UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Lucía Paola Facciola González

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 SOBRE O COMPORTAMENTO E PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS DE RATOS WISTAR OBESOS

Porto Alegre

2022

Lucía Paola Facciola González

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 SOBRE O COMPORTAMENTO E PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS DE RATOS WISTAR OBESOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Renata Padilha Guedes

Porto Alegre

2022

Catalogação na Publicação

Facciola González, Lucía Paola
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 SOBRE O COMPORTAMENTO E PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS DE RATOS WISTAR OBESOS / Lucía Paola Facciola González. -- 2022.
47 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Renata Padilha Guedes.

1. Comportamento. 2. Obesidade. 3. Ômega-3. 4. Ansiedade. 5. Dieta de Cafeteria. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimento

Quero iniciar dizendo que nem todas as palavras do mundo vão conseguir expressar a minha gratidão por ter conseguido chegar aqui. Foram dois anos desafiadores, não somente pela pandemia que assolou o mundo, mas de forma particular onde me vi em meio a diversos furacões e tempestades. Por isso, quero agradecer inicialmente a Deus, que permitiu a mim e aos meus pais chegarmos até aqui com saúde. Quero agradecer aos meus pais por todo o apoio que sempre me brindaram. Ao meu namorado Miguel, por ter me amparado nos momentos mais difíceis. A minha querida amiga, Jordana Nunes que incentivou, ouviu e motivou a todo momento. Amo vocês.

A minha orientadora Dra. Renata Padilha Guedes por me acolher no grupo, me incentivar e apoiar nos momentos mais difíceis. É um privilégio enorme ser sua aluna, fica aqui minha admiração à cientista brilhante que você é.

Aos colegas de laboratório pelas boas risadas, conversas e conselhos, me fazendo sentir parte do grupo desde o começo e por me ajudarem tanto. Um agradecimento, em especial, a Fernanda da Silva Rodrigues, Jeferson Jantsch e Samia Squizani, por me auxiliar, explicar e apoiar a cada etapa do processo. Vocês Junto com a Profa. Renata foram fundamentais nesta caminhada do mestrado, com as suas palavras de incentivo, sempre que eu duvidava de mim, tornaram a jornada mais leve e tranquila. Vocês possuem um lugar especial no meu coração.

Por fim, agradeço à UFCSPA, funcionários e corpo docente, por terem me permitido esta experiência incrível.

Resumo

Diversas comorbidades estão associados à obesidade, como síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, doenças neurodegenerativas entre outros. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do tipo ômega-3 (n3) têm sido estudados como uma opção terapêutica para amenizar os efeitos deletérios da obesidade, porém, seu papel nas alterações comportamentais relacionadas à obesidade ainda é controverso. Com isso, o nosso objetivo foi investigar se a suplementação com n3 reduz a neuroinflamação e os comportamentos do tipo ansioso em ratos Wistar obesos. Parâmetros metabólicos e bioquímicos foram avaliados, bem como comportamentos de ansiedade. Os animais alimentados com dieta de cafeteria (CAF) apresentaram maior ganho de peso, adiposidade visceral, glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos e níveis de insulina, e o n3 melhorou o perfil lipídico e restaurou a sensibilidade à insulina. Também apresentaram comportamentos do tipo ansioso nas tarefas de campo aberto e no teste claro-escuro. O n3 não exerceu nenhum efeito sobre esses comportamentos. Em relação à neuroinflamação, a dieta e a suplementação atuaram de maneira específica de acordo com a região do sistema nervoso central (SNC) estudada. No hipocampo, a CAF reduziu a expressão de claudina-5 sem efeito do n3, indicando perda de integridade da barreira hematoencefálica (BHE) após o consumo. Além disso, a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e do receptor Toll-like 4 (TLR-4) no hipocampo diminuíram nos animais obesos tratados com n3. No entanto, n3 não foi capaz de reverter o aumento da expressão de TLR-4 no córtex cerebral. Embora o n3 possa proteger contra algumas manifestações neuroinflamatórias no hipocampo, ele não parece ser suficiente para reverter o aumento das manifestações ansiogênicas causadas pela CAF.

Palavras-chave: campo aberto, teste caixa claro-escuro, condicionamento aversivo contextual, PUFAs, GFAP, TLR-4

Abstract

Several comorbidities are associated with obesity, such as metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, neurodegenerative diseases, among others. Omega-3 (n3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been studied as a therapeutic option to alleviate the deleterious effects of obesity, however, their role in obesity-related behavioral changes is still controversial. Therefore, our objective was to investigate whether n3 supplementation reduces neuroinflammation and anxiety-like behaviors in obese Wistar rats. Metabolic and biochemical parameters were evaluated, as well as anxiety behaviors. Animals fed cafeteria diet (CAF) showed greater weight gain, visceral adiposity, fasting glucose, total cholesterol, triglycerides and insulin levels, and n3 improved the lipid profile and restored insulin sensitivity. They also showed anxiety-like behaviors in the open-field and light-dark box tasks. The n3 had no effect on these behaviors. Regarding neuroinflammation, diet and supplementation acted in a specific way according to the region of the central nervous system (CNS) studied. In the hippocampus, CAF reduced claudin-5 expression with no n3 effect, indicating a disruption of the blood-brain barrier after consumption. In addition, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Toll-like receptor 4 (TLR-4) were reduced in obese animals treated in the hippocampus. However, n3 was not able to reverse the increase in TLR-4 expression in the cerebral cortex. Although n3 may protect against some neuroinflammatory manifestations in the hippocampus, it does not seem to be sufficient to reverse the increase in anxiogenic manifestations caused by CAF.

Keywords: open field, light-dark box test, contextual aversive conditioning, PUFAs, GFAP, TLR-4

Sumário

1. Introdução

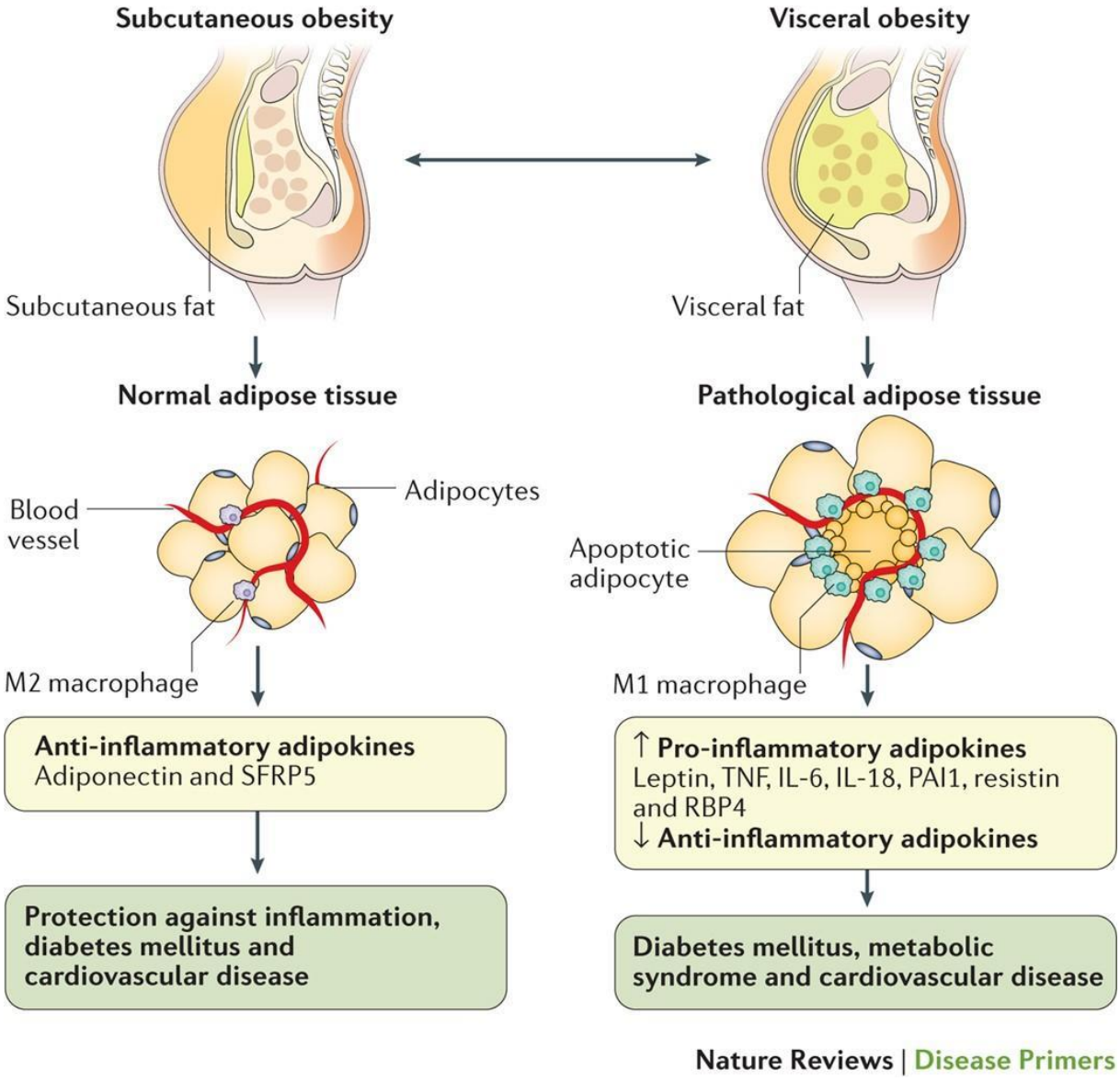
1.1 Obesidade

O tecido adiposo é um órgão endócrino fundamental para o armazenamento energético e regulação metabólica (DE MELLO et al., 2018). Contudo, o consumo calórico excessivo desencadeia processos hipertróficos e hiperplásicos nesse tecido, que prejudicam sua função e favorecem o desenvolvimento de obesidade e outras doenças metabólicas (O'ROURKE, 2018). Nas últimas décadas, o desbalanço energético crônico tem sido favorecido por mudanças nos hábitos de vida como sedentarismo, estresse e aumento no consumo de alimentos ultraprocessados e "fast-foods", caracterizados por possuírem alta palatabilidade e densidade energética porém poucos nutrientes (CUNHA et al., 2020; LEITE; RIBEIRO, 2020; DE MELLO et al., 2018). Assim, a obesidade é um problema de saúde pública com um crescimento alarmante, mesmo com esforços globais para reduzir e controlar os casos. Segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) entre o período de 2003 até 2019, o percentual de indivíduos acima de 20 anos com obesidade dobrou. Dados apontam que o índice de mulheres com obesidade subiu de 14,5% para 30,2%, enquanto homens com obesidade subiu de 9,6% para 22,8%. Outro dado alarmante é que em 2019, uma em cada quatro pessoas com 18 anos ou mais está obesa, o que representa cerca de 41 milhões de pessoas. Em relação ao sobrepeso, 96 milhões de pessoas são atingidas. Na faixa etária de 25 a 39 anos de idade, existe uma prevalência de mais de 50% de excesso de peso, sendo mais elevada no sexo masculino (IBGE, 2020).

O acúmulo de tecido adiposo gera alterações bioquímicas que favorecem a ativação de vias pró-inflamatórias e liberação de citocinas como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α), Interleucina-1beta (IL-1β) e Interleucina-6 (IL-6) (CYPESS, 2022). Esse ambiente inflamatório estimula e atrai células imunológicas como macrófagos (CYPESS, 2022; ZATTERALE et al., 2019), linfócitos T CD4 e CD8 e linfócitos B, que adquirem um perfil pró-inflamatório. Além disso, uma diversidade de respostas patológicas são desenvolvidas devido ao aumento na lipólise basal e liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, assim como o extravasamento de mediadores pró-inflamatórios para a circulação (MARTIN-

JIMÉNEZ et al., 2017; O'BRIEN et al., 2017), o que produz ativação de vias metabólicas não oxidativas, degradação lisossômica e estresse do retículo endoplasmático. Como consequência ocorre uma inflamação sistêmica crônica e de baixo grau (MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1: O excesso de calorias consumidas desencadeia o acúmulo de tecido adiposo. A proliferação e hipertrofia de adipócitos culmina para o estabelecimento de um perfil pro inflamatório que desencadeia a secreção de citocinas e outras moléculas inflamatórias para a periferia.



