-prazo, por influência do ambiente na vida precoce do animal têm mostrado prejuízos irreversíveis com relação aos aspectos emocionais, cognitivos, comportamentais e metabólicos (20).

Assim, o desenvolvimento e a gravidade de diversas condições patológicas na vida adulta dependem não só da vulnerabilidade genética do indivíduo, como também da exposição a fatores ambientais adversos e do período de ocorrência do evento ou fator ambiental (21), destacando-se principalmente os estágios iniciais do desenvolvimento.

4.2.1 Consumo de dietas palatáveis: comportamento emocional

O comportamento emocional está intimamente relacionado com a ingestão de alimentos altamente palatáveis. É importante definir que a ingestão alimentar é regulada por duas vias complementares: (a) homeostática e (b) hedônica. A via homeostática controla o balanço energético por aumentar a motivação para comer quando ocorre a redução dos estoques de gordura. A via hedônica, ou regulação baseada na recompensa, pode sobrepor-se à via homeostática durante períodos de relativa abundância de energia, aumentando o desejo de consumir alimentos altamente palatáveis, comportamento este podendo estar associado às características emocionais do indivíduo. Foi demonstrado que este tipo de dieta altamente palatável alterou o comportamento cognitivo através da diminuição direta da plasticidade

neuronal e reduziu o impacto negativo do estresse em termos de ansiedade, depressão e atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)(22).

Por exemplo, uma dieta de cafeteria administrada durante as fases iniciais de desenvolvimento, não só promove obesidade e distúrbios metabólicos, mas também tem impacto sobre o comportamento emocional, ativação do eixo HPA e prejuízo na memória espacial na vida adulta (23).

Sendo assim, é pertinente dizer que dependendo da quantidade, do tipo e do tempo de exposição a um alimento confortante ao longo da vida, podem-se encontrar diferentes respostas com relação às moléculas mediadoras da ativação do eixo HPA e possivelmente diferenças com relação ao comportamento emocional do animal.

4.2.2-Dietas palatáveis e memórias de diferentes graus de emocionalidade.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a íntima associação entre o aumento do consumo de dietas altamente energéticas com o risco para o surgimento de doenças neurológicas e déficits cognitivos, incluindo demência e Alzheimer (24-26). Em uma coorte prospectiva populacional de idosos, o risco de comprometimento cognitivo leve ou demência foi aumentado em indivíduos que derivaram uma alta porcentagem de sua energia de carboidratos, mas foi reduzida naqueles que derivaram uma alta porcentagem de energia de gordura e proteína(4). Dessa forma, a maior ingestão de carboidratos, particularmente açúcares simples, têm sido associados com menor função cognitiva.

A memória pode ser definida como o registro da representação de informações adquiridas através de experiências. A intensidade e a duração da memória são determinadas pela importância da informação e pela emoção envolvida no momento da aquisição da mesma (3).

O estudo da memória em modelos animais envolve tarefas comportamentais que apresentam diferentes graus de emocionalidade. A tarefa do reconhecimento de objetos avalia memória com emocionalidade neutra a qual pode ser avaliada com troca de objeto ou troca do lugar do objeto, que são, respectivamente, dependentes do córtex e do hipocampo (8). Estudos

vêm demonstrando que dependendo do tempo de exposição aos alimentos altamente calóricos pode ocorrer diferenças com relação à tarefa de reconhecimento de objetos. Uma curta exposição de dietas ricas em gordura e açúcar ou apenas rica em açúcar, induziu um prejuízo na memória de reconhecimento da troca de lugar do objeto, mas não houve diferença com relação à exploração do objeto novo, mostrando que o consumo de alimentos hiperpalatáveis prejudicou a memória dependente de hipocampo (27). No entanto, o consumo crônico de uma solução de 32% de sacarose mostrou um prejuízo no reconhecimento do objeto novo (28). Com relação à avaliação de memórias de grau emocional intermediário como labirinto do braço radial, Y-maze e labirinto aquático de Morris, ambas as tarefas comportamentais utilizam dicas espaciais para aquisição da memória dependente do hipocampo (29). Dentro deste parâmetro de avaliação da memória espacial, tem sido observado que o uso crônico de dieta ocidental (rica em gordura e açúcar) induz prejuízos cognitivos na aprendizagem e memória de roedores adultos (7, 27).

No contexto de uma memória aversiva, a tarefa do medo condicionado ao contexto, tem sido investigada com animais que recebem dietas palatáveis. O animal é exposto a um contexto aversivo com um breve choque nas patas, após 24 horas os animais são expostos novamente ao mesmo contexto e se não ocorreu um prejuízo no hipocampo os animais tendem a lembrar deste contexto aversivo e respondem com um comportamento defensivo, congelando os movimentos (“freezing”) (3, 30). Um recente estudo investigou animais na idade adulta expostos a uma dieta de cafeteria oferecida por 8 semanas, e quando os animais foram expostos ao contexto aversivo apresentaram um prejuízo no comportamento defensivo indicando que possivelmente a exposição crônica de alimentos palatáveis prejudica memórias de medo (30).

O Medo condicionado Pavloviano induz um aumento na sincronização da atividade de frequência-teta na amígdala lateral e região CA1 do hipocampo (31). Tais resultados sugerem fortemente que a ativação de um circuito amígdala-hipocampo está envolvida na aprendizagem e memória do medo.

Um estudo recente (30), sugere que o consumo de uma dieta rica em gordura e açúcar prejudica elementos de uma memória aversiva dependente do hipocampo reduzindo a plasticidade e causando déficits na memória aversiva.

Vários estudos apontam para o prejuízo de memórias induzidas pelo consumo tanto a curto, quanto a longo-prazo de alimentos altamente calóricos, ricos em açúcar e/ou gorduras. No entanto, pouco é sabido sobre como estes alimentos palatáveis oferecidos durante as fases do desenvolvimento podem modular a emoção destes animais a ponto destes lidarem melhor com uma tarefa comportamental neutra ou aversiva na idade adulta. Para isto, estudar a correlação entre essas tarefas comportamentais de distinto grau de emocionalidade, torna-se uma questão digna de estudo.

Compreender os processos e sistemas neurobiológicos que contribuem para tais diferenças nas memórias é o foco da pesquisa sobre a modulação de memórias (32).

4.2.3 Dietas palatáveis e biomarcadores envolvidos na memória

Marcadores moleculares envolvidos com a cognição e a neuroplasticidade tem sido alvo de influências ambientais como a exposição de alimentos altamente palatáveis, e estão diretamente envolvidos com o prejuízo na função executiva, na atenção, no aprendizado e na memória. Dentro deste contexto, é relevante para o desenvolvimento do sistema nervoso central a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, uma enzima que mantém o gradiente neuroquímico essencial para a excitabilidade neuronal e cuja atividade é influenciada por intervenções ambientais, como estressores no início da vida (Noschang et al., 2012; Silveira et al., 2011)

Um dos biomarcadores bem elucidado no contexto dos processos cognitivos e na memória é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (8). Esta neurotrofina apresenta

um papel fundamental na sobrevivência, manutenção e crescimento de muitos tipos de neurônios sendo expressa de forma abundante no hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral (33). O BDNF afeta a plasticidade neuronal e a memória de longa duração. Relevante para o contexto do presente projeto é que o BDNF é largamente expresso no hipocampo tanto no cérebro em desenvolvimento sendo essencial para neurogênese (34) e sobrevivência de neurônios durante as fases precoces da vida (35). Com base no exposto acima, é fundamental o papel do BDNF para maturação e desenvolvimento do hipocampo, e possivelmente intervenções ambientais precoces podem reduzir os níveis desta neurotrofina ao longo das fases do desenvolvimento e induzir alterações comportamentais principalmente relacionadas com a memória e a cognição na idade adulta.

A exposição precoce e crônica de alimentos calóricos durante as fases de desenvolvimento do animal mostraram uma redução na expressão do BDNF no hipocampo. Um estudo que avaliou uma exposição a curto-prazo de uma dieta de cafeteria não encontrou diferenças significativas com relação aos níveis de BDNF (36), porém sabe-se que uma redução nos níveis desta neurotrofina causa um prejuízo na memória em períodos de dieta usados em estudos que variam a partir de 2 meses a 2 anos de exposição (27, 37). Em contrapartida, restrição calórica durante adolescência induziu um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo dos animais (8). Esse fato é importante, pois as dietas ricas em gordura e açúcar têm mostrado uma redução na expressão de BDNF e tem sido correlacionada com déficits de memória e cognição, podendo ser marcadores biológicos de transtornos psiquiátricos.

Um importante marcador sináptico é a sinaptofisina, uma proteína associada à vesícula sináptica, comumente usada como uma estimativa do número de sinapses funcionais envolvidas na neurotransmissão (39). O óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), é um marcador bastante estudado, podendo influenciar a plasticidade sináptica e induzir a morte celular, levando à degeneração neuronal (41). Um estudo refere que a expressão de nNOS foi reduzida após dieta crônica rica em gordura e carboidratos, tanto no córtex como no hipocampo (42).

Outra proteína importante na participação da formação de sinapses é a neurabina cuja função primordial é atuar como um marcador de espinhos dendríticos dos neurônios em regiões do córtex pré-frontal e hipocampo, onde podem servir como uma proteína adaptadora de recrutamento das moléculas importantes para a transmissão sináptica e plasticidade. Um estudo investigou a memória do medo, a transmissão sináptica basal, a curto prazo e a plasticidade sináptica a longo prazo (LTP e LTD) em neurônios na região CA1 do hipocampo de ratos adultos. Os resultados deste estudo sugerem que a neurabina desempenha um papel crítico no hipocampo e que está diretamente relacionada com a memória de medo contextual, (43).

Estes estudos mostram o quanto o hipocampo é vulnerável a influência de fatores ambientais como alimentos altamente palatáveis, e com isso os marcadores moleculares presentes na funcionalidade desta estrutura encefálica tornam-se susceptíveis a exposição do consumo destes alimentos calóricos independente da fase do desenvolvimento.

5. METODOLOGIA

5.1 Delineamento

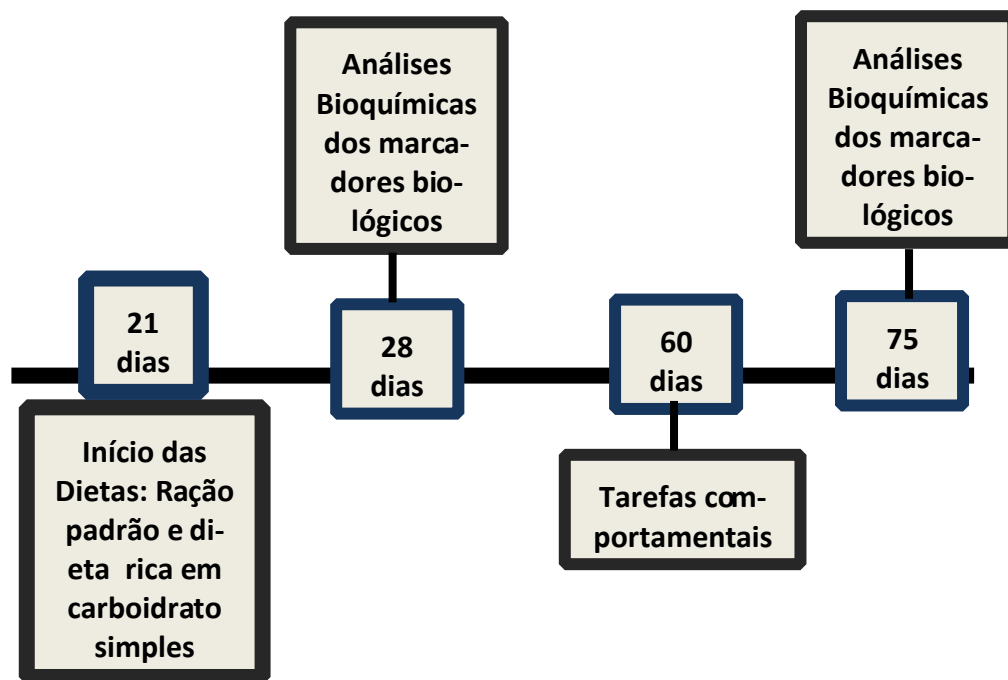
Estudo Experimental.

5.2 Animais e Desenho Experimental

Foram utilizados 62 ratos machos Wistar de 21 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil), randomicamente selecionados. Os ratos permaneceram, em caixas-moradia, confeccionadas em *Plexiglas* medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de maravalha, e foram mantidos em um ambiente controlado: ciclo normal claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 20^{\circ}\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, água, dieta hiperpalatável ou ração padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory*

Animal Care (NIH publication 85-23, 1985), obedecem às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences* – CIOMS) e a Lei AROUCA nº 11.794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais que foram utilizados neste estudo foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética para experiência com animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Com relação ao desenho experimental os animais foram divididos em dois grupos: animais que receberam apenas ração padrão e animais que receberam ração padrão e dieta hiperpalatável. As análises bioquímicas foram realizadas no 28º, e 75º dia de vida pós-natal, enquanto que as tarefas comportamentais foram realizadas apenas na idade adulta por volta do 60º dia de vida pós-natal, como mostra na figura a baixo.



