



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

GABRIELA CRISTINA DE PAULA

**A MODULAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO NO SNC:** dos Hábitos  
Alimentares aos Circuitos Neuroendócrinos

FLORIANÓPOLIS

2020

Gabriela Cristina de Paula

**A MODULAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO NO SNC:**  
dos Hábitos Alimentares aos Circuitos Neuroendócrinos

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de doutora em  
Bioquímica

Orientador: Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem

Coorientador: Profa. Dra. Manuella Pinto Kaster

Profa. Dra. Jade de Oliveira

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Paula, Gabriela Cristina

A modulação do balanço energético no SNC: : dos hábitos alimentares aos circuitos neuroendócrinos / Gabriela Cristina de Paula ; orientadora, Andreza Fabro de Bem, coorientadora, Manuella Pinto Kaster, coorientadora, Jade de Oliveira, 2020.

102 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. dieta hiperlipídica. 3. cognição. 4. AgRP. 5. Inflamação. I. de Bem, Andreza Fabro. II. Kaster, Manuella Pinto. III. de Oliveira, Jade IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. V. Título.

Gabriela Cristina de Paula  
**A MODULAÇÃO DO BALANÇO ENERGÉTICO NO SNC: dos Hábitos Alimentares aos**  
Circuitos Neuroendócrinos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcelo Oliveira Dietrich, Dr.  
Yale School of Medicine

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Carla Tasca, Dr(a).  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

---

Prof. Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa

---

Prof. Dr.(a) Andreza Fabro de Bem  
Orientador(a)

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2020.

Este trabalho é dedicado aos principais incentivadores e responsáveis pela minha educação. Meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas fizeram parte dessa caminhada, porém não poderia deixar de registrar aqui meus sinceros agradecimentos:

À Professora Dra. Andreza Fabro de Bem, minha orientadora, por todo incentivo, por acreditar tanto no potencial de seus alunos, instigar nossa curiosidade em explorar o novo todos os dias e pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho. És um exemplo de pesquisadora.

À minha coorientadora Profa. Dra. Jade de Oliveira, que ao longo desses anos se tornou uma grande amiga, sempre disponível para discutirmos hipóteses e resultados. Agradeço por toda dedicação e aprendizado.

À minha coorientadora Profa. Dra. Manuella Kaster, por compartilhar sua experiência na pesquisa e apontar novas ideias, pelas discussões científicas, apoio e carinho.

À Daiane, outra grande amizade que nasceu do ambiente de trabalho. Por todas as discussões científicas, troca de ideias e experiências, incentivos e conselhos, sou muito grata.

Ao Dr. Giuseppe D'Agostino que me recebeu em seu laboratório no Reino Unido para a realização do doutorado sanduíche, proporcionando-me uma experiência de crescimento profissional e pessoal. Pela sua confiança e apoio científico.

Aos Professores membros da banca de qualificação: Dra. Simone van de Sande-lee, Dra. Joana Gaspar e Dr. Eduardo G. Moreira, pelos apontamentos críticos, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram dando maior consistência e qualidade a este trabalho.

Aos técnicos do LAMEB, Denis, Vanessa, Chirle, Emily e Demetrio pela disponibilidade e auxílio na utilização de equipamentos.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos e exemplos passados durante o doutorado.

Aos meus pais, Sérgio e Tânia, pelo amor sem medidas, por terem sido o meu exemplo a seguir, por toda dedicação e preocupação com a minha educação e carreira, por todo apoio e incentivo nessa jornada, por tudo o que sou hoje.

Aos meus irmãos, Fernando e Pedro, pelo carinho a mim dedicado sempre, pela amizade e companheirismo e por sempre estarem por perto, me apoiando, incentivando e comemorando todas as conquistas.

A todos os colaboradores e amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

À CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

## Lista de Publicações durante o período de doutoramento

1. **De Paula GC**, Brunetta HS, Engel DF, Gaspar J, Velloso LA, de Oliveira J, De Bem AF. Rapid impairment of hippocampal function by intervention of high-fat diet in mice. Em submissão.
2. **De Paula GC**, de Oliveira J, Engel D, Lopes SC, Moreira ELG, Figueiredo CP, Prediger RD, De Bem AF. Red wine consumption mitigates the cognitive impairments in low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr<sup>-/-</sup>) mice. *Nutritional Neuroscience*. 2020 Jan, 7:1-11.
3. De Oliveira J, Engel DF, **De Paula GC**, Melo HM, Lopes SC, Prediger RD, Gabilan NH, Moreira ELG, Ferreira ST, De Bem AF. LDL receptor deficiency does not alter brain amyloid- $\beta$  levels but causes an exacerbation of apoptosis. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2020, 73(2):585-596.
4. Brunetta HS, **De Paula GC**, Fritzen M, Cecchini MS, Santos GJ, Nazari EM, Rafacho A, De Bem AF, Nunes EA. Leucine increases muscle mitochondrial respiration and attenuates glucose intolerance in diet-induced obesity in Swiss mice. *Journal of Functional Foods*. 2019 62:103544.
5. Brunetta HS, **De Paula GC**, De Oliveira J, Martins EL, Dos Santos GJ, Filho AG, Rafacho A, De Bem AF, Nunes EA. Decrement in resting and insulin-stimulated soleus muscle mitochondrial respiration is an early event in diet-induced obesity in mice. *Experimental Physiology*. 2018 1:1-32.