Fonte: (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017)

Embora trate-se de uma inflamação de baixo grau, seu caráter crônico é responsável para que atue de forma sistêmica, contribuindo para a síndrome metabólica, resistência insulínica e diabetes mellitus tipo 2 (DE MELLO et al., 2018; KHAZEN et al., 2019; LEITE; RIBEIRO, 2020; WANG et al., 2020). Além das doenças citadas acima, a obesidade está associada a hipertensão, dislipidemia e ao comprometimento das funções neurológicas como a cognição (ALEXAKI, 2021; BALASUBRAMANIAN et al., 2021; BENITO-LEÓN et al., 2013). Recentemente vem sendo discutida a maior propensão dos indivíduos com obesidade ao desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos e comportamentais, como por exemplo, ansiedade e depressão (ALONSO-CARABALLO et al., 2019; DAUMIT et al., 2003; LEITE; RIBEIRO, 2020; LUPPINO et al., 2010; NETO et al., 2021). Além disso, indivíduos com obesidade ou distúrbios metabólicos têm maior predisposição a desenvolver demência ou doença de Alzheimer (DA) em algum momento da vida (ALEXAKI, 2021; ANSTEY et al., 2011; PROCACCINI et al., 2016). Diversas regiões do encéfalo são envolvidas nessas repercusões, como hipocampo e córtex pré-frontal (ALONSO-CARABALLO et al., 2019; MURPHY; MERCER, 2013), porém os mecanismos relacionados permanecem obscuros.

1.2 Neuronflamação

A inflamação é um processo fisiológico necessário que acontece fundamentalmente para reparar danos teciduais. A inflamação aguda ocorre em curto prazo (GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2017; WEISS, 2008). Este tipo de inflamação começa logo após a lesão, fazendo com que mediadores como citocinas e quimiocinas estimulem o deslocamento de neutrófilos e macrófagos para a área afetada. Este tipo de inflamação controlada é benéfica na proteção do organismo contra patógenos. Porém, se esta inflamação ainda persistir por períodos mais prolongados, torna-se uma inflamação crônica (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021). Essa inflamação crônica pode causar dano tecidual, perdendo o caráter regenerativo e estabelecendo um papel patológico que predispõe ao surgimento de doenças como alergias, aterosclerose, câncer, artrite e doenças autoimunes (WEISS, 2008).

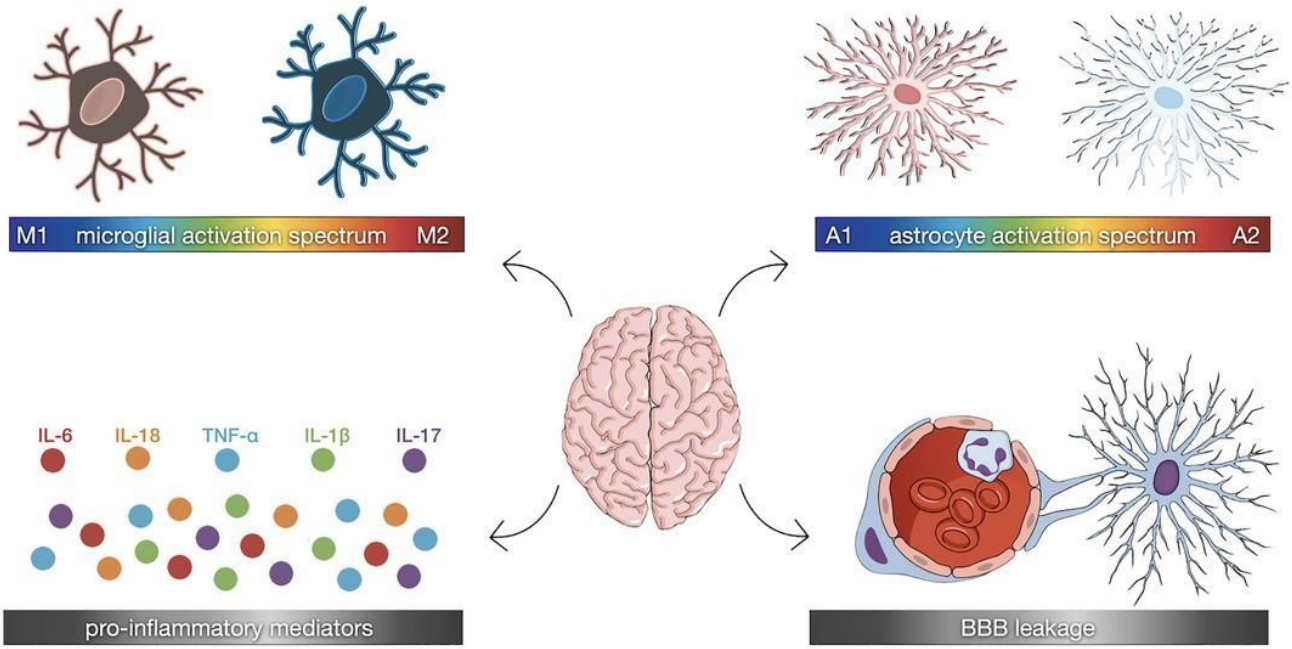
A neuroinflamação, semelhante ao que ocorre na periferia, ocorre com o intuito de proteger o sistema nervoso, removendo ou inibindo patógenos, e assim, conferindo neuroproteção Assim como na periferia, ao assumir um caráter crônico, pode tornar-

se prejudicial, desencadeando morte neuronal e, portanto, contribuindo para o surgimento de doenças neurológicas (KEMPURAJ et al., 2016; KWON; KOH, 2020).

No sistema nervoso central (SNC) há duas principais categorias de células, os neurônios e as células gliais, estas últimas possuem diversos papéis para a manutenção da homeostase do microambiente, além de fornecer suporte funcional para a atividade neuronal (KWON; KOH, 2020). A neuroinflamação é regulada, em parte, pelo conjunto de células da glia como astrócitos, oligodendrócitos e microglia (KWON; KOH, 2020; ROBB et al., 2020). Embora a microglia e os astrócitos possuam espectros fenotípicos diversos, classicamente são agrupados em neuroprotetor ou neurotóxico, sendo o último responsável por produzir mediadores pró-inflamatórios. Além disso, as mudanças de fenótipo de neuroprotetor para neurotóxico dependem de alguns fatores como o estágio e gravidade da doença (DE FRAGA et al., 2021; KWON; KOH, 2020). De acordo com isso, as células gliais expressam marcadores específicos que caracterizam cada um desses fenótipos. No fenótipo M1 (clássico), as células microgliais secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, Interferon-gama (IFN-γ) e IL-6, já no M2 (alternativo) são secretadas citocinas anti-inflamatórias como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) (DE FRAGA et al., 2021; KWON; KOH, 2020) Em relação aos astrócitos, no fenótipo A1 (pró-inflamatório), ocorre secreção de interleucina-1 alpha (IL-1α), TNF-α e complemento C1q. O fenótipo A2 (imunorregulador), secreta citocinas como IL-4, IL-10, interleucina-13 (IL-13) (REFOLO; STEFANOVA, 2019; STEPHENSON et al., 2018). Contudo, essas células possuem múltiplos fenótipos reativos de acordo com o estágio da doença, por exemplo, e os estados de polarização não são definitivos, em vez disso, podem existir espectros variáveis (KWON; KOH, 2020) (figura 2).

Figura 2: Assim como na periferia, o SNC adquire uma resposta inflamatória cunhada por neuroinflamação. A microglia e os astrócitos protagonizam essa resposta pela liberação de mediadores pró inflamatórios e por adquirirem mudanças no citoesqueleto que são típicas de um perfil mais pró-inflamatório. Da mesma forma, a

barreira hematoencefálica (BHE) é afetada por perturbações periféricas que podem desencadear perda de sua integridade.



Fonte: (DE FRAGA et al., 2021)

As células da microglia são as células imunes inatas do sistema nervoso (KWON; KOH, 2020). Além disso, exercem várias funções ao longo do desenvolvimento, detectam mudanças no microambiente neuronal, remodelam sinapses e respondem aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Em circunstâncias normais, a microglia encontra-se envolvida na manutenção da homeostase do SNC e na fagocitose de neurônios em fase apoptótica (KWON; KOH, 2020; GOGOLEVA; DRUTSKAYA; ATRETKHANY, 2019).

Os astrócitos são as células mais abundantes do tecido nervoso e possuem um importante papel no SNC (OLIVEIRA, 2015; MARQUES, 2014). Diferenciam-se da glia radial neuroepitelial durante o desenvolvimento embrionário e participam de diferentes funções no tecido nervoso como fornecimento de nutrientes para os neurônios e liberação de neuromoduladores como glutamato, ATP e GABA (REFOLO; STEFANOVA, 2019; OLIVEIRA, 2015). Os astrócitos integram a unidade neurovascular da BHE atuando como uma ligação entre neurônios e vasos sanguíneos no encéfalo. Essas células também estão relacionadas com o sistema linfático do encéfalo (REFOLO; STEFANOVA, 2019). Alguns marcadores de astrócitos

como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), S100B e YKL040 são detectadas no líquido cefalorraquidiano ou até mesmo no plasma para a avaliação da reatividade dos astrócitos (KWON; KOH, 2020). A GFAP é uma proteína de filamento intermediário do tipo III, principal componente do citoesqueleto dos astrócitos (DE FRAGA et al., 2021; MESSING; BRENNER, 2020). É reconhecida como um marcador astrocitário no SNC e sua alta expressão é considerada um indicador de gliose indicando lesão ou doença cerebral (MESSING; BRENNER, 2020).

Na neuroinflamação, a primeira linha de defesa do SNC é a ativação do sistema imunológico inato para opsonizar e fagocitar as células apoptóticas. Essa resposta também recruta células do sistema imune adaptativo para a secreção de citocinas e quimiocinas. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) celulares são acionados para responder a determinados insultos. Entre esses receptores estão os receptores do tipo toll (do inglês, toll-like receptors, TLRs) que ligam-se aos PAMPs e DAMPs. Os TLRs são amplamente expressos pela microglia, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios e, quando ativados, desencadeiam a síntese de citocinas pró-inflamatórias (RAN et al., 2020; AZAM et al., 2019; MOR et al., 2010).

O TLR-4 é uma proteína transmembrana que pertence à família dos TLRs e tem como principal função, em condições normais, restaurar a homeostase de tecidos acometidos por patógenos ou lesões (RAN et al., 2020). O principal agonista do TLR-4 é o lipopolissacarídeo (LPS), integrante estrutural integral da membrana externa de bactérias gram-negativas. A interação entre eles induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, atuando como mediadores inflamatórios endógenos, interagindo com receptores de diferentes células-alvo. Além disso, os macrófagos, em resposta ao LPS, liberam diversos mediadores biológicos como enzimas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e óxido nítrico (ON) (ROGERO; CALDER, 2018).

Na obesidade, acreditava-se que os ácidos graxos saturados (SFAs) e monoinsaturados (MUFAs) fossem capazes de ativar as vias de TLR-4 levando a um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (BUTTON et al., 2014; GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2017; WANG et al., 2012). Porém, novas evidências sugerem que o TLR-4 regula indiretamente a inflamação induzida por estes ácidos graxos, modificando o metabolismo lipídico dos macrófagos. E isso pode estar relacionado com a microbiota intestinal, pois estudos demonstraram que uma dieta

com altos índices de gordura altera a composição da microbiota intestinal e com isso, ocorre um aumento na absorção intestinal de produtos microbianos que por consequência aumentam a produção de LPS circulante (LANCASTER et al., 2018). Em modelos experimentais de obesidade é demonstrado que a sinalização do TLR-4 promove a produção de citocinas como TNFα, IL-1β e IL-6 e ativação de vias de estresse do retículo endoplasmático, resultando em sinalização pró-inflamatória e gliose no hipotálamo (O'BRIEN et al., 2017; THALER et al., 2012; THALER; SCHWARTZ, 2010).

Outras estruturas cerebrais também são afetadas pela inflamação causada pela obesidade (GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2017). Algumas consequências da obesidade ou de perturbações metabólicas são bem relatadas na literatura como redução da substância branca e cinzenta, resultando em menor volume cerebral em estruturas como córtex cerebral e hipocampo (ALEXAKI, 2021; LOWE; REICHELT; HALL, 2019; O'BRIEN et al., 2017).

