

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO  
ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Aline Marcelino de Andrade

**Efeito de uma dieta hiperlipídica  
associada à administração de  
ômega-3 sobre marcadores de  
neuroinflamação e memória em  
ratos Wistar**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2016

**Aline Marcelino de Andrade**

**Efeito de uma dieta hiperlipídica  
associada à administração de  
ômega-3 sobre marcadores de  
neuroinflamação e memória em  
ratos Wistar**

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre  
como requisito para a obtenção do  
grau de Mestre

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Renata  
Padilha Guedes  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Marcia  
Giovenardi

**Porto Alegre  
2016**

#### Catálogo na Publicação

Marcelino de Andrade, Aline

Efeito de uma dieta hiperlipídica associada à administração de ômega-3 sobre marcadores de neuroinflamação e memória em ratos Wistar / Aline Marcelino de Andrade. -- 2017.

76 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Renata Padilha Guedes ;  
coorientador(a): Marcia Giovenardi.

1. ômega-3. 2. memória. 3. ratos wistar. 4. neuroinflamação. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que surgiram durante esses anos em minha vida.

Aos meus queridos pais e irmã pelo incondicional amor e apoio durante esse período, agradeço por terem caminhado ao meu lado durante essa jornada. Agradeço por todo o incentivo durante a minha vida para ir atrás dos meus sonhos e por me mostrarem que sempre podemos ir mais longe. Se hoje eu fui mais longe foi porque vocês me mostraram esse caminho, mostrando que a educação e o conhecimento são o nosso bem mais precioso. Obrigada por segurarem a minha mão nos dias difíceis nesse período. Essa conclusão de hoje só foi possível porque vocês caminharam ao meu lado.

Agradecimento ao meu noivo João, que foi um incentivadores para a realização do meu sonhado título de mestre. Agradeço por estar ao meu lado por mais de dez anos me auxiliando em tudo, acreditando que eu podia me superar mais a cada dia, obrigada pela paciência, pelo auxílio e por todo o amor dedicado a mim.

À Professora doutora Renata Guedes, que acreditou no meu potencial para a realização desse trabalho. Sempre disponível a auxiliar e a passar todo o conhecimento para a realização do trabalho. Obrigada a Professora Doutora Marcia minha co-orientadora por todo auxílio. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento profissional.

À minha grande amiga Giovana Baldissera por todo apoio e auxílio durante todo o processo do mestrado e até a finalização do mesmo, sem dúvidas foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho, a todos os alunos de iniciação científica, técnicos, colegas e professores por toda a colaboração. Obrigada de coração a todos os envolvidos, ninguém trabalha sozinho. Obrigada por me darem a oportunidade de terem vocês no meu caminho nessa jornada.

## RESUMO

A obesidade é considerada uma doença crônica e multifatorial, que está se tornando uma epidemia mundial e refletindo negativamente sobre a saúde da população. Além de estar associada a doenças cardiovasculares, pode levar a alterações metabólicas no sistema nervoso central, podendo ser um fator que predispõe a diversas doenças neurológicas. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela maior suscetibilidade dos indivíduos obesos à déficits cognitivos, por exemplo, não são bem conhecidos. O ômega-3 é um ácido graxo poliinsaturado essencial que desempenha um importante papel anti-inflamatório. Contudo, sua função neuroprotetora ainda é questionada. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a dieta hiperlipídica e o tratamento com ômega-3 interferem em parâmetros comportamentais relacionados à memória e marcadores de neuroinflamação dos animais. Quarenta ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: dieta padrão (DP); dieta padrão + ômega-3 (DP+O); dieta hiperlipídica (DH); dieta hiperlipídica + ômega-3 (DH+O). O período de dieta foi de 20 semanas. Após a 16ª semana de dieta, iniciou-se a suplementação com ômega-3. Ao final do período experimental, foram avaliados o ganho de peso, o peso de gordura visceral, a glicemia de jejum e os níveis plasmáticos de insulina. A memória dos animais foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos. Além disso, foi avaliada a imunorreatividade ao GFAP no hipocampo e no córtex cerebral dos animais estudados e a expressão gênica das citocinas fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) no córtex cerebral. A DH aumentou significativamente o peso corporal dos animais ( $p < 0,0001$ ) e o ômega-3 não modificou o ganho de peso total. Contudo, os animais tratados com ômega-3 apresentaram uma menor quantidade de gordura visceral ( $p = 0,0015$ ) e melhor sensibilidade à insulina ( $p = 0,0154$ ). No teste de reconhecimento de objetos, os animais alimentados com dieta hiperlipídica não apresentaram diferenças significativas no tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto conhecido (DH  $p = 0,2126$ , DH+O  $p = 0,6635$ ), demonstrando que a obesidade pode causar comprometimento da memória de longo prazo. Encontramos resultados significativos também no córtex cerebral do grupo DH, demonstrando que a

obesidade pode levar à ativação astrocitária ( $p=0,0007$ ). Encontramos um aumento significativo na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6 ( $p=0,0352$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,0016$ ) no grupo DH. Assim, a suplementação de ácidos graxos ômega-3 após DH foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, diminuir a adiposidade visceral e diminuir o perfil neuroinflamatório. Contudo, a suplementação com ômega-3 não foi suficiente para reverter o déficit de memória causado pela DH, embora tenha demonstrado um importante papel na diminuição da neuroinflamação. Assim, os ácidos graxos da família ômega-3 podem exercer um importante papel no sistema nervoso central, impedindo a progressão da neuroinflamação na obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade, ácido graxo ômega-3, dieta hiperlipídica, neuroinflamação, memória, teste de reconhecimento de objetos.

## **ABSTRACT**

Obesity is a chronic and multifactorial disease. Nowadays, it is becoming a global epidemic, which affect negatively population's health. Besides being associated with cardiovascular diseases, it can lead to metabolic alterations in the central nervous system, and may be a risk factor that predisposes to several neurological diseases. However, the underlying mechanisms of such relationship are not well known. Omega-3 is an essential polyunsaturated fatty acid that plays an important anti-inflammatory role, but its neuroprotective function is still questioned. In this context, the objective of this study was to evaluate if a high-fat diet and omega-3 supplementation may affect long-term memory and neuroinflammation markers in rats. Forty male Wistar rats were divided into four groups: standard diet (SD); standard diet + omega-3 (SD+O); high-fat diet (HFD); high-fat diet + omega-3 (HFD+O). Diet administration was performed for 20 weeks. Omega-3 supplementation started at the 16th week of diet. At the end of the experimental period, visceral fat weight, fasting plasma glucose and plasma insulin levels were analysed. The animals' memory was evaluated using the object recognition test. In addition, we evaluated GFAP immunoreactivity in the hippocampus and in the cerebral cortex of the animals. Gene expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in the cerebral cortex was also analysed. HFD significantly increased the body weight of the animals and omega-3 did not modify the total weight gain ( $p < 0.0001$ ). However, the animals treated with omega-3 had a lower amount of visceral fat ( $p = 0.0015$ ) and better insulin sensitivity ( $p = 0,0154$ ). In the object recognition test, animals fed a high-fat diet did not present significant differences in the time of exploration of the new object in relation to the old one (HFD  $p = 0.2126$ , HFD+O  $p = 0.6635$ ), demonstrating that obesity can cause long-term memory impairment. Omega-3 supplementation did not improve recognition memory. We found significant results in GFAP immunoreactivity in the cerebral cortex of the HFD group, demonstrating that obesity can lead to astrocytic activation ( $p = 0.0007$ ). We also found a significant increase in gene expression of proinflammatory cytokines IL-6 ( $p = 0.0352$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p = 0.0016$ ) in the HFD group. Thus, supplementation of omega-3 fatty acids after HFD was able to improve insulin sensitivity, decrease visceral

adiposity and decrease neuroinflammatory profile. Our results demonstrate an important metabolic role of omega-3 by improving insulin sensitivity and reducing visceral adiposity. However, omega-3 supplementation was not sufficient to reverse the memory deficit caused by HFD, although it has been shown to play an important role in reducing the neuroinflammatory profile. Therefore, omega-3 fatty acids may play an important role in the central nervous system, preventing the progression of neuroinflammation in obesity.

**Keywords:** Obesity, omega-3 fatty acids, high-fat diet, neuroinflammation, memory, object recognition test.

## SUMÁRIO

1.	Referencial Teórico .....	11
1.1	Obesidade e Inflamação .....	11
1.2	Neuroinflamação: aspectos gerais .....	14
1.3	Neuroinflamação e Prejuízos Cognitivos na Obesidade .....	18
1.4	Ômega-3 .....	21
2.	Objetivos .....	39
2.1	Objetivo geral .....	39
2.2	Objetivos específicos .....	39
3.	Justificativa .....	40
4.	ARTIGO CIENTÍFICO .....	41
5.	Conclusão .....	64
	Anexo 1. REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA METABOLIC BRAIN DISEASE .....	65
	Anexo 2. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AA: Ácido araquidônico

ALA: Ácido linolênico

AMPK: Proteína cinase ativada por AMP

COX: Cicloxigenase

DHA: Docosaexaenóico

EPA: Ácidos eicosapentaenóico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

IFN- $\alpha$ : Interferon-alfa

IFN-  $\beta$ : Interferon-beta

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-18: Interleucina 18

IL1- $\beta$ : Interleucina 1-beta

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de massa corporal

LA: Ácido linoléico

LC-PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

LPS: Lipopolissacarídeo

NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

NPY: Neuropeptídeo Y

OMS: Organização Mundial de Saúde

POMC: Pró-opiomelanocortina

PPARs: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PUFAs: ácidos graxos poliinsaturados

SNC: Sistema nervoso central

TGF- $\beta$ : fator de transformação de crescimento beta

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

UFAS: ácidos graxos insaturados

## 1. Referencial Teórico

### 1.1 Obesidade e Inflamação

A obesidade é considerada uma doença crônica, multifatorial que está se tornando uma epidemia mundial, o que reflete negativamente sobre a saúde da população (Popkin, 1998; Bahia *et al.*, 2012) sendo que sua associação com doenças cardiovasculares (Lotufo, 2000; Kenchaiah *et al.*, 2004; Aghamohammadzadeh e Heagerty, 2012), alguns tipos de câncer (Demark-Wahnefried *et al.*, 2012) e diabetes mellitus tipo 2 é bem conhecida (Wannamethee e Shaper, 1999). O diagnóstico de obesidade pode ser estabelecido com base no índice de massa corporal (IMC), que é calculado a partir do peso corporal (em kg) dividido pelo valor da altura (em m) do indivíduo ao quadrado. Um indivíduo é considerado obeso quando apresenta um IMC igual ou maior que 30 e valores entre 25,0 a 29,9 são classificados como sobrepeso. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014 mais de 1,9 bilhão de adultos no mundo estavam acima do peso (Who, 2015). No Brasil, nos últimos seis anos houve um aumento no número de pessoas com sobrepeso e obesidade, sendo que 52,5% da população apresenta sobrepeso e 17,9% são obesos (Vigitel, 2014).

O tecido adiposo humano é classificado em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB está localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral, ele armazena energia e participa da regulação do balanço energético. Já o TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. O TAB expressa e secreta substâncias ativas com ação local ou sistêmica chamadas de adipocinas, que estão envolvidas nos processos metabólicos, neuroendócrinos e imunológicos (Kershaw e Flier, 2004). As adipocinas atuam exercendo efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos. Além disso, o tecido adiposo é capaz de expressar receptores que lhe permitem responder a sinais aferentes provenientes de órgãos endócrinos e do sistema nervoso central (SNC) (Kershaw e Flier, 2004).

Praticamente todas as adipocinas tem sua secreção alterada quando o indivíduo apresenta obesidade, podendo estar relacionadas com a resistência à insulina e inflamação. Uma importante adipocina é a leptina, que atua em vários tecidos como fígado, sistema imune e também no SNC (Badman e Flier, 2007). No SNC, auxilia na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético (Ronti *et al.*, 2006). A ligação da leptina aos seus receptores hipotalâmicos, localizados principalmente no núcleo arqueado, estimula a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos nos neurônios positivos para pró-opiomelanocortina (POMC) e inibe a atividade dos neurônios positivos para o neuropeptídeo Y (NPY), que possui ação orexígena (Ahima *et al.*, 1996). É comum a ocorrência de hiperleptinemia na obesidade, o que também está associado com resistência à insulina. Dessa forma, os níveis de leptina podem corresponder a massa adiposa podendo ainda refletir mudanças do estado nutricional do indivíduo.

O excesso de gordura visceral, que corresponde ao tecido adiposo acumulado nas regiões perirrenal, perigonadal e peritoneal, é um fator de risco mais importante do que o excesso de peso corporal total de um indivíduo. Está bem demonstrado que o aumento da gordura visceral é um fator causal de síndrome metabólica (Després e Lemieux, 2006). O desenvolvimento do tecido adiposo visceral contribui com a secreção aumentada de mediadores pró-inflamatórios na obesidade, o que leva a um estado de metainflamação, termo empregado para designar a inflamação crônica de baixa intensidade gerada por células metabólicas (Gregor e Hotamisligil, 2011).

A inflamação causada pela obesidade é caracterizada pela secreção alterada de citocinas pró e anti-inflamatórias. As principais citocinas pró-inflamatórias relacionadas à obesidade são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 6 (IL-6), a interleucina 12 (IL-12) e a interleucina 18 (IL-18). As citocinas anti-inflamatórias incluem o interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 10 (IL-10) entre outras (Cavaillon, 2001). Na obesidade ocorre um desequilíbrio nos níveis dessas citocinas, com diminuição das anti-inflamatórias, que favorecem a sensibilidade à insulina, e aumento das pró-inflamatórias que estão relacionadas à resistência à insulina (Maury e Brichard, 2010).

O TNF- $\alpha$  foi a primeira citocina que foi demonstrada ter seus níveis aumentados em roedores obesos (Morin *et al.*, 1997). Após este achado, foi proposto que o TNF- $\alpha$  estaria relacionado com o desenvolvimento da resistência à insulina (Fain *et al.*, 2004). Esta citocina é um regulador local dentro do tecido adiposo, atuando tanto de forma autócrina quanto parácrina e influencia uma grande variedade de processos, incluindo a apoptose (Coppack, 2001). Sua expressão é maior no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo, e sua secreção ocorre principalmente por macrófagos (Maury *et al.*, 2009). O TNF- $\alpha$  possui um papel fundamental para a regulação da secreção de adipocinas na obesidade, ele pode estimular adipocinas pró-inflamatórias e também pode inibir adipocinas anti-inflamatórias (Maury *et al.*, 2009).