5.3 Cálculos do tamanho da amostra

Por meio da utilização do programa *Minitab* foi determinado o número de animais que deverão ser utilizados para realização das técnicas descritas nesse projeto, como está descrito abaixo:

Para as tarefas comportamentais avaliadas (reconhecimento de objetos, medo condicionado e Y maze), que apresentam um desvio padrão ao redor de 20%, utilizando-se uma diferença entre os grupos de 30%, poder de 0,8 e significância de 0,05, o tamanho amostral será de 11-18 animais por grupo, resultando em um poder real de 84%.

Para as análises de proteínas (NaKATPase, Trkb, BDNF, Nnos, AKT, pAKT e sinaptofisina) por meio da técnica de Western Blotting no hipocampo que apresentam desvio padrão ao redor de 30%, utilizando-se uma diferença entre os grupos de 50%, poder de 0,8 e significância de 0,05, o tamanho amostral calculado foi de 5-7 animais por grupo, resultando em um poder real de 83%.

5.4 Composição da Dieta Hiperpalatável:

Os grupos foram subdivididos em (a) recebendo ração padrão *ad libitum* (*livre escolha*) ou (b) recebendo ração padrão e uma dieta hiperpalatável *ad libitum*.

Ração: 50% carboidrato (proveniente do amido), 22% proteína, 12% umidade, 12% minerais e fibras e 4% gordura.

Dieta hiperpalatável: é enriquecida com carboidratos simples e é feita de leite condensado, sacarose, vitaminas e sais, ração padrão em pó, proteína de soja purificada, óleo de soja, água, metionina e lisina. O conteúdo nutricional desta dieta é semelhante ao da ração padrão (incluindo 22% de proteína e 4-6% de gordura), no entanto a maioria dos carboidratos na dieta palatável foram da sacarose (a partir de leite condensado e sacarose). Em contraste, a ração padrão era composto de carboidratos complexos principalmente de amido.

O consumo de ração e de dieta hiperpalatável foi avaliado regularmente até atingir a idade adulta. Os animais foram pesados uma vez por semana até o fim do experimento.

5.5 Tarefas Comportamentais

5.5.1 Tarefa Reconhecimento de objetos (RO)

Habituação: Cada rato foi colocado durante 3 dias consecutivos, 20 minutos por dia na caixa do RO a fim de que pudesse explorá-la livremente antes do primeiro ensaio de reconhecimento de objetos. No treino, 2 objetos diferentes (A e B) foram fixados na arena (com a mesma distância entre eles e as paredes laterais) para que os animais pudessem explorá-los livremente durante 5 minutos. Foi contabilizado como tempo de exploração do objeto toda vez que o rato cheirar, tocar ou aproximar-se a menos de 2 cm do objeto. Apoiarse no objeto não conta como exploração. O teste ocorreu 24h após o treino quando um dos objetos foi aleatoriamente substituído por um novo objeto (C/D/E/F) e os animais foram colocados novamente na arena por 5 minutos (seguindo as mesmas observações do treino). Foi observado o percentual do tempo total de exploração dedicado a cada objeto. Espera-se que o rato explore igualmente os dois objetos no treino e, em caso de aprendizagem, no teste ele deve explorar mais o objeto novo do que o antigo (38).

5.5.2 Troca do lugar do objeto

Os ratos foram familiarizados com um objeto em uma primeira fase, e depois ocorreu a troca do lugar do objeto em uma segunda fase.

Na fase de teste de local, foram apresentados dois objetos idênticos utilizados para familiarização; um permaneceu na sua orientação original local, enquanto o outro foi transferido para um dos quatro cantos quadrantes da arena. A fase de teste durou 3 minutos. A exploração foi definida como a cabeça do rato dentro perto de 2 cm do objeto com o pescoço alargado e se movendo ao redor do objeto (27).

5.5.3 Tarefa memória espacial Y-maze

A memória intermediária de reconhecimento espacial dos animais foi investigada usando um paradigma Y-maze (Dellu et al., 1997). O aparato consiste de três braços (50x10x20 cm³) além de plástico preto, colocado em uma sala com pistas visuais nas paredes. O teste Y-maze consiste em dois ensaios separados por um intervalo de uma hora. No primeiro ensaio, o animal foi colocado na extremidade de um braço e permitido o acesso a esse braço e outro braço, durante 5 min. O terceiro braço foi bloqueado por uma porta de guilhotina. O rato foi removido do labirinto e devolvido à sua gaiola de origem. Para o segundo julgamento, o rato foi colocado de volta no braço de início do labirinto e foi dado livre acesso a todos os três braços por 5 min. Foram registrados o número de entradas e o tempo passado em cada braço. A percentagem de entradas e o tempo gasto no braço novo foram comparados com a exploração aleatória dos três braços do labirinto. Todos os experimentos comportamentais foram realizados em uma sala com som atenuado sob a luz de baixa intensidade. Todos os aparelhos foram limpos com uma solução de etanol a 30% e, em seguida, secos com uma toalha de papel após cada ensaio (29).

5.5.4 Tarefa de medo condicionado

O teste de medo condicionado é utilizado para descrever a formação de memórias aversivas, resultante de uma situação de perigo, onde está associada a processos de reações e adaptações frente a situações de risco (3). No treino, os animais foram colocados em aparato de medo condicionado ao contexto, que consiste em uma caixa de madeira nas dimensões 28 x 26 x 23 cm, com barras metálicas na base, por onde é conduzida a corrente elétrica. Os animais permaneceram na caixa durante 3 minutos, para ambientação. Ao término deste período, os animais receberam 3 choques de 0,7 mA, com duração de 2 segundos e 30 segundos de intervalo entre choques (sessão de treino). O teste foi realizado vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram colocados novamente no aparato, durante 5 minutos, mas não receberam qualquer choque (sessão de teste). O tempo de congelamento dos animais foi

determinado, sendo este considerado uma medida da força da memória de medo do animal

(40)

5.6 Análises Bioquímicas

Os animais foram mortos por decapitação aos 28^o e 75^o dias de vida pós-natal. Os hipocampus destes animais foram rapidamente dissecados. As amostras destinadas às técnicas de *Western Blotting* foram imediatamente congeladas a -80° C.

5.6.1 Análise por *Western Blotting* das proteínas envolvidas com o paradigma de memória (Trkb, BDNF, Sinaptofisina, AKT, pAKT, Nnos, Neurabina)

Amostras foram fervidas na presença de 500µL de solução bloqueadora (4% sódio dodecil sulfato [SDS], 250mMTris-HCl, pH 6.8, 1% β-mercaptoetanol, 1% bromofenol Azul, e 20% glicerol) por 2 minutos a 90 °C. Proteínas (40 µg por pista) foram separadas em um gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore). As amostras foram normalizadas de acordo com o total de proteínas, com quantidades iguais de cada proteína carregada por pista. Depois de bloqueados com solução de leite 5% dissolvido em TBS-T por 2 h, as proteínas foram incubadas overnight a 4°C, com os anticorpos primários (anti-TRKB 1:1000; anti-BDNF 1:2000; No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e TBS e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho conjugados a peroxidase (anti-GR 1:1000; anti-TRKB 1:1000; BDNF 1:1000. Depois os blots foram lavados com TBS-T e as proteínas foram observadas usando um reagente potencializador de quimiluminescência (Amersham Pharmacia Biotech,Aylesbury,UK) por 5 min. Logo as membranas foram colocadas em um foto documentador e os blots foram analisados com o programa adequado chamado Image J.

5.7 Análise de Dados

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 21.0 e representados em gráficos do programa Prisma 5. Para análise das tarefas comportamentais na idade adulta foi utilizado o *Test-t Student* e a Análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, usando como fator dieta palatável. Para análise dos parâmetros bioquímicos avaliados foi utilizada *Test-t Student* usando como fator dieta palatável. Os valores foram representados através de média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os níveis de significância foram aceitos como diferentes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

5.8 Cronograma de atividades

O prazo para execução do projeto foi de 24 meses, conforme cronograma abaixo (tabelas 1-2). O tratamento dos animais e a execução das tarefas comportamentais foram desenvolvidos no laboratório de Neurobiologia do Estresse, sob supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Carla Dalmaz, a qual foi coorientadora deste projeto, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de neurociências clínicas da UCPel sob supervisão da Prof^ª. Dr^ª Rachel S.S Bast, orientadora deste projeto.

Tabela 1. Cronograma das atividades previstas do primeiro ano

	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comitê de ética		X	X							
Qualificação							X			
Tratamento dos animais (início da dieta palatável)							X	X	X	
Comportamento reconhecimento de objetos									X	X
Comportamento Y maze									X	X
Comportamento Medo condicionado									X	X

Tabela 2. Cronograma das atividades previstas do segundo ano:

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Digitação dos dados comportamentais	X	X										
Análises estatísticas dos dados comportamentais			X									
Análises bioquímicas			X	X					X	X		
Digitação dos dados bioquímicos					X					X		
Análises estatísticas dos dados bioquímicos					X	X						
Participação em congressos				X				X	X	X		
Redação de artigo científico						X	X	X	X			
Defesa da dissertação											X	X

5.9 Orçamento

Para realização deste projeto os animais serão fornecidos pelo Centro de Produção e Experimentação Animal (CEPEA) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os cuidados gerais com os mesmos (água, ração, limpeza das gaiolas) foram efetuados pelo pessoal do CEPEA do Departamento de Bioquímica. Os aparatos para a realização das tarefas comportamentais, os equipamentos necessários para a realização deste trabalho (guilhotina, etc), diversos reagentes (tampões, etc) foram disponibilizados no Departamento de Bioquímica e no laboratório da professora Dra. Carla Dalmaz e equipamentos para análises bioquímicas foram disponibilizados pela UCPel. No laboratório de neurociências clínicas.

Materiais de consumo	Valor total R\$	Financiamento
Materiais diversos - Ependorfs, ponteiras, amarelas e azuis, luvas.	200,00	Próprio e CAPES
Reagentes bioquímicos – Anticorpos para dosagem de proteínas Reagentes para <i>Western blotting</i> - Caixas de géis	2.267,00 600,00	Próprio e CNPq
	Total: 3067,00	

6- Referências

1. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source*. 2012;11:42.
2. Osborne DM, Pearson-Leary J, McNay EC. The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:164.
3. Schmidt do Prado-Lima PA, Perrenoud MF, Kristensen CH, Cammarota M, Izquierdo I. Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 2011 Jul;36(4):250-5.
4. Cormick C. The Challenges of Community Engagement. *Nanoethics*. 2010 Dec;4(3):229-31.
5. Giedd JN, Rapoport JL. Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron*. 2010 Sep 9;67(5):728-34.
6. Kuipers SD, Bramham CR, Cameron HA, Fitzsimons CP, Korosi A, Lucassen PJ. Environmental control of adult neurogenesis: from hippocampal homeostasis to behavior and disease. *Neural plasticity*. 2014;2014:808643.
7. Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & behavior*. 2011 Apr 18;103(1):59-68.
8. Kaptan Z, Akgun-Dar K, Kapucu A, Dedeakayogullari H, Batu S, Uzum G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain research*. 2015 Aug 27;1618:194-204.
9. Souza GG, Mendonca-de-Souza AC, Barros EM, Coutinho EF, Oliveira L, Mendlowicz MV, et al. Resilience and vagal tone predict cardiac recovery from acute social stress. *Stress*. 2007 Nov;10(4):368-74.
10. Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2007 Feb;86(2):18999.
11. Barone S, Jr., Das KP, Lassiter TL, White LD. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology*. 2000 Feb-Apr;21(1-2):1536.
12. Eiland L, Romeo RD. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*. 2013 Sep 26;249:162-71.
13. Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature neuroscience*. 2004 Oct;7(10):1040-7.
14. Dahl RE. Adolescent development and the regulation of behavior and emotion: introduction to part VIII. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Jun;1021:294-5.
15. Kleinhaus K, Steinfeld S, Balaban J, Goodman L, Craft TS, Malaspina D, et al. Effects of excessive glucocorticoid receptor stimulation during early gestation on psychomotor and social behavior in the rat. *Developmental psychobiology*. 2010 Mar;52(2):121-32.
16. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 May 25;101(21):8174-9.
17. Weitzdorfer R, Hoyer H, Shim KS, Cekici L, Pollak A, Lubec G. Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. *Hippocampus*. 2008;18(8):807-13.

18. Spear L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2000;24(2):115-23.
19. Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature reviews Neuroscience*. 2008 Dec;9(12):947-57.
20. Pervanidou P, Chrousos GP. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012 May;61(5):611-9.
21. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Hormone research*. 2003;59(4):161-79.
22. De Souza AM, Potts JE, Potts MT, De Souza ES, Rowland TW, Pritchard SL, et al. A stress echocardiography study of cardiac function during progressive exercise in pediatric oncology patients treated with anthracyclines. *Pediatric blood & cancer*. 2007 Jul;49(1):56-64.
23. Warneke W, Klaus S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2014 Jan;116:45-54.
24. Eskelinen MH, Ngandu T, Helkala EL, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, et al. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *International journal of geriatric psychiatry*. 2008 Jul;23(7):741-7.
25. Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *Journal of cellular physiology*. 2002 Feb;190(2):133-59.
26. Solfrizzi V, Frisardi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Vendemiale G, et al. Dietary fatty acids in dementia and predementia syndromes: epidemiological evidence and possible underlying mechanisms. *Ageing research reviews*. 2010 Apr;9(2):184-99.
27. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. *Nutrients*. 2015 Aug;7(8):6719-38.
28. Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiology & behavior*. 2009 Jan 8;96(1):1-5.
29. Pandolfo P, Machado NJ, Kofalvi A, Takahashi RN, Cunha RA. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2013 Apr;23(4):317-28.
30. Reichelt AC, Maniam J, Westbrook RF, Morris MJ. Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. *Brain, behavior, and immunity*. 2015 Jan;43:68-75.
31. Pape HC, Narayanan RT, Smid J, Stork O, Seidenbecher T. Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. *Hippocampus*. 2005;15(7):874-80.
32. Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behavioral neuroscience*. 2011 Dec;125(6):797-824.
33. Leffad M, Cousens R, Raoult D. CMI editorial report, 2015. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015 Mar;21(3):207-13.
34. Lee SH, Ingles PJ, Knipple DC, Soderlund DM. Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *Vssc1* sodium channel gene. *Invertebrate neuroscience : IN*. 2002 Apr;4(3):125-33.