## RESUMO

Mundialmente, o aumento do consumo de dietas com alto teor de gorduras e carboidratos está relacionado ao crescente número de indivíduos com sobrepeso e obesidade. O cérebro é um regulador chave do metabolismo energético e o hipotálamo, especificamente, contém neurônios orexígenos e anorexígenos (que integram sinais metabólicos gerados periféricamente, modulando o apetite. Por outro lado, pesquisas emergentes apontam a susceptibilidade do hipocampo a danos por fatores alimentares. Nossa hipótese neste estudo é de que o alto consumo de gorduras na dieta, leva não somente a alterações hipotalâmicas, como também hipocampais, prejudicando sua correta funcionalidade no controle do balanço energético. Para isso, avaliamos o impacto do consumo da dieta hiperlipídica, de forma temporal em camundongos, sobre diversos fatores que podem culminar em alterações funcionais, comportamentais e bioquímicas associadas a um aumento da susceptibilidade do sistema nervoso central à neurodegeneração. Investigamos a função cognitiva e de humor, bem como a integridade da barreira hematoencefálica e as funções sináptica, mitocondrial e inflamatória. Mostramos que a memória de reconhecimento e o comportamento humoral estão comprometidos após apenas 3 e 5 dias de ingestão da dieta hiperlipídica, respectivamente. Esses eventos são acompanhados por alterações detectáveis nos neurônios pré-sinápticos, observados após 7 dias de dieta hiperlipídica. A função mitocondrial hipocampal também é afetada, assim como a ativação astrocitária, mesmo que visualizadas após um período maior do consumo da dieta (28 dias). Também demonstramos que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são os primeiros mecanismos modulados pela dieta, ocorrendo a partir do segundo dia de ingestão de alto teor de gordura saturada. Quando tratados com Infliximab, anti-inflamatório antagonista ao TNF- $\alpha$ , e concomitantemente submetidos à dieta hiperlipídica, as alterações comportamentais e da BHE foram prevenidas. Ainda, buscamos avaliar a regulação do apetite durante processos inflamatórios sistêmicos. Para isso, investigamos a possível ligação entre os neurônios orexígenos AgRP e a endotoxemia, a fim de esclarecer o mecanismo biológico que governa um aparente paradoxo, o de reduzir o consumo de alimentos durante um processo de alta demanda de energia, como inflamação sistêmica. Ao avaliarmos a atividade dos neurônios AgRP, observamos que estes se mantêm ativos sob endotoxemia induzida por injeção de LPS, detectam o déficit calórico no estado de jejum, mas não promovem alimentação, mantendo estado de anorexia. Demonstramos que durante a inflamação sistêmica, a barreira hematohipotalâmica (BHH) sofre aumento na sua permeabilidade, com alterações na expressão da ocludina, permitindo a infiltração de linfócitos T. As células T aumentam a expressão da elastase leucocitária quando os neurônios AgRP estão ativados, sendo reduzidas durante a inflamação. Ao mesmo tempo, a atividade proteolítica da granzima B encontra-se aumentada durante o estado de inflamação sistêmica e ativação dos neurônios AgRP. Os efeitos benéficos da atividade de AgRP sobre a inflamação também puderam ser observados com a redução da expressão proteica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na fase aguda da doença, além de reduzir também a expressão gênica de diversas citocinas pró-inflamatórias no cólon, o que comprova a comunicação cérebro-sistema imune e reguladores da atividade imune mediada pelo sistema nervoso central.

**Palavras-chave:** Dieta hiperlipídica. Metabolismo energético. Cognição. Transtornos de humor. Barreira hematoencefálica. Inflamação. Neurônios AgRP.