O hipocampo, está envolvido em diversas funções como cognição, memória, aprendizado e emoções. Essa região também é suscetível aos processos inflamatórios causados pela obesidade, sendo uma das primeiras áreas a ser afetada na neuroinflamação (WANG et al., 2020; DE MELLO et al., 2018; KHAZEN et al., 2019) e um dos mais vulneráveis no início das demências neurodegenerativas (KANOSKI et al., 2010). O consumo elevado de alimentos ricos em gordura e açúcar está associado ao comprometimento da aprendizagem e da memória dependentes do hipocampo (ATTUQUAYEFIO et al., 2017; DE PAULA et al., 2021; WANG et al., 2020). Além disso, a dieta rica em gordura e açúcar desencadeia diversos mecanismos independentes, como a sinalização inflamatória com ativação das células da glia, recrutamento de células do sistema imune, aumento da permeabilidade da BHE e comprometimento da plasticidade sináptica (DE PAULA et al., 2021; KANOSKI et al., 2010). No comprometimento cognitivo leve e na doença de Alzheimer, ocorre uma mudança estrutural no cérebro e uma diminuição na integridade cerebral, principalmente no hipocampo. Indivíduos com Alzheimer apresentam uma atrofia no lobo temporal e indivíduos com comprometimento cognitivo leve apresentam um padrão semelhante de perda hipocampal porém, em menor grau (O'BRIEN et al., 2017). Essas alterações podem ocorrer também em indivíduos com obesidade, pois

também há evidências de uma diminuição no volume hipocampal nesta população (O'BRIEN et al., 2017).

Outra região que também é suscetível aos danos produzidos pela obesidade é o córtex pré-frontal. A obesidade pode estar envolvida na alteração do sistema de recompensa (DE MELLO et al., 2018; FARR; LI; MANTZOROS, 2016; NUMMENMAA et al., 2012). Além disso, os níveis de dopamina mostraram-se reduzidos em ratos com predisposição à obesidade. E a baixa função do sistema dopaminérgico está relacionada com alterações como dependência e hiperfagia (DE MELLO et al., 2018).

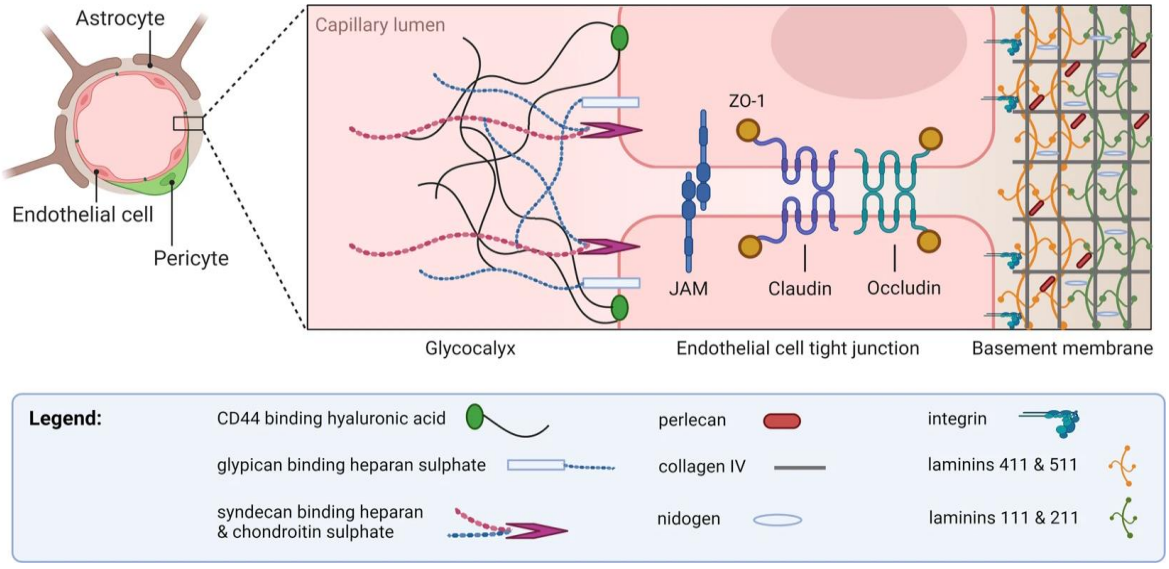
Inicialmente acreditava-se em uma relação causa e efeito direta entre obesidade e a resposta cortical. Porém, parece existir uma relação recíproca onde o consumo excessivo de alimentos densos em calorias em conjunto com a redução do controle modulatório sobre as regiões de recompensa do córtex e controle cognitivo, reduzam as habilidades de autorregulação da dieta, aumentando assim o consumo desses alimentos ricos em gordura e açúcar. Com o passar do tempo, o excesso de alimentos hipercalóricos pode promover uma desregulação funcional do córtex e do sistema dopaminérgico, causando o consumo excessivo e posteriormente levando à obesidade. Como consequência, ocorrem deficiências neurocognitivas e neurofisiológicas características de indivíduos com obesidade (LOWE; REICHELT; HALL, 2019). Além disso, foi observado em humanos que a exposição prolongada a dietas ricas em gordura pode levar a prejuízos na atenção, velocidade de processamento, memória e habilidades cognitivas globais (EDWARDS; MURRAY; HOLLOWAY, 2011; LOWE; REICHELT; HALL, 2019; MICHA; ROGERS; NELSON, 2011).

Estudos realizados com ratos alimentados com dieta rica em gordura e sacarose ou rica em sacarose demonstraram uma redução significativa na principal classe de interneurônios GABAérgicos, neurônios parvalbumina, dentro da região do roedor que é homóloga ao córtex pré-frontal (BAKER; REICHELT, 2016; LOWE; REICHELT; HALL, 2019; REICHELT et al., 2015). Esses achados sugerem um mecanismo possível pelo qual este tipo de alimentação pode provocar deficiência funcional no controle cognitivo e na desregulação do córtex cerebral (LOWE; REICHELT; HALL, 2019).

1.3 Barreira Hematoencefálica

A BHE é a principal ligação entre o cérebro com o meio externo. Sendo chamada de barreira, ela permite a passagem bidirecional de moléculas, porém de forma regulada mantendo o microambiente do SNC diferenciado (GALEA, 2021). Para manter sua função, células endoteliais especializadas estão conectadas com as proteínas de junção oclusiva impedindo o transporte paracelular. Essas junções são formadas por três tipos de moléculas claudinas (CLDN), ocludinas (OCLDN) e moléculas de adesão juncional (DE FRAGA et al., 2021). Essas junções estão conectadas ao citoesqueleto endotelial por proteínas da zônula ocludens (ZO) (GALEA, 2021). Os astrócitos são capazes de regular diferentes características da BHE contribuindo com as junções oclusivas, expressão e polarização de transportadores e sistemas enzimáticos especializados como a barreira física, de transporte e metabólica (LIU et al., 2018) (Figura 3).

Figura 3: A BHE é composta pela junção não fenestrada do endotélio vascular, união celular mantida por proteínas de junção e oclusão como a claudina, ocludina e zônula-ocludens e reforçadas pelos pés astrocitários que garantem mais uma camada de proteção. No contexto de manifestações neuroinflamatórias, pode haver diminuição na expressão dessas proteínas de barreira, bem como retração dos pés astrocitários, deixando a passagem sangue periférico-cérebro mais vulnerável, permitindo o extravasamento de moléculas que podem desencadear processos neuroinflamatórios.



Fonte: (GALEA, 2021).

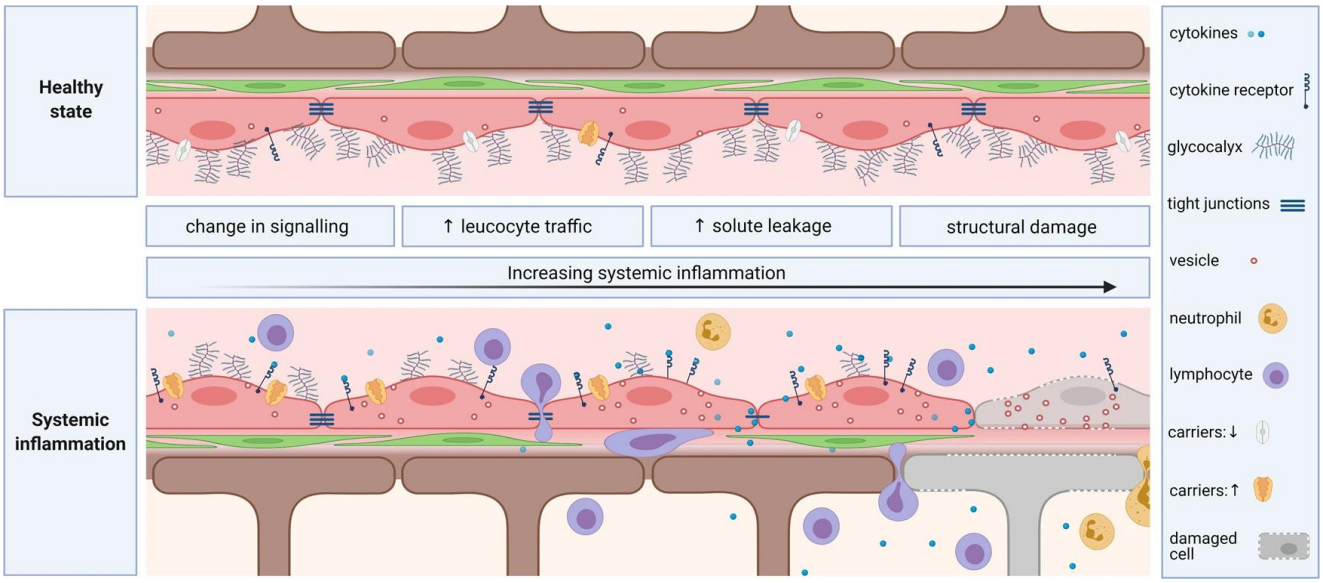
As claudinas são uma família de proteínas importantes na formação da BHE. Foram identificadas 27 isoformas diferentes de claudinas, as quais apresentam padrões de expressão específicos para cada tecido com isso (LOCHHEAD et al., 2020). A estrutura das claudinas é similar com as ocludinas e conexinas, sendo formadas por quatro domínios transmembranas e duas alças extracelulares (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019).

A claudina-5 está presente nas células endoteliais dos pulmões, fígado, rins e pele e é expressa na camada de células epiteliais do estômago, em enterócitos no intestino delgado e grosso e em células acinares pancreáticas, porém, sua maior expressão é observada no cérebro e pulmões (LOCHHEAD et al., 2020). Além disso, a sua expressão também foi observada em vasos linfáticos do SNC. A regulação desta proteína acontece por meio de interações físicas com proteínas de suporte citoplasmático e interações com proteínas na própria célula ou de células adjacentes. A regulação negativa da claudina-5 compromete a integridade da BHE (GREENE; HANLEY; CAMPBELL, 2019).

A inflamação persistente pode levar à fagocitose dos pés astrocíticos e consequentemente ao aumento de permeabilidade da BHE. Ainda, estímulos inflamatórios, como LPS, por exemplo, diminuem a expressão das proteínas das junções oclusivas (ALEXAKI, 2021). O aumento da permeabilidade da BHE permite a passagem de citocinas e quimiocinas, células do sistema imune, ácidos graxos livres e triglicerídeos, propiciando o desenvolvimento de neurotoxicidade (O'BRIEN et al., 2017) (Figura 4).

No estudo dirigido por Hargrave e colaboradores em 2016, avaliou-se a lesão da BHE através da injeção periférica de fluoresceína de sódio em ratos que receberam dieta ocidental por 90 dias. Foi possível observar um extravasamento maior do corante no hipocampo em comparação com o grupo controle. Curiosamente, o cerebelo não foi afetado, o que indica que a dieta pode comprometer a BHE de forma região-dependente (HARGRAVE et al., 2016). Outra substância como o azul de Evans também foi utilizada para demonstrar o comprometimento da BHE através do extravasamento do corante, em modelo de dieta rica em gordura, indicando que a BHE pode se tornar mais permeável no hipotálamo a partir da 4ª semana (LEE et al., 2019)

Figura 4: Processos neuroinflamatórios são complexos. Há comprometimento estrutural da BHE com diminuição das proteínas de junção e retração de pés astrocitária. Também ocorre invasão de células imunológicas periféricas e moléculas inflamatórias. Dessa forma, a BHE perde sua integridade e função. Intervenções que possam atuar na restauração da barreira são interessantes para diminuir os processos neuroinflamatórios no SNC.