35. Linnarsson S, Willson CA, Ernfors P. Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice. *Brain research Molecular brain research*. 2000 Jan 10;75(1):61-9.
36. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, behavior, and immunity*. 2014 Mar;37:134-41.
37. Morris MJ, Beilharz JE, Maniam J, Reichelt AC, Westbrook RF. 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 Dec 10.
38. Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Toniazzo AP, Berlitz C, Lazzaretti C, et al. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. *Int J Dev Neurosci*. 2016 May;50:16-25.
39. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Aug;6(8):603-14.

Considerações finais

O presente estudo verificou a forte influência do consumo de alimentos palatáveis ricos em açúcar sobre a memória emocional. Nossos achados mostraram que o consumo precoce e crônico desta dieta calórica, induziu prejuízo na memória com diferentes graus de emoção no animal adulto. Além disso, foi observado que os marcadores bioquímicos apresentaram diferentes alterações no hipocampo dependendo do estágio do desenvolvimento avaliado. Contudo, é importante apontar que o hipocampo apresenta diferente vulnerabilidade à intervenção ambiental dependendo do tempo e do período que a dieta palatável é oferecida.

Cabe ressaltar que o impacto do consumo de dietas ricas em açúcar a longo-prazo no SNC é de grande importância, já que estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram uma associação entre o aumento do consumo de dietas altamente energéticas com maior vulnerabilidade de lesão cerebral e risco para o surgimento de déficits neurológicos e cognitivos, incluindo demência e Alzheimer. Nesse sentido, o nosso estudo aponta grande relevância para o âmbito científico, uma vez que o consumo deliberado de alimentos palatáveis está ligado a diversas alterações neuroquímicas e comportamentais e o conhecimento dos mecanismos que desencadeiam esse comportamento é importante para identificação de possíveis alterações na memória emocional, principalmente quando o estudo ocorre em estágios precoces do desenvolvimento, pois assim, possivelmente poderá se prevenir futuros transtornos psiquiátricos.

ANEXOS

ANEXO A

Autor, ano e país	Título	Delineamento	Metodologia	Resultados
Kanoski& Davidson EUA 2010	Western Diet Consumption and Cognitive Impairment: Links to Hippocampal Dysfunction and Obesity	Review	-Diferentes metodologias de exposição à dietas ocidentais associadas com prejuízos cognitivos na aprendizagem e na memória com ênfase nas funções do hipocampo.	-Dietas ricas em gordura e açúcar refletem na diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo além de prejuízos na memória espacial.
Kaptan et al, Turkia 2015	Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level...	Experimental 28 ratas submetidas a uma dieta de restrição calórica por 4 semanas.	-Labirinto aquático de Morris para investigar a memória espacial, -Avaliação dos níveis de BDNF no hipocampo e CPF.	-A restrição calórica na adolescência aumenta o número de neurónios e níveis de BDNF no hipocampo. -Melhora o desempenho dos ratos na tarefa de memória espacial, melhora da cognição.
Morris et al, Austrália 2014	Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and, cognition.	Review	Discute a relação dos alimentos confortantes com obesidade, stress e cognição.	-A exposição aos carboidratos simples, estão associadas a uma diminuição do BDNF no hipocampo. - Relacionado a memória.

Beilharz et al, Austrália 2014	Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object	Experimental	-Ratos alimentados com dieta de cafeteria e uma solução de sacarose 10% durante 5,11 e 20 dias. -Tarefa de Reconhecimento de objetos	-Curta exposição a dietas ricas em gordura e açúcar ou ricas em açúcar, prejudicam a memória de reconhecimento de lugar (dependentes de HP)
---	--	---------------------	---	---

	recognition memory in rats			
Reichert et al, Austrália 2015	Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases Hippocampal reelin expression	Experimental 32 ratos divididos 2 grupos 16 C 16 GDC	-Memória avaliada pela tarefa de medo condicionado, choque nas patas.	-Ratos alimentados com dieta palatável tiveram reduções na plasticidade do hipocampo e prejuízos na memória aversiva. - Ratos Dieta congelaram menos do que os ratos alimentados com ração.
Beilharz et al, Austrália 2015	Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions	Review	-Discute as relações das dietas ricas em gordura e açúcar com os mecanismos cognitivos e a memória.	-As dietas ricas em gordura e açúcar reduzem a expressão de BDNF no hipocampo e esta tem sido correlacionada com déficits de memória.
Osborne USA 2015	The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory	Review	-Alterações no metabolismo do stress e glicose afeta a memória.	-O stress crônico e elevação prolongada dos Glicocorticóides no HP causa excitotoxicidade no metabolismo da glicose e déficits de memória.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CPF	Córtex Pré-Frontal
DC	Dieta de Cafeteria
HP	Hipocampo
HPA Mg	Hipotalâmico-pituitário-adrenal
µl	Microlitro
PUBMED	Banco de dados artigos científicos
RO	Reconhecimento de Objetos
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Solução tampão
Trkb,	Receptor BDNF

ARTIGO: “Impact of consumption of a palatable diet during development on the memory of different degrees of emotionality”.

O artigo será submetido à revista Neuroscience.

IMPACT OF CONSUMPTION OF A PALATABLE DIET DURING DEVELOPMENT ON THE MEMORY OF DIFFERENT DEGREES OF EMOTIONALITY.

Viviane Alterman Torre^a; Pamela Salerno da Silva^a; Danusa Mar Arcego^b; Emily dos Santos Garcia^b; Camilla Lazzaretti^c; Carla Dalmaz^{b,c} Rachel Krolow^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas (UCPel), Pelotas, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica/Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Rachel Krolow

E-mail: rachelkrolow@yahoo.com.br

ABSTRACT

During the postnatal period, the nervous system is characterized by an intense and constant brain remodeling, and excessive consumption of diets rich in sugar during development promoting a series of neurophysiologic changes in the hippocampus. We evaluated the effect of a chronic palatable diet on distinct types of memory in 62 male adult Wistar rats (Object Recognition tests, Y-maze and fear conditioning) and investigated hippocampal plasticity markers. In this study, the exposure to a chronic palatable diet induced an impaired in the memory of different degrees of emotionality. Additionally, the palatable diet consumption increased Na^+ , K^+ -Atpase activity in the hippocampus at postnatal day 28 (PND 28) and remained increasing until adulthood. Alterations in synaptic markers such as, synaptophysin, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), protein Kinase B (AKT), protein kinase B phosphorylated-(p-AKT), were reduced in the hippocampus at PND 28 after palatable diet access. However, at postnatal day 75 (PND 75), the palatable diet increased hippocampal levels of synaptophysin, spinophilin/neurabin-II and decreased levels of BNF and neuronal nitric oxide synthase (nNos) in adult rats. In conclusion, this study supports the idea that increase in consumption of a palatable diet during the developmental stages is strongly associated with memory impairment of different degrees of emotionality. Analysis of plasticity-related proteins and memory had different results depending on the stage of development evaluated. These differences found in these markers involved in learning and memory can be attributed to an adaptive process or a failure in pruning of dendritic spines in the animal's hippocampus.

Keywords: palatable diet; prepubertal period; adult period; hippocampus; memory; plasticity

1. Introduction

During the postnatal period, the nervous system is characterized by an intense and constant brain remodeling, promoting changes of adaptation and making the brain more vulnerable to insults. It is important to note that maturation and plasticity during development are highly variable in different brain regions, such as the hippocampus, which shows an increase in neurogenesis and density of dendritic spines before puberty, which decreases in adulthood (Crews F et al. 2007, Weitzdorfer R, et al, 2008). Although recent research has drawn attention to the development of the brain in the early stages of life (Cormick C. 2010, Giedd JN and Rapoport JL.. 2010), there are few studies approach how palatable foods can affect brain and memory during pre-puberty and adolescence, increasing susceptibility to develop Psychiatric disorders in adulthood.

Epidemiological studies have demonstrated an association between consumption of highly energetic diets during development with the risk of neurological diseases and cognitive deficits, including dementia and Alzheimer's (Eskelinen MH, et al. 2008, Solfrizzi V, et al 2010). It is known that memory can be defined as the recording of the representation of information acquired through experiments and the intensity and duration of memory are determined by the importance of the information and the emotion involved in the moment of its acquisition (Izquierdo I. 2011). Memory modulation depends on the sequence of biochemical reactions, which are vulnerable to various environmental interventions, such as the consumption of high-calorie foods. In this context, exposure to the diet with high sugar content may alter the physiology and development of various structures in the central nervous system (CNS), such as the hippocampus, which could cause changes in the neural maturation trajectory and thus, a compromise of emotional memory.

A high calorie diet, in the early stages of development, led to the damage of neurogenesis in adolescent rats and caused spatial memory deficits in adulthood (Cormick C. 2010). These long-term effects have shown irreversible damage to the emotional, cognitive, behavioral and metabolic aspects (Pervanidou P, 2012). Other studies suggest that ingestion of western diets rich in fat and sugar is associated with cognitive deficits in learning and memory dependent on the hippocampus (Cormick C. 2010, Kanoski SE and Davidson TL., 2012). Therefore, it is pertinent to say that depending on the amount, type and time of exposure to a comforting food throughout life, different responses may be found regarding emotional behavior.

Brain structural changes in plasticity, such as loss of synapses and dendritic spines, as well as reduced dendritic branching and reduction of glial cells in the hippocampus, have been associated with cognitive deficits and others psychiatric disorder (Serafini et al., 2014; Wongchitrat et al., 2016). Within this context, the consumption of caloric diets has been shown to alter important proteins, such as Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptophysin, involved with plasticity and memory (Arnold et al., 2014; Najem et al., 2014; Arcego et al., 2016). This neurotrophin involved in neurogenesis and modulation of brain plasticity exerts many biological effects by binding and activating specific tropomyosin-related kinase (Trk) receptors, which in turn triggers multiple intracellular signaling cascades, including activation of phosphatidyl inositol 3-kinase PI3 K/AKT, phospholipase C (PLC), and SHC/RAS/MAPK pathways (Bennett and Lagopoulos, 2014). Alterations in BDNF or intracellular signaling cascade have been associated with memory impairment induced by high caloric intake (Cui et al., 2012; Granholm et al., 2008).

Considering that the deliberate consumption of palatable foods is linked to several neurochemical and behavioral changes, knowledge of the mechanisms that trigger this behavior is important to identify possible changes in emotional memory.

Thus, the purpose of this study was to verify how chronic consumption of a palatable diet during the developmental stages can modulate memories of different degrees of emotionality in Wistar rats in adulthood. Furthermore, this study verified proteins involved with the plasticity, neurogenesis, memory and cognition in the hippocampus of wistar rats during developmental stages emphasizing the pre-pubertal period and adulthood of these animals.

2. Material and Methods

2.1 Experimental subjects

All animal procedures were performed in strict accordance with the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC) and Brazilian Laws on the use of animals (Federal Law 11.794/2008), and were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-UFRGS #25488). All efforts were made to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals used. Animals were housed in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust, and maintained on a standard 12h dark/light cycle (lights on between 7:00h and 19:00h), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. On postnatal day (PND) 21, 62 Wistar rats were weaned and only male pups were used in this study. The animals were housed in groups of 4 per cage and were subdivided into 2 other groups, according to their diet: (1) receiving

standard lab chow or (2) receiving both standard chow plus palatable diet *ad libitum*. Therefore, animals from this group could choose from the two diets available. These interventions occurred between postnatal days 21–28 and daily food consumption was measured. At postnatal day 28 (PND 28), half of the animals in each group were killed by decapitation and biochemical evaluations were performed in the hippocampus. The other half of the animals received standard chow and also standard chow plus palatable diet were maintained on these diets until adulthood. PND 60, the following behavioral tests were performed on different days; exposure to open field, object recognition, Y Maze and contextual fear conditioning. Days after finishing the behavioral tests, each animal was euthanized by decapitation between 1:00 pm to 3:00 pm, and the brain was removed, dissected on ice, and the hippocampus were immediately frozen and stored at -80°C for further biochemical evaluations.

2.2 Palatable Diet

The palatable diet used in this study is enriched with simple carbohydrates, and made from condensed milk, sucrose, vitamins and salts, powdered standard lab chow, purified soy protein, soy oil, water, methionine and lysine. The nutritional content of this diet is similar to that of a standard lab chow (including 22% protein and 4–6% fat), however most carbohydrates in the palatable diet were sucrose (from condensed milk and from sucrose). In contrast, the standard lab chow was composed of carbohydrates that were mainly from starch.

The palatable diet was made on postnatal day 20 and the pellets were daily switched.