## ABSTRACT

Worldwide, the increase in consumption of high-fat (HFD) and high-carbohydrate diets is related to the growing number of overweight and obese individuals. The brain is a key regulator of energy metabolism, and the hypothalamus specifically, contains orexigenic and anorectic neurons that integrate peripherally generated metabolic signals, modulating appetite. On the other hand, emerging research points to the hippocampus' susceptibility to damage by dietary factors. Our hypothesis in this study is that the high consumption of fats in the diet, leads not only to hypothalamic changes, but also hippocampals, impairing its correct functionality in energy balance control. To this, we sought to evaluate the impact of a high-fat diet consumption in mice, in a time-course way, on several factors that may culminate in functional, behavioral and biochemical changes associated with an increased susceptibility of the central nervous system to neurodegeneration. We investigated cognitive and mood function, as well as the integrity of the blood-brain barrier and synaptic, mitochondrial and inflammatory functions. We have shown that recognition memory and mood behavior are compromised after only 3 and 5 days of HFD, respectively. These events are accompanied by detectable changes in presynaptic neurons, observed after 7 days of HFD. The hippocampal mitochondrial function is also affected, as well as astrocyte activation, even if seen after a longer period of consumption of the diet (28 days). We also demonstrated that the increased blood-brain barrier (BBB) permeability and the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , are the first mechanisms modulated by the diet, occurring from the second day of high saturated fat intake. When treated with Infliximab, an anti-inflammatory antagonist to TNF- $\alpha$ , and concomitantly subjected to the HFD, behavioral and BBB alterations were prevented. Still, we seek to assess the regulation of appetite during systemic inflammatory processes. For this, we investigated the possible link between the AgRP hunger-promoting neurons and endotoxemia, in order to clarify the biological mechanism that governs an apparent paradox, of reducing food consumption during a process of high energy demand, such as systemic inflammation. When evaluating the activity of AgRP neurons, we observed that they remain active under LPS injection-induced endotoxemia, detect the caloric deficit during fasting, but do not promote food intake, maintaining anorexia. During systemic inflammation, the hemato-hypothalamic barrier (BHH) undergoes an increase in its permeability, with alterations in the expression of occludin, allowing the infiltration of T lymphocytes. T cells increase the expression of leukocyte elastase when the AgRP neurons are activated, being reduced during inflammation. At the same time, the proteolytic activity of granzyme B is increased during the state of systemic inflammation and activation of AgRP neurons. The beneficial effects of AgRP activity on inflammation could also be seen with the reduction of protein expression of TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  in the acute phase of the disease, in addition of reducing the gene expression of several pro-inflammatory cytokines in the colon, which proves the brain-immune system communication and regulators of immune activity mediated by the central nervous system.

**Keywords:** High-fat diet. Energy metabolism. Cognition. Mood disorders. Blood-brain barrier. Inflammation. AgRP neurons.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Controle do equilíbrio energético .....	20
Figura 2 - Representação esquemática da barreira hematoencefálica (BHE) e componentes da unidade neurovascular (UNV) .....	28
Figura 3 - Perda da regulação imune e ativação pró-inflamatória no tecido adiposo associado à obesidade .....	34
Figura 4 - Atividade neuronal de AgRP durante a inflamação sistêmica.....	38
<b>Figuras Capítulo I</b>	
Figura 1 - Hippocampal abnormalities of mice fed a high-fat diet.....	52
Figura 2 - Hippocampal alterations followed by 4 weeks of HFD.....	54
Figura 3 - Evaluation of the high-fat diet effects in an early time-course.....	55
Figura 4 - Decrease of synaptic density after seven days of HFD.....	56
Figura 5 - Anti-inflammatory effect on CNS alterations induced by high-fat diet.....	57
Figura Suplementar - Mitochondrial function and astrocyte activation within 1 and 2 weeks of HFD.....	58
<b>Figuras Capítulo II</b>	
Figura 1 - In vivo calcium imaging of AgRP neurons in freely behaving mice on the detection of feeding behavior during inflammation.....	69
Figura 2 - BHB rearrangement during anorexia and endotoxemia.....	70
Figura 3 - Serine proteases immune regulation during anorexia and endotoxemia.....	71
Figura 4 - Serum protein levels of proinflammatory cytokines during anorexia and endotoxemia.....	72
Figura 5 - Tissue gene expression of pro-inflammatory cytokines during anorexia and endotoxemia.....	73
Figura 6 - Sustained inflammatory response in DSS colitis murine model.....	74
Figura 7 - Positive correlation between colitis disease score and number of CD3 cells in hypothalamus.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -MSH	alfa-melanócito
AGs	ácidos graxos
AgRP	proteína relacionada ao gene agouti
AQP-4	aquaporina-4
ARC	núcleo arqueado
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barreira hematoencefálica
BHH	barreira hematohipotalâmica
CART	transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CCK	colecistocinina
CCL	comprometimento cognitivo leve
DHF	dieta high-fat
Elane	elastase leucocitária
EM	eminência média
EROs	espécies reativas de oxigênio
FCE	fluido cerebrospinal
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GFP	proteína de fluorescência verde
GzmB	granzima B
HHA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HVM	hipotálamo ventromedial
IFN- $\gamma$	interferon-gama
IL	interleucina
ILR4	receptor toll do tipo 4
IMC	índice de massa corporal
JAK2	Janus cinase 2
LepR	receptor de leptina
LPS	lipopolissacarídeo
LTP	potencial de longa duração
MCR	receptor de melanocortina
NAc	núcleo acumbens
NaFl	fluoresceína de sódio