Fonte: (GALEA, 2021)

1.4 Ansiedade e Depressão

Nos últimos anos vem ocorrendo um aumento no número de casos de transtornos mentais como ansiedade e depressão. A obesidade está ligada a diversas mudanças estruturais e funcionais no encéfalo que são similares aos aspectos fisiopatológicos desses transtornos. A obesidade aumenta em 30 a 40% o risco para o desenvolvimento de sintomas de ansiedade (FULTON et al., 2022; DE PAULA et al., 2021; MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015). Além disso, existe uma relação bidirecional entre esta associação, pois além de os indivíduos com obesidade apresentaram tendência ao desenvolvimento desses transtornos, os indivíduos que apresentam depressão e ansiedade tendem a procurar alimentos hipercalóricos o que leva a um aumento gradativo de peso (DE PAULA et al., 2021; MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015; TOUPS et al., 2013). Ainda, pessoas com obesidade ou com

sobrepeso e com transtorno de bipolaridade apresentam um desempenho cognitivo menor (MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015).

A obesidade e a síndrome metabólica possuem relação com uma série de hormônios associados à ansiedade e depressão como cortisol, insulina e leptina. Existe um aumento da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em uma variedade de doenças inflamatórias, metabólicas e psiquiátricas. A relação entre os níveis de cortisol e obesidade é complexa pois, indivíduos com obesidade têm cortisol elevado. Por outro lado, o desenvolvimento da obesidade é compatível com o aumento de fatores como estresse, consumo de alimentos ricos em gordura e açúcar e diminuição do sono, os quais elevam a produção de cortisol que, por sua vez, aumenta o acúmulo de tecido adiposo visceral. Além disso, citocinas pró-inflamatórias provenientes do tecido adiposo também podem estar associadas ao efeito estimulador do eixo HPA, que uma vez ativado, atua no sentido de atenuar a resposta inflamatória. Essas alterações metabólicas e endócrinas estão associadas com parâmetros clínicos de depressão (FULTON et al., 2022).

Disfunções relacionadas à insulina também possuem correlação com a sintomatologia de ansiedade e depressão. Uma alta taxa de pacientes com depressão apresentam resistência insulínica, porém, ainda não está claro se este hormônio atua modificando os circuitos neuronais que regulam o humor. É bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias promovem resistência à insulina, e a diminuição da sinalização cerebral da insulina, provocada por neuroinflamação, intensifica comportamentos depressivos (FULTON et al., 2022; CAI et al., 2018;; KLEINRIDDERS et al., 2015).

Já a leptina, derivada do tecido adiposo, em níveis normais pode suprimir o comportamento semelhante à ansiedade. Porém, na obesidade o excesso na produção do hormônio leva à resistência à leptina provocando sintomas de ansiedade e depressão em humanos. Foi observado em camundongos que a leptina possui ação ansiolítica o que pode estar associado à sinalização da leptina em neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (FULTON et al., 2022; FERNANDES et al., 2021; LIU; GUO; LU, 2015).

1.5 Modelos animais para o estudo da ansiedade e obesidade

Modelos experimentais são utilizados para estudar a ansiedade avaliando o comportamento inato dos animais. A tarefa do campo aberto (CA), desenvolvida para roedores em 1934, é um dos testes mais utilizados já que fornece uma avaliação rápida e fácil do comportamento animal. É possível avaliar desde a atividade locomotora geral até comportamentos emocionais do tipo ansiedade. Os roedores não gostam de ambientes grandes e abertos, iluminados e desconhecidos, sendo possível incorporar estes recursos ao campo aberto. Três aspectos podem ser observados neste teste: distância percorrida durante o teste; a tigmotaxia, que é a porcentagem de tempo total que o animal fica próximo à parede externa, e o número de pellets fecais deixados, indicando comportamento do tipo ansioso (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015).

O teste claro-escuro (CE) se baseia na resposta inata dos roedores a ambientes iluminados e no comportamento exploratório. Observa-se quanto tempo o animal permanece na área iluminada e o tempo que leva até encontrar uma passagem para o lado escuro da caixa. Assim como o aumento das transições entre as câmaras escuras e claras. Se o mesmo permanecer mais tempo na área clara onde normalmente o animal teria adversão, é considerado um indicativo de comportamento do tipo ansioso (BOURIN; HASCOËT, 2003).

O condicionamento aversivo ao contexto (CAC) é um teste utilizado para avaliar o mecanismo neurobiológico associativo do medo e a memória dos animais. Em uma situação comum de medo, os roedores têm um comportamento de imobilidade com isso, quando expostos a uma situação como um choque nas patas, tendem a apresentar o congelamento como resposta de medo, este comportamento é medido com um índice de aprendizado associativo de medo e memória. A avaliação é medida pelo tempo de imobilidade do animal (SHOJI et al., 2014).

O aumento da ingestão de alimentos industrializados de alta densidade calórica e palatáveis é um dos principais fatores para o desenvolvimento de obesidade na sociedade moderna (GIUDETTI et al., 2020). A pesquisa com modelos animais desempenha um papel importante no entendimento dos distúrbios humanos, incluindo condições neuropsiquiátricas. Por bastante tempo, os pesquisadores utilizaram a dieta

rica em gordura e açúcar como principal indutor de obesidade. Embora seja útil e tenha vantagens quanto ao controle de nutrientes e energia que os animais recebem, esta abordagem não mimetiza de forma acurada a dieta humana atual. Sendo assim, foi desenvolvido o modelo de dieta de cafeteria (CAF) para indução de obesidade, que implica em dar aos animais acesso a alimentos denominados de “junk food”, altamente consumidos pelos humanos, os quais são ultraprocessados, altamente palatáveis e de fácil acesso (LALANZA; SNOEREN, 2021; BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019).

1.6 Ômega-3

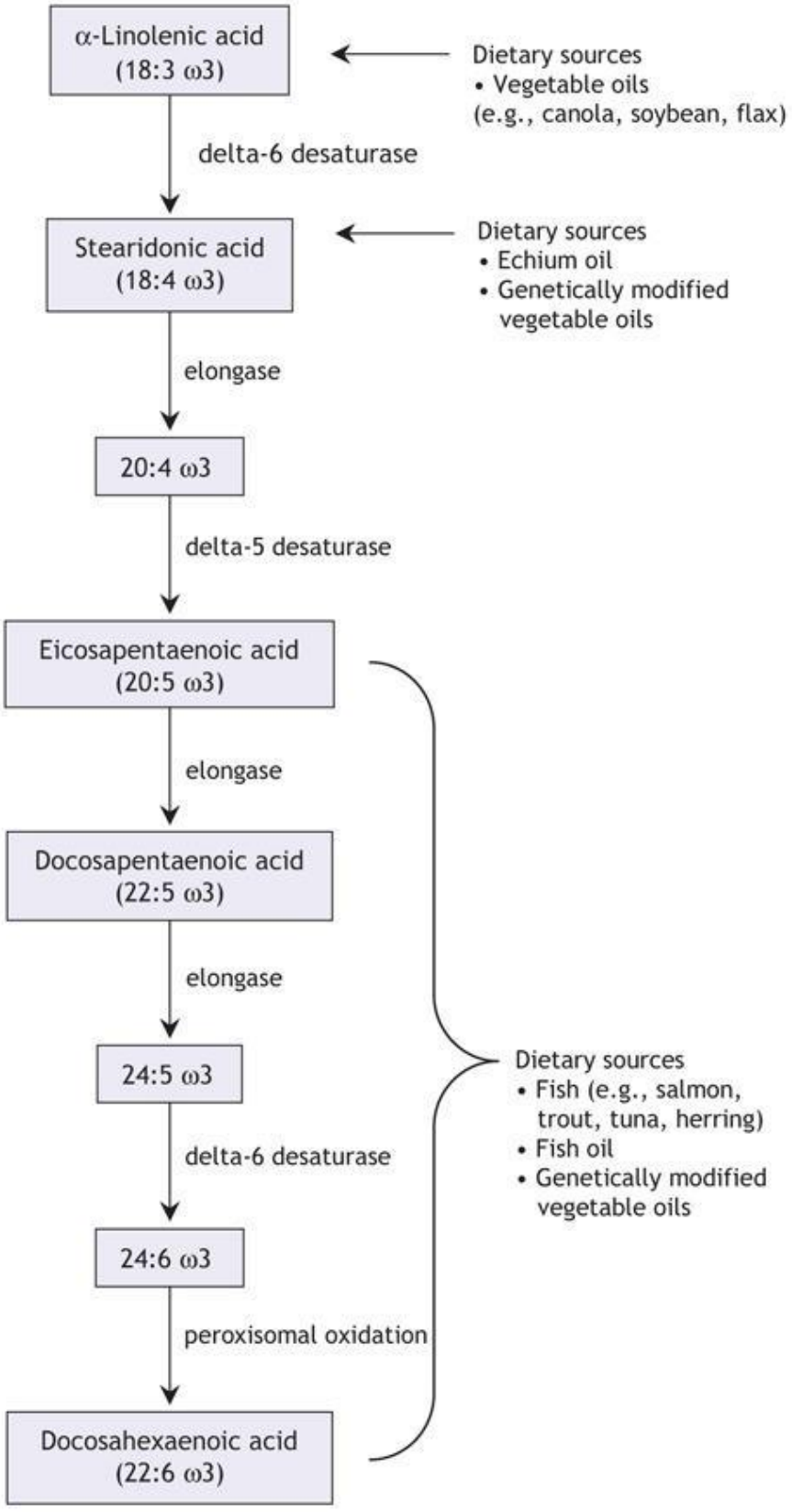
Pensando em terapias que possam melhorar o quadro causado pela obesidade, as intervenções no estilo de vida como alterações na alimentação combinada com atividade física estão entre as estratégias principais (O’BRIEN et al., 2017). Porém, somente a mudança alimentar não reverte totalmente os efeitos causados pela obesidade, principalmente em relação aos efeitos comportamentais, já que pessoas com obesidade apresentam propensão a diversos distúrbios emocionais (SARWER; POLONSKY, 2016). Com isso, a busca de estratégias que auxiliam na neuroproteção é imprescindível.

Os ácidos graxos podem ser divididos em quatro grupos de acordo com o tamanho da cadeia de carbono, são eles: ácidos graxos de cadeia curta, que contêm de um a seis carbonos e são formados da fermentação de carboidratos pela microbiota intestinal de mamíferos. O segundo grupo possui de oito a 14 átomos e são chamados de ácidos graxos de cadeia média. Já os ácidos graxos de cadeia longa são compostos por 14 a 18 átomos de carbono e são a maioria dos ácidos graxos ingeridos pela alimentação. E, por último, o grupo dos ácidos graxos de cadeia muito longa possuem mais de 20 átomos de carbono. Além disso, os ácidos graxos podem ser divididos em dois subgrupos, os ácidos graxos saturados de cadeia longa da dieta e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018). Destes quatro grupos, o que abordaremos neste trabalho serão os ácidos graxos de cadeia longa, mais precisamente o ômega-3 (n3).

O n3, pertencente à família dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), são encontrados nas membranas celulares (DE MELLO et al., 2018). Possuem uma ligação dupla entre o terceiro e o quarto átomo de carbono da extremidade metil

terminal da cadeia (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018). São denominados essenciais, ou seja, precisam ser ingeridos (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018). O ácido α-linolênico (ALA) é o precursor para os outros ácidos graxos, o eicosapentaenoico (EPA), o docosapentaenoico (DPA) e o docosahexaenoico (DHA) no corpo, todavia, estudos apontam a baixa taxa de conversão de ALA para EPA e DPA e praticamente nenhuma taxa para conversão em DHA, com isso é necessário obter este ácidos graxos na alimentação (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018). Entre as fontes principais de n3 podem ser citados os frutos do mar, nozes e alguns vegetais (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018) (Figura 5). Porém, não é fácil o consumo desses alimentos na quantidade adequada para a obtenção da dosagem recomendada de n3, por isso é comum ser necessária a suplementação destes ácidos graxos. Em relação à suplementação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, recomenda a dosagem de no mínimo 1.500 mg de EPA e DHA por dia (ANVISA, 2018).