Outra citocina com efeito pró-inflamatório é a IL-6, que assim como o TNF- $\alpha$ , é produzida pelos macrófagos e também pelos adipócitos no TAB, principalmente no tecido adiposo visceral (Fantuzzi e Mazzone, 2007). Na obesidade e no estado de resistência à insulina, os níveis sanguíneos de IL-6 estão aumentados. Nos tecidos periféricos, essa citocina pode atuar diminuindo a expressão de receptores de insulina nas células alvo (Senn *et al.*, 2003). A IL-6 pode também atuar reduzindo a secreção de adiponectina, que é uma adipocina que possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e que melhora a sensibilidade à insulina (Kershaw e Flier, 2004; Maury e Brichard, 2010). Por outro lado, foi demonstrado que os níveis de IL-6 no líquido cefalorraquidiano de humanos são negativamente correlacionados com a quantidade de gordura corporal em indivíduos obesos ou com sobrepeso (Stenlöf *et al.*, 2003). Sendo assim, sugere-se que a IL-6 desempenha um papel importante no controle do peso corporal. A IL-6 geralmente é considerada um fator pró-inflamatório, e seus níveis plasmáticos aumentados se correlacionam com adiposidade e resistência à insulina. Porém, algumas evidências sugerem que a IL-6 também pode exercer um efeito benéfico melhorando a sensibilidade à insulina. O exercício físico promove a secreção de IL-6 a partir do músculo esquelético, aumentando em cerca de 100 vezes sua concentração plasmática, e isso parece estar associado com uma melhora na sensibilidade à insulina (Ostrowski *et al.*, 2000; Helge *et al.*, 2003). Dessa forma, as ações da IL-6 nos distúrbios metabólicos são incertas.

Uma citocina com propriedades anti-inflamatórias é a IL-10, que pode atuar reprimindo citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , produzidas por macrófagos e monócitos ativados, e pode ainda estimular a produção endógena de outras citocinas anti-inflamatórias (Zhang e An, 2007). Ropelle e colaboradores, demonstraram que a infusão intra-hipotalâmica de IL-10 pode exercer uma importante ação anti-inflamatória no SNC de ratos obesos. Esse efeito foi associado ao aumento da ação da leptina e da insulina, o que melhorou o controle do balanço energético e diminuiu a ingestão alimentar desses animais. Assim, a modulação do estado inflamatório parece exercer efeitos benéficos na obesidade (Ropelle *et al.*, 2010).

## 1.2 Neuroinflamação: aspectos gerais

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico que possui o objetivo de proteção ao organismo. A resposta inflamatória é conduzida pela interação de vários tipos de células e moléculas de sinalização, produzindo respostas locais e sistêmicas. Os leucócitos e as células endoteliais são as principais células envolvidas na resposta inflamatória. Contudo, além desse caráter protetor, uma resposta inflamatória excessiva pode causar ou contribuir para o surgimento de doenças (Morales *et al.*, 2014).

O termo neuroinflamação é empregado para descrever o conjunto de respostas imunitárias que ocorrem no SNC, as quais diferem da inflamação periférica. Essa diferença pode ser exemplificada pelas células envolvidas, pois no SNC a resposta inflamatória envolve principalmente astrócitos e microglia. A barreira hematoencefálica separa o SNC do sistema imune periférico, porém, na inflamação, a barreira torna-se permeável aos mediadores pró-inflamatórios derivados da periferia bem como aos linfócitos e outras células imunes periféricas. Além disso, as células endoteliais, que também são componentes da barreira hematoencefálica, são ativadas, aumentando a liberação desses mediadores que acabam alcançando o SNC (De Vries *et al.*, 1996; Dilger e Johnson, 2008). A resposta neuroinflamatória pode resultar em prejuízos na função sináptica e morte neuronal, o que culmina no desenvolvimento de várias doenças neurológicas.

A ativação das células gliais são um componente importante das respostas neuroinflamatórias na neurodegeneração. As células da microglia são os macrófagos residentes no SNC e além de realizarem fagocitose, também desempenham um papel importante na regeneração neural, reparação tecidual, remoção de neurônios apoptóticos e ainda podem atuar regulando a plasticidade sináptica durante o desenvolvimento (Wakselman *et al.*, 2008). A microglia está entre as primeiras células a serem ativadas em resposta a lesões do SNC. Diante de um estímulo nocivo, a microglia pode alterar a sua morfologia e exercer uma variedade de funções. Quando ativada, a microglia pode perder sua arborização e assumir um formato ameboide (Goldmann e Prinz, 2013). Sob condições patológicas, a microglia desempenha papéis que podem ser neurotóxicos ou neuroprotetores. Isso ocorre pois essas células gliais podem expressar reações funcionais específicas em resposta a sinais do microambiente, e podem apresentar dois estados funcionais de polarização (Jha *et al.*, 2016). Assim como os macrófagos periféricos, a microglia pode ser fenotipicamente polarizada e desenvolver um fenótipo clássico pró-inflamatório (M1) ou um fenótipo alternativo anti-inflamatório (M2) (Porta *et al.*, 2009; Cherry *et al.*, 2014). A microglia com fenótipo M1 é caracterizada por liberar mediadores pró-inflamatórios e radicais livres contribuindo com danos à função neurológica e assim, promovendo neurodegeneração. As principais citocinas liberadas neste caso são IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ . O fenótipo M2 melhora a capacidade de reparação e regeneração do encéfalo, aumentando a fagocitose, e amplificando a liberação de fatores de crescimento, o que contribui com a resolução da neuroinflamação, além de conferir proteção contra a desmielinização. No fenótipo M2 ocorre a liberação do fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), IL-4, IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (Jha *et al.*, 2016). Esses fenótipos adotados em resposta a uma lesão específica podem ser marcadores diagnósticos em doenças neuroinflamatórias sendo que a natureza do microambiente inflamado define os fenótipos globais ou estados funcionais da microglia (Ajmone-Cat *et al.*, 2013).

Os astrócitos desempenham uma grande diversidade de funções no SNC como o fornecimento de nutrientes aos neurônios, reciclagem de neurotransmissores, síntese de fatores de crescimento, manutenção da

homeostasia do tecido nervoso e também participam da resposta imune. Apesar de não serem consideradas células do sistema imune, os astrócitos também podem expressar quimiocinas e citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Choi *et al.*, 2014; Pekny e Pekna, 2014). Assim, como as células microgliais, os astrócitos podem alterar sua morfologia, retraíndo ou amplificando seus prolongamentos, e induzir mudanças que afetam a neurotransmissão (Theodosis *et al.*, 2008). Devido a capacidade dos astrócitos de liberar diversos fatores com ação pró e anti-inflamatória, e dessa forma, exercer efeitos neuroprotetores e efeitos neurotóxicos, alguns estudos tentaram definir os processos regulatórios da polarização fenotípica dos astrócitos (Tarassishin *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013). Os astrócitos parecem desempenhar um papel duplo de acordo com tal ativação fenotípica, semelhante ao que é descrito para a microglia, caracterizando os fenótipos M1 e M2 (Hanisch e Kettenmann, 2007; Martinez *et al.*, 2009). Essa polarização dos astrócitos pode ocasionar a liberação de citocinas pró ou anti-inflamatórias, com efeitos neurotóxicos ou neuroprotetores, respectivamente. Astrócitos com fenótipo do tipo M1 podem liberar citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . Por outro lado, os astrócitos com fenótipo M2 liberam mediadores anti-inflamatórios como IL-4 e IL-10 (Martinez *et al.*, 2009).

A proteína fibrilar glial ácida (GFAP) é um marcador de astrócitos já que é expressa principalmente neste tipo celular. A marcação de GFAP é amplamente utilizada para detecção de tumores de linhagem astrocitária (Liedtke *et al.*, 1996), sendo o marcador imuno-histoquímico mais utilizado para identificação de astrócitos (Bignami e Dahl, 1977; Catalani *et al.*, 2002). A GFAP é uma subunidade dos filamentos intermediários do tipo III presentes no citoesqueleto glial. A GFAP altera a estrutura do citoesqueleto, permitindo alterações na morfologia dos astrócitos. Assim, pode-se afirmar que uma de suas principais funções é modular a motilidade e a forma dos astrócitos, fornecendo estabilidade estrutural aos seus processos (Rodnight *et al.*, 1997; Allen e Barres, 2005). As células gliais mudam rapidamente sua estrutura e função em resposta a vários fatores, como perda ou comprometimento das células nervosas, sendo que o aumento da imunorreatividade da GFAP é considerado um indicador de lesão cerebral. Sendo assim, os astrócitos reagem a lesões nervosas, aumentando a expressão de GFAP, e esta

propriedade torna a imuno-histoquímica da GFAP um marcador útil para astrogliose, que ocorre no encéfalo após dano neuronal e alterações vasculares (Latov *et al.*, 1979; Hatten *et al.*, 1991).

A astrogliose está presente em muitas doenças que podem afetar o SNC, incluindo as doenças psiquiátricas e as doenças neurodegenerativas, sendo assim, a GFAP se mostra útil para a marcação da ativação astrogliosa que ocorre nessas doenças. Em um estudo *post-mortem* realizado por Müller e colaboradores, foi demonstrado um aumento na expressão de GFAP nas áreas CA1 e CA2 do hipocampo em pacientes com transtornos afetivos (Müller *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram o aumento da ativação astrogliosa em diferentes modelos experimentais, como encefalomielite alérgica experimental e modelos de epilepsia. Nessas circunstâncias, os astrócitos se tornam reativos e respondem de maneira típica, sendo o GFAP utilizado como um biomarcador sensível e precoce, aumentando sua expressão próximo ao local de lesão (Eng *et al.*, 2000). Doenças neurodegenerativas como doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica também são caracterizadas por mudanças astrocíticas com aumento na expressão de GFAP (Dutra *et al.*, 2012). A intensidade da síntese de GFAP pode estar envolvida no controle da doença após a ativação astrogliosa. Se sugere que exista a participação desse filamento nos processos de recuperação e neuroproteção dos danos no encéfalo (Dutra *et al.*, 2012).

A GFAP também tem sido utilizada para marcação de astrogliose em estudos sobre obesidade. Em um modelo transgênico para obesidade e diabetes mellitus tipo II foi avaliada a imunorreatividade da GFAP no córtex cerebral e no hipocampo. Nesses animais, foi demonstrado um aumento significativo no número de astrócitos no córtex frontal e parietal bem como no hipocampo, indicando lesão nervosa e astrogliose em decorrência das alterações metabólicas provocadas pela obesidade (Tomassoni *et al.*, 2013). Outro estudo realizado por Cano e colaboradores avaliou as alterações morfológicas e a densidade dos astrócitos do hipocampo de ratos obesos. Foi encontrado que os astrócitos desses animais apresentam projeções mais longas e menos abundantes quando comparados com os animais controle. Esses dados mostram que o comprometimento funcional cognitivo que é descrito em animais obesos é concomitante com alterações morfológicas nos

astrócitos dentro do hipocampo (Cano *et al.*, 2014). Assim, os astrócitos podem responder aos insultos do SNC por sofrer hiperplasia e hipertrofia. A astrogliose também já foi investigada no hipotálamo de camundongos em resposta à obesidade, por meio de imuno-histoquímica para GFAP. Foi demonstrado que a obesidade provoca um padrão distinto de elevada imunorreatividade, sugerindo que a astrogliose pode ocorrer como uma resposta a alterações na barreira hematoencefálica e na circulação periférica dos animais obesos. Assim, a astrogliose observada em resposta à obesidade pode ter um impacto significativo na modulação e na comunicação neuronal (Buckman *et al.*, 2013).

### 1.3 Neuroinflamação e Prejuízos Cognitivos na Obesidade

O hipotálamo é o centro do controle energético do organismo e responde rapidamente às alterações metabólicas. Essa capacidade é refletida pela observação de que mesmo após apenas um dia de dieta hiperlipídica, já ocorre ativação microglial no hipotálamo e elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Thaler *et al.*, 2012; Kälin *et al.*, 2015). Alguns estudos indicam que a obesidade pode aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, e as células gliais são fundamentais na resposta inflamatória central causada pelo excesso de alimentação. Gonzáles e colaboradores demonstraram que uma dieta hiperlipídica pode levar a uma produção excessiva de IL-6 pela microglia ativada e causar também ativação subsequente de astrócidos, devido aos estímulos das citocinas pró-inflamatórias (Tapia-González *et al.*, 2011).

Ao longo da vida existe um declínio natural das funções cognitivas, contudo alguns fatores ambientais podem potencializar esse declínio, como a obesidade (Haan e Wallace, 2004). Em humanos, já foi demonstrado que a obesidade pode causar déficits de aprendizagem e memória (Elias *et al.*, 2005). As evidências atuais sugerem que a obesidade e as consequências da obesidade que podem incluir hipertensão, doença cardiovascular, diabetes, entre outras, contribuem significativamente para o declínio cognitivo e podem acelerar o desenvolvimento de demências (Qiu *et al.*, 2007).

A ativação de vias inflamatórias pode contribuir para prejuízos nas funções cognitivas o que parece estar relacionado à obesidade, embora os

mecanismos pelos quais isso ocorre ainda sejam pouco entendidos. Já está demonstrado que a obesidade afeta a aprendizagem em roedores (Hwang *et al.*, 2010; Pistell *et al.*, 2010). Nos humanos tem se sugerido que os indivíduos que apresentam obesidade podem ter deficiência nos processos de atenção e memória e isso pode contribuir para a perda de controle da ingestão alimentar (Martin e Davidson, 2014; Prickett *et al.*, 2015). Algumas investigações demonstram que animais e homens obesos que consomem dietas hiperlipídicas podem apresentar pior desempenho em testes de memória e de aprendizado, quando comparados aos que apresentam peso adequado e mantêm uma dieta mais equilibrada (Greenwood e Winocur, 2001; Heyne *et al.*, 2009; Abildgaard *et al.*, 2011). Em humanos, uma elevada relação cintura/quadril é associada a declínio cognitivo, especialmente em idades avançadas (Wolf *et al.*, 2007).

Além disso, diversas evidências indicam que a neurodegeneração pode estar associada com a presença de inflamação em várias doenças neurológicas e neurodegenerativas, como por exemplo esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, depressão, epilepsia, entre outras (Morales *et al.*, 2014; Calsolaro e Edison, 2016). Contudo, em algumas disfunções neurológicas, especula-se se a inflamação é causa ou consequência dessas doenças. Na doença de Alzheimer, por exemplo, sabe-se que existe um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  ou IL-6 no tecido nervoso desses pacientes (Strauss *et al.*, 1992).

Nos países ocidentais, as doenças neurodegenerativas são a sexta maior causa de morte, sendo que 35,6 milhões de pessoas sofrem de demência em todo o mundo. É previsto que a população de pacientes com demência chegue a 115,4 milhões em 2050 (Andrews-Hanna *et al.*, 2007; Wimo *et al.*, 2013). Esse aumento também está relacionado com a maior longevidade da população. Assim, já que o número de pessoas com demências como a doença de Alzheimer está aumentando na população mundial, os estudos sobre tratamentos mais efetivos ou medidas preventivas são de extrema importância.

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência progressiva do envelhecimento nas populações humanas, é um distúrbio que está relacionado com a idade e é caracterizado pelo declínio nas funções cognitivas

e sociais como perda de memória, bem como alterações emocionais (Grammas, 2011; Dá Mesquita *et al.*, 2016). Bayer-Carter e colaboradores demonstraram que a administração de uma dieta hiperlipídica por apenas quatro semanas já é suficiente para causar alterações comportamentais e bioquímicas que indicam risco aumentado à doença de Alzheimer em homens idosos (Bayer-Carter *et al.*, 2011). Os mecanismos envolvidos nessa correlação são indeterminados, porém estudos recentes indicam que o elo entre obesidade e disfunção neurológica pode ser a inflamação sustentada presente nestes indivíduos (Glass *et al.*, 2010). Portanto, já que a obesidade causa uma inflamação sistêmica sustentada que repercute no SNC provocando neuroinflamação, pode-se presumir que a obesidade seja um fator causal de disfunções neurológicas por meio da ativação desse fenótipo pró-inflamatório. Dessa forma, estudos que busquem esclarecer esses mecanismos são de grande relevância.