NPV núcleo paraventricular  
NPY neuropeptídeo Y  
NTS núcleo do trato solitário  
OMS organização mundial da saúde  
PAMPs padrões moleculares associados a patógenos  
POMC pró-opiomelanocortina  
Serpina3N serina protease A3N  
SD dieta padrão  
SNC sistema nervoso central  
SOCS-3 supressor de sinalização de citocinas 3  
SYP sinaptofisina  
TAB tecido adiposo branco  
TDAH transtorno do déficit de atenção com hiperatividade  
TNF- $\alpha$  fator de necrose tumoral alfa  
UNV unidade neurovascular

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em seções organizadas da seguinte maneira: Introdução, Resultados (Capítulo I e Capítulo II), Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

Na Introdução, são apresentados os temas estudados, a fundamentação teórica que nos levou ao desenvolvimento deste trabalho e os focos de estudo, descritos no item Objetivos.

A seção de Resultados está dividida em dois capítulos, de acordo com os diferentes focos de estudo. Em cada capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, sendo o primeiro capítulo o artigo científico submetido.

**Capítulo I: Rapid impairment of hippocampal function by intervention of high-fat diet in mice.** Este capítulo refere-se ao projeto principal desta tese de doutorado, no qual metodologia e desenhos experimentais abordados foram conduzidos na Universidade Federal de Santa Catarina.

**Capítulo II: Appetite regulation during endotoxin-mediated systemic inflammation.** Este capítulo refere-se ao projeto de doutorado sanduíche realizado no Instituto Rowett, vinculado à Universidade de Aberdeen, Reino Unido, sob a supervisão do Dr. Giuseppe D'Agostino, com bolsa de estudos concedida pela Capes (PDSE).

A Discussão contém a argumentação bibliograficamente embasada da interpretação e da importância dos resultados obtidos nos capítulos descritos. A seção Conclusões aborda as hipóteses concluídas na tese. A seção Referências Bibliográficas lista elementos bibliográficos utilizados na redação da tese.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	DISFUNÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERLIPÍDICA .....	17
1.2	DESREGULAÇÃO ENERGÉTICA <i>versus</i> COMPROMETIMENTO COGNITIVO .....	22
1.3	A INGESTÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E OS TRANSTORNOS DE HUMOR .....	25
1.4	MECANISMOS SUBJACENTES ÀS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERLIPÍDICA .....	26
1.4.1	Fator de risco vascular e seu papel na integridade da BHE .....	26
1.4.2	Estado redox e a funcionalidade mitocondrial .....	29
1.4.3	Plasticidade sináptica .....	31
1.4.4	Processo inflamatório no desbalanço energético .....	33
1.5	MODULAÇÃO DO APETITE ATRAVÉS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	36
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos Específicos .....	42
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>43</b>
	INTRODUCTION .....	46
	METHODS .....	47
	RESULTS.....	51
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>61</b>
	INTRODUCTION .....	62
	METHODS .....	63
	RESULTS.....	68
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O que nos leva a comer? Uma resposta pode abranger: a necessidade de sobreviver; rotinas ou padrões bem estabelecidos de comportamento alimentar (por exemplo, comer em determinados momentos do dia); e/ou porque gostamos principalmente do sabor e das sensações agradáveis ao ingerirmos determinados alimentos. Atualmente vivemos em uma cultura onde alimentos e bebidas altamente palatáveis e densos em energia são abundantes e onde a propaganda e outras manobras de marketing visam o aumento do consumo desses alimentos (Johnson, 2013). Embora estejamos cientes de que o mantra “Coma bem e se exercite” é o segredo para promover a estabilidade do peso corporal e a boa saúde, esse ambiente “obesogênico” muitas vezes leva ao aumento do consumo de dietas ricas em gorduras saturadas e açúcares processados. Nos últimos 30 anos, o aumento do consumo de uma dieta hiperlipídica, principalmente gordura saturada, levou grande parte da população que vive nesses lugares a entrar em um quadro de sobrepeso ou obesidade (Ford & Mokdad, 2008).