2.3. Food consumption

Previously weighed amounts of standard lab chow and palatable diet were offered and the remaining amounts of pellets were measured each day to evaluate consumption. The food consumption was measured per cage and the amount of food consumed was divided by the number of animals per cage to determine mean consumption per animal. To verify the amount of kilocalories consumed per animal, the amount of food ingested was multiplied by the caloric content per gram of chow or palatable diet. The standard lab chow has a caloric content of 3.24 kcal/g, whereas the palatable diet has a caloric content of 4.5 kcal/g (being 38% more caloric than the standard chow).

2.4 Behavioral Tests

Before each behavioral task, rats were placed in the test room (temperature $21 \pm 2^\circ\text{C}$) for one hour to allow habituation in the environment and with the researcher.

2.4.1. Open Field Test

Open field exposure was used to evaluate anxiety and locomotion by the time in central area (sec), time in peripheral area (sec), number line crossings and distance traveled (m). A 50-cm high, 50 × 50-cm open field was used. The floor was subdivided with white lines into 16 equal 12.5- by 12.5-cm squares, and each animal was gently placed facing the left corner and allowed to explore the arena for 20 min, in three consecutive days. The performance was observed for 5 min, using the Any maze to behavioral analysis. The same apparatus was used in the novel object recognition task, and was also considered as a habituation trial for that task.

2.4.2. Object Recognition

The novel object recognition task was based on Ennaceur and Delacour (1988) and adapted from the task previously described by H. Ouchi et al. (2013). This test was used to evaluate the rodents' ability to recognize a novel object in the environment. It consists of 3 phases: habituation, training and testing. In habituation (before training), all animals were exposed to an open-field arena for 20 min without objects during three days. In the training phase (after 24 h the last habituation session), the animal was placed in the open-field arena containing two identical objects, arranged separately (two cups or two magic cubes), for 5 min.

They recorded the mouse operating time on each object. It was accounted for as operating time of every object as the mouse smell, touch or approach within 3 cm of the object. To prevent coercion to explore the objects, rodents were released against the center of the opposite wall with its back to the objects. Then, animals returned to a separate housing box and one of the objects was changed. To evaluate the short-term memory after 1 hour and a half the animal was again placed in the same arena (test phase) with two objects, one equal to the previously explored objects(cups) and one novel object(cube), and it was left to explore them for 5 min. To evaluate the long-term memory, the test was performed 24 hours after placing the animals back in the arena for exploring the familiar object (cups) and a new object (Tin) for 5 min. After each trial, objects were cleaned in an attempt to remove any olfactory cues. The exploration time of the familiar and the new objects was compared. Exploration time was defined as the time when the animal's nose was directed towards the object at a distance of no more than 2 cm and/or touching the object with the nose and paws (HernandezRapp et al., 2015). If the animal climbed on top of or lined against the object, this period was not included in the exploration time. The total exploration time of both objects in both trials was calculated. The results are expressed as a % discrimination index, defined as the time spent exploring the novel object/total time exploring objects. It was taken as a memory index to the task an increase in

the exploration time of the novel object compared to the familiar object (H. Ouchi et al., 2013). Preference for one of the objects was previously discarded with other animals (data not shown).

2.4.3 Object Location Test

The object location test was exactly identical to the object recognition task described above except that in the test phase identical copies of the sample objects are exposed. To evaluate the short-term memory after 1 hour and a half the animal was again placed in the same arena (test phase) with the same two objects, but one of the two objects was moved to a novel location.

2.4.4 Y Maze

The Apparatus used have three symmetrical arms (each arm: 49 cm long × 13 cm wide × 33 cm high), placed in a room illuminated with 50 lux. The animal was placed on the end of an arm (fixed arm), back turned to the center of the apparatus, and allowed access to this arm and another arm for 5 min. It was determined the number of entries and the time spent on each arm. The third arm (new arm) was blocked by a guillotine door. The rat was removed from the maze and returned to its home cage at the end of training. The test occurred 1 hour after training, the rat was placed in the fixed arm of the maze, back turned to the center of the apparatus, and given free access to all three arms for 5 min. The number of entries and time spent on novel arm was recorded.

2.4.5 Contextual Fear Conditioning

The Apparatus of contextual fear conditioning was a wooden box in the dimensions 28 x 26 x 23 cm, with metal bars at the base, where the electric current is conducted. In training, the animals were placed in the apparatus of fear conditioning context for 3 minutes for setting. At the end of this period, the animals received 3 footshocks of 0.7 mA intensity, 2 second duration and 30 second interval between footshocks and remained 1 minute in the apparatus.

The response to each footshock was recorded to compare the reactivity to pain in animals. The test was carried out twenty-four hours after the training session; the animals were placed again in the apparatus for 5 minutes, but didn't receive any shock. The freezing duration was determined as a percentage of total test time and is considered a measure of the strength of the animal's fear memory. The frequency of rearing and grooming was also determined as complementary measures. The apparatus was cleaned with a solution of ethanol 30% and then dried with a paper towel after each animal. It was considered freezing when the animal stood still without showing any movement except those resulting from breathing (Blanchard & Blanchard, 1969).

2.5 Biochemical Analysis

2.5.1 Na^+/K^+ -ATPase activity assay

At PND 28 and 75, Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity determination, hippocampus was homogenized in 10 vol (w:v) of 0.32 M sucrose solution containing 5mM HEPES and 1 mM EDTA, pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 1000g for 10 min and the supernatants were used. The reaction mixture contained 5 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 20 mM KCl, and 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μ l. The reaction started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3mM. Control was assayed under the same conditions with the addition of 1mM ouabain. Na^+/K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (de Souza Wyse et al., 2000; Tsakiris and Deliconstantinos,1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Enzyme specific activities were expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein [evaluated according to Bradford (1976)]. All assays were performed in duplicate, and the mean was used for statistical analysis.

2.5.2 Western Blotting

Hippocampus were homogenized in ice-cold lysis buffer (pH 7.9): 10mM KCl, 10mM HEPES, 0.6mM EDTA, 1% NP 40 and 1% protease inhibitor cocktail and centrifuged at 1000g for 10 min. Equal protein concentrations (40 μ g/lane of total protein, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, U.S.A]) were loaded onto NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gels. After electrophoresis, proteins were transferred (XCell SureLock® Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes (1 h at 50V in transfer buffer [48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% sodium dodecyl sulfate]) (38). The blot was submitted to 2-h incubation in blocking solution (5% bovine serum albumin in Tris-buffered-saline -TBS). After the incubation, the blot was incubated overnight at 4°C in blocking solution containing one of the following antibodies: anti-BDNF(1:1000, Abcam, RRID:AB_305367), anti-TrkB (1:1000, Millipore, receptor, anti-AKT (1:1000, Cell Signaling, , RRID:AB_2225340), anti-phospho-AKT (Ser473, 1:1000, Cell Signaling, RRID:AB_2315049), anti-synaptophysin (SYP, 1:500; Millipore, RRID:AB_570874), antispinophilin/neurabin-II (1:1000, Millipore, , RRID:AB_310266), anti- neuronal nitric oxide synthase (nNos, 1:1000, Millipore) or anti- β -actin (1:3000, Millipore, RRID:AB_11214202). The blot was then washed with Tween-TBS and incubated in solution containing peroxidaseconjugated anti-rabbit IgG (1:1000, Millipore, , RRID:AB

_11212848) or anti-mouse IgG (1:1000, Millipore, RRID:AB_10679589), before developing with a chemiluminescence ECL kit (Amersham, Oakville, Ontario).

The chemiluminescence was detected using a digital imaging system (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences) and analyzed using the Image Studio Lite Software5.2(https://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite,RID:SCR_014211). Results were expressed as the ratio of the intensity of the protein of interest to that of 1:3000 anti- β -actin (Millipore, RRID:AB_11214202) on the same membrane.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard error of the mean, and were analyzed using Repeated Measures ANOVA for consumption of diets evaluation and Student's t test in the other cases. Significance level was accepted as different when the P value was less than 0.05. Regarding Repeated Measures ANOVA, Greenhouse-Geisser correction was applied considering violation of the sphericity assumption as shown by the Mauchly test.

3. Results

3.1 Food Consumption

Total caloric consumption was analyzed using Student's t test during the prepubertal period (at PND 28) and adulthood period (at PND 75) of life. With regard to the caloric consumption during this first week (between PND 21-28), the animals with access to a high carbohydrate diet had a higher caloric consumption, compared to the control group [$t(13) = 1.17$, $P < 0.001$] as displayed in Fig.1B. In addition, also was observed higher caloric consumption of palatable diet in adult animals, compared to the control group [$t(13) = 0.421$, $P < 0.001$] as displayed in Fig.1C. The mean consumption for each week during all time of treatment was analyzed using repeated measures ANOVA. During the period of food consumption, the results demonstrate that rats had increased caloric consumption over time [repeated measures ANOVA, $F(1.881, 43.10) = 12.74$, $P < 0.001$, correction for Greenhouse-Geisser], with an interaction between time and palatable diet, since palatable diet group showed a greater increase in consumption over time [$F(1.78, 21.40) = 6.00$, $P < 0.02$, correction for Greenhouse-Geisser] (see, Fig 1D).

3.2 Behavioral Results

Fig. 2 shows the results from exposure to the open field evaluated in adulthood. No significant differences were observed in time in central area (sec), time in peripheral area

(sec), number line crossings and distance traveled (m) (Fig 2A, 2B, 2C e 2D, respectively), $P > 0.05$, showing that these animals had no difference in locomotor activity and anxiety.

The novel object recognition task was carried out to assess short-term and long-term memory. In the training phase (two identical objects) in both memory tasks, there was no difference in the time exploring of the two objects and there were no differences between groups (see table 1, $P > 0.05$), consequently all groups explored the two objects by chance. In contrast, in the testing phase (familiar object \times novel object), the palatable diet group decreased exploration time in new object in short-term [$t(27) = 0.739$, $P < 0.001$] and long-term memory [$t(27) = 2.074$, $P < 0.001$], see table 1. In addition, the palatable diet decreased the discrimination index, in both, short-term [$t(27) = 3.027$, $P < 0.001$] and long-term memory [$t(27) = 2.099$, $P < 0.001$] tests (see Fig 3 A e B, respectively).

In the object location test was evaluated short-term memory. This behavioral task, one of the two objects was moved to a novel location. In the testing phase, the results showed that palatable diet group increased exploration time of the object in the familiar place [$t(26) = 0.228$, $P < 0.01$] and decreased exploration time of the object in the new place [$t(26) = 5.195$, $P < 0.001$], see table 2, respectively. In addition, the palatable diet decreased the discrimination index [$t(26) = 0.541$, $P < 0.001$, see Fig 3C].

Fig. 4 summarizes the effects of palatable diet consumption on spacial and aversive memory, assessed in the Y maze and contextual fear conditioning. Student *t*-test analysis revealed a significant reduction of palatable diet group on the percentage of duration spent in the novel arm visits [$t(29) = 1.946$, $P < 0.01$, see Fig 4A], indicating a deficit of spatial learning compared with control group. However, no differences were found with regarding on the percentage of entries in the novel arm ($P > 0.05$), see fig 4B. In the fig.4C was evaluated aversive memory and was verified that palatable diet group decreased the percentage of freezing time [$t(22) = 6.963$, $P < 0.001$].

3.3 Biochemical results

Change in Na^+ , K^+ -ATPase activity is important to learning and memory (Andero et al., 2014; Petzold et al., 2015). Therefore we evaluated the possible effect of palatable diet consumption on Na^+ , K^+ -ATPase activity in the hippocampus of animals at different stages of development. At 28 PND, the palatable diet increased Na^+ , K^+ -ATPase activity [$t(9) = 2.237$, $P = 0.04$, see fig.5], which remained increasing until adulthood [$t(10) = 2.316$, $P < 0.05$, see fig.5].

Since high calorie diets can influence the plasticity and neurogenesis in the hippocampus and possible changes could lead to memory impairment, we then evaluated proteins related to plasticity and memory process in the hippocampus in pre-pubertal and adult period, using Western blotting. At PDN 28, hippocampal levels of synaptophysin [$t(7) = 0.277$, $P < 0.05$],

BDNF [$t(6) = 4.883, P < 0.05$], AKT [$t(6) = 0.367, P < 0.01$], p-AKT [$t(6) = 0.719, P < 0.05$], were reduced after palatable diet access (see Figures 6 and 7). No significant differences were found in relation to hippocampal levels of nNos, spinophilin/neurabin-II and TrkB receptor ($P > 0.05$). At PND 75, the palatable diet increased hippocampal levels of synaptophysin [$t(9) = 0.740, P < 0.05$], spinophilin/neurabin-II [$t(10) = 0.80, P < 0.05$], see Fig 6B and 6D. However, the palatable consumption decreased hippocampal levels of BDNF [$t(8) = 1.063, P < 0.05$] and nNos [$t(9) = 1.699, P < 0.01$], see Fig 6F and 8A, in adult rats.

4. Discussion

The nervous system has the ability to modify its morph functional organization in response to the environment, especially during the initial stages of development, since intense brain maturation occurs during this period. Variations in environmental conditions such as the influence of a diet rich in carbohydrates during development, may affect the path of neural maturation and contribute to cognitive impairment and memory changes. In this study, the exposure to a chronic palatable diet induced an impaired in the memory of different degrees of emotionality. Additionally, the palatable diet consumption increased Na^+, K^+ -Atpase activity in the hippocampus at PND 28 and remained increasing until adulthood. Alterations in synaptic markers such as, synaptophysin, BDNF, AKT, p-AKT, were reduced in the hippocampus at PND 28 after palatable diet access. However, at PND 75, the palatable diet increased hippocampal levels of synaptophysin, spinophilin/neurabin-II and decreased levels of BDNF and nNos in adult rats.