O impacto de uma dieta hiperlipídica sobre o metabolismo sistêmico e parâmetros comportamentais de memória também já foi investigado comparando-se ratos machos e fêmeas. Os machos alimentados com dieta hiperlipídica tornaram-se obesos, apresentando também hiperglicemia de jejum e elevação nos níveis de corticosterona. As fêmeas submetidas à dieta hiperlipídica apresentaram apenas elevação nos níveis de corticosterona. Contudo, os animais de ambos os sexos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um pior desempenho no teste de reconhecimento espacial de objetos, que é um teste de memória que avalia a função hipocampal (Underwood e Thompson, 2016).

Como diversas evidências apontam para um prejuízo cognitivo na obesidade, Kosari e colaboradores desenvolveram um estudo com o objetivo de determinar se uma dieta hiperlipídica poderia afetar a memória dos ratos ou se a deficiência cognitiva induzida pela dieta estaria ligada ao nível de acetilcolina no encéfalo. Os resultados demonstraram que o consumo de uma dieta hiperlipídica por doze semanas prejudicou a memória espacial dos ratos, os quais tiveram aumento do peso corporal, da pressão arterial e nos níveis de triglicédeos. Porém, não foram observadas alterações significativas nos marcadores de acetilcolina cerebral (Kosari *et al.*, 2012).

Apesar do número expressivo de estudos que confirmam a associação entre a obesidade e o declínio cognitivo, os mecanismos biológicos dos efeitos da dieta sobre a função cerebral são desconhecidos.

#### 1.4 Ômega-3

Os ácidos graxos ômega-6 (n-6 ou  $\omega$ -6) e ômega-3 (n-3 ou  $\omega$ -3) são ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) essenciais, e dessa forma, não são produzidos pelo próprio organismo humano, devendo ser obtidos a partir da dieta. Na família ômega-3, a estrutura química consiste em uma dupla ligação no 3o carbono a partir do grupo metil terminal, na extremidade oposta da carboxila. Os ácidos linoléico (18:2n-6, LA) e o araquidônico (20:4n-6, AA) são pertencentes à família ômega-6. A família ômega-3 é constituída pelos ácidos alfa-linolênico (18:3n-3, ALA), eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6n-3, DHA).

Nos alimentos, são encontrados os ácidos ALA e LA, e a partir da ação de enzimas hepáticas, eles são convertidos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), que apresentam importantes funções no organismo, desde a constituição das membranas celulares até a regulação de processos metabólicos (Haag, 2003).

Esses ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) do tipo EPA e DHA estão presentes em peixes como sardinha, salmão, cavalinha e atum. O ALA sofre reações de dessaturação e alongamento no retículo endoplasmático das células hepáticas, permitindo a formação dos outros ácidos graxos dessa família como o EPA e o DHA (Qiu *et al.*, 2001). O EPA possui uma conhecida ação anti-inflamatória no organismo, enquanto o DHA desempenha um papel fundamental na visão, neuroproteção, envelhecimento saudável, memória e outras funções (Mesquita *et al.*, 2011).

Os PUFAs do tipo ômega-3 exercem uma grande variedade de efeitos biológicos e são estudados em várias condições clínicas distintas como doença coronariana, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes, doenças renais e doenças inflamatórias. Esses PUFAs possuem uma ação anti-inflamatória, pois reduzem a síntese de derivados do ácido araquidônico (Nicolas G. Bazan *et al.*, 2012). Além disso, no SNC, eles também influenciam na atividade enzimática,

sinalização celular, plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e também modulação de citocinas que possuem atividade neuromodulatória e neurotransmissora (Högyes *et al.*, 2003).

Nemeth e colaboradores, investigaram os efeitos do consumo de ácidos graxos insaturados (UFAs) sobre o desempenho cognitivo de cobaias machos e fêmeas. Nesse estudo, dietas diferentes foram administradas entre os grupos: um grupo recebeu uma dieta enriquecida tanto em sementes de chia (ômega-3), nozes (ômega-6), ou amendoim (ômega-9) e o outro grupo recebeu uma dieta controle. Foi sugerido que o consumo de UFAs possa afetar positivamente a aprendizagem espacial, a memória e também diminuir as consequências negativas do estresse fisiológico sobre as habilidades cognitivas. O estudo ainda mostrou efeitos específicos do gênero. Aparentemente, pode-se melhorar a aprendizagem espacial apenas no sexo feminino, enquanto nos machos, os UFAs parecem melhorar a memória de longa duração (Nemeth *et al.*, 2015).

Outros estudos também mostram que o aumento do consumo de peixe e o consumo de DHA e EPA são associados com redução de declínio cognitivo (Kalmijn *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005). Além disso, o declínio cognitivo também está associado com os níveis reduzidos de DHA no encéfalo (Schaefer *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2011). Além disso, a administração oral de DHA e também de EPA protege contra perda de memória em modelo animal para doença de Alzheimer, e esse efeito protetor foi acompanhado por um aumento cortical de EPA e DHA (Hashimoto *et al.*, 2009). Isso também é acompanhado por uma acumulação de DHA nos tecidos, com uma diminuição correspondente no estresse oxidativo e um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a plasticidade sináptica (Hashimoto *et al.*, 2009). Em outro estudo, foi investigado se EPA e DHA poderiam melhorar a capacidade de aprendizagem de ratos envelhecidos, e o resultado sugere que a administração crônica de EPA e DHA pode ser uma estratégia de prevenção contra o declínio cognitivo relacionado com a idade (Hashimoto *et al.*, 2015).

A deficiência de DHA pode causar estresse oxidativo por meio de processos de peroxidação lipídica, oxidação proteica e que também está associado ao aumento da produção do peptídeo  $\beta$ -amiloide no SNC (Green *et al.*, 2007). O consumo de DHA pode evitar a produção do peptídeo  $\beta$ -amiloide

por inibição do estresse oxidativo, podendo assim contribuir para a melhora do aprendizado e do raciocínio (Hashimoto *et al.*, 2005). Assim, o consumo do ômega-3 possui benefícios que podem proteger o SNC dos efeitos do estresse oxidativo e do envelhecimento.

Ainda, os ácidos graxos do tipo ômega-3 podem ser incorporados aos fosfolipídios das membranas celulares. A mudança na composição dos ácidos graxos das membranas permite manter a fluidez nas mesmas e modificar a formação de derivados lipídicos, podendo influenciar, dessa forma, a função celular. Essa alteração nas propriedades físicas das membranas pode também provocar efeitos sobre as vias de sinalização por modificar os mecanismos de transdução de sinal intracelular (Yaqoob e Shaikh, 2010).

Existem dois fatores de transcrição que desempenham um papel importante na inflamação, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e o receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR $\gamma$ ). O NF- $\kappa$ B pode desempenhar um papel importante nas várias vias de sinalização inflamatórias podendo controlar a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas (Kumar *et al.*, 2004). A via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B por estímulos inflamatórios ocorre por meio da fosforilação e degradação de sua subunidade inibitória, o I $\kappa$ B, que está localizado no citosol. A degradação do I $\kappa$ B causa a translocação das subunidades p50 e p65 para o núcleo da célula o que leva à ativação do NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B quando ativado induz a expressão de mais genes pró-inflamatórios. O PPAR $\gamma$  possui uma ação anti-inflamatória regulando a expressão gênica, podendo interferir na ativação do NF- $\kappa$ B ao inibir sua ação, o que acaba criando uma interação entre estes dois fatores de transcrição (Vanden Berghe *et al.*, 2003). Os PUFAs parecem estar envolvidos na inibição da degradação do I $\kappa$ B e conseqüentemente na diminuição da ativação do NF- $\kappa$ B (Lee *et al.*, 2001). Os PUFAs podem ser considerados ligantes naturais de PPAR $\gamma$  (Grygiel-Górniak, 2014). Alguns estudos sugerem que o ômega-3 pode melhorar o metabolismo lipídico e a capacidade anti-inflamatória, por regular genes relacionados à sinalização do PPAR $\gamma$  (Banga *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2014). Estudos envolvendo suplementação com óleo de peixe indicaram que o ômega-3 pode atuar sobre processos inflamatórios por inibir a ativação do NF- $\kappa$ B e a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Baumann *et al.*, 1999; Trebble *et al.*, 2003).

O efeito anti-inflamatório do ômega-3 também ocorre devido ao seu envolvimento no desvio da síntese de ácido araquidônico. O ácido araquidônico é o substrato primário para a síntese de eicosanoides por meio das vias ciclooxigenase (COX), lipoxigenase e citocromo P450, dando origem a prostaglandinas série 2 e leucotrienos série 4 (Siriwardhana *et al.*, 2013). A enzima COX é expressa como duas isoformas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é a enzima induzível que é expressa em nível basal na maioria dos tecidos, sendo responsável por funções protetoras do organismo. A COX-2, no entanto, é uma enzima ativada no processo inflamatório e que leva à produção de prostaglandinas (Donnelly e Hawkey, 1997). A COX desempenha um papel essencial na neuroinflamação, sendo que as enzimas COX-1 e COX-2 são localizadas nos neurônios, astrócitos e nas células da microglia, e podem ser induzidas por várias condições (Consilvio *et al.*, 2004). A região promotora da COX-2 contém dois sítios de ligação para o NF- $\kappa$ B sendo demonstrado que este fator de transcrição é um regulador positivo da expressão de COX-2 em várias células humanas (Chun e Surh, 2004).

Um estudo realizado com ratos submetidos a uma dieta com alto teor de gordura em comparação com uma dieta com baixo teor de gordura, demonstrou que o aumento dos níveis de gordura da dieta podem reduzir a expressão de COX-2 no SNC dos ratos (Zhang *et al.*, 2005). Já a privação do ácido DHA também reduz a COX-1 e aumenta a expressão da COX-2 (Rao *et al.*, 2007). Os derivados do EPA atuam como antagonistas dos mediadores derivados do AA (Calder, 2001).

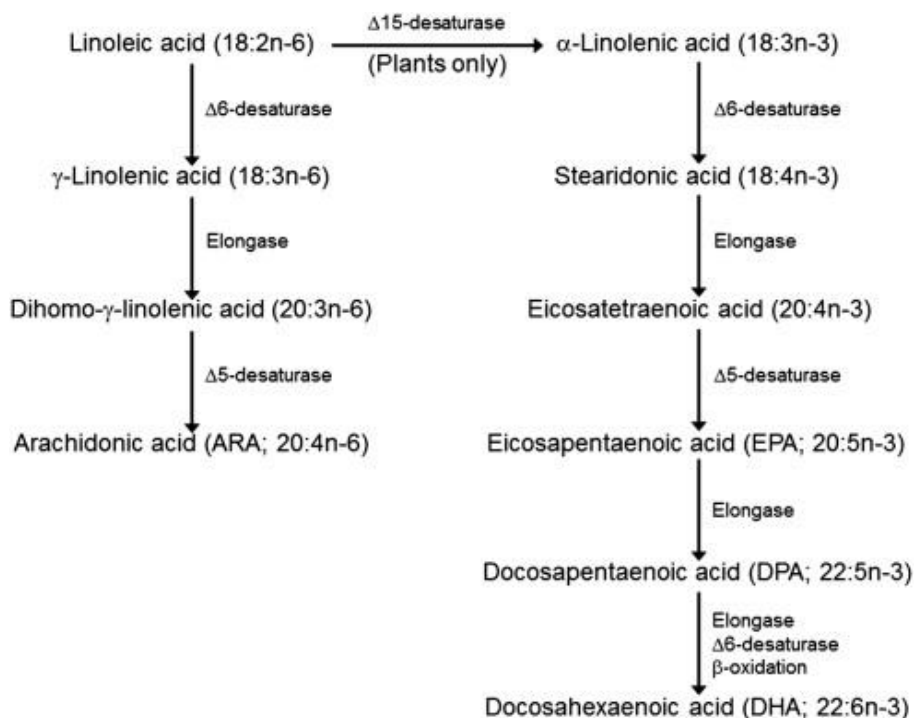


Figura 1- Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ômega-3 e ômega-6. AA, ácido araquidônico; DHA, ácido docosahexaenóico; DPA, ácido docosapentaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico. [Fonte: Calder (2015)].

Os ácidos graxos ômega-3 e o ômega-6 competem entre si pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de alongação e dessaturação, sendo que essas enzimas possuem uma maior afinidade pelos ácidos graxos ômega-3 (Teitelbaum e Allan Walker, 2001). As dessaturases são enzimas que atuam oxidando dois carbonos da cadeia com formação de duplas ligações e as elongases atuam adicionando dois átomos de carbono à cadeia. Essas dessaturases possuem a capacidade de introduzir duplas ligações nas posições  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  e  $\Delta 9$ , sendo que as enzimas  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  atuam na dessaturação dos PUFAs, e a  $\Delta 9$  dessaturase atua na síntese dos ácidos graxos monoinsaturados (Qiu, 2003). É de grande importância na alimentação humana a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de ômega-6 e ômega-3. Tem sido recomendado por alguns autores as razões de ômega-6 e ômega-3 2:1 a 3:1, por isso possibilitar uma maior conversão do ácido alfa-linolênico em DHA que alcança o seu valor máximo em torno de 2,3:1. Uma alimentação

baseada em razões ômega-6/ômega-3 inferiores a 1:1 não são recomendadas, por inibirem a transformação do ácido linoléico em PUFAs (Martin *et al.*, 2006).

Os efeitos anti-inflamatórios do ômega-3 e as ações benéficas do consumo regular de alimentos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre a função cognitiva são bem demonstrados (Robinson *et al.*, 2010; Muldoon *et al.*, 2014). Contudo, sua função neuroprotetora ainda é questionada. Assim, o estudo de um modelo experimental de obesidade associado à administração de ômega-3 pode fornecer subsídios para o esclarecimento da função deste ácido graxo como agente neuroprotetor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILDGAARD, A. et al. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 623-33, Jun 2011. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888697> >.

AGHAMOHAMMADZADEH, R.; HEAGERTY, A. M. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. **Ann Med**, v. 44 Suppl 1, p. S74-84, Jun 2012. ISSN 1365-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713152> >.

AHIMA, R. S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 250-2, Jul 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717038> >.

AJMONE-CAT, M. A. et al. Microglial polarization and plasticity: evidence from organotypic hippocampal slice cultures. **Glia**, v. 61, n. 10, p. 1698-711, Oct 2013. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918452> >.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol**, v. 15, n. 5, p. 542-8, Oct 2005. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144764> >.

ANDERSON, E. J. et al. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPAR $\gamma$  activation? **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 8, p. 1156-63, Sep 2014. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24597798> >.

ANDREWS-HANNA, J. R. et al. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 924-35, Dec 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054866> >.

BADMAN, M. K.; FLIER, J. S. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2103-15, May 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498506> >.

BAHIA, L. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 12, p. 440, 2012. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713624> >.

BANGA, A. et al. Adiponectin translation is increased by the PPAR $\gamma$  agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 3, p. E480-9, Mar 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088251> >.

BAUMANN, K. H. et al. Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 1, p. 59-66, Jan 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888867> >.