### 1.1 DISFUNÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERLIPÍDICA

Um grande número de estudos demonstra que a adoção de uma alimentação com alto teor de gordura saturada está relacionada ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos. Vários mecanismos são propostos para explicar como o consumo da dieta hiperlipídica contribui para as alterações no metabolismo, e incluem modificação dos hormônios / citocinas circulantes e aumento da disponibilidade de ácidos graxos (AGs) que, por sua vez, promovem o acúmulo de lipídios intracelulares e o estresse celular, dando origem ao conceito de "lipotoxicidade" e "gordura ectópica" (Mittendorfer et al., 2009). A funcionalidade do tecido adiposo desempenha um papel crítico na homeostase lipídica e glicêmica. Uma das principais funções do tecido adiposo branco (TAB) é a liberação de AGs não esterificados na circulação durante o jejum e outros estados que demandam energia, como em exercícios físicos. A lipólise irrestrita, que leva ao aumento dos AGs circulantes no estado absorvente, tem sido associada à incorporação de lipídeos no músculo (Bergman e Ader, 2000), no fígado (Boden et al., 1994), à resistência à insulina e à esteatose hepática (Ginsberg et al., 2006).

Ao longo das últimas décadas, pesquisas estabelecem o conceito de que o sistema nervoso central (SNC) é o sistema regulador-chave do metabolismo energético de todo o corpo, desempenhando um papel importante no controle do consumo calórico e em manter a homeostase metabólica (Glavas et al., 2007). Nesse sentido, a homeostase energética requer a comunicação entre o corpo e o cérebro. Essa comunicação é possível através conexões neuroendócrinas, em que o SNC integra e responde a vários hormônios homeostáticos, neurotransmissores, nutrientes e sinais neuronais ascendentes que reportam o estado nutricional do corpo (Dietrich e Horvath, 2013; Morton et al., 2014). Acredita-se que os principais alvos destes sinais sejam neurônios presentes no hipotálamo - localizado na parte basal do encéfalo - e em estruturas relacionadas que integram esta informação, a fim de gerar uma representação central do estado fisiológico e da integração de sinais metabólicos gerados periféricamente e direcionados ao SNC (Clemmensen et al., 2017).

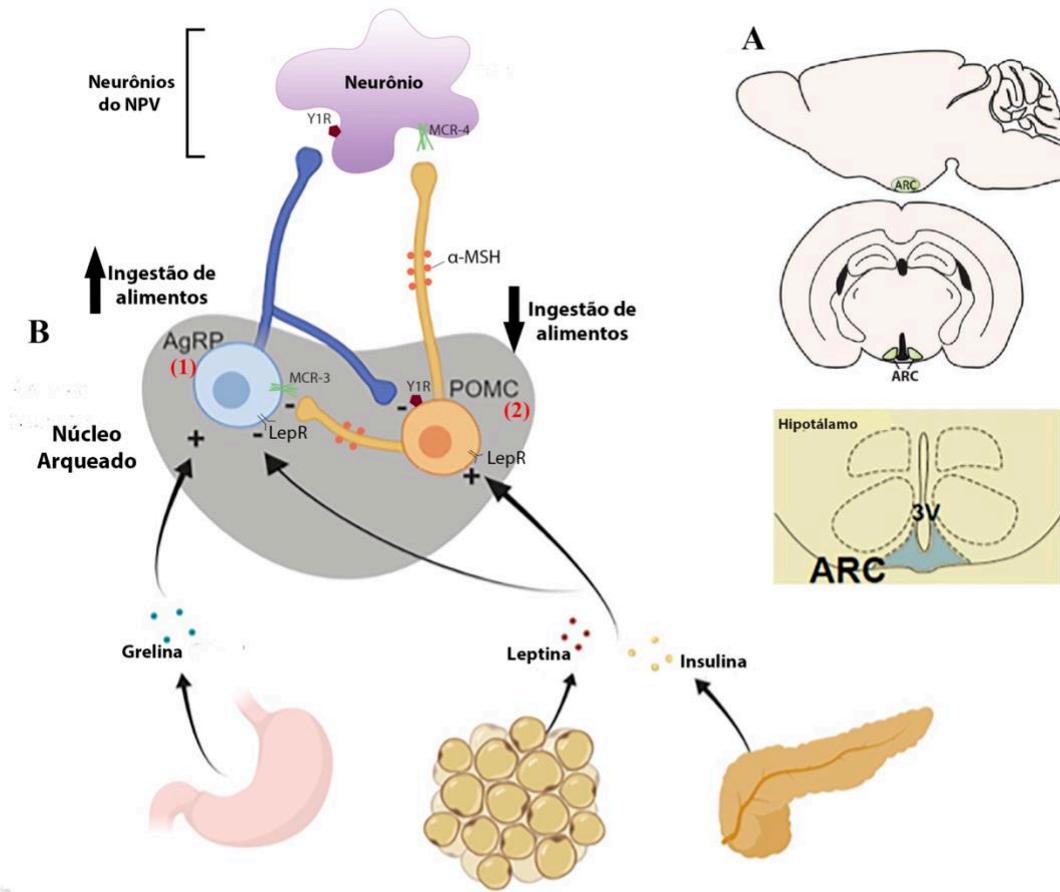
De fato, populações específicas de neurônios no núcleo arqueado (ARC), localizado basalmente no hipotálamo e adjacente ao terceiro ventrículo (3V), à eminência média (EM) e ao hipotálamo ventromedial (HVM), são capazes de detectar e integrar sinais circulantes nos circuitos cerebrais que modulam o apetite (Williams e Elmquist, 2012). Dessa forma, possuem funções fundamentais na regulação do balanço energético, representando o principal local encefálico de integração de sinais relacionados ao apetite (Grill e Hayes, 2012; Rinaman, 2010; Wu et al., 2012). Anatomicamente, o ARC possui uma localização privilegiada por estar entre um órgão circunventricular, a EM, onde a barreira hematoencefálica (BHE) é mais permeável através dos capilares fenestrados, facilitando a acessibilidade dos sinais circulantes (Ciofi et al., 2009); e por estar adjacente ao HVM, conhecido como “centro de saciedade” do cérebro (Sainsbury et al., 2010).