Previous studies using high caloric diet have also reported that its intake may lead to a cognitive deficit and memory impairment, when offered either in a short (Kaczmarczyk et al., 2013) or long-term period (Kosariet al., 2012; Wang et al., 2015). According to our findings, events early in life, such as the chronic high caloric diet intake beginning at weaning induced impairments in short-term and long-term memory in a novel object or object novel location recognition tasks. The tasks of recognition of the object or object place change evaluated neutral memory and requires a series of cognitive operations, such as perception, discrimination, identification and comparisons (Warburton and Brown, 2015), and are respectively dependents on the cortex and hippocampus. It is important to note that the behavioral effects observed are not related to altered locomotion, since no differences were observed in the open field exploration. Beilharz et al (2014) showed that a short exposition of diets rich in fat and sugar or only rich in sugar induced a loss in the memory of recognition of the change of place of the

object, but there was no difference in relation to the exploration of the new object, showing that the consumption of palatable foods prejudiced the hippocampus-dependent memory.

Another behavioral task evaluated, in this study, was Y-maze, this task allows to check the working memory using spatial tips. This type of behavioral task presents a greater requirement of the animal for identification of the arms in the apparatus, leading to the animal a greater degree of emotionality to perform the behavior. Our findings showed that palatable diet consumption until adulthood induced a memory impaired by decreases the percentage of duration spent in novel arm. Other studies that used the labyrinth of the radial arm and Morris's aquatic labyrinth to evaluate spatial memory observed that the chronic use of western diet (high in fat and sugar) induced cognitive impairment in learning and memory of adult rodents (Kanoski and Davidson et al., 2011; Beilharz et al., 2015).

With regard to the context-dependent task of fear, the animals are exposed to an aversive context with a brief shock in the legs, after 24 hours the animals are exposed again to the same context and if there was no damage in the hippocampus, the animals tend to remember this aversive context and respond with a defensive behavior as freezing. In this study, the palatable diet reduced the percentage of freezing in the animals, suggesting damage in the hippocampus dependent memory. A recent study showed that consumption of a cafeteria diet offered for 8 weeks, for animals in adulthood, showed that when the animals were exposed to the aversive context they exhibited impairment in the defensive behavior, indicating that possibly the chronic exposure of palatable foods harms memories of fear (Reichelt et al., 2015). With respect to the behavioral findings, we observed that the supply of a palatable food during the development was able to impair the memory on different degrees of emotionality. Based on these behavioral results, proteins involved with plasticity, neurogenesis and memory were evaluated at different stages of development. An finding was that the chronic consumption of a palatable diet from the beginning of life until adulthood increased the activity of the enzyme Na^+, K^+ -Atpase at both stages of development. With regard to the ontogeny of activation this enzyme, studies suggest that in hippocampus, Na^+, K^+ -Atpase pump activity is very low in the first postnatal week but develops gradually over the first 5 weeks of life (Fukuda and Prince, 1992; Lopez et al., 2002). However our results showed that exposure to caloric diet in the early life may alter the ontogeny of activation of this enzyme. It is interesting to note that other studies using a palatable diet, rich in simple sugar, also induced an increase in the activation of this enzyme that was reversed by withdraw of the diet (Krolow et al., 2012; da S Benetti et al., 2010).

Within this context, levels of proteins related to plasticity, neurogenesis and memory were evaluated in the hippocampus at different stages of animal development. We observed that proteins such as synaptophysin, BDNF and its signaling pathway were reduced by the early

consumption of a palatable diet at PND 28. These findings reinforce the brain vulnerability in early life, since the hippocampus is in an intense process of neurogenesis, plasticity and completes its maturation process around 35 days postnatal life (He e Crews, 2007; Yildirim et al., 2008). During the initial stages of an individual's life, environmental changes may influence the final process of maturation of the central nervous system's neurochemical circuit (19).

Proteins such as, synaptophysin and BDNF are related to plasticity and memory (Edelmann et al., 1995; Lu et al., 2005; Arcego et al., 2016; Wongchitrat et al., 2016). In addition, the synaptophysin protein is a constituent of neurotransmitter-containing presynaptic vesicle membranes, augmentation of this synaptic protein may reflect an increase in neurotransmission leading to improved memory (Edelmann et al., 1995). With respect to the BDNF protein, it is known that its functions are related to neurite outgrowth, cell survival and synaptic strengthening (39). Interestingly, one of the pathways of the activation of the intracellular cascade of BDNF was reduced by the early consumption of a palatable diet. The AKT protein, a serine/threonine kinase, involved in the signaling pathway of BDNF showed a reduction, both in its total immunocontent and in its phosphorylated form (Patapoutian and Reichardt, 2001). Studies have shown that environmental interventions such as the consumption of highcalorie foods may act by decreasing the expression of BDNF and synaptophysin (Arnold et al., 2014; Najem et al., 2014). Consequently, it has been shown that the reduction of these proteins may be directly associated with greater impairment in learning and memory (Cui et al., 2012; Granholm et al., 2008; Trudeau et al., 2004).

The present findings show that chronic palatable diet during the early life until adulthood altered proteins, related to plasticity, differently in relation to exposure to caloric food in the prepuberal period, as discussed previously. Our results showed that the group that received palatable diet during life, increased hippocampal protein levels of synaptophysin and neurabin. This increase may suggest an adaptive process of CNS, since when analyzed the levels of synaptophysin in the pre pubertal period a reduction in this protein was observed. It should be noted that spinophilin/neurabin protein are highly enriched in the dendritic spines of hippocampal neurons, where they may serve as an adaptor protein recruiting the related binding molecules important for spine morphogenesis, synaptic transmission and plasticity (Feng et al., 2000; Hu et al., 2006). On the other hand, we can speculate that the increase Na^+ , K^+ -Atpase activity and in the synaptophysin, spinophilin/neurabin proteins levels, in the hippocampus of adult rats, induced by palatable diet consumption may suggest a loss in dendritic spines prunning, since in this study was observed an impaired in the memory of different degrees of emotionality in adult rats. During the pubertal period, the density of dendritic spines decreases in the CA1 hippocampus and temporal lobe of both rodents (Yildirim et al., 2008). This process is referred to as adolescent synaptic pruning which remove

unnecessary brain connections to make room for new relevant memories. This is an important process for optimal learning in adulthood (Afroz et al., 2016).

Other interesting findings were regarding the BDNF and nNos proteins. Both proteins showed a reduction in the hippocampus of animals that received palatable diet. Other studies have also observed that high caloric diets offered throughout life may reduce BDNF (Carmer et al., 2015; Arcego et al., 2016). This reduction may be directly associated with memory impairment (Arcego et al., 2016), contributing to our findings. Additionally, NO is synthesized from L-arginine, in the presence of NADPH and O₂, by a series of isoenzymes of the family of NO synthases (NOS). High level of NO may influence synaptic plasticity and induce cell death, leading to neuronal degeneration; it seems to be involved in learning and memory formation by potentiating or facilitating mainly the acquisition process. Gzielo et al. (2016) also verified that long-term consumption of high-caloric diet in rats reduced neuronal nitric oxide synthase expression. In rats, it has been verified that NOS inhibition leads to a slight impairment of memory (Brown and Bal-Price 2003; Arnaiz et al., 2004; Noschang et al., 2010).

In conclusion, this study supports the idea that increase of consumption of a palatable diet during the developmental stages is strongly associated with memory impairment of different degrees of emotionality. Analysis of plasticity-related proteins and memory had different results depending on the stage of development evaluated. These differences found in these markers involved in learning and memory can be attributed to an adaptive process or a failure in pruning of dendritic spines in the animal's hippocampus. Within this context, regardless of the hypotheses addressed, memory impairment was clearly observed in the animals that consumed this highly palatable diet. Further studies are required to confirm and expand upon these results and may help to understand the pathophysiology of some psychiatric disorders.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Research Council of Brazil (CNPq), and CAPES.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Author Contributions

The Author Contributions were as follows: Conceived and designed the experiments: T.A.V., A.D.M., T.A.P., D.C., P.N., K.R. Performed the experiments: T.A.V., A.D.M., P.N., K.R.

Analyzed the data: T.A.V., A.D.M., T.A.P., K.R. Contributed reagents/materials/analysis tools: K.R., D.C.; Wrote the paper: T.A.V., K.R. All authors provided important intellectual content and critically revised the final version of the manuscript.

5. References

AFROZ S, PARATO J, SHEN H³, SMITH SS. SYNAPTIC PRUNING IN THE FEMALE HIPPOCAMPUS IS TRIGGERED AT PUBERTY BY EXTRASYNAPTIC GABAA RECEPTORS ON DENDRITIC SPINES. ELIFE. 2016 2;5.

ANDERO, R., CHOI, D.C., RESSLER, K.J., 2014. BDNF-TRKB RECEPTOR REGULATION OF DISTRIBUTED ADULT NEURAL PLASTICITY, MEMORY FORMATION, AND PSYCHIATRIC DISORDERS. PROG. MOL. BIOL. TRANSL. SCI. 122, 169–192.

ARCEGO DM, KROLOW R, LAMPERT C, TONIAZZO AP, BERLITZ C, LAZZARETTI C, SCHMITZ F, RODRIGUES AF, WYSE AT, DALMAZ C (EARLY LIFE ADVERSITIES OR HIGH FAT DIET INTAKE REDUCE COGNITIVE FUNCTION AND ALTER BDNF SIGNALING IN ADULT RATS: INTERPLAY OF THESE FACTORS CHANGES THESE EFFECTS. INT J DEV NEUROSCI 50:16-25.2016).

ARNOLD, S.E., LUCKI, I., BROOKSHIRE, B.R., CARLSON, G.C., BROWNE, C.A., KAZI, H., BANG, S., CHOI, B.R., CHEN, Y., MCMULLEN, M.F., KIM, S.F., 2014. HIGH FAT DIET PRODUCES BRAIN INSULIN RESISTANCE, SYNAPTO DENDRITIC ABNORMALITIES AND ALTERED BEHAVIOR IN MICE.

BEILHARZ JE, MANIAM J, MORRIS MJ. DIET-INDUCED COGNITIVE DEFICITS: THE ROLE OF FAT AND SUGAR, POTENTIAL MECHANISMS AND NUTRITIONAL INTERVENTIONS. NUTRIENTS. 2015;7(8):6719-38.

BENNETT, M.R., LAGOPOULOS, J., 2014. STRESS AND TRAUMA: BDNF CONTROL OF DENDRITIC-SPINE FORMATION AND REGRESSION. PROG. NEUROBIOL. 112, 80–99.

BLANCHARD & BLANCHARD, JOURNAL OF COMPARATIVE AND PHYSIOLOGICAL PSYCHOLOGY (1969), VOL. 67, NO. 3, 370-375).

BROWN GC, BAL-PRICE A (2003) INFLAMMATORY NEURODEGENERATION MEDIATED BY NITRIC OXIDE, GLUTAMATE, AND MITOCHONDRIA. MOL NEUROBIOL 27(3):325–355
CAMER, D., YU, Y., SZABO, A., FERNANDEZ, F., DINH, C.H., HUANG, X.F., 2015. BARDOXOLONE METHYL PREVENTS HIGH-FAT DIET-INDUCED ALTERATIONS IN PREFRONTAL CORTEX SIGNALLING MOLECULES INVOLVED IN RECOGNITION MEMORY. PROG. NEUROPSYCHOPHARMACOL. BIOL. PSYCHIATRY 59, 68–75.

CRISTIE GRAZZIOTIN NOSCHANG; RACHEL KROLOW, FERNANDA URRUTH FONTELLA; DANUSA M. ARCEGO; LUI'SA AMA'LIA DIEHL; SIMONE NARDIN WEIS; NICE S. ARTENI; CARLA DALMAZ NEONATAL HANDLING IMPAIRS SPATIAL MEMORY AND LEADS TO ALTERED NITRIC OXIDE PRODUCTION AND DNA BREAKS IN A SEX SPECIFIC MANNER. NEUROCHEM RES (2010) 35:1083–1091

CORMICK C. THE CHALLENGES OF COMMUNITY ENGAGEMENT. NANOETHICS. 2010.

CUI, Y., SHU, Y., ZHU, Y., SHI, Y., LE, G., 2012. HIGH-FAT DIETS IMPAIR SPATIAL LEARNING OF MICE IN THE Y-MAZE PARADIGM: AMELIORATIVE POTENTIAL OF ALPHA-LIPOIC ACID. J. MED. FOOD 15, 713–717.

DA S BENETTI C, SILVEIRA PP, MATTE' C ET AL (2010) EFFECTS OF A CHRONIC EXPOSURE TO A HIGHLY PALATABLE DIET AND ITS WITHDRAWAL, IN ADULTHOOD, ON CEREBRAL NA⁺, K⁺-ATPASE AND PLASMA S100B IN NEONATALLY HANDLED RATS. INT J DEV NEUROSCI 28:153–159.

ENNACEUR A, DELACOUR J. A NEW ONE-TRIAL TEST FOR NEUROBIOLOGICAL STUDIES OF MEMORY IN RATS. 1: BEHAVIORAL DATA. BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH. 1988; 31:47–59. [PUBMED: 3228475]

ESKELINEN MH, NGANDU T, HELKALA EL, TUOMILEHTO J, NISSINEN A, SOININEN H, ET AL. FAT INTAKE AT MIDLIFE AND COGNITIVE IMPAIRMENT LATER IN LIFE: A POPULATION-BASED CAIDE STUDY. INTERNATIONAL JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY. 2008 JUL;23(7):741-7. PUBMED PMID: 18188871

FENG J, YAN Z, FERREIRA A, TOMIZAWA K, LIAUW JA, ET AL. (2000) SPINOPHILIN REGULATES THE FORMATION AND FUNCTION OF DENDRITIC SPINES. PROC NATL ACAD SCI U S A 97: 9287–9292.