Figura 5: Síntese e fonte alimentar da família de ácidos graxos poli-insaturados n3.



Fonte: (SURETTE, 2008).

Níveis baixos de n3 estão associados com o aumento do estado inflamatório e risco de depressão em humanos. Em ratos foi observado que baixos níveis de n3 no encéfalo estimulam a neuroinflamação e comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Além disso, no cérebro de roedores foi observado que o consumo crônico e elevado de gorduras saturadas diminui sensivelmente os níveis de PUFAs, o que provavelmente leva a respostas neuroinflamatórias e déficits de humor (FULTON et al., 2022).

O DHA é o mais abundante entre os lípidos estruturais do encéfalo, sendo fundamental para a função cerebral. Em conjunto com o EPA, possuem ação anti-inflamatória, inibindo o NF-kB e as vias de sinalização dos TLRs e assim, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (FULTON et al., 2022; DE MELLO et al., 2018). Estudos demonstram que altos níveis destes ácidos graxos protegem o cérebro de danos cerebrais isquêmicos, através da supressão de respostas inflamatórias e estresse oxidativo (WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2014; CHANG et al., 2013). Mais do que isso, os PUFAs são precursores de endocanabinóides e seus efeitos são conhecidos na imunomodulação, neuroinflamação, ingestão alimentar e humor (FULTON et al., 2022).

Além dos benefícios sobre o sistema nervoso, o n3 atua na melhora do perfil metabólico por interferir na liberação de adipocinas. Também atua no metabolismo de carboidratos por melhorar o índice glicêmico e no metabolismo de lipídios por aumentar a oxidação de gordura. Além disso, estimula o aumento da termogênese e a ativação do anabolismo muscular (ALBRACHT-SCHULTE et al., 2018). Contudo, nos casos de obesidade severa, esses efeitos podem ser limitados. Assim, embora muitos estudos demonstram efeitos positivos do n3 em parâmetros metabólicos, o impacto da sua suplementação sobre aspectos cognitivos e comportamentais na população obesa ainda é controverso e necessita de mais evidências.

2. Objetivo Geral

Investigar se a suplementação com ômega-3 reduz a neuroinflamação e os comportamentos do tipo ansioso em ratos Wistar obesos.

2.1 Objetivos específicos

- Induzir obesidade em ratos Wistar por meio de dieta de cafeteria.
- Avaliar os efeitos da dieta de cafeteria e do ômega-3 sobre parâmetros metabólicos dos animais.
- Avaliar o comportamento do tipo ansioso dos animais estudados.
- Analisar a expressão de marcadores neuroinflamatórios como GFAP e TLR-4 no córtex cerebral e hipocampo.
- Analisar a expressão da claudina-5 no córtex cerebral e hipocampo como indicativo de integridade da barreira hematoencefálica.

3. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380639/do1-2018-07-27-instrucao-normativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550>acesso em: 02 de maio. 2022

ALBRACHT-SCHULTE, K. et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 58, p. 1–16, ago. 2018.

ALEXAKI, V. I. The Impact of Obesity on Microglial Function: Immune, Metabolic and Endocrine Perspectives. **Cells** , v. 10, n. 7, 23 jun. 2021.

ALONSO-CARABALLO, Y. et al. Enhanced anxiety-like behavior emerges with weight gain in male and female obesity-susceptible rats. **Behavioural brain research**, v. 360, p. 81–93, 15 mar. 2019.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 154–169, fev. 2010.

ANSTEY, K. J. et al. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 12, n. 5, p. e426-37, maio 2011.

ATTUQUAYEFIO, T. et al. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172645, 23 fev. 2017.

AZAM, S. et al. Regulation of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Pathway by Polyphenols in the Treatment of Age-Linked Neurodegenerative Diseases: Focus on TLR4 Signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1000, 10 maio 2019.

BAKER, K. D.; REICHELT, A. C. Impaired fear extinction retention and increased anxiety-like behaviours induced by limited daily access to a high-fat/high-sugar diet in male rats: Implications for diet-induced prefrontal cortex dysregulation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 136, p. 127–138, dez. 2016.

BALASUBRAMANIAN, P. et al. Obesity-induced cognitive impairment in older adults: a microvascular perspective. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 320, n. 2, p. H740–H761, 1 fev. 2021.

BENITO-LEÓN, J. et al. Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: a population-based cross-sectional study (NEDICES). **European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 20, n. 6, p. 899–906, e76-7, jun. 2013.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 28 fev. 2003.

BUTTON, E. B. et al. Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. **Lipids**, v. 49, n. 4, p. 305–316, abr. 2014.

BUYUKDERE, Y.; GULEC, A.; AKYOL, A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. **PeerJ**, v. 7, p. e6656, 5 abr. 2019.

CAI, W. et al. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 7, p. 2914–2926, 2 jul. 2018.

CHANG, C.-Y. et al. Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 12, p. 2127–2137, dez. 2013.

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. A Comprehensive Review of Chemistry, Sources and Bioavailability of Omega-3 Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 4 nov. 2018.

CUNHA, A. et al. “Comfort-foods” chronic intake has different behavioral and neurobiological effects in male rats exposed or not to early-life stress. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 11, n. 1, p. 18–24, fev. 2020.

CYPESS, A. M. Reassessing Human Adipose Tissue. **The New England journal of medicine**, v. 386, n. 8, p. 768–779, 24 fev. 2022.

DAUMIT, G. L. et al. Prevalence and correlates of obesity in a community sample of individuals with severe and persistent mental illness. **The Journal of nervous and mental disease**, v. 191, n. 12, p. 799–805, dez. 2003.

DE FRAGA, L. S. et al. “A picture is worth a thousand words”: The use of microscopy for imaging neuroinflammation. **Clinical and experimental immunology**, v. 206, n. 3, p. 325–345, dez. 2021.

DE MELLO, A. H. et al. n-3 PUFA and obesity: from peripheral tissues to the central nervous system. **The British journal of nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1312–1323, jun. 2018.

DE PAULA, G. C. et al. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood-Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. **Frontiers in neuroscience**, v. 15, p. 734158, 4 nov. 2021.

EDWARDS, L. M.; MURRAY, A. J.; HOLLOWAY, C. J. Short-term consumption of a high-fat diet impairs whole-body efficiency and cognitive function in sedentary men. **The FASEB**, 2011.

FARR, O. M.; LI, C.-S. R.; MANTZOROS, C. S. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 5, p. 699–713, 1 maio 2016.

FERNANDES, M. F. et al. Anxiety-like behavior in female mice is modulated by STAT3 signaling in midbrain dopamine neurons. **Brain, behavior, and immunity**, v. 95, p. 391–400, jul. 2021.

FULTON, S. et al. The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 33, n. 1, p. 18–35, jan. 2022.

GALEA, I. The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 11, p. 2489–2501, 30 set. 2021.

GIUDETTI, A. M. et al. Brief daily access to cafeteria-style diet impairs hepatic metabolism even in the absence of excessive body weight gain in rats. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 7, p. 9358–9371, jul. 2020.

GOGOLEVA, V. S.; DRUTSKAYA, M. S.; ATRETKHANY, K. S.-N. The Role of Microglia in the Homeostasis of the Central Nervous System and Neuroinflammation. **Molecular biology**, v. 53, n. 5, p. 696–703, 1 set. 2019.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 17034, 15 jun. 2017.

GREENE, C.; HANLEY, N.; CAMPBELL, M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. **Fluids and barriers of the CNS**, v. 16, n. 1, p. 3, 29 jan. 2019.

GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends in neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237–253, abr. 2017.

HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. N. Acute Inflammatory Response. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

HARGRAVE, S. L. et al. Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 130, n. 1, p. 123–135, fev. 2016.

KANOSKI, S. E. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 21, n. 1, p. 207–219, 2010.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine**, v. 1, n. 1, 18 nov. 2016.

KHAZEN, T. et al. Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 12270, 22 ago. 2019.

KLEINRIDDERS, A. et al. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. 3463–3468, 17 mar. 2015.

KWON, H. S.; KOH, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 42, 26 nov. 2020.

LALANZA, J. F.; SNOEREN, E. M. S. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 122, p. 92–119, mar. 2021.

LANCASTER, G. I. et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. **Cell metabolism**, v. 27, n. 5, p. 1096- 1110.e5, 1 maio 2018.

LEE, C. H. et al. Cellular source of hypothalamic macrophage accumulation in diet-induced obesity. **Journal of neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 221, 14 nov. 2019.

LEITE, F.; RIBEIRO, L. Dopaminergic Pathways in Obesity-Associated Inflammation. **Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 93–113, mar. 2020.

LIU, C.-Y. et al. Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 193, 10 jul. 2018.

LIU, J.; GUO, M.; LU, X.-Y. Leptin/LepRb in the Ventral Tegmental Area Mediates Anxiety-Related Behaviors. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum** , v. 19, n. 2, 5 out. 2015.

LOCHHEAD, J. J. et al. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 914, 6 ago. 2020.

LOWE, C. J.; REICHELT, A. C.; HALL, P. A. The Prefrontal Cortex and Obesity: A Health Neuroscience Perspective. **Trends in cognitive sciences**, v. 23, n. 4, p. 349–361, abr. 2019.

LUPPINO, F. S. et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Archives of general psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 220–229, mar. 2010.

MANSUR, R. B.; BRIETZKE, E.; MCINTYRE, R. S. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 52, p. 89–104, maio 2015.

MARQUES, M. L. DA C. G. **Estudo imunohistoquímico da expressão da micróglia nos tumores gliais**. [s.l: s.n.].

MARTIN-JIMÉNEZ, C. A. et al. Astrocytes and endoplasmic reticulum stress: A bridge between obesity and neurodegenerative diseases. **Progress in neurobiology**, v. 158, p. 45–68, 1 nov. 2017.

MESSING, A.; BRENNER, M. GFAP at 50. **ASN neuro**, v. 12, p. 1759091420949680, jan. 2020.

MICHA, R.; ROGERS, P. J.; NELSON, M. Glycaemic index and glycaemic load of breakfast predict cognitive function and mood in school children: a randomised

controlled trial. **The British journal of nutrition**, v. 106, n. 10, p. 1552–1561, nov. 2011.

MURPHY, M.; MERCER, J. G. Diet-regulated anxiety. **International journal of endocrinology**, v. 2013, p. 701967, 20 ago. 2013.

NETO, J. et al. DHA/EPA supplementation decreases anxiety-like behaviour, but it does not ameliorate metabolic profile in obese male rats. **The British journal of nutrition**, p. 1–11, 4 out. 2021.

NUMMENMAA, L. et al. Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31089, 3 fev. 2012.

O'BRIEN, P. D. et al. Neurological consequences of obesity. **Lancet neurology**, v. 16, n. 6, p. 465–477, jun. 2017.

OLIVEIRA, A. Estudo das respostas dos astrócitos hipotalâmicos ao tratamento in vitro com ácidos graxos saturados. Dissertação (Mestrado em). **Biologia Celular e Estrutural)**, 2015.

O'ROURKE, R. W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for obesity and related diseases: official journal of the American Society for Bariatric Surgery**, v. 14, n. 11, p. 1755–1763, nov. 2018.

Pesquisa do IBGE mostra aumento da obesidade entre adultos. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/10/pesquisa-do-ibge-mostra-aumento-da-obesidade-entre-adultos>. Acesso em: 4 maio. 2022.

PROCACCINI, C. et al. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 9, p. 1376–1390, set. 2016.

RAN, S. et al. TLR4-induced inflammation is a key promoter of tumor growth, vascularization, and metastasis. **Translational studies on inflammation**, p. 133, 2020.

REFOLO, V.; STEFANOVA, N. Neuroinflammation and Glial Phenotypic Changes in Alpha-Synucleinopathies. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 263, 13 jun. 2019.

REICHELT, A. C. et al. Impact of adolescent sucrose access on cognitive control, recognition memory, and parvalbumin immunoreactivity. **Learning & memory** , v. 22, n. 4, p. 215–224, abr. 2015.