Em particular, a consciência interoceptiva da suficiência calórica e o início de comportamentos relacionados à alimentação dependem, em parte, do sistema da melanocortina (Cowley et al., 1999; Sternson, 2013). Esse sistema tem sido extensivamente estudado por seu papel na regulação do apetite, peso corporal e metabolismo; e é definido por neurônios que coexpressam neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos. Entre os neuropeptídeos orexígenos estão a proteína relacionada ao gene *agouti* (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), enquanto os anorexígenos incluem a pró-opiomelanocortina (POMC), o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Diéguez et al., 2011; Myers e Olson,

2012; Williams e Elmquist, 2012) e, recentemente identificado, as células expressando colecistocinina (CCK) no núcleo do trato solitário (NTS) (D'Agostino et al., 2016).

Os neurônios AgRP e POMC são os dois conjuntos celulares mais amplamente estudados que controlam a alimentação. Os neurônios AgRP são ativados pela grelina, um hormônio liberado pelo estômago antes das refeições ou durante o jejum, e promovem a busca e o consumo de alimentos. Já os neurônios POMC são ativados pela insulina, leptina e pelo aumento dos níveis de glicose no sangue, promovendo saciedade e aumento do gasto energético através da liberação de transcritos pós-traducionais, como o hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH). Esses dois conjuntos de neurônios estão entremesclados no ARC hipotalâmico e se projetam amplamente para um conjunto comum de estruturas subcorádicas, onde têm efeitos opostos sobre a ingestão de alimentos e outros parâmetros autonômicos e comportamentais modulados pelo equilíbrio e demanda energéticos (revisado em Andermann e Lowell, 2017) (Figura 1).

Figura 1. Controle do equilíbrio energético.



A) representação da localização do núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico no encéfalo de camundongos. B) neurônios do ARC controlam o apetite: (1) neurônios que produzem a proteína relacionada à agouti (AgRP), aumentando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto energético e (2) neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) que liberam o hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético. O  $\alpha$ -MSH estimula os receptores da melanocortina (MCR-3 e MCR-4) nos núcleos paraventriculares (NPV), que então ativam as vias neuronais que se projetam para o núcleo do trato solitário, aumentando a atividade simpática e o gasto energético. O AgRP atua como um antagonista do MCR-4. Insulina e leptina são hormônios que inibem os neurônios AgRP e estimulam os neurônios POMC adjacentes, reduzindo assim a ingestão alimentar. A grelina, um hormônio secretado pelo estômago, ativa os neurônios AgRP, estimulando a ingestão de alimentos. LepR, receptor de leptina; Y1R, receptor do neuropeptídeo Y1.