FUKUDA A, PRINCE DA. POSTNATAL DEVELOPMENT OF ELECTROGENIC SODIUM PUMP ACTIVITY IN RAT HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL NEURONS. BRAIN RES DEV BRAIN RES. 1992 JAN 17;65(1):101-14. PUBMED PMID: 1372539.

GIEDD JN, RAPOPORT JL. STRUCTURAL MRI OF PEDIATRIC BRAIN DEVELOPMENT: WHAT HAVE WE LEARNED AND WHERE ARE WE GOING? NEURON. 2010 SEP 9;67(5):728-34. PUBMED PMID: 20826305. PUBMED CENTRAL PMCID: 3285464. ARNAIZ SL, D'AMICO G, PAGLIA N ET AL (2004). ENRICHED ENVIRONMENT, NITRIC OXIDE PRODUCTION AND SYNAPTIC PLASTICITY PREVENT THE AGING-DEPENDENT IMPAIRMENT OF SPATIAL COGNITION. MOL ASPECTS MED 25:91–101.

GRANHOLM, A.C., BIMONTE-NELSON, H.A., MOORE, A.B., NELSON, M.E., FREEMAN, L.R., SAMBAMURTI, K., 2008. EFFECTS OF A SATURATED FAT AND HIGH CHOLESTEROL DIET ON MEMORY AND HIPPOCAMPAL MORPHOLOGY IN THE MIDDLE-AGED RAT. J. ALZHEIMERS DIS. 14, 133–145.

GZIELO K, KIELBINSKI M, PLOSZAJ J, JANECZKO K, GAZDZINSKI SP, SETKOWICZ Z². LONG-TERM CONSUMPTION OF HIGH-FAT DIET IN RATS: EFFECTS ON MICROGLIAL AND ASTROCYTIC MORPHOLOGY AND NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION. CELL MOL NEUROBIOL. 2016 AUG 19.

HE J, CREWS FT. NEUROGENESIS DECREASES DURING BRAIN MATURATION FROM ADOLESCENCE TO ADULTHOOD. PHARMACOLOGY, BIOCHEMISTRY, AND BEHAVIOR. 86: 327–333; 2007.

HERNANDEZ-RAPP ET AL./BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 287 (2015)15–26.

H. OUCHI ET AL./BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 238 (2013) 146– 153.

HU XD, HUANG Q, ROADCAP DW, SHENOLIKAR SS, XIA H (2006) ACTINASSOCIATED NEURABIN-PROTEIN PHOSPHATASE-1 COMPLEX REGULATES HIPPOCAMPAL PLASTICITY. J NEUROCHEM 98: 1841–1851.

KACZMARCZYK, M.M., MACHAJ, A.S., CHIU, G.S., LAWSON, M.A., GAINEY, S.J., YORK, J.M., MELING, D.D., MARTIN, S.A., KWAKWA, K.A., NEWMAN, A.F., WOODS, J.A., KELLEY, K.W., WANG, Y., MILLER, M.J., FREUND, G.G., 2013. METHYLPHENIDATE PREVENTS HIGH-FAT DIET (HFD)-INDUCED LEARNING/MEMORY IMPAIRMENT IN JUVENILE MICE. PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 38, 1553–1564.

KANOSKI SE, DAVIDSON TL. WESTERN DIET CONSUMPTION AND COGNITIVE IMPAIRMENT: LINKS TO HIPPOCAMPAL DYSFUNCTION AND OBESITY. PHYSIOLOGY & BEHAVIOR. 2011 APR 18;103(1):59-68.

KROLOW R¹, NOSCHANG C, WEIS SN, PETTENUZZO LF, HUFFELL AP, ARCEGO DM, MARCOLIN M, MOTA CS, KOLLING J, SCHERER EB, WYSE AT, DALMAZ C. ISOLATION STRESS DURING THE PREPUBERTAL PERIOD IN RATS INDUCES LONG-LASTING NEUROCHEMICAL CHANGES IN THE PREFRONTAL CORTEX. NEUROCHEM RES. 2012 MAY;37(5):1063-73. DOI: 10.1007/S11064-012-0709-1. EPUB 2012 FEB 11.

KOSARI, S., BADOER, E., NGUYEN, J.C., KILLCROSS, A.S., JENKINS, T.A., 2012. EFFECT OF WESTERN AND HIGH FAT DIETS ON MEMORY AND CHOLINERGIC MEASURES IN THE RAT. BEHAV. BRAIN RES. 235, 98–103.

LOPEZ LB, QUINTAS LE, NOËL F. INFLUENCE OF DEVELOPMENT ON NA(+)/K(+)-ATPASE EXPRESSION: ISOFORM- AND TISSUE-DEPENDENCY. 2002

LU B, PANG PT, WOO NH (THE YIN AND YANG OF NEUROTROPHIN ACTION. NAT REV NEUROSCI 6:603-614.2005).

NAJEM, D., BAMJI-MIRZA, M., CHANG, N., LIU, Q.Y., ZHANG, W., 2014. INSULIN RESISTANCE, NEUROINFLAMMATION, AND ALZHEIMER'S DISEASE. REV. NEUROSCI. 25, 509E525.

PATAPOUTIAN, A., REICHARDT, L.F., 2001. TRK RECEPTORS: MEDIATORS OF NEUROTROPHIN ACTION. CURR. OPIN. NEUROBIOL. 11, 272–280.

PAUS T, KESHAVAN M, GIEDD JN (WHY DO MANY PSYCHIATRIC DISORDERS EMERGE DURING ADOLESCENCE? NAT REV NEUROSCI 9:947-957.2008).

PERVANIDOU P, CHROUSOS GP. METABOLIC CONSEQUENCES OF STRESS DURING CHILDHOOD AND ADOLESCENCE. METABOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL. 2012 MAY;61(5):611-9. PUBMED PMID: 22146091.

REICHELT AC, MANIAM J, WESTBROOK RF, MORRIS MJ. DIETARY-INDUCED OBESITY DISRUPTS TRACE FEAR CONDITIONING AND DECREASES HIPPOCAMPAL REELIN EXPRESSION. BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY. 2015 JAN;43:68-75.

SATO, T., TANAKA, K., OHNISHI, Y., TERAMOTO, T., IRIFUNE, M., NISHIKAWA, T., 2004. EFFECTS OF STEROID HORMONES ON (NA⁺, K⁺)-ATPASE ACTIVITY INHIBITION-INDUCED AMNESIA ON THE STEP-THROUGH PASSIVE AVOIDANCE TASK IN GONADECTOMIZED MICE. PHARMACOL. RES. 49, 151–159.

SOLFRIZZI V, FRISARDI V, CAPURSO C, D'INTRONO A, COLACICCO AM, VENDEMIALE G, ET AL. DIETARY FATTY ACIDS IN DEMENTIA AND PREDEMENTIA SYNDROMES: EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE AND POSSIBLE UNDERLYING MECHANISMS. AGEING RESEARCH REVIEWS. 2010 APR;9(2):184-99. PUBMED PMID: 19643207.

TRUDEAU, F., GAGNON, S., MASSICOTTE, G., 2004. HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY AND GLUTAMATE RECEPTOR REGULATION: INFLUENCES OF DIABETES MELLITUS. EUR. J. PHARMACOL. 490, 177E186

WANG, D., YAN, J., CHEN, J., WU, W., ZHU, X., WANG, Y., 2015. NARINGIN IMPROVES NEURONAL INSULIN SIGNALING, BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION, AND COGNITIVE FUNCTION IN HIGH-FAT DIET-INDUCED OBESE MICE. CELL. MOL. NEUROBIOL.

WARBURTON, E.C., BROWN, M.W., 2015. NEURAL CIRCUITRY FOR RAT RECOGNITION MEMORY. BEHAV. BRAIN RES. 285, 131–139.

WONGCHITRAT P, LANSUBSAKUL N, KAMSRIJAI U, SAE-UNG K, MUKDA S, GOVITRAPONG P. MELATONIN ATTENUATES THE HIGH-FAT DIET AND STREPTOZOTOCIN-INDUCED REDUCTION IN RAT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS. NEUROCHEM INT. 2016 NOV;100:97-109.

WEITZDORFER R,ET AL. CHANGES OF HIPPOCAMPAL SIGNALING PROTEIN LEVELS.DURING POSTNATAL BRAIN DEVELOPMENT IN THE RAT. HIPPOCAMPUS, 2008.

YILDIRIM M, MAPP OM, JANSSEN WG, YIN W, MORRISON JH, GORE AC. POSTPUBERTAL DECREASE IN HIPPOCAMPAL DENDRITIC SPINES OF FEMALE RATS. EXPERIMENTAL NEUROLOGY 210:339–348. 2008.

Table 1: Effects of chronic access to palatable diet in novel object recognition in adult rats.

Groups	Training Time in object A	Training Time in object B	Short-Test Time in familiar object	Short-Test Time in new object	Long-test Time in familiar object	Long-test Time in new object
Control	34.12± 2.5	34.62± 2.5	31.62± 3.9	61.6± 3.94	29.12± 2.3	58.6± 4.20
Palatable Diet	30.92± 2.4	31.61± 2.7	39.8± 5.04	37.6± 4.8*	37.61± 2.96	34.53± 3.0*

Time in the objects was expressed in seconds. Data are expressed as mean ± SEM, N = 13 for Control-Chow and 18 for Palatable diet. *The palatable diet group decreased exploration time in new object (P<0,001) in short-term memory and long-term memory (P<0,001), test phase.

Table 2: Effects of chronic access to palatable diet in novel place of object recognition in adult rats.

Groups	Training Time in object A	Training Time in object B	Short-test Time in familiar object	Short-test Time in new object
Control	30.60± 2.2	31.20± 2.1	30.40± 3.4	56.53± 4.5
Palatable Diet	34.46± 1.5	34.38± 1.6	44.8± 3.5	32.30± 2.6*

Time in the place of objects was expressed in seconds. Data are expressed as mean ± SEM, N = 13 for Control-Chow and 18 for Palatable diet. *The palatable diet group decreased exploration time in new place object (P<0,001), test phase.

Fig. 1A TIMELINE

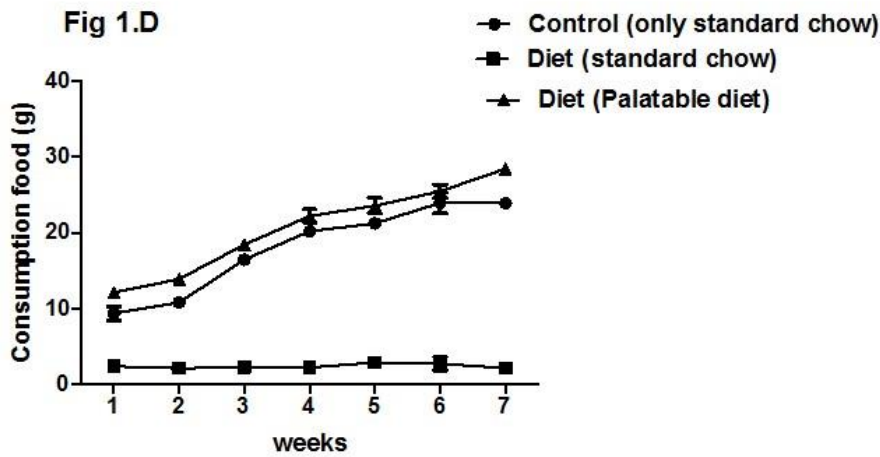
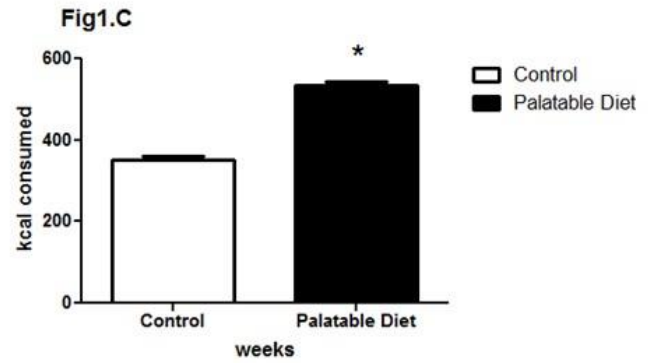
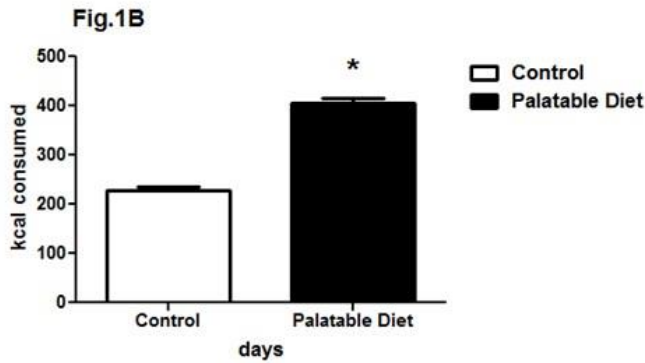
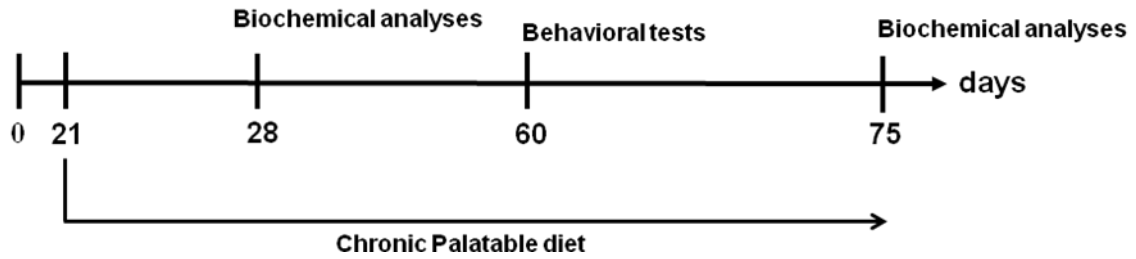


Fig.1: Time line and effect of caloric intake of a palatable diet during the development. Fig 1A: Time line. Fig 1B: kcal consumed of diets during 7 days (Between 21-28 postnatal days); Fig 1C: Kcal consumed of diets during 7 weeks (Between 21-75 postnatal days); Fig 1D: Consumption of food in grams during 7 weeks (Between 21-75 postnatal days). Data are expressed as mean \pm SEM, N = 4 (for cages of animals, with 4–5 animals/cage). The mean consumption was analyzed using Student's t-test our repeated measures ANOVA. *Palatable diet group increased Kcal and grams consumed in the pre-pubertal period and until adulthood.