BAYER-CARTER, J. L. et al. Diet intervention and cerebrospinal fluid biomarkers in amnesic mild cognitive impairment. **Arch Neurol**, v. 68, n. 6, p. 743-52, Jun 2011. ISSN 1538-3687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670398> >.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. **J Histochem Cytochem**, v. 25, n. 6, p. 466-9, Jun 1977. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/69656> >.

BUCKMAN, L. B. et al. Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. **J Comp Neurol**, v. 521, n. 6, p. 1322-33, Apr 2013. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23047490> >.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007-24, Sep 2001. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724453> >.

\_\_\_\_\_. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-84, Apr 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25149823> >.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimers Dement**, v. 12, n. 6, p. 719-32, Jun 2016. ISSN 1552-5279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27179961> >.

CANO, V. et al. Morphological changes in glial fibrillary acidic protein immunopositive astrocytes in the hippocampus of dietary-induced obese mice. **Neuroreport**, Jun 2014. ISSN 1473-558X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911388> >.

CATALANI, A. et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. **Mech Ageing Dev**, v. 123, n. 5, p. 481-90, Mar 2002. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796133> >.

CAVAILLON, J. M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 47, n. 4, p. 695-702, Jun 2001. ISSN 0145-5680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502077> >.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 98, Jun 2014. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24889886> >.

CHOI, S. S. et al. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e92325, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691121> >.

CHUN, K. S.; SURH, Y. J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 6, p. 1089-100, Sep 2004. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313405> >.

CONSILVIO, C.; VINCENT, A. M.; FELDMAN, E. L. Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? **Exp Neurol**, v. 187, n. 1, p. 1-10, May 2004. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081582> >.

COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 3, p. 349-56, Aug 2001. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11681809> >.

DE VRIES, H. E. et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. **J Neuroimmunol**, v. 64, n. 1, p. 37-43, Jan 1996. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598388> >.

DEMARK-WAHNEFRIED, W. et al. The role of obesity in cancer survival and recurrence. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 21, n. 8, p. 1244-59, Aug 2012. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695735> >.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-7, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167477> >.

DILGER, R. N.; JOHNSON, R. W. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 4, p. 932-9, Oct 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495785> >.

DONNELLY, M. T.; HAWKEY, C. J. Review article: COX-II inhibitors--a new generation of safer NSAIDs? **Aliment Pharmacol Ther**, v. 11, n. 2, p. 227-36, Apr 1997. ISSN 0269-2813. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9146759> >.

DUTRA, M. F. et al. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. **Neurol Sci**, v. 33, n. 5, p. 1137-44, Oct 2012. ISSN 1590-3478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231471> >.

DÁ MESQUITA, S. et al. Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 68, p. 547-562, Jun 2016. ISSN 1873-7528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27328788> >.

ELIAS, M. F. et al. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 11-6, Dec 2005. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223549> >.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, Oct 2000. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059815> >.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-82, May 2004. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726444> >.

FANTUZZI, G.; MAZZONE, T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 5, p. 996-1003, May 2007. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303782> >.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-34, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303880> >.

GOLDMANN, T.; PRINZ, M. Role of microglia in CNS autoimmunity. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 208093, 2013. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840238> >.

GRAMMAS, P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 26, 2011. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439035> >.

GREEN, K. N. et al. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. **J Neurosci**, v. 27, n. 16, p. 4385-95, Apr 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442823> >.

GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G. Glucose treatment reduces memory deficits in young adult rats fed high-fat diets. **Neurobiol Learn Mem**, v. 75, n. 2, p. 179-89, Mar 2001. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222059> >.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219177> >.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. **Nutr J**, v. 13, p. 17, Feb 2014. ISSN 1475-2891. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524207> >.

HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Can J Psychiatry**, v. 48, n. 3, p. 195-203, Apr 2003. ISSN 0706-7437. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728744> >.

HAAN, M. N.; WALLACE, R. Can dementia be prevented? Brain aging in a population-based context. **Annu Rev Public Health**, v. 25, p. 1-24, 2004. ISSN 0163-7525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15015910> >.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1387-94, Nov 2007. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965659> >.

HASHIMOTO, M. et al. The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta(1-40). **J Nutr Biochem**, v. 20, n. 12, p. 965-73, Dec 2009. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18993051> >.

\_\_\_\_\_. n-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 2, p. 203-9, Feb 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25450447> >.

\_\_\_\_\_. Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats. **J Nutr**, v. 135, n. 3, p. 549-55, Mar 2005. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735092> >.

HATTEN, M. E. et al. Astroglia in CNS injury. **Glia**, v. 4, n. 2, p. 233-43, 1991. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1827781> >.

HELGE, J. W. et al. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 546, n. Pt 1, p. 299-305, Jan 2003. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509497> >.

HEYNE, A. et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addict Biol**, v. 14, n. 4, p. 373-83, Sep 2009. ISSN 1369-1600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740365> >.

HUANG, T. L. et al. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. **Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1409-14, Nov 2005. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275829> >.

HWANG, L. L. et al. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 3, p. 463-9, Mar 2010. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730425> >.

HÖGYES, E. et al. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. **Neuroscience**, v. 119, n. 4, p. 999-1012, 2003. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12831859> >.

JANG, E. et al. Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. **J Immunol**, v. 191, n. 10, p. 5204-19, Nov 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24089194> >.

JHA, M. K.; LEE, W. H.; SUK, K. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. **Biochem Pharmacol**, v. 103, p. 1-16, Mar 2016. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26556658> >.

KALMIJN, S. et al. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. **Ann Neurol**, v. 42, n. 5, p. 776-82, Nov 1997. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392577> >.

KENCHIAIAH, S.; GAZIANO, J. M.; VASAN, R. S. Impact of obesity on the risk of heart failure and survival after the onset of heart failure. **Med Clin North Am**, v. 88, n. 5, p. 1273-94, Sep 2004. ISSN 0025-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331317> >.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2548-56, Jun 2004. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181022> >.

KOSARI, S. et al. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. **Behav Brain Res**, v. 235, n. 1, p. 98-103, Nov 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820146> >.

KUMAR, A. et al. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 82, n. 7, p. 434-48, Jul 2004. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175863> >.

KÄLIN, S. et al. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 6, p. 339-51, Jun 2015. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824676> >.

LATOV, N. et al. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. **Dev Biol**, v. 72, n. 2, p. 381-4, Oct 1979. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/389711> >.

LEE, J. Y. et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 18, n. 20 p. 276, May 2001 May. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278967> >.

LIEDTKE, W. et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. **Neuron**, v. 17, n. 4, p. 607-15, Oct 1996. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893019> >.

LOPEZ, L. B.; KRITZ-SILVERSTEIN, D.; BARRETT CONNOR, E. High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: the Rancho Bernardo study. **J Nutr Health Aging**, v. 15, n. 1, p. 25-31, Jan 2011. ISSN 1760-4788. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267518> >.

LOTUFO, P. A. Increasing obesity in Brazil: predicting a new peak of cardiovascular mortality. **Sao Paulo Med J**, v. 118, n. 6, p. 161-2, Nov 2000. ISSN 1516-3180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120544> >.

MARTIN, A. A.; DAVIDSON, T. L. Human cognitive function and the obesogenic environment. **Physiol Behav**, v. 136, p. 185-93, Sep 2014. ISSN 1873-507X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631299> >.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-770, 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732006000600011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000600011&nrm=iso) >.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105661> >.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, n. 1, p. 1-16, Jan 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682539> >.

MAURY, E. et al. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 4, p. 1393-400, Apr 2009. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174496> >.

MESQUITA, T. R. et al. Efeito anti-inflamatório da suplementação dietética com ácidos graxos ômega-3, em ratos. **Revista Dor**, v. 12, p. 337-341, 2011. ISSN 1806-0013. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-00132011000400010&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-00132011000400010&nrm=iso) >.

MORALES, I. et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 112, 2014. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795567> >.

MORIN, C. L. et al. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4665-71, Nov 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348192> >.

MULDOON, M. F. et al. Long-chain omega-3 fatty acids and optimization of cognitive performance. **Mil Med**, v. 179, n. 11 Suppl, p. 95-105, Nov 2014. ISSN 1930-613X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25373092> >.

MÜLLER, M. B. et al. Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 10, p. 1603-12, Nov 2001. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860455> >.

NEMETH, M. et al. Sex-Specific Effects of Diets High in Unsaturated Fatty Acids on Spatial Learning and Memory in Guinea Pigs. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140485, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26469777> >.

NICOLAS G. BAZAN; MIGUEL F. MOLINA; GORDON, W. C. **Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases**. Annu Rev Nutr. 2012.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 83, n. 6, p. 512-5, Dec 2000. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192058> >.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1077-98, Oct 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287860> >.

PISTELL, P. J. et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **J Neuroimmunol**, v. 219, n. 1-2, p. 25-32, Feb 2010. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004026> >.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and its health implications in lower-income countries. **Public Health Nutr**, v. 1, n. 1, p. 5-21, Mar 1998. ISSN 1368-9800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555527> >.

PORTA, C. et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 35, p. 14978-83, Sep 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706447> >.

PRICKETT, C.; BRENNAN, L.; STOLWYK, R. Examining the relationship between obesity and cognitive function: a systematic literature review. **Obes Res Clin Pract**, v. 9, n. 2, p. 93-113, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1871-403X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890426> >.

QIU, C.; DE RONCHI, D.; FRATIGLIONI, L. The epidemiology of the dementias: an update. **Curr Opin Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 380-5, Jul 2007. ISSN 0951-7367. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17551353> >.

QIU, X. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 181-6, Feb 2003. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538082> >.

QIU, X.; HONG, H.; MACKENZIE, S. L. Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 34, p. 31561-6, Aug 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397798> >.

RAO, J. S. et al. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 151-7, Feb 2007. ISSN 1359-4184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983392> >.

ROBINSON, J. G.; IJIOMA, N.; HARRIS, W. Omega-3 fatty acids and cognitive function in women. **Womens Health (Lond)**, v. 6, n. 1, p. 119-34, Jan 2010. ISSN 1745-5065. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088735> >.

RODNIGHT, R. et al. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 3, p. 325-38, Mar 1997. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246230> >.

RONTI, T.; LUPATTELLI, G.; MANNARINO, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 64, n. 4, p. 355-65, Apr 2006. ISSN 0300-0664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16584505> >.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biol**, v. 8, n. 8, Aug 2010. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808781> >.

SCHAEFER, E. J. et al. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. **Arch Neurol**, v. 63, n. 11, p. 1545-50, Nov 2006. ISSN 0003-9942. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101822> >.

SENN, J. J. et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 16, p. 13740-6, Apr 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560330> >.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 4, p. 613-23, Apr 2013. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498665> >.

STENLÖF, K. et al. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 9, p. 4379-83, Sep 2003. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970313> >.

STRAUSS, S. et al. Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. **Lab Invest**, v. 66, n. 2, p. 223-30, Feb 1992. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370967> >.

TAPIA-GONZÁLEZ, S. et al. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. **J Neuroendocrinol**, v. 23, n. 4, p. 365-70, Apr 2011. ISSN 1365-2826. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314736> >.

TARASSISHIN, L. et al. Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155\*. **Glia**, v. 59, n. 12, p. 1911-22, Dec 2011. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170100> >.

TEITELBAUM, J. E.; ALLAN WALKER, W. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **J Nutr Biochem**, v. 12, n. 1, p. 21-32, Jan 2001. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179858> >.

THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-62, Jan 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201683> >.

THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A.; OLIET, S. H. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. **Physiol Rev**, v. 88, n. 3, p. 983-1008, Jul 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626065> >.

TOMASSONI, D. et al. Astroglialosis in the brain of obese Zucker rat: a model of metabolic syndrome. **Neurosci Lett**, v. 543, p. 136-41, May 2013. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545209> >.

TREBBLE, T. et al. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. **Br J Nutr**, v. 90, n. 2, p. 405-12, Aug 2003. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908901> >.

UNDERWOOD, E. L.; THOMPSON, L. T. A High-Fat Diet Causes Impairment in Hippocampal Memory and Sex-Dependent Alterations in Peripheral Metabolism. **Neural Plast**, v. 2016, p. 7385314, 2016. ISSN 1687-5443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26819773> >.

VANDEN BERGHE, W. et al. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. **Adv Exp Med Biol**, v. 544, p. 181-96, 2003. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14713228> >.

VIGITEL. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico** 2014.

WAKSELMAN, S. et al. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. **J Neurosci**, v. 28, n. 32, p. 8138-43, Aug 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685038> >.

WANNAMETHEE, S. G.; SHAPER, A. G. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 8, p. 1266-72, Aug 1999. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480769> >.

WHO. **World Health Statistics** 2015.

WIMO, A. et al. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimers Dement**, v. 9, n. 1, p. 1-11.e3, Jan 2013. ISSN 1552-5279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305821> >.

WOLF, P. A. et al. Relation of obesity to cognitive function: importance of central obesity and synergistic influence of concomitant hypertension. The Framingham Heart Study. **Curr Alzheimer Res**, v. 4, n. 2, p. 111-6, Apr 2007. ISSN 1567-2050. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430232> >.

YAQOUB, P.; SHAIKH, S. R. The nutritional and clinical significance of lipid rafts. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 2, p. 156-66, Mar 2010. ISSN 1473-6519. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010096> >.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007. ISSN 0020-5907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426506> >.

ZHANG, X. et al. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. **Exp Neurol**, v. 191, n. 2, p. 318-25, Feb 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649487> >.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar se a dieta hiperlipídica interfere na memória e nos marcadores de neuroinflamação em ratos Wistar, e se o tratamento com ômega-3 é capaz de reverter estes efeitos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar se a dieta hiperlipídica empregada causa obesidade e/ou síndrome metabólica.
- Avaliar se a obesidade afeta a memória de longa duração nos animais estudados.
- Avaliar se o tratamento com ômega-3 reverte os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a memória de longa duração.
- Identificar qual o impacto da dieta hiperlipídica e da suplementação com ômega-3 sobre a ativação astrocitária no córtex cerebral e no hipocampo.
- Determinar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  e da anti-inflamatória IL-10 no córtex cerebral dos animais estudados.

### **3. Justificativa**

Uma das principais características da obesidade é a exacerbação do estado inflamatório sistêmico, sendo esta condição um fator predisponente a diversas doenças, incluindo as que afetam o SNC. Os mecanismos responsáveis por esta relação não são completamente compreendidos, porém, nos últimos anos, diversas evidências indicam que a neuroinflamação causada pela obesidade pode ser um fator etiológico para declínio cognitivo. Devido ao crescente número de obesos na população mundial, é necessário a busca por medidas preventivas e de combate ao ganho de peso, bem como o desenvolvimento de terapias que minimizem os efeitos deletérios da obesidade sobre a saúde. Como os ácidos graxos da família ômega-3 possuem uma importante ação anti-inflamatória, o estudo de seu efeito sobre neuroinflamação e cognição pode auxiliar na busca de estratégias de prevenção e/ou tratamento dos efeitos deletérios da obesidade.