Tradicionalmente, os pesquisadores costumavam avaliar os problemas resultantes da dieta hiperlipídica e distúrbios metabólicos relacionados (Diabetes tipo II, obesidade, hipertensão) por um lado; e as doenças do SNC por outro, como etiologias distintas, com funções biológicas subjacentes que dependem em estruturas e circuitos cerebrais amplamente

separados. No entanto, evidências epidemiológicas e experimentais mais recentes indicam que a obesidade e o consumo de uma dieta rica em gordura estão correlacionados a danos estruturais e funcionais no SNC frequentemente associados a transtornos neuropsiquiátricos e a doenças neurodegenerativas (Vanhanen et al., 2006; Komulainen et al., 2007; Panza et al., 2010; Kaidanovich-Beilin et al., 2012; Yates et al., 2012; Zhang e Tian, 2014). Não há dúvida de que a compreensão das respostas aos sinais endócrinos é crucial para o diagnóstico e o gerenciamento de muitas condições patológicas.

Uma marca registrada da obesidade é a resistência à leptina, ou seja, altos níveis de leptina na circulação são incapazes de promover seus efeitos anorexígenos centrais (Bjørbaek, 2009). A leptina tem um efeito adipostático robusto no hipotálamo promovendo a saciedade e aumento do gasto energético (Zhang et al., 1994). No início, pensou-se que a leptina recombinante exógena seria uma ferramenta farmacológica útil para o tratamento da obesidade. No entanto, os estudos realizados na segunda metade da década de 1990 sugeriram que a maioria dos modelos humanos e animais de obesidade são hiperleptinêmicos e resistentes às ações adipostáticas da leptina, o que resulta no controle anômalo da alimentação e da termogênese (Heymsfield et al., 1999; Frühbeck et al., 2000). A investigação dos mecanismos que culminam na resistência à leptina revelou que a hiperleptinemia crônica poderia induzir uma maior expressão hipotalâmica do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS-3), o que, por sua vez, inibe a ativação da Janus cinase 2 (JAK2) ativada por leptina (Bjørbaek et al., 1999). Em modelos animais de obesidade genética e induzida por dieta, a ativação de uma resposta inflamatória no hipotálamo leva à resistência molecular e funcional aos hormônios adipostáticos leptina e insulina, resultando em um controle defeituoso da ingestão alimentar e do gasto energético (Carvalho et al., 2001; De Souza et al., 2005).

A grande maioria dos estudos referentes ao consumo de dieta hiperlipídica indica alterações predominantemente no hipotálamo uma vez que, como já abordado, está diretamente relacionado ao comportamento apetitivo e às informações aferentes do intestino, desempenhando um papel importante na compreensão das alterações metabólicas resultantes da dieta (revisado em Velloso e Schwartz, 2011). É bastante claro que manipulações no hipotálamo (sejam elas cirúrgicas, genéticas ou hormonais) podem ter efeitos profundos na alimentação e no ganho de peso corporal em modelos experimentais e que o aumento na

ingestão calórica e na regulação do peso corporal em humanos são acompanhados por alterações acentuadas nas vias de sinalização neuro-hormonais hipotalâmica (Benoit et al., 2009). Curiosamente, ao contrário do que se pensava de que as outras regiões do cérebro eram poupadas, há boas razões para acreditar que o hipocampo também pode ser particularmente suscetível a danos por fatores alimentares (Davidson et al., 2007).

Pertencente ao sistema límbico, o hipocampo desempenha importantes papéis no aprendizado e na consolidação de informações da memória de curto prazo para a memória de longo prazo (Amaral e Lavenex, 2007) e também na memória espacial e declarativa (Squire e Schacter, 2002). Os neurônios piramidais do hipocampo possuem uma demanda metabólica particularmente alta, criando assim um perfil metabólico único que parece tornar esses neurônios especialmente sensíveis aos danos causados por uma variedade de insultos ambientais e biológicos. Esses e outros neurônios do hipocampo dependem muito da fosforilação oxidativa e das mitocôndrias para obter energia, e as anormalidades em qualquer um desses mecanismos comprometem a integridade do hipocampo (revisado em Michaelis, 2012). Nesse sentido, estudos recentes indicam que danos seletivos no hipocampo em roedores e patologias que estão amplamente confinadas ao hipocampo em humanos estão associados ao aumento da ingestão de alimentos (Davidson et al., 2005) e da frequência das refeições (Rozin et al., 1998). Assim, sugere-se que os fatores alimentares também estão associados ao surgimento da patologia do hipocampo, a qual está relacionada ao aumento da ingestão alimentar e ganho de peso corporal.