ROBB, J. L. et al. Immunometabolic changes in Glia--A potential role in the pathophysiology of obesity and diabetes. **Neuroscience**, v. 447, p. 167–181, 2020.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 30 mar. 2018.

SARWER, D. B.; POLONSKY, H. M. The Psychosocial Burden of Obesity. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 45, n. 3, p. 677–688, set. 2016.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 96, p. e52434, 6 fev. 2015.

SHOJI, H. et al. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 85, 1 mar. 2014.

STEPHENSON, J. et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 204–219, jun. 2018.

SURETTE, M. E. The science behind dietary omega-3 fatty acids. **journal de l'Association medicale canadienne [Canadian Medical Association journal]**, v. 178, n. 2, p. 177–180, 15 jan. 2008.

THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 1, p. 153–162, jan. 2012.

THALER, J. P.; SCHWARTZ, M. W. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4109–4115, set. 2010.

TOUPS, M. S. P. et al. Relationship between obesity and depression: characteristics and treatment outcomes with antidepressant medication. **Psychosomatic medicine**, v. 75, n. 9, p. 863–872, nov. 2013.

WANG, J. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance cerebral angiogenesis and provide long-term protection after stroke. **Neurobiology of disease**, v. 68, p. 91–103, ago. 2014.

WANG, Z. et al. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-κB signalling. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 2, p. 229–241, jan. 2012.

WANG, Z. et al. Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. **Neuroscience**, v. 424, p. 24–33, 1 jan. 2020.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 427–427, 1 jul. 2008.

ZATTERALE, F. et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 1607, 2019.

ZHANG, M. et al. Omega-3 fatty acids protect the brain against ischemic injury by activating Nrf2 and upregulating heme oxygenase 1. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 5, p. 1903–1915, 29 jan. 2014.

4. Artigo Científico

Effects of omega-3 supplementation on anxiety-like behaviors and neuroinflammation in Wistar rats following cafeteria diet-induced obesity

(*Nutritional Neuroscience*)

Effects of omega-3 supplementation on anxiety-like behaviors and neuroinflammation in Wistar rats following cafeteria diet-induced obesity

Lucía Paola Facciola González[a*], Fernanda da Silva Rodrigues[b*], Jeferson Jantsch[b], Gabriel de Farias Fraga[d], Samia Squizani[b], Luis Felipe dos Santos Castro[d], Lídia Luz Correia[d], João Pereira Neto[b], Márcia Giovenardi[a,b], Marilene Porawski[b,c], Renata Padilha Guedes[a,b]

[a] *Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;*

[b] *Graduate Program in Biosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;*

[c] *Graduate Program in Medicine: Hepatology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;*

[d] *Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;*

* LPFG and FSR contributed equally to this work.

Corresponding author: Renata Padilha Guedes

Address: Rua Sarmento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone number: (+55) 51 33038751

Electronic mail address: renata.guedes@ufcspa.edu.br

Author contributions: RPG and MP supervised the study; LPFG, FSR, JJ, GFF, SS, LFSC, LLC and JPN carried out the experiments; RPG, LPFG, FSR and JJ conducted the data analysis; RPG, MG and MP interpreted the findings; LPFG, FSR and JJ wrote the manuscript.

Effects of omega-3 supplementation on anxiety-like behaviors and neuroinflammation in Wistar rats following cafeteria diet-induced obesity

Omega-3 (n3) fatty acids have been studied as a therapeutic option to alleviate the harmful effects of obesity. However, its role in obesity-related behavioral changes is still controversial. To evaluate the effects of n3 on behavior and neuroinflammation in obese animals, male Wistar rats were divided into four groups: control diet (CT), CT+n3, cafeteria diet (CAF), and CAF+n3. Diet was administered for 13 weeks, and n3 was supplemented during the last 5 weeks. Metabolic and biochemical parameters were evaluated, as well as anxiety-like behaviors. Immunoblots were conducted in the animals' cerebral cortex and hippocampus to assess changes in neuroinflammatory targets. CAF-fed animals showed higher weight gain, visceral adiposity, fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, and insulin levels, and n3 improved the lipid profile and restored insulin sensitivity. CAF-fed rats showed anxiety-like behaviors in the open field and light-dark box tasks but not in the contextual aversive conditioning. Omega-3 did not exert any effect on these behaviors. Regarding neuroinflammation, diet and supplementation acted in a region-specific manner. In the hippocampus, CAF reduced claudin-5 expression with no effect of n3, indicating a brain-blood barrier disruption following CAF. Furthermore, in the hippocampus, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and toll-like receptor 4 (TLR-4) were reduced in treated obese animals. However, n3 could not reverse the TLR-4 expression increase in the cerebral cortex. Although n3 may protect against some neuroinflammatory manifestations in the hippocampus, it does not seem sufficient to reverse the increase in anxiolytic manifestations caused by CAF.

Keywords: open field, light-dark box, contextual aversive conditioning, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), GFAP, TLR-4

Introduction

The inflammatory state, a hallmark of obesity, is hypothesized as one of the main etiological factors that lead to neurological disorders since the exacerbated pro-inflammatory state also occurs in the central nervous system [1]. In addition, people with obesity may also experience low self-esteem, depression, and social isolation. Although the brain has a certain immunological privilege, peripheral inflammation can disrupt the blood-brain barrier's integrity and shift both microglia (resident immune cells) and astrocytes (essential for proper neural functioning) to a pro-inflammatory state [2].

Furthermore, the activation of the dopaminergic system caused by the excessive consumption of palatable and energy-dense foods can lead to a profound state of hypo-sensitivity to the reward, similar to drug abuse, which can also lead to changes in the gabaergic system and promote the development of anxiety [3]. Despite fear and anxiety being part of an evolutionary survival mechanism and forming the first line of defense for dangerous situations, disorders in this system characterize a disabling condition, considered the most prevalent psychiatric disorder worldwide [4].

The cafeteria diet (CAF) constitutes a model of diet to induce obesity in rodents by using human foods like cookies, sausages, and soft drinks. These foods have high sugar, salt and processed fat content, increasing their palatability and determining food preference [5]. The consumption of ultra-processed foods induces persistent hyperphagia followed by an increase in energy intake, which accelerates body weight gain and provides a translational model for human obesity [6].

Omega-3 (n3) polyunsaturated fatty acids are essential components for the organism since it is not synthesized endogenously. This family is mainly made up of alpha-linoleic (C18: 3n-3) (ALA), eicosapentaenoic (C20: 5n-3) (EPA), and docosahexaenoic (C22: 6n-3) (DHA) acids. Its adequate consumption was already related to improved cardiovascular outcomes [7], improvement of the plasma lipid profile [8] and reduced inflammation [9]. Omega-3 exerts anti-inflammatory effects by inhibiting NFkB, a transcription factor related to inflammatory gene expression [9]. In the brain, the consumption of unsaturated fatty acids benefits spatial learning and memory and reduces the negative consequences of physiological stress and depressive symptoms on cognitive skills [10]. Thus, n3 fatty acids are positively related to anti-inflammatory and neuroprotective responses.

It was already shown that n3 improves metabolic profile in obese subjects [11] and its anxiolytic effect was also described in previous studies [10]. However, animal studies

commonly use high-fat diet models, which do not translate to human "junk food" consumption. Therefore, we investigated whether CAF-induced obesity interferes with metabolic, neuroinflammation, and anxiety-like behaviors in Wistar rats. Then, we also studied if n3 supplementation was able to mitigate the harmful effects of CAF on these parameters.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats were obtained from the animal facility of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) and housed two per cage in a controlled environment (12-hour light/dark cycle and temperature of 22° ± 2ºC). At three months of age rodents were divided into four groups (n=10/group): CT (control, standard chow), CT+n3 (standard chow + omega-3 supplementation), CAF (cafeteria diet), and CAF+n3 (cafeteria diet + omega-3 supplementation). All experimental procedures were performed following the Institutional Animal Care and Use Committee of UFCSPA. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The study was approved under protocol number 570/18.

Diet

Standard (CT) or cafeteria (CAF) diets were administered for 13 weeks. CAF consisted of three menus per week containing bacon mortadella (Perdigão®), strawberry wafers (Isabela®), chocolate cookies (Isabela®), pizza-flavored crackers (Parati®), white chocolate (Harald®), sausage (Alibem®), and orange-flavored soda (Sukita®) offered concomitantly with *ad libitum* standard chow and water. CAF provides an energy content of 4.4 Kcal/g (48% carbohydrates, 10% proteins, and 44% lipids). The standard chow diet (Nuvilab CR-1, Nuvital®) contained 3.4 Kcal/g (63% carbohydrates, 26% proteins, 11% lipids). Animals were weighed weekly to determine weight gain. Diet consumption was measured by weighing the leftovers of the food supplied minus the quantity offered and multiplied by the respective caloric value of each food, according to the nutritional information provided by the manufacturers.

Omega-3 Supplementation

Omega-3 (n3) was administered by oral gavage in the CT+n3 and CAF+n3 groups, 5 days a week, for 5 weeks from the 9th week of diet administration. The n3 used was a high concentration of EPA (10%) and DHA (50%) in dose 500 mg/kg/day.

Behavioral Tasks

Open Field (OF)

Animals were subjected to the open field paradigm in the last week of the experiment (week 13). The open field apparatus was a wood chamber (100 x 100 x 40cm) divided into 20 equal-sized quadrants, in which the animals were free to explore for 5 minutes. The locomotor activity was evaluated as the number of lines crossed. The amount of time animals spent in the central quadrants of the apparatus was scored and used as indicative of less anxiety-like behavior [12].

Light-Dark Box (LDB)

Animals were submitted to the LDB in the last week of the experiment (13th week). In this apparatus, animals were able to freely explore for 5 minutes an environment composed of a light compartment (100 x 67 x 40cm) and a dark compartment (100 x 34 x 40cm) (respectively 2/3 and 1/3 of the total space), divided by a door. The time spent in the illuminated compartment was counted and used to indicate less anxiety-like behavior. Results are expressed as a percentage of the total task time [13].

Contextual Aversive Conditioning (CAC)

Animals were submitted to the CAC paradigm in the last week of the experiment (13th week). The apparatus was an acrylic chamber with a floor of parallel stainless-steel grid bars connected to a device to deliver the foot shocks (40 × 25 × 30 cm) (Insight Ltd. Ribeirão Preto, SP - Brazil).

On the first day (training), animals were placed into the conditioning chamber for 2 min. Then, three electrical foot shocks (0.5 mA, 2 s) were delivered with a 30 s interval between them. Animals were removed from the conditioning chamber 30 s after the last foot shock and placed back in their home cages. 24 h later, animals were placed in the same conditioning chamber for a 3 min memory retention test without foot shocks. Freezing time was measured as an aversive conditioned response during the first 120 s of the training session and throughout the entire test session [14].

Tissue and blood samples

Visceral fat and blood were collected directly from the animals' carcasses after euthanasia. Visceral fat was weighed and plasma was separated from whole blood by centrifugation and stored at -80 ºC. The animals' brains were removed and the hippocampus and cerebral cortex were dissected and quickly frozen in liquid nitrogen for.

Plasmatic dosages

Plasma levels of glucose, total cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic colorimetric kits following the manufacturer's instructions (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Insulin was determined by the Rat Ins1 Insulin ELISA Kit (Sigma-Aldrich, RAB0904) following the manufacturer's instructions. We also calculated HOMA-IR (Homeostatic Model for Insulin Resistance) = [glucose (nmol/ L) * insulin (µU/mL)/22.5].

Western Blotting

For the analysis of protein expression, the cerebral cortex and hippocampus were homogenized in a lysis buffer. Total protein content was quantified and then separated by SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate). Separated proteins were transferred from the gel to nitrocellulose membranes using semi-dry equipment (Biorad), at 110V for 1 hour. Membranes were incubated with 8% powdered milk in tris saline buffer containing 0.1% tween 20 (TTBS) for 90 min, to block nonspecific binding. The membranes were incubated overnight (at 4ºC) with the primary antibodies anti-CLN-5 (1:1000, Cat# ABT45, RRID:AB_11205041; Millipore), anti-GFAP (1:1000, Cat# MAB360, RRID:AB_11212597; Sigma), anti-TLR-4 (1:200, Cat# sc-293072, RRID:AB_10611320; Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin antibody (Cat# sc-47778 horseradish peroxidase, RRID:AB_2714189; Santa Cruz Biotechnology). Membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2 hours at room temperature. All incubations were maintained under constant agitation and between each incubation the membranes were washed with TTBS. The chemiluminescence reaction was developed using

electrochemiluminescence solution (Bio-Rad Laboratories) and detected through Chemi-Doc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM. Statistical differences were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. The two factors analyzed were the type of diet (CT or CAF) and supplementation (n3 or water). The only exception was the analysis of weight gain per week, in this case, we used repeated-measures ANOVA. Outliers were detected and removed using the ROUT test. Statistical significance was set when $p<0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism 9 software.