**Omega-3 fatty acids revert high-fat diet-induced neuroinflammation but  
not recognition memory impairment in rats**

Aline Marcelino de Andrade<sup>1</sup>, Marilda da Cruz Fernandes<sup>2</sup>, Luciano Stürmer de  
Fraga<sup>3</sup>, Marilene Porawski<sup>4,5</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,5</sup> and Renata Padilha  
Guedes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Patologia, Universidade Federal  
de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, Universidade Federal  
de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author: Dra Renata Padilha Guedes  
Rua Sarmento Leite, 245/308- Porto Alegre- 90050-170  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
Porto Alegre, RS, Brazil  
Telefone number: 55 51 3303-8751  
E-mail: [renata.guedes@ufcspa.edu.br](mailto:renata.guedes@ufcspa.edu.br)

**ABSTRACT**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Neuroinflammation is a consequence of overeating and may predispose to the development of cognitive decline and neurological disorders. This study aimed to evaluate the impact of omega-3 supplementation on memory and neuroinflammatory markers of rats fed a high-fat diet. Male Wistar rats (n=40) were divided into four groups: standard diet (SD); standard diet + omega-3 (SD+O); high fat diet (HFD); High fat diet + omega-3 (HFD+O). Diet administration was performed for 20 weeks and omega-3 supplementation started at 16th week. HFD significantly increased body weight and omega-3 supplementation did not modify the total weight gain ( $p < 0.0001$ ). However, animals from HFD+O group showed a lower amount of visceral fat ( $p = 0.0015$ ) along with an improvement in insulin sensitivity following HFD ( $p = 0.0154$ ). HFD animals presented an impairment in the object recognition memory, which was not recovered by omega-3. There was an increase in GFAP-positive cells in cerebral cortex of HFD group ( $p = 0.0007$ ), however no differences were found in hippocampus. We also found a significant increase in gene expression of proinflammatory cytokines IL-6 ( $p = 0.0352$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p = 0.0016$ ) in the HFD group. Our results demonstrate a beneficial metabolic role of omega-3 following HFD. However, omega-3 supplementation was not sufficient to reverse the memory deficit caused by HFD, although it played an important role in reducing the neuroinflammatory profile. Therefore, omega-3 fatty acids may play an important role in the central nervous system, preventing the progression of neuroinflammation in obesity.

**Keywords:** Obesity; polyunsaturated fatty acids; GFAP; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-6; inflammation

## Introduction

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
The prevalence of obesity has increased over the last decades making it a major public health problem worldwide. An imbalance between energy intake and energy expenditure leads to overproduction of body fat, which may cause various metabolic disorders (Hossain et al. 2007; Mello et al. 2006). The association between this excess of body fat and cardiovascular diseases (Aghamohammadzadeh and Heagerty 2012; Kenchaiah et al. 2004; Lotufo 2000), some types of cancers (Demark-Wahnefried et al. 2012) and diabetes mellitus type II is well known (Wannamethee and Shaper 1999). Besides these classical comorbidities, there is paramount evidence of the relationship between obesity and neurological dysfunction, including neuropsychiatric and neurodegenerative diseases (Calsolaro and Edison 2016; Morales et al. 2014).

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
An important feature of the obesity is the chronic low-grade inflammation that occurs in the metabolic tissues, especially in the adipose tissue. This inflammatory state, named metaflammation, is the main cause of the maladaptive responses to obesity. The increased secretion of proinflammatory cytokines by the adipose tissue, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), can inhibit insulin signaling (Bulló et al. 2007; Maury and Brichard 2010; Shah et al. 2008). Hence, the proinflammatory phenotype is associated with insulin resistance, and together, these features promote a widespread repercussion in the body systems. On the other hand, it was already demonstrated that a reduction in the body weight leads to an increased expression of anti-inflammatory adipokines concomitantly with a decrease in insulin resistance and in the levels of proinflammatory cytokines (Shah et al. 2008). Thus, strategies to contribute to weight loss are highly beneficial.

48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
Previous studies have shown that, in obesity, inflammation in the hypothalamus may contribute to the inappropriate regulation of energy metabolism (van de Sande-Lee and Velloso 2012). However, this proinflammatory activity is not limited to hypothalamus, being propagated to other brain regions affecting a variety of brain functions (Gregor and Hotamisligil 2011). In addition, obesity can increase susceptibility for the development of neurodegenerative diseases, and neuroinflammation is a potential causal factor

1 of the dysregulation in the central nervous system caused by overeating. It was  
2 shown that a high fat diet can lead to excessive production of IL-6 by activated  
3 microglia and also cause the subsequent activation of astrocytes due to  
4 stimulation of the pro-inflammatory cytokines (Tapia-González et al. 2011).  
5 These neuroinflammatory responses are harmful, since these mechanisms are  
6 associated with neuropathological processes and neurodegeneration  
7 (Ransohoff et al. 2015). The long-term inflammation could have disastrous  
8 consequences in the CNS, such as loss of synapses, affecting cognition and  
9 executive functions (Hein and O'Banion 2009; Kohman and Rhodes 2013).  
10 Throughout life there is a natural decline in cognitive functions, however, some  
11 environmental factors, such as obesity, may accelerate this decline (Haan and  
12 Wallace 2004). The activation of inflammatory pathways may contribute to  
13 impairment in learning and memory, which may be related to obesity, although  
14 the mechanisms by which this occurs are still poorly understood (Hwang et al.  
15 2010; Pistell et al. 2010).

27 Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from omega-3 family are well known  
28 to suppress neuroinflammation and reduce oxidative stress. These PUFAs have  
29 an anti-inflammatory action, reducing the synthesis of arachidonic acid  
30 derivatives (Nicolas G. Bazan et al. 2012). Furthermore, in the CNS, they  
31 influence enzymatic activity, cell signaling, synaptic plasticity, neurotransmitter  
32 release, and they modulate cytokines that have neuromodulatory activity  
33 (Högyes et al. 2003). It has been suggested that the consumption of  
34 unsaturated fatty acids (UFAs) can positively affect spatial learning, memory  
35 and also decrease the negative effects of physiological stress on cognitive skills  
36 (Nemeth et al. 2015).

45 Despite the important action of omega-3 family of PUFAs as anti-  
46 inflammatory molecules, the present study aimed to evaluate the impact of  
47 omega-3 supplementation on memory and neuroinflammatory markers of obese  
48 rats.  
49  
50  
51

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats (n=40) from the animal facility of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre were used. Animals had free access to standard rat chow and water until the age of 7 months. Rats were housed in plastic cages (2-3 rats per cage) under controlled temperature (22-24°C) and light (12h light/12h dark cycle; lights on at 6:00 a.m.) conditions.

All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments and were performed in accordance with international laws for the care of laboratory animals. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (UFCSPA, Brazil, protocol No. 261/14).

### Diet and omega-3 administration

Seven months old rats were divided into the following experimental groups: standard diet + vehicle (SD, n=11); standard diet + omega-3 (SD+O, n=8); high fat diet (HFD, n=12) + vehicle; high fat diet + omega-3 (HFD+O, n=9). SD or HFD was administered for 20 weeks. Omega-3 supplementation was performed from 16<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> week of diet administration. Omega-3 was administered daily through gavage at a dose of 1g/kg.

SD and SD+O groups were fed with Nuvilab® CR-1 standard rat chow (NUVITAL®, Curitiba, PR, Brazil) providing a total energy content of 3.4 kcal/g (63% carbohydrates, 26% protein, 11% fat). Animals from HFD and HFD+O groups were fed a high fat diet (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brazil) providing a total energy of 4.5 kcal/g (35.7% carbohydrate, 19.2% protein, 45.1% fat). Nutritional information was provided by manufacturers.

### Object recognition test

In the last week of the diet administration, animals were submitted to the object recognition test. In the first day, rats were habituated in an acrylic box (40cm x 40cm) delimited by four walls 20cm height. Twenty-four hours after the habituation, the training session was conducted. Animals were placed

1 individually in the left rear quadrant of the box containing two different objects  
2 (A and B), being allowed to freely explore them for 5 minutes. The retention test  
3 was performed 24 hours after training session. For the test, rats were  
4 individually reintroduced into the box where one of the objects presented during  
5 training was randomly replaced by a new object (C). Exploration of an object  
6 was defined as directing the nose towards the object at a distance less than 2  
7 cm and/or when the animal touched the object with the nose (Ennaceur and  
8 Delacour 1988). The exploration time of the familiar and the new object were  
9 counted.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

### 18 Tissue and blood collection

19  
20 At the end of experimental time course, animals were decapitated for  
21 blood and tissue collection. Trunk blood was collected and, after centrifugation  
22 (1500 x g for 10 min at 4°C), serum was separated and stored at -80°C for later  
23 analysis. The brain was quickly removed and right and left hemispheres were  
24 separated. The right hemisphere was put in a fixative solution for histological  
25 analyses. Cerebral cortex was dissected out from the left hemisphere and  
26 quickly frozen in liquid nitrogen as previously described in De Moura et al.  
27 (2015) (de Moura et al. 2015).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

### 36 Blood analysis

37  
38 Serum levels of glucose were analyzed using colorimetric kits (LabTest),  
39 according instructions of manufacturer. Enzyme-linked immunosorbent assay  
40 (ELISA) commercial kit (Millipore) was used to analyze serum levels of insulin  
41 according instructions of manufacturer.  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 HOMA index

48  
49 The HOMA (homeostasis model assessment) index was used in order to  
50 quantify insulin resistance and beta cell function in the pancreas (Matthews et  
51 al. 1985). The index is calculated based on blood levels of glucose (mmol/L)  
52 and insulin (mU/L), using the following formula: (glucose blood levels x insulin  
53 blood levels) / 22.5. (Nattiv et al. 2007).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Immunohistochemical staining (IHC)

1  
2 For immunohistochemistry, the left hemisphere of the brain was fixed in a  
3 zinc buffer solution (pH 7.4) for 48h at room temperature. After this period,  
4 tissues were dehydrated, embedded in paraffin and sectioned (8  $\mu$ m thick)  
5 using a microtome. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide in 10%  
6 methanol for 30 min, washed in PBS for 30 min and incubated for 30 min in 3%  
7 normal goat serum in PBS containing 0,4% Triton X-100 (PBS-T). Then,  
8 sections were incubated for 48h at 4°C with a monoclonal anti-GFAP antibody  
9 (Millipore), diluted 1:750. Sections were incubated with anti-mouse IgG  
10 peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma), diluted 1:500 in PBS-T, for  
11 90 min at room temperature. Immunoreaction was developed using a solution of  
12 0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) and 0.005% hydrogen  
13 peroxide in PBS. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated,  
14 and covered with Entellan (Merck) and coverslips. Digital images were acquired  
15 using a digital camera coupled to an Olympus BX-41 microscope using a 20x  
16 objective lens. The images were analyzed using ImageJ software  
17 (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Three randomly selected fields were analyzed in six  
18 nonadjacent sections. Five animals per group were analyzed.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

## Molecular analyses

### RNA extraction

33  
34  
35  
36  
37  
38 RNA was extracted from the samples with Trizol (Invitrogen) which was  
39 used according to the manufacturer's recommendations. The structures of the  
40 brain were homogenized in the presence of Trizol (1:5, v/v); aqueous phase  
41 was obtained by centrifugation (12000 x g, 15 min). The RNA was precipitated  
42 with isopropanol, for 15 min at room temperature, followed by centrifugation at  
43 12000 x g for 10 min. The pellets were resuspended in 0.1% DEPC-treated  
44 water. The concentration of total RNA was determined by measuring the optical  
45 density at 260 nm and purity of the RNA was evaluated on the basis of the ratio  
46 280 nm / 260 nm and electrophoresis on agarose gel (Langnaese et al. 2008).  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

### cDNA synthesis

56  
57  
58 Total RNA (1  $\mu$ g) was used as a template to synthesize cDNA. The RNA  
59 was incubated with 1  $\mu$ l oligo (dT) (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Invitrogen), 1  $\mu$ l 10 mM dNTP and  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 DEPC-water to a final volume of 12  $\mu$ l, for 5 minutes at 60°C, and then 1 min in  
2 ice. The following reagents were then added to a final volume of 19  $\mu$ l: 4  $\mu$ l of  
3 RT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ l 0.1 M DTT,  
4 and 1  $\mu$ l RNaseOUT (40 U/ $\mu$ l, Invitrogen). After 2 min incubation at 37°C, 1  $\mu$ l  
5 M-MLV-RT (200 U/ $\mu$ l; Invitrogen) was added and cDNA synthesis was carried  
6 out at 50°C for 1 h. The reaction was inactivated by incubation at 70°C for 15  
7 min.  
8  
9  
10  
11  
12

### 13 Real time PCR (qPCR)

14 The expression of TNF- $\alpha$ , IL6 and IL10 was performed. The  
15 housekeeping genes beta-actin (ActB) and Cyclophilin A (CypA), which have  
16 been shown to be stable in each brain area, were used as control. Amplification  
17 was carried out using 7.5  $\mu$ L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied  
18 Biosystems), 0.5  $\mu$ L of forward and reverse primers (0.33 M each), 100 ng of  
19 cDNA and nuclease-free water, in a total volume of 15  $\mu$ L. Reactions were  
20 performed in an optical 96-well plate, using a StepOnePlus™ thermocycler  
21 (Applied Biosystems). After an initial denaturation step at 95°C for 10 min,  
22 amplification was performed in 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s,  
23 annealing at 60°C for 40 s and extension at 72°C for 40 s. Amplification was  
24 followed by a melting curve analysis to confirm PCR product specificity. No  
25 signals were detected in no-template controls. The experimental Ct (cycle  
26 threshold) was calculated using the algorithm enhancements provided by the  
27 equipment. All samples were run in duplicate and the mean value of each  
28 duplicate was used for all further calculations (Cook et al. 2010; Langnaese et  
29 al. 2008; Nelissen et al. 2010). The Ct value of each reaction was used to  
30 calculate the level of mRNA expression of each specific gene, after normalizing  
31 it to the expression of the control housekeeping gene (HKG) genes analyzed in  
32 the same reaction plate (Zimmermann-Peruzatto et al. 2016).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 Statistical analyses

52 The data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and analyzed by Student's t test  
53 or one-way ANOVA, with Student-Newman Keuls post-hoc. GraphPad Prism  
54 5.0 was used for the statistical analyses. The significance level was set at  
55 p<0.05.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Results

Animals from HFD group gained significantly more weight over time than the animals fed a standard diet ( $F_{3,36}=10.18$ ,  $p<0.0001$ ). Omega-3 treatment (HFD+O group) did not revert significantly this parameter and weight gain in HFD+O group was also higher than SD and SD+O groups.

However, when visceral adiposity was evaluated, HFD group showed a significant increase in visceral fat depot compared to the other groups ( $F_{3,36}=6.325$ ,  $p=0.001$ ). Thus, omega-3 supplementation is able to prevent visceral adiposity in obese rats. Plasma insulin ( $F_{3,35}=2.311$ ,  $p=0.09$ ) and glycemia ( $F_{3,34}=4.089$ ,  $p=0.01$ ) did not show any differences among groups. However, HOMA-IR, which provides an estimation of insulin resistance, was significantly higher in HFD group ( $F_{3,36}=3.487$ ,  $p=0.02$ ). HOMA-IR of HFD+O group was similar to control groups, showing that omega-3 PUFA improves insulin sensitivity in obesity (Table 2).