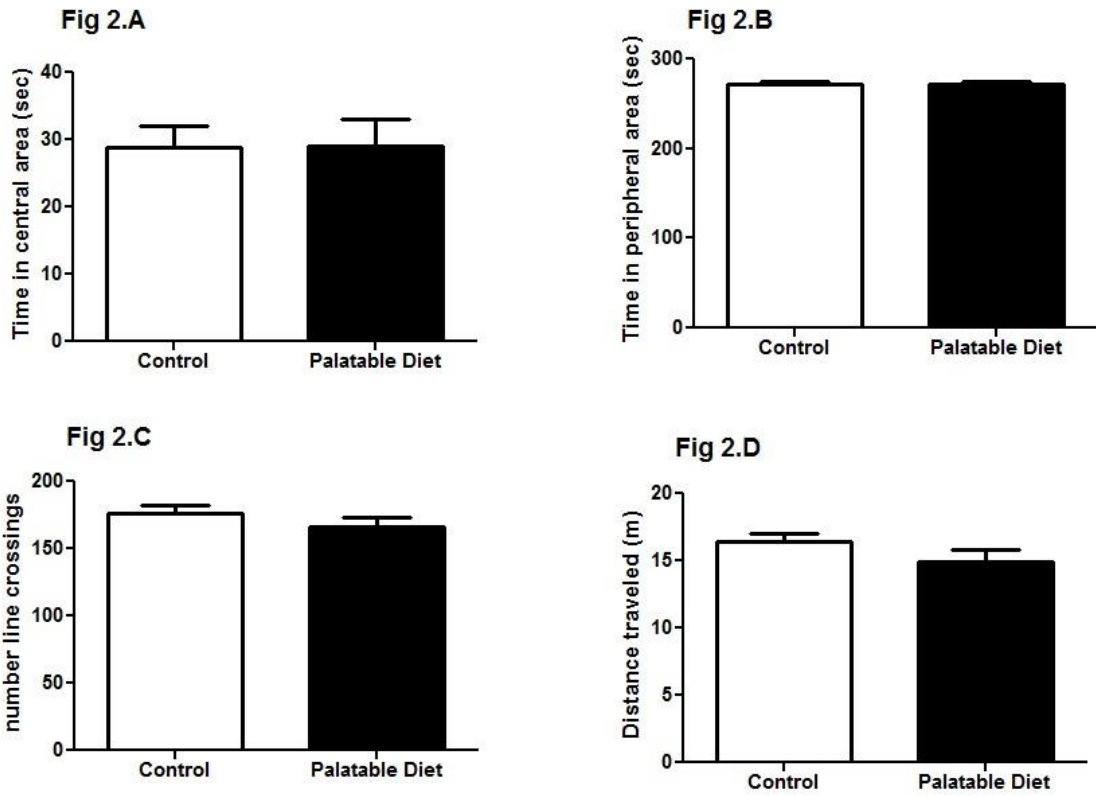


Fig 2: Effect of caloric intake of a palatable diet on open field behavior in adult rats. Fig 2A: Time in area central (sec); Fig 2B: Time in peripheral (sec); Fig2C: Number line crossings; Fig 2D: Distance traveled (m). Data are expressed as mean \pm SEM, N = 15 to control group and N=13 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. There were no significant differences in any of the parameters evaluated ($P > 0.05$).

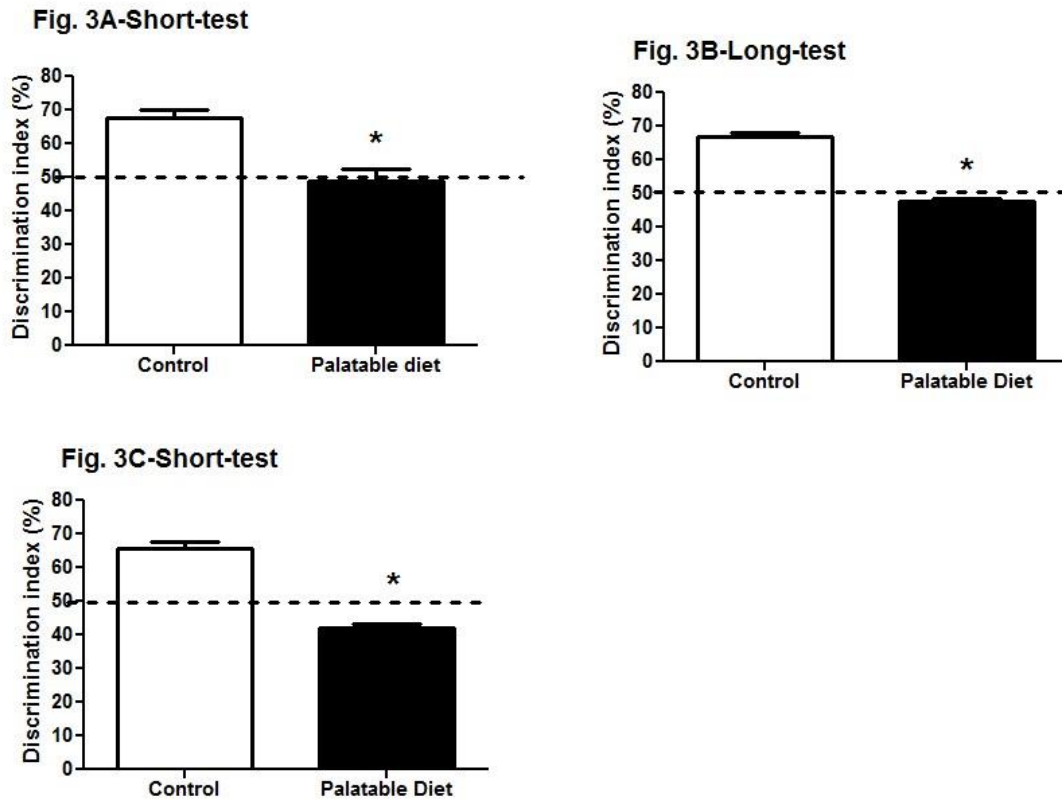


Fig 3: Effects of chronic access to palatable diet in novel object or place recognition in adult rats. Fig 3A: percentage of discrimination index of object in short-test; Fig 3B: percentage of discrimination index of object in Long-test and Fig 3C: percentage of discrimination index of new object place in short-test. Data are expressed as mean \pm SEM, N = 13 to control group and N=15 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. *Palatable diet group decreased the discrimination index in all evaluated parameters ($P < 0.05$).

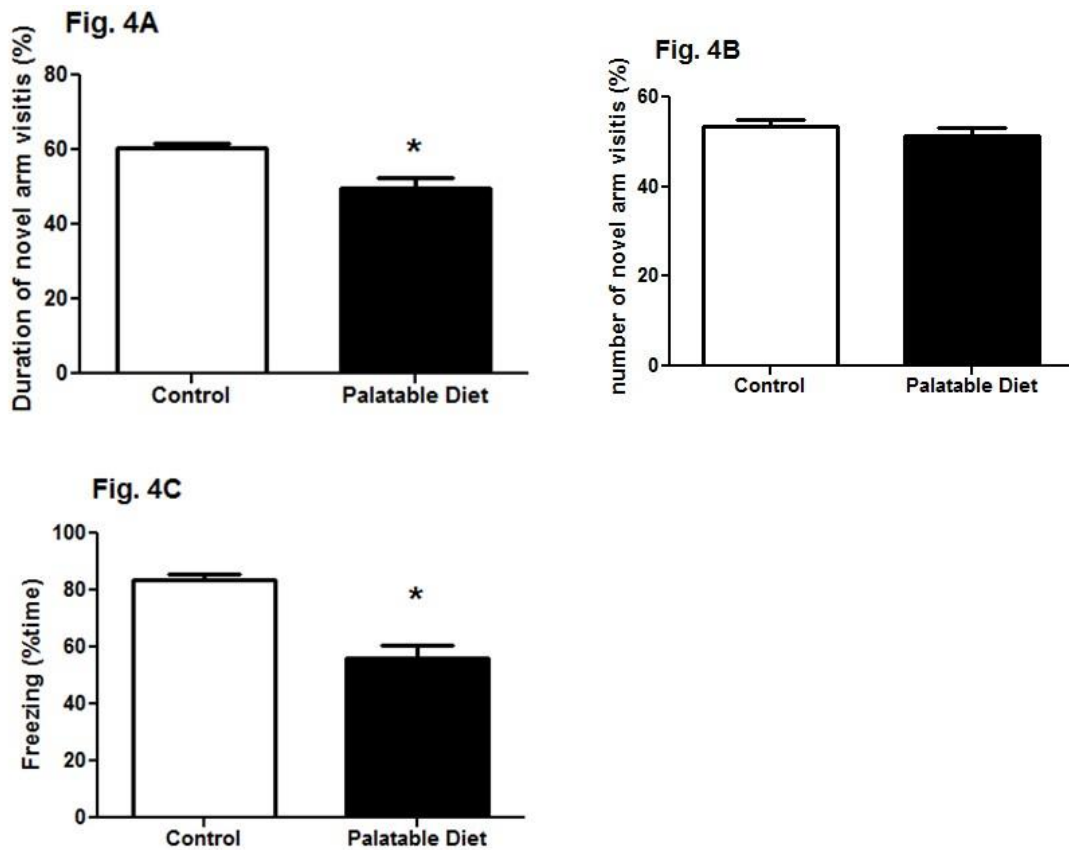


Fig 4: Effects of chronic access to palatable diet in Y-maze and Contextual fear conditioning, in adult rats. Fig. 4A: percentage of duration of novel arm visits; Fig. 4B: percentage of number of novel arm visits and Fig 4C percentage of time in freezing. Data are expressed as mean \pm SEM, N = 13 to control group and N=15 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. * Palatable diet group decreased the duration of novel arm visits and freezing in evaluated parameters ($P < 0.05$).

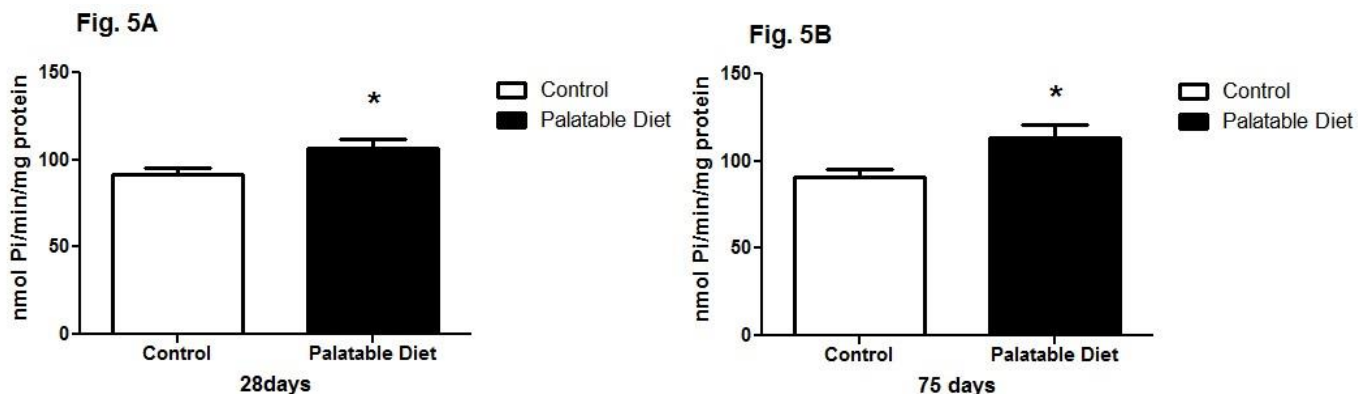


Fig 5: Effects of chronic access to palatable diet on Na^+, K^+ -ATPase activity during the development. Fig. 5A: Na^+, K^+ -ATPase activity, at PND 28; Fig. 5B: Na^+, K^+ -ATPase activity, at PND 75. Data are expressed as mean \pm SEM, N = 6 to control group and N=6 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. * Palatable diet group increased the Na^+, K^+ -ATPase activity ($P < 0.05$), during the stages of development.