Results

Weight gain and visceral adiposity

The consumption of ultra-processed foods triggered weight gain (diet effect $F[1,36]=46.74$, $p<0.0001$, Fig. 1A) from the seventh week onwards (Fig. 1B), with no effect of n3 supplementation. However, regarding visceral adiposity, two-way ANOVA showed an interaction between diet and supplementation ($F[1,34] = 5.659$, $p=0.0231$; Fig 1C). CAF caused an increase in visceral adiposity (diet effect $F[1,34]=46.26$ $p<0.0001$), but n3 was able to ameliorate this effect (n3 effect $F[1,34]=5.023$ $p=0.0317$).

[Figure 1 near here]

Plasma biochemical markers

To evaluate glucose homeostasis, we measured plasma glucose and insulin and calculated the HOMA index. Fasting glucose was increased in CAF-fed rats (diet effect; $F [1,30] = 24.55$, $p<0.0001$) with no effect of n3 supplementation (Fig. 2A). Plasma insulin (Fig. 2B) showed an interaction between diet and supplementation ($F[1,34] = 7.311$, $p=0.0106$), and also a diet ($F[1,34]=11.91$, $p=0.0015$) and a n3 supplementation effects ($F[1,34]=10.13$, $p=0.031$). Post-hoc analysis also evidenced reduced insulin levels in the CAF+n3 group compared to CAF-fed animals ($p=0.0004$). HOMA-index (Fig. 3C) further demonstrated that CAF consumption triggered insulin resistance (diet effect; $F [1,33] = 14.58$, $p=0.0006$), and n3 supplementation exerted a protective role (n3 effect: $F[1,33]=7.847$, $p=0.0084$; interaction: $F[1,33] = 6.666$, $p=0.0145$). Like insulin levels, HOMA-IR was also significantly decreased in CAF+n3 compared to CAF group ($p=0.0010$). In sum, n3 ameliorated glucose homeostasis disturbance in obese rats.

[Figure 2 near here]

Total cholesterol and triglycerides were also measured. We found an interaction between diet and supplementation ($F[1,31]=4.175$, $p=0.0496$) as well as an effect of n3 (n3 effect: $F[1,31]=29.32$, $p<0.0001$) in total cholesterol (Fig. 3A). The CAF group had higher levels of total cholesterol compared to CAF+n3 ($p<0.0001$). Regarding triglycerides, there was an effect of diet (diet $F[1,32]=5.830$, $p=0.0216$), supplementation ($F[1, 32]=7.260$, $p=0.0111$) and interaction between these two factors (interaction $F[1,32]=5.303$, $p=0.0279$; Fig. 3B). Multiple comparisons also showed that CAF animals had increased levels of triglycerides compared CAF+n3 ($p=0.0023$) group, which demonstrated that n3 supplementation was efficient in reducing plasma triglycerides in obese rats.

[Figure 3 near here]

Anxiety-like behaviors

In the open field paradigm, CAF-fed animals showed a lower permanence in the central quadrants when compared to CT animals (diet effect: F[1,33]=9.537, p=0.0041), indicating anxiety-like behavior in obese rats. Supplementation with n3 did not exert any effect on this behavior (Fig. 4A). Locomotor deficits could be excluded since there were no differences in the number of lines crossed (Fig. 4B).

In the light-dark box test, CAF-fed rats spent less time in the light compartment of the box when compared to CT groups (diet effect: F[1,34]=6.8, p=0.0134), which is also considered an anxiety-like behavior. Again, n3 supplementation did not affect this behavior (Fig. 4C).

In the contextual aversive conditioning, we found equal immobility time (freezing) among groups after conditioning, indicating that neither diet nor supplementation interferes with conditioned behavioral

[Figure 4 near here]

Neuroinflammatory markers

Western blot was used to quantify the expression of neuroinflammatory targets in both hippocampus and cerebral cortex. Claudin-5, a tight junction protein, was reduced in the hippocampus of obese rats (diet effect F[1,18]=6.55, p=0.019), which indicates a blood-brain barrier disturbance caused by CAF with no effect of n3 supplementation (Fig. 5A). We also evaluated GFAP, a component of astrocyte cytoskeleton to further analyze neuroinflammatory responses in the hippocampus after our diet protocol (Fig. 5B). We found a significant supplementation effect (n3 F[1,17]=9.65, p=0.0064) showing that n3 is able to decrease GFAP expression. The CAF+n3 group also had lower GFAP expression compared to CAF-fed animals (p = 0.0294).

The innate immune receptor involved in inflammatory responses TLR-4 was also analyzed (Fig. 5C). We found that both diet (F[1,14]=14.46, p=0.019) and supplementation (F[1,14]=6.45, p=0.023) affected its expression. Whilst the CAF group had higher expression of TLR-4 compared to CAF+n3 (p = 0,0319).

[Figure 5 near here]

When analyzing the cerebral cortex, we did not find statistically significant differences in either claudin-5 (Fig. 6A) or GFAP (Fig. 6C) expression. However, TLR-4 expression was also increased following the CAF diet (diet effect F[1.18]=4.49, p=0.048; Fig. 6B). Although Bonferroni post-hoc could not find differences among the groups, our obese model is sufficient to increase levels of this neuroinflammation marker in the cerebral cortex. Therefore, CAF affected the cerebral cortex and hippocampus in a region-specific manner, which was also seen regarding n3 supplementation.

[Figure 6 near here]

Discussion

The present study showed that the CAF effectively promotes hyperphagia, increases energy intake and visceral adiposity, and accelerates weight gain, generating obesity in experimental animals after seven weeks of administration. Therefore, CAF provides a reliable model of the so-called Western diet by exposing the rats to highly palatable foods high in fat and carbohydrates [15]. Furthermore, several studies demonstrate that CAF produces an even more prominent obesity phenotype than purified high-fat or high-fat-high-sugar diets [15,16].

Regarding plasma biochemical analyses, CAF increased blood glucose, insulin, HOMA-index, total cholesterol, and triglycerides, corroborating with most studies using this obesity model [2,10,15]. Interestingly, although n3 supplementation did not improve blood glucose, it was able to revert the metabolic alterations regarding insulin, HOMA-index, and the lipidic profile. Previous studies have already stated a lack of response after n3 supplementation regarding fasting or postprandial glucose in severe obesity states and type 2 diabetes mellitus [17]. By HOMA index calculation, it is also possible to observe a protective effect of n3 supplementation. This finding agrees with a study using a high-fat with fish oil supplementation for 8 weeks [18]. On the other hand, body weight did not change with n3, but promising results pointed out a visceral adiposity decrease after the supplementation, which was also shown in humans [19]. The beneficial effects of n3 on dyslipidemia have been well demonstrated in the literature. It has been shown that EPA and DHA may exert their anti-lipidemic functions by promoting intracellular catabolism of apolipoprotein B-100, stimulating plasma triglyceride clearance via lipoprotein lipase (LPL), attenuating postprandial lipemia [8,20]. Thus, n3 supplementation exerts a beneficial role in diminishing metabolic dysfunctions in obese adult male rats.

Thereby, the main goal of the present study was to evaluate whether the obesogenic effects of CAF translate into anxiety-like behavioral changes and neuroinflammatory markers. Here, we showed that CAF effectively promotes anxiety-like behaviors in male rats, expressed by the lower permanence in the central quadrants of the OF and the light compartment in the LDB. The innate fear behavior was verified by evaluating the locomotion into the central zone of the open field [21,22]. Moreover, the number of crossed lines between groups in the OF did not change, indicating that the diet did not alter locomotor and exploratory activities and any findings related to anxiety were unrelated to impaired mobility.

Our findings agree with previous reports relating obesity with anxiety showing an anxiogenic effect of highly palatable and carbohydrate-enriched diets in rodents and increased anxiety in hyperglycemic states in humans as well. It is worth mentioning that these alterations remain even after discontinuation of the hyperenergetic diet and following several months of subsequent control diet [23].

On the other hand, supplementation with n3 did not affect the behavioral impairments caused by CAF in OF and LDB. Literature diverges on this lack of effect. While a few studies report anxiolytic effects of n3 supplementation, even associated with obesogenic diets such as high-fat diets [24,25], another endorses that there is not enough qualified evidence to support any specific anxiolytic and/or anti-depressant effects of n3 [26]. However, evidence of the neurological effects of n3 considering the specific physiological effects of CAF are scarce. Therefore, we believe that CAF-induced obesity promotes a significant neurological impact translated into anxiety-like behaviors. The dosage or the duration of n3 supplementation was insufficient to revert the behavioral alterations.

On the other hand, our research group has recently demonstrated a significant increase in anxiety-like behaviors after a similar protocol of CAF but using the elevated plus-maze test, which considers the natural aversion of rodents to elevated and open spaces. At that time, n3 supplementation was able to reverse anxiety-like behavior in obese rats [10], raising the hypothesis that this discrepancy in the effect observed in the different behavioral tests may be related to the task itself. Previous studies indicate that tests that depend on unconditioned responses assess different behavioral aspects, that emotional reactivity is multidimensional, and may present intrinsic variations related to the parameters evaluated in each task [27,28].

Also, in the CAC, CAF-fed animals showed the same percentage of freezing as CT group, indicating that all groups consolidated the aversive memory properly. However, neither obesity caused by CAF nor supplementation with n3 seem to affect the expression of this memory through conditioned responses. CAC is one of the main models of post-traumatic stress disorder. A traumatic event has been shown to lead to the development of anxiety and depression-like deficits and therefore can be used to measure these behaviors. [29,30]. However, the type of anxiety assessed by CAC may differ from the one assessed by the OF or LDB once the first is actively provoked and the last two are innate in the animal's behavior. Thus, the lack of effects observed in this task does not go against the effects seen in the previous tasks but raises the hypothesis that obesity, specifically due to a CAF, may not worsen anxiety directly induced by aversive conditioning.

Although the effects of omega-3 in the treatment of obesity are described regarding the metabolic alterations of obesity, little is known about its effects concerning central nervous system dysfunction following obesity. Obesogenic diets prime neuroinflammation and alter the blood-brain barrier (BBB) integrity, which might lead to behavior abnormalities and even favors the development of neurodegenerative diseases [31].

In physiological conditions, the entry of substances and cells into the CNS is selectively controlled by the BBB, which guarantees a certain immunological privilege compared to peripheral organs. Metabolic diseases such as obesity and diabetes may compromise BBB integrity, exposing the brain to insults that can trigger neuroinflammatory responses and even behavior abnormalities [32,33]. In the present study, to test whether the obesogenic diet or the supplementation could disrupt BBB integrity, we quantified the levels of claudin-5, a tight junction protein, in the cerebral cortex and hippocampus. These regions were chosen since they are affected by obesity which may be translated into behavioral consequences, such as anxiety-like manifestations [31].

Our findings suggest that CAF impacts barrier integrity in a region-dependent manner since reduced expression of claudin-5 was found in the hippocampus but not in the cerebral cortex. The reduced levels of claudin-5 suggest a BBB leakage [34] which has already been associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and amyotrophic lateral sclerosis [35]. In mice models of diabetes, hyperglycemia was also related to damage to the BBB, triggering cognitive deficits in the animals [36]. In another study, high-fat diet (HFD) consumption for 3 days caused a BBB disruption, indicating that this damage may be directly related to the increased energy intake [37]. Our findings suggest that hyperglycemia and the overconsumption of ultra-processed foods could be detrimental to BBB integrity, especially in the hippocampus. We have already demonstrated that the hippocampus of CAF-fed animals is more sensitive to neuroinflammation than the cerebral cortex after our protocol of obesity [2].