In order to assess if HFD-induced obesity can interfere in animal recognition memory, object recognition test was performed. This task evaluates long-term memory through the ability to memorize and recognize both new and already known objects, 24 hours after the training session (Caletti et al. 2015; Rossato et al. 2007). In SD and SD+O groups animals spend significantly more time exploring the new object during the test session, which means that these rats recognized familiar and non-familiar objects (SD  $p=0.02$ ; SD+O  $p=0.02$ ). On the other hand, animals fed a HFD did not exhibit differences in the exploration time between familiar and new objects (HFD  $p=0.21$ ; HFD+O  $p=0.66$ ) showing that obesity causes long-term memory impairment. These results also demonstrate that omega-3 did not exert a protective effect on the recognition memory (Fig.1).

GFAP was assessed by immunohistochemistry in order to determine the HFD effect on astrocyte activation. GFAP is an astrocyte marker and GFAP labeling is widely used for the detection of tumors of astrocytic lineage (Liedtke et al. 1996), being the most used immunohistochemical marker for the identification of astrocytes (Catalani et al. 2002). There was an increase in the number of GFAP-positive cells in the cerebral cortex of HFD group, showing that obesity leads to astrocytic activation ( $F_{3,60}=6.538$ ,  $p=0.0007$ ) (Fig 2).

1 HFD+O group did not show the same increase in the number of GFAP-positive  
2 cells, which indicates that omega-3 may exert a protective role in the cerebral  
3 cortex by diminishing the activation state of astrocytes. Interestingly, there was  
4 no significant difference among groups in the number of GFAP-positive cell in  
5 the hippocampus ( $F_{3,164}=6.278$ ,  $p=0.43$ ) (Fig.3).  
6  
7

8  
9 The gene expression of the neuroinflammatory markers TNF- $\alpha$ , IL-6 and  
10 IL-10 was also determined in the cerebral cortex.. We found a significant  
11 increase of pro-inflammatory cytokines IL-6 ( $F_{3,21}=3.44$ ,  $p=0.03$ ) and TNF- $\alpha$   
12 ( $F_{3,29}=6.57$ ,  $p=0.001$ ) gene expression in HFD group. Once more, HFD+O rats  
13 exhibited a response similar to SD and SD+O, demonstrating that omega-3 may  
14 control obesity-induced neuroinflammation. The anti-inflammatory cytokine IL-  
15 10 did not show differences in gene expression among groups ( $F_{3,24}=0.45$ ,  
16  $p=0.72$ ) (Fig. 4).  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

## 25 Discussion

26  
27 In the present study, we showed that omega-3 supplementation is able to  
28 revert insulin resistance and the increase in visceral adiposity caused by HFD. It  
29 is well demonstrated that increased visceral fat is a causal factor of metabolic  
30 syndrome (Després and Lemieux 2006). The development of visceral adipose  
31 tissue also contributes to a heightened secretion of proinflammatory mediators,  
32 contributing to the systemic state of inflammation found in obesity (Gregor and  
33 Hotamisligil 2011). Although we did not find significant differences in plasma  
34 insulin and glycemia, HOMA-IR was significantly higher in HFD group. Omega-3  
35 supplementation ameliorates insulin sensitivity since HFD+O group showed  
36 HOMA-IR similar to rats fed standard diet. Our findings are in agreement with  
37 previous studies that demonstrated reduction in adiposity and improvement in  
38 insulin sensitivity when a high fat diet is associated with omega-3  
39 supplementation (de Sá et al. 2016; Rokling-Andersen et al. 2009; Storlien et al.  
40 1987). In the present study, we showed that HFD induced a higher weight gain  
41 than SD, independent of omega-3 administration. LeMieux *et al.* (2015), also  
42 reported that omega-3 did not interfere in total body weight in HFD fed mice.  
43 However, they found a reduction in adipocyte size and adipogenesis following  
44 omega-3 supplementation (LeMieux et al. 2015). Then, omega-3 exerts an  
45 important role in the maintenance of metabolic tissues homeostasis.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 In spite of the important metabolic repercussions of omega-3  
2 supplementation, we could not show any improvement in long-term memory  
3 related to omega-3 treatment. Our findings are in agreement with previous  
4 studies showing memory impairment in experimental models of obesity in  
5 rodents. Molteni *et al.* (2002) reported spatial memory deficits in female rats two  
6 months after they were fed a high saturated fat and refined sugar diet (Molteni  
7 *et al.* 2002). A similar diet administered for five months produced deficits in  
8 spatial learning and long-term memory evaluated in the 8-arm radial maze in  
9 adult male rats (Ullrich *et al.* 2010). In our study, 20 weeks of HFD with 45% of  
10 energy from fat also promoted memory impairment as showed by object  
11 recognition task. However, shorter HFD administration is already sufficient to  
12 induce cognitive deficits as demonstrated elsewhere. It was already shown that  
13 four to five weeks of high fat diet also produces spatial memory deficits in young  
14 rats (Gergerlioglu *et al.* 2016; Pathan *et al.* 2008).

15 In our study, omega-3 was administered for four weeks after 16 weeks of  
16 HFD, in order to evaluate if the effects caused by HFD could be reversed by  
17 omega-3. In this case, the results have shown that omega-3 did not exert a  
18 protective effect on animal recognition memory. We can assume that four  
19 weeks of omega-3 administration was not sufficient to cause an improvement in  
20 the recognition memory of these animals following a HFD. It was shown that 12  
21 weeks of administration of docosahexaenoic acid (DHA), a fatty acid from  
22 omega-3 family, promotes an improvement in spatial cognition (Tanabe *et al.*  
23 2004). Besides, in our study we used a higher dosage of omega-3 for a shorter  
24 period of time. We can speculate that a lower dose of omega-3 over a longer  
25 period may have a more positive effect on the memory. On the other hand,  
26 Sopian *et al.* (2015), found an improvement in cognitive performance after three  
27 weeks of fish oil supplementation, with a standard diet enriched with omega-3  
28 PUFAs (Sopian *et al.* 2015). Another reasonable explanation for our results is  
29 that omega-3 is unable to recover impairment in cognitive function caused by  
30 HFD. In Alzheimer's disease transgenic mice, omega-3 treatment did not  
31 promote any beneficial effect on cognition, suggesting that supplementation of  
32 these fatty acids do not protect against Alzheimer's disease in susceptible  
33 individuals (Arendash *et al.* 2007). However, we cannot exclude their potential  
34 in the prevention of cognitive decline. When eicosapentaenoic acid (EPA), also  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 from omega-3 family, was administered previously to amyloid- $\beta$  peptide  
2 infusion, there was an improvement in the learning ability of rats. Since the  
3 deposition of amyloid- $\beta$  peptide occurs mainly in the aging, this finding indicates  
4 that omega-3 supplementation may be a strategy to prevent age-related  
5 cognitive decline (Hashimoto et al. 2009).  
6  
7

8  
9 Increasing evidence demonstrates that besides cognitive impairment,  
10 HFD can promote insulin resistance, immune and synaptic changes in different  
11 brain areas (Liu et al. 2015; Petrov et al. 2015). Such alterations may promote  
12 tissue lesions to which the astrocytes react, elevating GFAP expression. These  
13 changes are directly related to neuroinflammation, since astrocytes, in  
14 association with microglia, are able to release inflammatory mediators, directly  
15 interfering on the nervous system milieu (Theodosis et al. 2008). Then,  
16 astrocytic activation, which is a marker of neuroinflammation, may be evaluated  
17 by a higher number of GFAP-positive cells. In obesity, neuroinflammation is well  
18 described in the hypothalamus, which is a primary site where signals coming  
19 from periphery arrive in the CNS (Cavadas et al. 2016; Miller and Spencer  
20 2014). However, there are a few studies focusing on obesity and  
21 neuroinflammation in other brain regions. In the present study, we showed an  
22 increase in astrocytic activation in the cerebral cortex of HFD group. However,  
23 when evaluating the effect of HFD on GFAP-immunoreactivity in the  
24 hippocampus, we didn't find any difference among experimental groups.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Baufeld *et al.* described the opposite effect, showing an increased number of  
astrocytes in the hippocampus but no in the cerebral cortex following 8 weeks of  
HFD (Baufeld et al. 2016). In a transgenic model of obesity and type II diabetes  
mellitus, GFAP-immunoreactivity was increased in the frontal and parietal  
cortex as well as in the hippocampus, indicating neuronal damage and  
astrogliosis due to the metabolic changes caused by obesity (Tomassoni et al.  
2013). Thus, despite the conflicting results on the brain areas that exhibit  
astrocytic activation in response to obesity, certainly this is an important  
neuroinflammatory response in this condition.

66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

In the present study, we observed that omega-3 exerts a protective effect  
in the brain by decreasing astrocytic activation in the cerebral cortex of HFD+O  
group. This finding demonstrates that even for a short period of  
supplementation, omega-3 is able to exert anti-inflammatory function. In

1 addition to interfering in inflammation processes, omega-3 can be incorporated  
 2 into the phospholipids of inflammatory cell membranes, altering inflammatory  
 3 processes. This change in fatty acid composition allows membranes to maintain  
 4 its fluidity and to modify the formation of lipid derivatives, being able to  
 5 influence, in this way, the function of cells involved in the inflammation (Yaqoob  
 6 and Shaikh 2010).  
 7  
 8  
 9

10 The anti-inflammatory effects of omega-3 PUFAs are well known. In  
 11 obesity, omega-3 prevents macrophage infiltration and decreases inflammatory  
 12 gene expression in adipose tissue (Todoric et al. 2006). Labrousse *et al.*, found  
 13 that two-month treatment with EPA/DHA prevented the increase in  
 14 proinflammatory cytokines expression in the hippocampus (Labrousse et al.  
 15 2012). In the present study, we found an increased mRNA expression of  
 16 proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in the cerebral cortex after HFD. This  
 17 proinflammatory profile in the brain caused by obesity is already shown in  
 18 previous studies (Sánchez-Sarasúa et al. 2016; Toyama et al. 2015). In  
 19 addition, the neuroinflammatory status has been related to cognitive decline in  
 20 obesity (Miller and Spencer 2014). In the present study, omega-3  
 21 supplementation following induction of obesity was able to restrain the increase  
 22 in cytokines expression in the cerebral cortex. Despite this, omega-3 did not  
 23 improve long-term memory. This result is probably explained by the fact that  
 24 omega-3 acts preventing inflammation and consequently, cognitive decline, but  
 25 it is not able to revert an already established neuronal and/or synaptic damage.  
 26 This assumption is reinforced by studies focused on aging, since in this  
 27 situation there is a neuroinflammatory profile.  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43

44 In conclusion, supplementation of omega-3 fatty acid for four weeks  
 45 following HFD was able to improve insulin sensitivity, decrease visceral  
 46 adiposity and diminish neuroinflammatory profile. These results emphasize the  
 47 anti-inflammatory role of this family of PUFAs not only in the periphery but also  
 48 in the CNS. However, the lack of a protective effect on the long-term recognition  
 49 memory after HFD suggests that omega-3 fatty acids are not able to revert  
 50 cognitive impairment already established. Thus, omega-3 supplementation  
 51 plays an important role to prevent more than revert neuronal function  
 52 impairment.  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

## Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

## Funding agencies

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## References

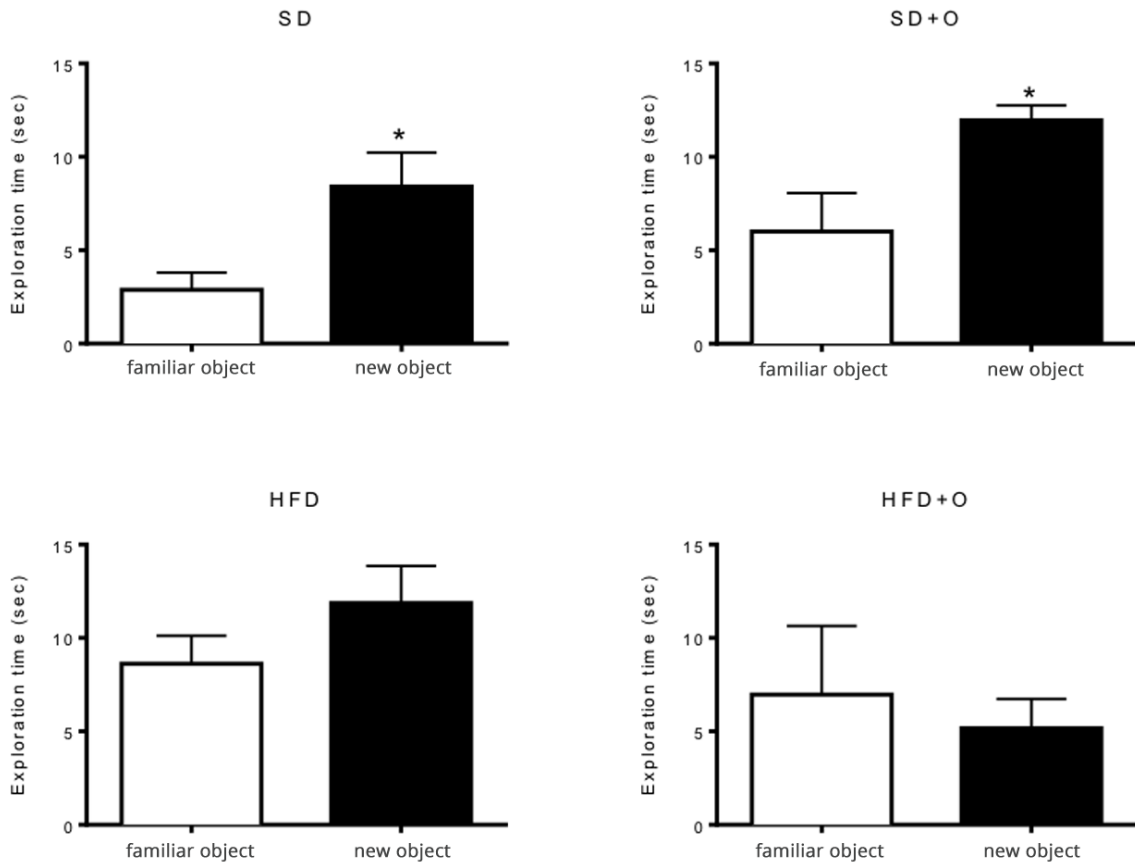
- Aghamohammadzadeh R, Heagerty AM (2012) Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue *Ann Med* 44 Suppl 1:S74-84 doi:10.3109/07853890.2012.663928
- Arendash GW, Jensen MT, Salem N, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, Leighty R, Potter H (2007) A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice *Neuroscience* 149:286-302 doi:10.1016/j.neuroscience.2007.08.018
- Baufeld C, Osterloh A, Prokop S, Miller KR, Heppner FL (2016) High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia *Acta Neuropathol* 132:361-375 doi:10.1007/s00401-016-1595-4
- Bulló M, Casas-Agustench P, Amigó-Correig P, Aranceta J, Salas-Salvadó J (2007) Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet *Public Health Nutr* 10:1164-1172 doi:10.1017/S1368980007000663
- Caletti G, Almeida FB, Agnes G, Nin MS, Barros HM, Gomez R (2015) Antidepressant dose of taurine increases mRNA expression of GABAA receptor  $\alpha 2$  subunit and BDNF in the hippocampus of diabetic rats *Behav Brain Res* 283:11-15 doi:10.1016/j.bbr.2015.01.018
- Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions *Alzheimers Dement* 12:719-732 doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010
- Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, Cinque C, Tomassoni D, Azmitia E, Angelucci L, Amenta F (2002) Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus *Mech Ageing Dev* 123:481-490
- Cavadas C, Aveleira CA, Souza GF, Velloso LA (2016) The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - from obesity to ageing *Nat Rev Endocrinol* 12:723-733 doi:10.1038/nrendo.2016.107
- Cook NL, Kleinig TJ, van den Heuvel C, Vink R (2010) Reference genes for normalising gene expression data in collagenase-induced rat intracerebral haemorrhage *BMC Mol Biol* 11:7 doi:10.1186/1471-2199-11-7
- de Moura AC, Lazzari VM, Becker RO, Gil MS, Ruthschilling CA, Agnes G, Almeida S, da Veiga AB, Lucion AB, Giovenardi M (2015) Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior *Neurosci Res* 99:8-15 doi:10.1016/j.neures.2015.05.003
- de Sá RD, Crisma AR, Cruz MM, Martins AR, Masi LN, do Amaral CL, Curi R, Alonso-Vale MI (2016) Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes *J Physiol* 594:6301-6317 doi:10.1113/JP272541
- Demark-Wahnefried W, Platz EA, Ligibel JA, Blair CK, Courneya KS, Meyerhardt JA, Ganz PA, Rock CL, Schmitz KH, Wadden T, Philip EJ, Wolfe B, Gapstur SM, Ballard-Barbash R, McTiernan A, Minasian L, Nebeling L, Goodwin PJ (2012) The role of obesity in cancer