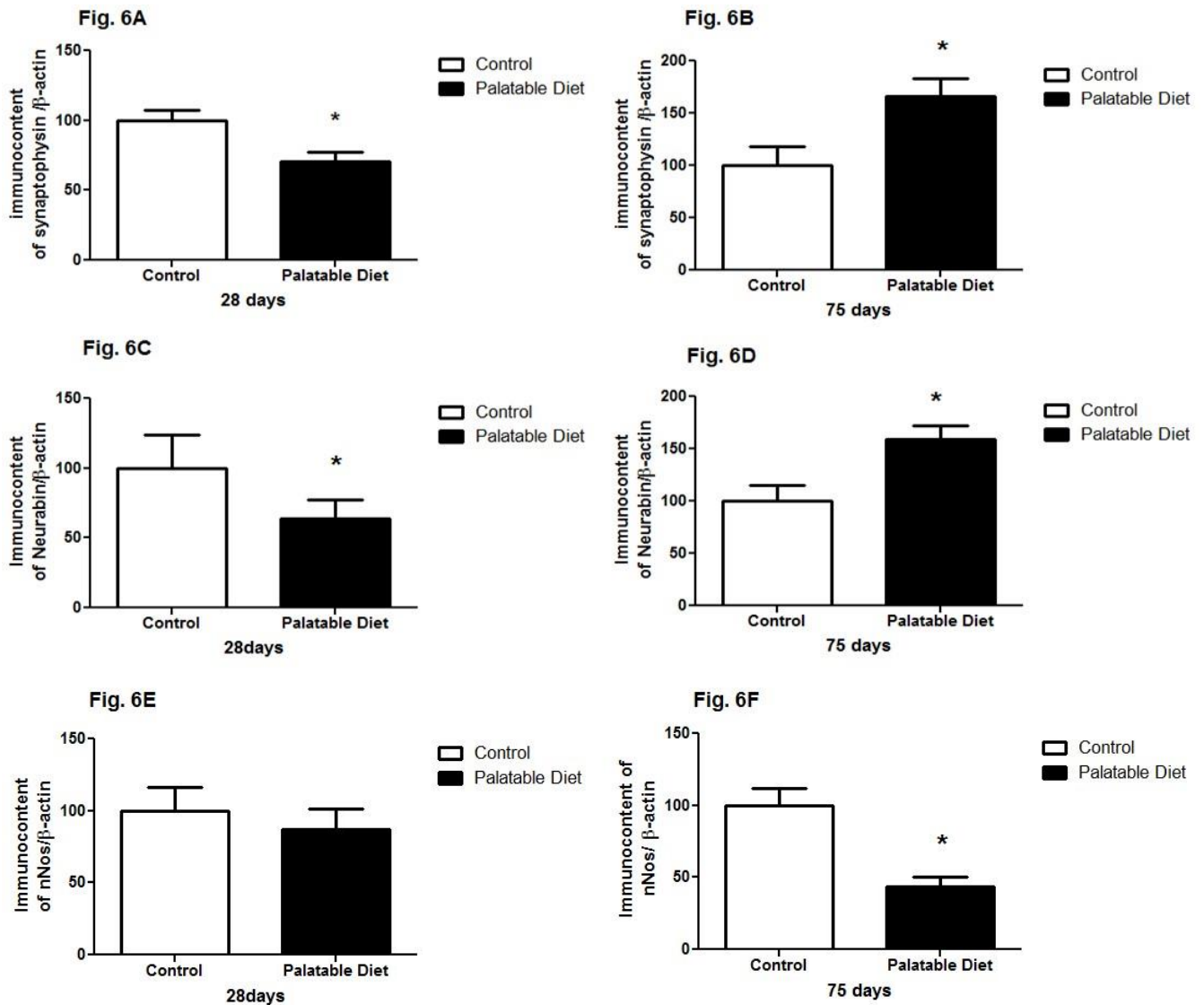


Fig 6: Effects of chronic access to palatable diet on proteins levels in the hippocampus during the development. Fig. 6A: Immunocontent of synaptophysin/β-actin, at PND 28; Fig. 6B: Immunocontent of synaptophysin/β-actin, at PND 75; Fig. 6C: Immunocontent of neurabin/βactin at PND 28; Fig. 6D: Immunocontent of neurabin/β-actin at PND 75; Fig.6E: Immunocontent of nNos/β-actin at PND 28; Fig. 6F: Immunocontent of nNos/β-actin at PND 75. Data are expressed as mean ± SEM, N = 4-6 to control group and N=4-6 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. * Palatable diet group decreased synaptophysin and neurabin (P<0.05), at PND 28. At PND 75, * Palatable diet increased synaptophysin, neurabin and decreased nNos, (P<0.05).

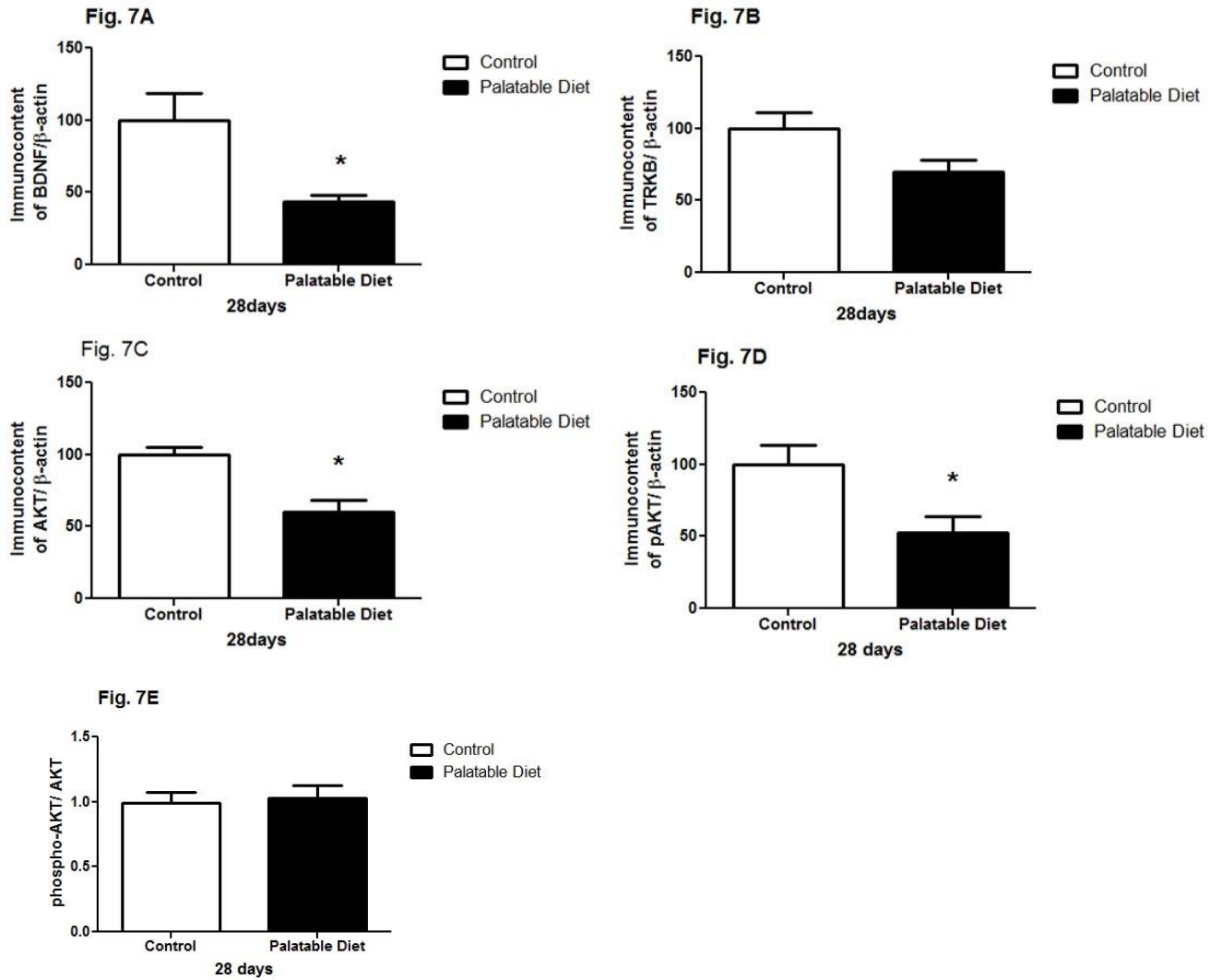


Fig 7: Effects of chronic access to palatable diet on proteins levels in the hippocampus at PND 28. Fig.7A: Immunocontent of BDNF/ β -actin; Fig. 7B: Immunocontent of TRKB/ β actin; Fig. 7C: Immunocontent of AKT/ β -actin, Fig. 7D: Immunocontent of pAKT/ β -actin and Fig.7E: phosphor-Akt/AKT. Data are expressed as mean \pm SEM, N = 4-6 to control group and N=4-6 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. * Palatable diet group decreased BDNF, AKT and pAKT proteins ($P < 0.05$).

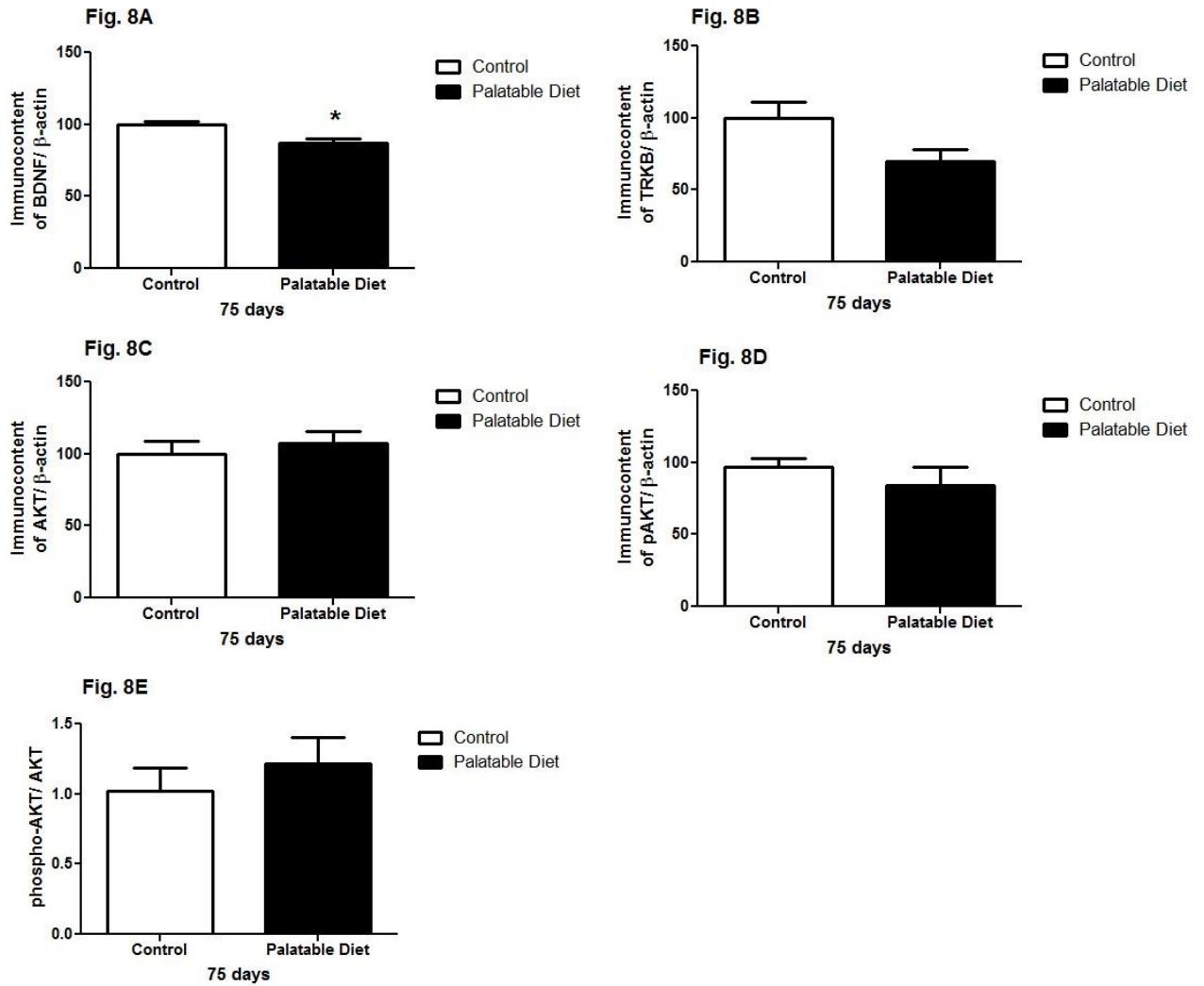


Fig 8: Effects of chronic access to palatable diet on proteins levels in the hippocampus at PND 75. Fig.8A: Immunocontent of BDNF/β-actin; Fig. 8B: Immunocontent of TRKB/βactin; Fig. 8C: Immunocontent of AKT/β-actin, Fig. 8D: Immunocontent of pAKT/β-actin and Fig.8E: phosphor-Akt/AKT. Data are expressed as mean ± SEM, N = 4-6 to control group and N=4-6 to palatable group. The mean consumption was analyzed using Student's t-test. * Palatable diet group decreased BDNFprotein (P<0.05).