However, here we did not find a n3 supplementation effect on claudin-5 expression. On the other hand, pup rats submitted to hypoxic-ischemic were protected from BBB alterations when the dams received n3 supplementation for two weeks during the gestational period [38]. Therefore, although we did not find a protective effect of n3 in the BBB integrity maintenance, future research using different doses and regimens should be encouraged. It is worth mentioning that the lack of n3 action in this parameter could have contributed to the lack of a behavioral effect in the present study.

The use of fish oil to mitigate inflammation is a topic of great research interest. It has been shown that dietary treatment with fish oil could mitigate hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation in piglets challenged with LPS due to TLR-4 signaling pathway blockade, which resulted in decreased pro-inflammatory cytokines [39]. In the present study, we showed that obesity-induced by the consumption of ultra-processed foods is capable of causing an increase in TLR-4 expression in the

cerebral cortex and hippocampus and that omega-3 supplementation can decrease its expression in the hippocampus. Therefore, fish oil consumption may be interesting to be encouraged as a neuroprotective strategy against obesity.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an important neuroinflammatory marker once it indicates astrocyte proliferation in response to immune stressors. GFAP is a reliable marker for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) cases, a condition highly related to nervous tissue inflammation [40]. Considering the involvement of astrocytes in the maintenance of BBB and neuroinflammation, we also evaluated GFAP expression in the two areas of interest. Although this parameter did not have a diet effect, we found region-specific responses after n3 supplementation. In the hippocampus, n3 supplementation decreased GFAP expression in CAF-fed rats, which demonstrates the role of n3 in reducing astrocyte proliferation after the obesogenic diet. However, this finding was not seen in the cerebral cortex. Several studies have evaluated GFAP expression after exposure to an HFD or CAF diet, and it is possible to observe an increase in its expression, indicating diet-associated astrogliosis [41,42]. The involvement of astrocytes in brain immune responses mediated by obesogenic diets was already shown in rats that received a purified HFD for 20 weeks, in which an increase in GFAP-positive cells was seen in the cerebral cortex. In this study, the n3 supplementation from the 16th week onwards reduced GFAP+ cells, indicating a protective effect of n3 to reverse neuroinflammatory responses after the establishment of obesity [43]. HFD may cause milder effects than the CAF diet [16]. In a study conducted by Mori and colleagues in 2017, mice given fish oil supplementation were subjected to the neurotoxic 6-hydroxypopamine (6-OHDA) injections, which causes neuroinflammation. It was observed that GFAP expression was increased in the group that received 6-OHDA in the medial striatum, and this effect was reversed by supplementation with n3 [44]. In sum, we can speculate that the effects caused by a chronic CAF may not be reversed with the dosage and the time of supplementation offered, and further investigations are encouraged.

Conclusion

We showed that n3 improved the lipidic profile and insulin sensitivity in CAF-fed animals to the levels of standard diet-fed rats. These findings highlight the importance of n3 in the treatment of obesity repercussions. Also, our findings reinforce that CAF is an efficient method to mimic the Western diet as a pre-clinical model of obesity, leading to both obesity phenotype and behavioral changes through multiple factors, which might involve local inflammation, as seen by the increase in neuroinflammatory markers such as TLR-4 and GFAP, and damages to the blood-brain barrier, as verified by the decrease in tight-junction proteins such as claudin-5. Even though n3 supplementation attenuated some of these deleterious effects in a brain region-specific manner, it did not produce any effects on anxiety-like behaviors. Based on that, and considering previous studies showing anxiolytic effects of n3, we presume that the duration and/or dose used might not be efficient enough to translate the positive neuroimmune effects into behavioral improvements when such harmful comorbidity is present. However, our study is preliminary and other investigations must be conducted to better understand the cognitive and physiological aspects of the Western diet or CAF-induced obesity.

Acknowledgements

We thank the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support.

Declaration of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare

References

[1] Hersey M, Woodruff JL, Maxwell N, et al. High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. *Brain Behav Immun*. 2021;96:63–72.

[2] de Oliveira S, Feijó GDS, Neto J, et al. Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats. *Obesity* . 2021;29:116–124.

[3] Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010;13:635–641.

[4] Stein DJ, Scott KM, de Jonge P, et al. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19:127–136.

[5] de Macedo IC, de Freitas JS, da Silva Torres IL. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Adv Pharmacol Sci*. 2016;2016:7238679.

[6] Castro H, Pomar CA, Picó C, et al. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int J Obes* . 2015;39:430–437.

[7] Khan SU, Lone AN, Khan MS, et al. Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2021;38:100997.

[8] Skulas-Ray AC, Wilson PWF, Harris WS, et al. Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;140:e673–e691.

[9] Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2015;1851:469–484.

[10] Neto J, Jantsch J, de Oliveira S, et al. DHA/EPA supplementation decreases anxiety-like behaviour, but it does not ameliorate metabolic profile in obese male rats. *Br J Nutr*. 2021;1–11.

[11] Chewcharat A, Chewcharat P, Rutirapong A, et al. The effects of omega-3 fatty acids on diabetic nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* 2020;15:e0228315.

[12] Michael L. Seibenhener MCW. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2015 [cited 2022 May 9]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354627/.

[13] Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2003 [cited 2022 May 9];463. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12600702/.

[14] Shoji H, Takao K, Hattori S, et al. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2014; Available from: http://dx.doi.org/10.3791/50871.

[15] Lalanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021;122:92–119.

[16] Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019;7:e6656.

[17] Buoite Stella A, Gortan Cappellari G, Barazzoni R, et al. Update on the Impact of Omega 3 Fatty Acids on Inflammation, Insulin Resistance and Sarcopenia: A Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19. Available from: http://dx.doi.org/10.3390/ijms19010218.

[18] Chacińska M, Zabielski P, Książek M, et al. The Impact of OMEGA-3 Fatty Acids Supplementation on Insulin Resistance and Content of Adipocytokines and Biologically Active Lipids in Adipose Tissue of High-Fat Diet Fed Rats. *Nutrients* [Internet]. 2019;11. Available from: http://dx.doi.org/10.3390/nu11040835.

[19] Sangouni AA, Orang Z, Mozaffari-Khosravi H. Effect of omega-3 supplementation on fatty liver and visceral adiposity indices in diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. Clin Nutr ESPEN. 2021;44:130–135.

[20] Itsiopoulos C, Marx W, Mayr HL, et al. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the management of type 2 diabetes mellitus: A narrative review. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2018;14:42–51.

[21] Madruga C, Xavier LL, Achaval M, et al. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav Brain Res.* 2006;166:241–246.

[22] Benetti F, Andrade de Araujo P, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Dev Psychobiol.* 2007;49:258–264.

[23] Warneke W, Klaus S, Fink H, et al. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:45–54.

[24] Larrieu T, Layé S. Food for Mood: Relevance of Nutritional Omega-3 Fatty Acids for Depression and Anxiety. *Front Physiol*. 2018;9:1047.

[25] Su K-P, Tseng P-T, Lin P-Y, et al. Association of Use of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids With Changes in Severity of Anxiety Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2018;1:e182327.

[26] Deane KHO, Jimoh OF, Biswas P, et al. Omega-3 and polyunsaturated fat for prevention of depression and anxiety symptoms: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Br J Psychiatry*. 2021;218:135–142.

[27] Ramos A, Pereira E, Martins GC, et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav Brain Res.* 2008;193:277–288.

[28] Vendruscolo LF, Takahashi RN, Brüske GR, et al. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacology* . 2003;170:287–293.

[29] Padurariu M, Antioch I, Balmus I, et al. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *Int J Vet Sci Med*. 2017;5:98–104.

[30] Solanki N, Alkadhi I, Atrooz F, et al. Grape powder prevents cognitive, behavioral, and biochemical impairments in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Nutr Res.* 2015;35:65–75.

[31] Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci*. 2017;40:237–253.

[32] Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS.* 2019;16:3.

[33] Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Front Neurosci*. 2018;12:930.

[34] de Fraga LS, Tassinari ID, Jantsch J, et al. "A picture is worth a thousand words": The use of microscopy for imaging neuroinflammation. *Clin Exp Immunol.* 2021;206:325–345.

[35] Xie B, Tao C, Li J, et al. Artificial Intelligence for Caregivers of Persons With Alzheimer's Disease and Related Dementias: *Systematic Literature Review* [Internet]. JMIR Medical Informatics. 2020. p. e18189. Available from: http://dx.doi.org/10.2196/18189.

[36] Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, et al. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol*. 2019;56:1883–1896.

[37] de Paula GC, Brunetta HS, Engel DF, et al. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood-Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. *Front Neurosci.* 2021;15:734158.

[38] Zhang W, Zhang H, Mu H, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids mitigate blood-brain barrier disruption after hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2016;91:37–46.

[39] Liu Y, Chen F, Li Q, et al. Fish oil alleviates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis associated with inhibition of TLR4 and NOD signaling pathways in weaned piglets after a lipopolysaccharide challenge. *J Nutr.* 2013;143:1799–1807.

[40] Kassubek R, Gorges M, Schocke M, et al. GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. *Neurosci Lett*. 2017;657:166–170.

[41] Lau JKY, Tian M, Shen Y, et al. Melanocortin receptor activation alleviates amyloid pathology and glial reactivity in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Sci Rep*. 2021;11:4359.

[42] Bondan EF, Cardoso CV, Martins M de FM, et al. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019;77:601–608.

[43] de Andrade AM, Fernandes M da C, de Fraga LS, et al. Omega-3 fatty acids revert high-fat diet-induced neuroinflammation but not recognition memory impairment in rats. *Metab Brain Dis.* 2017;32:1871–1881.

[44] Mori MA, Delattre AM, Carabelli B, et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr Neurosci.* 2018;21:341–351.

Figure legends:

Figure 1. Effects of the cafeteria diet (CAF) and omega-3 (n3) supplementation on body weight and visceral adiposity. CAF consumption increased weight gain with no n3 effect (A). The increased body weight in CAF and CAF+n3 groups started from the seventh week of experiment (B). Visceral fat was higher in the CAF groups than in CT groups, but n3 reduced visceral fat in CAF-fed group (C). The arrow in (B) indicates the beginning of n3 supplementation. CT, control group - standard diet. **p<0.01. n=9-10 animals per group.

Fig. 2. Effects of the cafeteria diet (CAF) and omega-3 (n3) supplementation on glucose homeostasis. CAF increased fasting glucose levels, with no effect of n3 (A). Increased plasma insulin levels were ameliorated after n3 supplementation in obese rats (B). HOMA-index demonstrated glucose homeostasis disturbance following a cafeteria diet and n3 supplementation exerted a protective role (C). CT, control group - standard diet. **p<0.01; ***p<0.001. n=9-10 animals per group.

Fig. 3 Total cholesterol (A) and triglycerides (B) levels were increased in the CAF group, but n3 supplementation decreased both. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. CT, control group - standard diet. n=7-10 animals per group.

Fig. 4. Effects of the cafeteria diet (CAF) and omega-3 (n3) supplementation in the open field test. CAF induced a lower permanence in central quadrants, with no effect of n3 supplementation (A) with no differences in locomotor activity (B). Effects of the cafeteria diet (CAF) and omega-3 (n3) supplementation in the light-dark box test. CAF induced a lower permanence in the light compartment, with no effect of n3 supplementation (C). Effects of the cafeteria diet (CAF) and omega-3 (n3) supplementation in the duration of freezing in the contextual aversive conditioning test. Neither CAF nor n3 affected freezing time after conditioning (D). CT, control group - standard diet. n=7-10 animals per group.

Fig. 5. Claudin-5 expression was reduced after the CAF diet in the hippocampus (A). The expression GFAP was affected by supplementation and the CAF+n3 group had lower expression compared to CAF-fed animals (B). The expression of the TLR-4 was affected by diet and supplementation, and the CAF+n3 group was protected from the increase found in CAF-fed animals (C). *p<0.05. CT, control group - standard diet; OD, optical density. n=4-6 animals per group.

Fig. 6 The expression of claudin-5 (A) and GFAP (C) was not affected by diet or supplementation in the cerebral cortex. On the other hand, TLR-4 expression (B) was increased following the CAF diet, but supplementation could not reverse it. CT, control group - standard diet; OD, optical density. n=4-6 animals per group.