- survival and recurrence *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21:1244-1259  
doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0485
- 1  
2 Després JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome *Nature* 444:881-887  
3 doi:10.1038/nature05488
- 4  
5 Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in  
6 rats. 1: Behavioral data *Behav Brain Res* 31:47-59
- 7  
8 Gergerlioglu HS, Oz M, Demir EA, Nurullahoglu-Atalik KE, Yerlikaya FH (2016) Environmental  
9 enrichment reverses cognitive impairments provoked by Western diet in rats: Role of  
10 corticosteroid receptors *Life Sci* 148:279-285 doi:10.1016/j.lfs.2016.02.011
- 11  
12 Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity *Annu Rev Immunol*  
29:415-445 doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- 13  
14 Haan MN, Wallace R (2004) Can dementia be prevented? Brain aging in a population-based  
15 context *Annu Rev Public Health* 25:1-24  
doi:10.1146/annurev.publhealth.25.101802.122951
- 16  
17 Hashimoto M, Hossain S, Tanabe Y, Kawashima A, Harada T, Yano T, Mizuguchi K, Shido O  
18 (2009) The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of  
19 spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta(1-40) *J Nutr Biochem*  
20 20:965-973 doi:10.1016/j.jnutbio.2008.08.009
- 21  
22 Hein AM, O'Banion MK (2009) Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins *Mol*  
23 *Neurobiol* 40:15-32 doi:10.1007/s12035-009-8066-z
- 24  
25 Högyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG (2003) Neuroprotective effect of  
26 developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in  
27 infant rats *Neuroscience* 119:999-1012
- 28  
29 Hossain P, Kavar B, El Nahas M (2007) Obesity and diabetes in the developing world--a  
30 growing challenge *N Engl J Med* 356:213-215 doi:10.1056/NEJMp068177
- 31  
32 Hwang LL, Wang CH, Li TL, Chang SD, Lin LC, Chen CP, Chen CT, Liang KC, Ho IK, Yang WS, Chiou  
33 LC (2010) Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and  
34 learning, and synaptic plasticity deficits in mice *Obesity (Silver Spring)* 18:463-469  
35 doi:10.1038/oby.2009.273
- 36  
37 Kenchaiah S, Gaziano JM, Vasan RS (2004) Impact of obesity on the risk of heart failure and  
38 survival after the onset of heart failure *Med Clin North Am* 88:1273-1294  
39 doi:10.1016/j.mcna.2004.04.011
- 40  
41 Kohman RA, Rhodes JS (2013) Neurogenesis, inflammation and behavior *Brain Behav Immun*  
27:22-32 doi:10.1016/j.bbi.2012.09.003
- 42  
43 Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Grégoire S, Bretillon L, Layé S (2012)  
44 Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and  
45 memory impairment in aged mice *PLoS One* 7:e36861 doi:10.1371/journal.pone.0036861
- 46  
47 Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G (2008) Selection of reference genes  
48 for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model *BMC Mol Biol* 9:53  
49 doi:10.1186/1471-2199-9-53
- 50  
51 LeMieux MJ, Kalupahana NS, Scoggin S, Moustaid-Moussa N (2015) Eicosapentaenoic acid  
52 reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an  
53 adiposity-independent manner *J Nutr* 145:411-417 doi:10.3945/jn.114.202952
- 54  
55 Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is  
56 necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance  
57 of myelination *Neuron* 17:607-615
- 58  
59 Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, Yin F, Cadenas E (2015) High-fat diet  
60 induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity *PLoS One*  
10:e0128274 doi:10.1371/journal.pone.0128274
- 61  
62 Lotufo PA (2000) Increasing obesity in Brazil: predicting a new peak of cardiovascular mortality  
63 Sao Paulo Med J 118:161-162
- 64  
65

- 1 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis  
2 model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose  
3 and insulin concentrations in man *Diabetologia* 28:412-419
- 4 Maury E, Brichard SM (2010) Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and  
5 metabolic syndrome *Mol Cell Endocrinol* 314:1-16 doi:10.1016/j.mce.2009.07.031
- 6 Mello MM, Studdert DM, Brennan TA (2006) Obesity--the new frontier of public health law *N*  
7 *Engl J Med* 354:2601-2610 doi:10.1056/NEJMp060227
- 8 Miller AA, Spencer SJ (2014) Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive  
9 impairment *Brain Behav Immun* 42:10-21 doi:10.1016/j.bbi.2014.04.001
- 10 Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F (2002) A high-fat, refined sugar diet  
11 reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning  
12 *Neuroscience* 112:803-814
- 13 Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB (2014)  
14 Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for  
15 the search of novel therapeutic approaches *Front Cell Neurosci* 8:112  
16 doi:10.3389/fncel.2014.00112
- 17 Nattiv A, Loucks AB, Manore MM, Sanborn CF, Sundgot-Borgen J, Warren MP, Medicine ACoS  
18 (2007) American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad *Med*  
19 *Sci Sports Exerc* 39:1867-1882 doi:10.1249/mss.0b013e318149f111
- 20 Nelissen K, Smeets K, Mulder M, Hendriks JJ, Ameloot M (2010) Selection of reference genes  
21 for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR *J*  
22 *Neurosci Methods* 187:78-83 doi:10.1016/j.jneumeth.2009.12.018
- 23 Nemeth M, Millesi E, Wagner KH, Wallner B (2015) Sex-Specific Effects of Diets High in  
24 Unsaturated Fatty Acids on Spatial Learning and Memory in Guinea Pigs *PLoS One*  
25 10:e0140485 doi:10.1371/journal.pone.0140485
- 26 Nicolas G, Bazan, Miguel F, Molina, Gordon WC (2012) Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics  
27 in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration,  
28 Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Nutr.*
- 29 Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P (2008) Rosiglitazone attenuates the cognitive  
30 deficits induced by high fat diet feeding in rats *Eur J Pharmacol* 589:176-179  
31 doi:10.1016/j.ejphar.2008.06.016
- 32 Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesús G, Beas-Zarate C, Carro  
33 E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Camins A (2015) High-fat diet-induced  
34 deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies  
35 contribute to Alzheimer disease pathology in rodents *Biochim Biophys Acta* 1852:1687-  
36 1699 doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004
- 37 Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ (2010)  
38 Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain  
39 inflammation *J Neuroimmunol* 219:25-32 doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.010
- 40 Ransohoff RM, Schafer D, Vincent A, Blachère NE, Bar-Or A (2015) Neuroinflammation: Ways in  
41 Which the Immune System Affects the Brain *Neurotherapeutics* 12:896-909  
42 doi:10.1007/s13311-015-0385-3
- 43 Rokling-Andersen MH, Rustan AC, Wensaas AJ, Kaalhus O, Wergedahl H, Røst TH, Jensen J,  
44 Graff BA, Caesar R, Drevon CA (2009) Marine n-3 fatty acids promote size reduction of  
45 visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar  
46 rats fed a high-fat diet *Br J Nutr* 102:995-1006 doi:10.1017/S0007114509353210
- 47 Rossato JI, Bevilacqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2007) On the role  
48 of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object  
49 recognition memory *Learn Mem* 14:36-46 doi:10.1101/lm.422607
- 50 Sánchez-Sarasúa S, Moustafa S, García-Avilés Á, López-Climent MF, Gómez-Cadenas A, Olucha-  
51 Bordonau FE, Sánchez-Pérez AM (2016) The effect of abscisic acid chronic treatment on  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

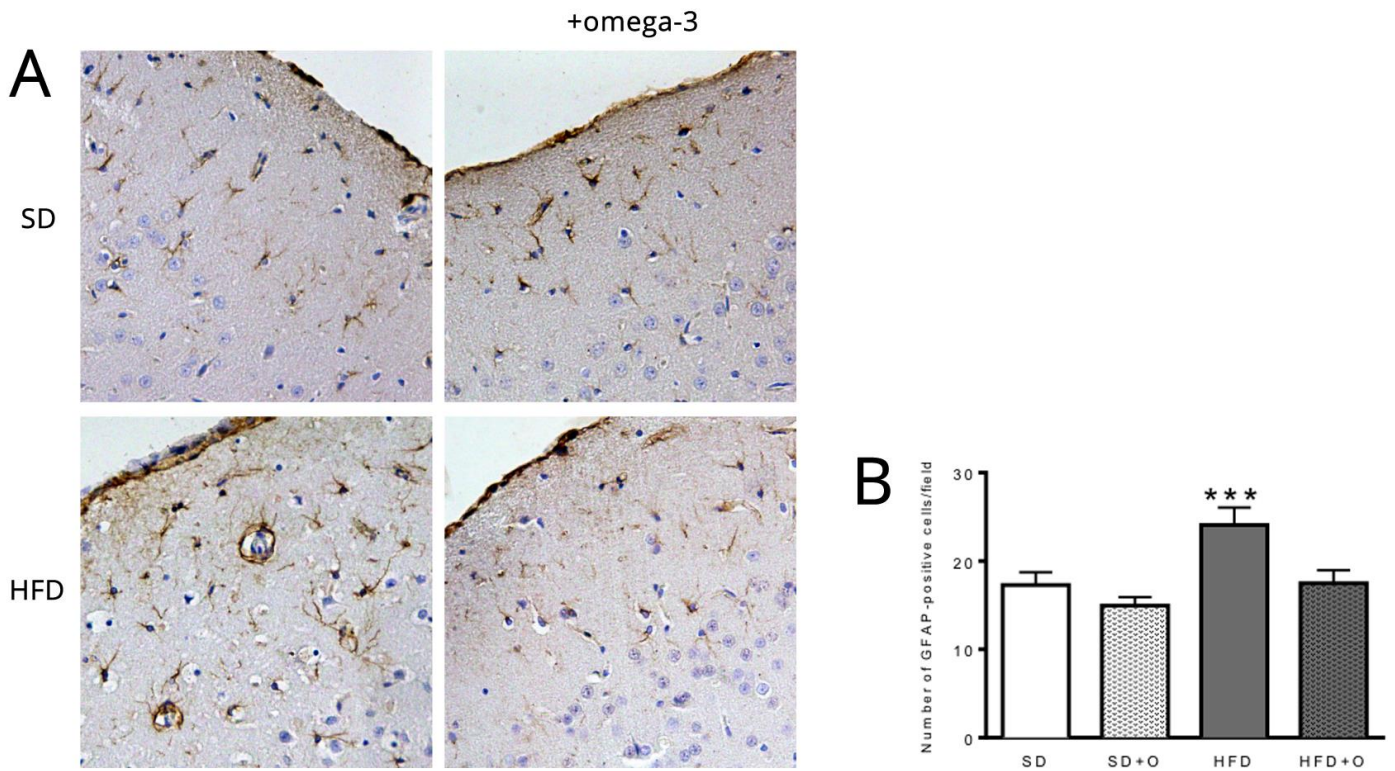
- neuroinflammatory markers and memory in a rat model of high-fat diet induced neuroinflammation *Nutr Metab (Lond)* 13:73 doi:10.1186/s12986-016-0137-3
- 1  
2 Shah A, Mehta N, Reilly MP (2008) Adipose inflammation, insulin resistance, and  
3 cardiovascular disease *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 32:638-644  
4 doi:10.1177/0148607108325251  
5
- 6 Sopian NF, Ajat M, Shafie NI, Noor MH, Ebrahimi M, Rajion MA, Meng GY, Ahmad H (2015)  
7 Does Short-Term Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Influence Brain  
8 Hippocampus Gene Expression of Zinc Transporter-3? *Int J Mol Sci* 16:15800-15810  
9 doi:10.3390/ijms160715800
- 10 Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS (1987) Fish oil prevents  
11 insulin resistance induced by high-fat feeding in rats *Science* 237:885-888
- 12 Tanabe Y, Hashimoto M, Sugioka K, Maruyama M, Fujii Y, Hagiwara R, Hara T, Hossain SM,  
13 Shido O (2004) Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is  
14 associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus *Clin Exp Pharmacol*  
15 *Physiol* 31:700-703 doi:10.1111/j.1440-1681.2004.04068.x
- 16 Tapia-González S, García-Segura LM, Tena-Sempere M, Frago LM, Castellano JM, Fuente-  
17 Martín E, García-Cáceres C, Argente J, Chowen JA (2011) Activation of microglia in specific  
18 hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition *J*  
19 *Neuroendocrinol* 23:365-370 doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02113.x
- 20 Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2008) Activity-dependent structural and functional  
21 plasticity of astrocyte-neuron interactions *Physiol Rev* 88:983-1008  
22 doi:10.1152/physrev.00036.2007
- 23 Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhäusl W, Stulnig TM  
24 (2006) Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is  
25 prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids *Diabetologia* 49:2109-2119  
26 doi:10.1007/s00125-006-0300-x
- 27 Tomassoni D, Nwankwo IE, Gabrielli MG, Bhatt S, Muhammad AB, Lokhandwala MF, Tayebati  
28 SK, Amenta F (2013) Astroglialosis in the brain of obese Zucker rat: a model of metabolic  
29 syndrome *Neurosci Lett* 543:136-141 doi:10.1016/j.neulet.2013.03.025
- 30 Toyama K, Koibuchi N, Hasegawa Y, Uekawa K, Yasuda O, Sueta D, Nakagawa T, Ma M, Kusaka  
31 H, Lin B, Ogawa H, Ichijo H, Kim-Mitsuyama S (2015) ASK1 is involved in cognitive  
32 impairment caused by long-term high-fat diet feeding in mice *Sci Rep* 5:10844  
33 doi:10.1038/srep10844
- 34 Ullrich C, Pirchl M, Humpel C (2010) Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic  
35 system and leads to memory deficits *Mol Cell Neurosci* 45:408-417  
36 doi:10.1016/j.mcn.2010.08.001
- 37 van de Sande-Lee S, Velloso LA (2012) [Hypothalamic dysfunction in obesity] *Arq Bras*  
38 *Endocrinol Metabol* 56:341-350
- 39 Wannamethee SG, Shaper AG (1999) Weight change and duration of overweight and obesity in  
40 the incidence of type 2 diabetes *Diabetes Care* 22:1266-1272
- 41 Yaqoob P, Shaikh SR (2010) The nutritional and clinical significance of lipid rafts *Curr Opin Clin*  
42 *Nutr Metab Care* 13:156-166 doi:10.1097/MCO.0b013e328335725b
- 43 Zimmermann-Peruzatto JM, Lazzari VM, Agnes G, Becker RO, de Moura AC, Guedes RP, Lucion  
44 AB, Almeida S, Giovenardi M (2016) The Impact of Oxytocin Gene Knockout on Sexual  
45 Behavior and Gene Expression Related to Neuroendocrine Systems in the Brain of Female  
46 Mice *Cell Mol Neurobiol* doi:10.1007/s10571-016-0419-3
- 47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 1



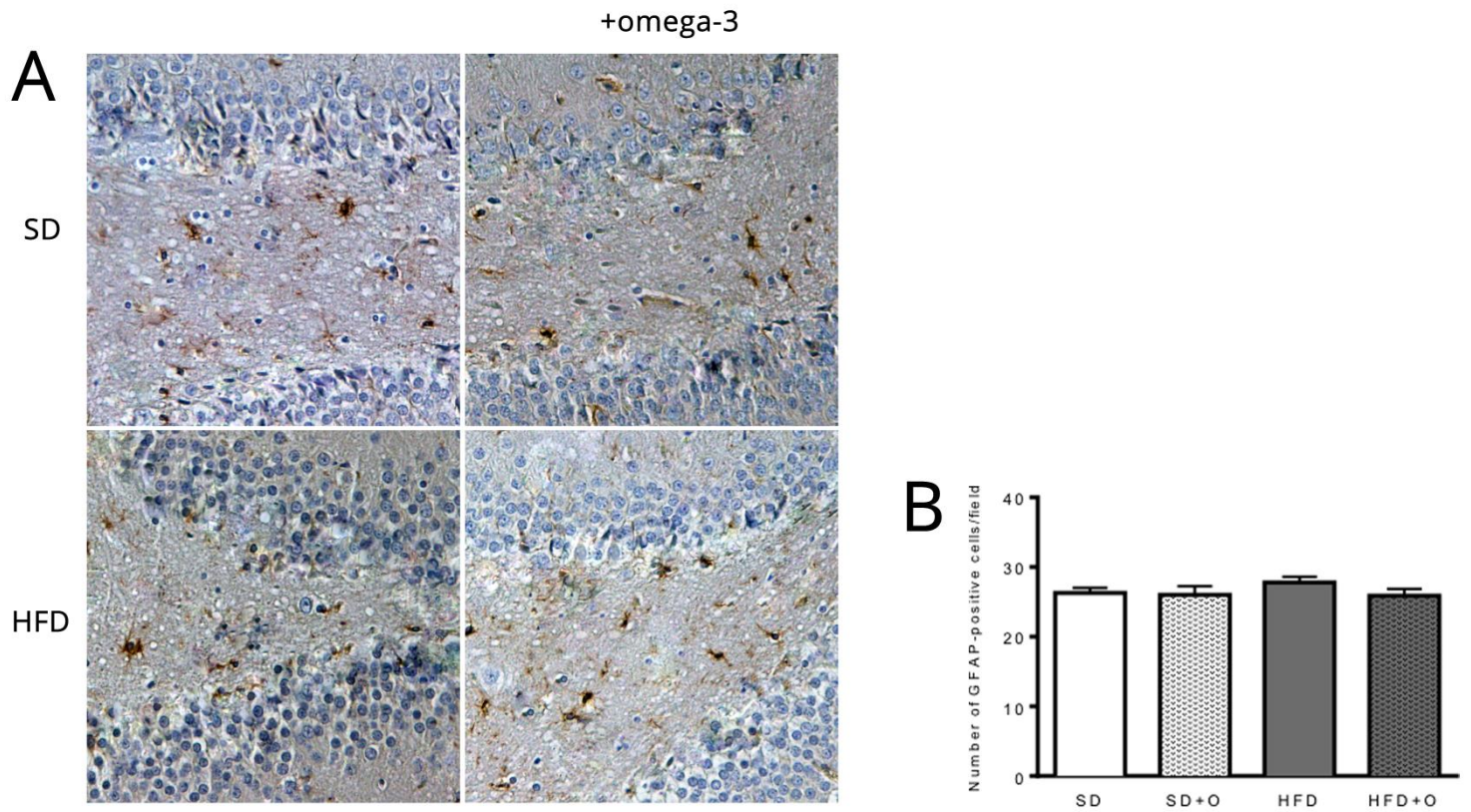
**Figure 1:** Exploration time in the object recognition test. In SD and SD+O groups, animals spent more time exploring the new object in the retention session. HFD and HFD+O groups did not show differences in the exploration time of familiar and unfamiliar object. Omega-3 did not exert a protective effect on recognition memory. \* $p < 0.05$ .  $n = 7-8$  for each group. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Figure 2



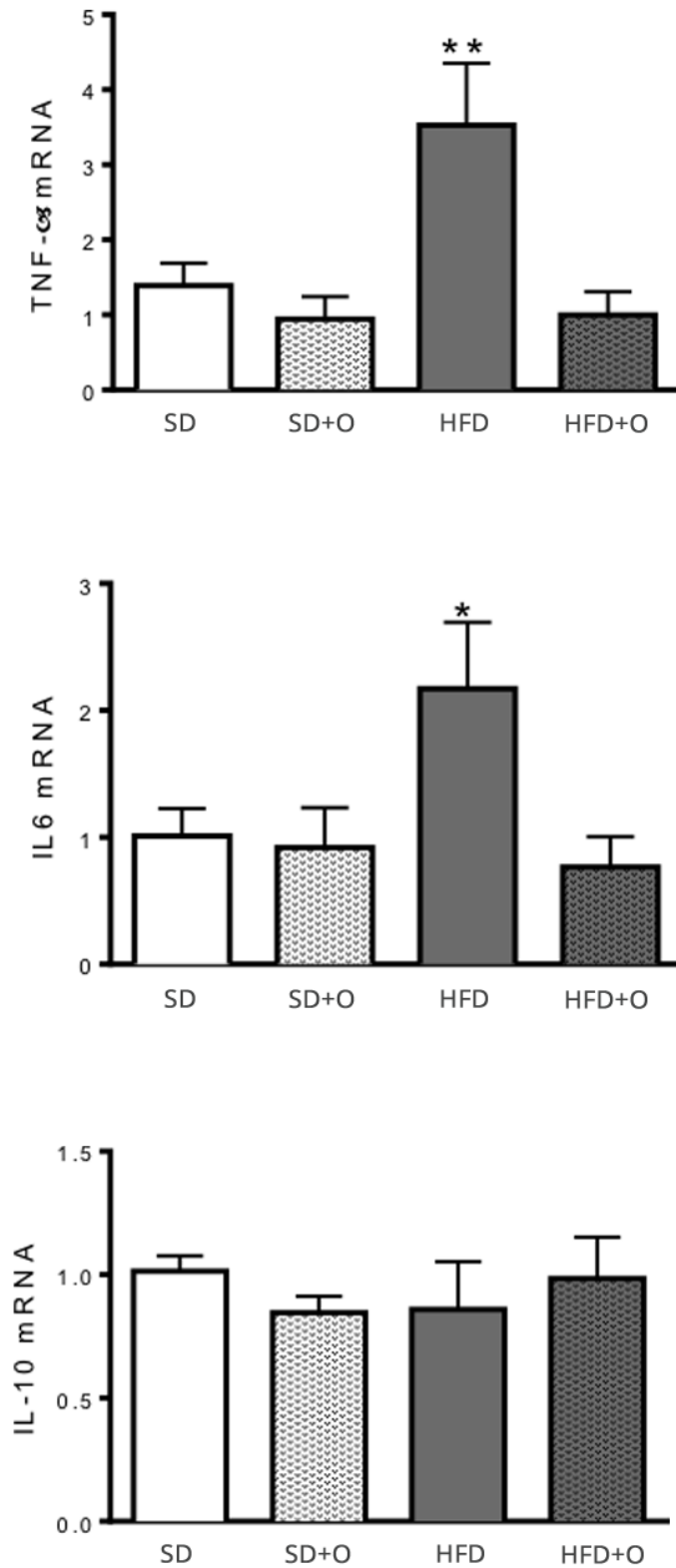
**Figure 2:** GFAP immunoreactivity in the cerebral cortex. The number of GFAP-positive cells was significantly higher in HFD group. A) Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity in the cerebral cortex. B) Data are the mean number of cells from two to three random fields from the cerebral cortex in six nonadjacent sections. \*\*\* $p < 0.001$ .  $n = 5$  animals for each group. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Figure 3



**Figure 3:** GFAP immunoreactivity in the hippocampus. There was no differences in GFAP-positive cells between groups. A) Representative photomicrographs of GFAP immunoreactivity in the hippocampus. B) Data are the mean number of cells from two to three random fields from the hippocampus in six nonadjacent sections. n=5 animals for each group. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Figure 4



**Figure 4:** mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in the cerebral cortex. Pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression increased in HFD group. IL-10 did not show differences between groups. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ .  $n = 5-11$  for each group. Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Table 1

**Table 1.** Primer sequences used in the study

Gene	Primer F	Primer R
TNF- $\alpha$	5' TGGCGTGGTCATCCGTTCTCTACC3'	5' CCCGCAATCCAGGCCACTACTT3'
IL-6	5' GACCAAGACCAT CCAACTCATC3'	5' GCTTAGGCATAGCACACTAGG3'
IL-10	5' AATTCCTGGGTGAGAAGCTG3'	5'TCATGGCCTTGTAGACACCTTG3'
CypA	5'TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG3'	5' CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC3'
Act $\beta$	5'TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG3'	5' TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT3'

Abbreviations: TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; IL-6, interleukin 6;IL-10, interleukin 10; CypA, cyclophilin A; Act $\beta$ , actin-beta.

Table 2

**Table 2.** Effects of High fat diet and omega-3 treatment on weight gain, visceral fat depot, glycemia, plasm insulin and HOMA-IR.

	SD (n= 11)	SD+O (n= 8)	HFD (n= 12)	HFD+O (n= 9)
Weight gain (g)	5.27 ± 10.62	-0.25 ± 12.21	66.33 ± 9.37*	40.00 ± 7.39*
Visceral fat weight (g)	3.49 ± 0.625	3.29 ± 0.534	10.77± 2.186 <sup>#</sup>	6.39 ± 0.967
Glycemia (mg/dL)	129.4 ± 4.189	135.1 ± 8.084	151.1 ± 5.894	133.3 ± 6.064
Plasm insulin (ng/mL)	0.198 ± 0.073	0.196 ± 0.080	0.397 ± 0.080	0.186 ± 0.037
HOMA-IR	1.014 ± 0.3688	1.141 ± 0.4580	2.749 ± 0.6191 <sup>#</sup>	1.115 ± 0.2128

Data are expressed as mean ± SEM

\*p<0.05 versus SD and SD+O

<sup>#</sup>p<0.05 versus SD, SD+O and HFD+O

#### 4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o consumo de uma dieta hiperlipídica aumentou o depósito de gordura visceral dos animais, e a suplementação com ácido graxo ômega-3 foi capaz de prevenir este aumento nos ratos obesos. Além disso, a suplementação de ômega-3 por quatro semanas, após o consumo da dieta hiperlipídica, foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina. Os resultados demonstram que a obesidade causa comprometimento da memória de longo prazo nos animais e que o ômega-3 não exerceu nenhum efeito protetor sobre este parâmetro comportamental. Observamos que a dieta hiperlipídica causou um aumento no número de células imunorreativas ao GFAP no córtex cerebral dos animais, indicando ativação astrocitária, e o ômega-3 demonstrou exercer um papel protetor ao diminuir o estado de ativação dos astrócitos. Ao determinar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-6, observamos um aumento significativo no córtex cerebral no grupo com dieta hiperlipídica. O ácido graxo ômega-3 demonstrou que pode controlar a neuroinflamação induzida pela obesidade. Portanto, sugerimos que os ácidos graxos ômega-3 não são capazes de reverter deterioração cognitiva quando já está estabelecida. Contudo, diversos estudos indicam que a suplementação com ômega-3 melhora o desempenho cognitivo em modelos experimentais em animais e também em humanos. Sendo assim, concluímos que possivelmente, o papel principal do ômega-3 seja a prevenção do declínio cognitivo e não revertê-lo. Além disso, a importante ação anti-inflamatória desses ácidos graxos evidenciada no sistema nervoso central, reforça seu papel como agentes neuroprotetores.

## Anexo 1

### REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA METABOLIC BRAIN DISEASE

#### *Instructions for Authors*

##### TYPES OF PAPERS

Metabolic Brain Disease is committed to high standards of presentation and will consider:

Research Papers: No page limitations but typical length is 6000 words with 60 references and a total of 8 figures and tables.

Short Communications: Usually, 1500 words with no more than 2 tables or figures.

Review Articles: No page limitations but typical length is 6000 words.

Editorials: Approximately 1,000 words with 10 references.

Please contact the Editor to discuss the suitability of topics.

##### TITLE PAGE

## Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

## Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

##### TEXT

## Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

### SCIENTIFIC STYLE

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

### REFERENCES

## Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article
  - Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
  - Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
    - Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.*  
doi:10.1007/s001090000086

- Book  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
  - Book chapter  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
  - Online document  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.  
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
  - Dissertation  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- [ISSN LTWA](#)  
If you are unsure, please use the full journal title.  
For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
  - [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

#### TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

## Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

## Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

## Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

## Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

## Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

## Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

## Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

## Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

## Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

## Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

## Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

## Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

## Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

## Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

## Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

## Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

## Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

## Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

## Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked “retracted” and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author’s institution may be informed.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals

- **Informed consent**  
Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.  
The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.  
The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

#### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):  
The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

## 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in

accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

## 2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

## Anexo 2

### CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

#### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 142/14 Parecer 261/14

2) DATA DO PARECER: 09/04/2014

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeitos da obesidade sobre a resposta inflamatória no sistema nervoso central e o desenvolvimento de alterações morfofisiológicas predisponentes à deurodegeneração

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Renata Padilha Guedes

5) RESUMO DO PROJETO:

Consta resumo adequado no projeto

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar se a obesidade induzida por dieta hiperlipídica altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica e ativa vias pró-inflamatórias no sistema nervoso central predispondo a alterações celulares típicas da doença de Alzheimer.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Relevância e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Materiais e Métodos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim  Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B  C  D  E

Justifique:

Espécie:  Número Amostral:

Redução Amostral:  Sim  Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:  Sim  Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:  Sim  Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:  Adequada  Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:  Adequada  Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Explicar no projeto como será realizada a manipulação dos animais: onde serão alojados antes da injeção de estreptozotocina, onde ficarão antes e depois dos testes comportamentais. Ver comentários abaixo.

Analgesia dos animais (se aplicável):  Adequada  Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável):  Adequada  Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Não se aplica por não haver manipulação cirúrgica.

Eutanásia dos animais (se aplicável):  Adequada  Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): UFCSPA e UFRGS.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS**

<b>Data</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Quantidade</b>
-------------	----------------	-------------	-------------------

**12) RECOMENDAÇÃO:**

- Aprovado  
 Com Pendência  
 Não aprovado

**Comentários gerais sobre o projeto:**

Todos os questionamentos foram respondidos.