## 1.2 DESREGULAÇÃO ENERGÉTICA *versus* COMPROMETIMENTO COGNITIVO

Na regulação da ingestão de alimentos, o papel do aprendizado e da memória dependentes do hipocampo foi desencadeado pela descoberta de que pacientes com episódios de amnésia por dano hipocampal bilateral eram capazes de comer uma segunda refeição apresentada menos de 15 minutos após a primeira (Hebben et al., 1985; Rozin et al., 1998). Pesquisas subsequentes mostraram que quando a capacidade dos participantes de recordar a ingestão prévia de alimentos é aumentada ou prejudicada experimentalmente, isso diminui ou aumenta respectivamente a ingestão posterior de alimentos (Higgs, 2002; Higgs et al., 2008; Mittal et al., 2011). Esses achados sugerem que a memória episódica do que foi ingerido contribui para a regulação da ingestão de alimentos. Sendo a principal região responsável pelos

processos de aprendizado e memória, o hipocampo torna-se vulnerável às fases iniciais das demências neurodegenerativas, incluindo demência vascular e doença de Alzheimer (Kanoski e Davidson, 2011).

Pesquisas emergentes apontam evidências entre as semelhanças nas etiologias associadas ao consumo elevado de gordura saturada e açúcares simples ao aumento da incidência da doença de Alzheimer (Berrino, 2002; Pasinetti e Eberstein, 2008) e formas mais leves de disfunção cognitiva (Eskelinen et al., 2008; Jurdak et al., 2008). As funções cognitivas que possivelmente são comprometidas pela alta ingestão de gordura saturada incluem memória espacial, memória declarativa, memória de trabalho, atenção e controle inibitório.

O consumo excessivo da dieta hiperlipídica é associado a alterações de memória e aprendizado em crianças (Baym et al., 2014), adultos (Gibson et al., 2013) e em idosos (Gardener, 2014), indicando que o excesso de gordura na dieta impacta a cognição durante todas as etapas da vida. Estudos clínicos comprovam que a obesidade na meia idade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de transtorno cognitivo e da doença de Alzheimer no envelhecimento (Kivipelto et al., 2001; Kalmijn et al., 2004; Tolppanen et al., 2015). O estudo transversal em uma população de meia idade, realizado por Kalmijn e colaboradores (2004) demonstrou que indivíduos que consomem maior quantidade de gordura saturada e/ou rica em colesterol possuíam um risco aumentado de funções cognitivas prejudicadas, incluindo memória, velocidade e flexibilidade, em relação àqueles cuja gordura da dieta deriva-se em maior parte do consumo de peixes. Há ainda relatos clínicos de redução de memória de sensibilidade a sinais interoceptivos relacionados à esta dieta (Francis e Stevenson, 2011). O aumento do consumo de gorduras na dieta também foi associado ao maior comprometimento cognitivo em um escore global que avalia memória imediata e atrasada, memória de trabalho e fluência verbal (Devore et al., 2009; Morris et al., 2004). Além disso, evidências bastante recentes demonstram que o déficit cognitivo não ocorre apenas após a ingestão excessiva de dieta rica em gordura a longo prazo, mas também após curtos períodos de ingestão. Attuquayefio e colaboradores (2017) reportaram que a ingestão de dieta hiperlipídica por apenas 4 dias induziu alterações cognitivas em adultos jovens saudáveis. Por outro lado, um estudo longitudinal realizado entre idosos, constatou que a alta adesão a uma dieta nutricionalmente equilibrada foi inversamente associada ao declínio cognitivo em

comparação à alta adesão a um padrão alimentar ocidental, positivamente associado a prejuízos na cognição (Shakersain et al., 2015).

Em estudos experimentais, roedores têm sido submetidos à dieta hiperlipídica por diferentes períodos no intuito de investigar a correlação entre os hábitos alimentares ocidentais e a função cognitiva. Camundongos C57BL/6 apresentam comprometimento de memória espacial avaliada pelo teste de realocação do objeto (Heyward et al., 2012) e labirinto em T (Pistell et al., 2010) após o consumo de dieta hiperlipídica por 22 e 16 semanas, respectivamente. De forma interessante, Kaczmarczyk e colaboradores (2013) demonstraram que a memória de reconhecimento dos animais é comprometida com 1 e 3 semanas de dieta rica em gordura, e esta é restaurada ao substituir a dieta hiperlipídica por uma dieta com baixo teor de gordura.

Além disso, existem fortes correlações positivas entre o índice de massa corporal (IMC) e o desenvolvimento da doença de Alzheimer em vários grupos etários (Kivipelto et al., 2005; Cohen et al., 2011; Benito-León et al., 2013; Reinert et al., 2013). O estudo de base populacional de Kivipelto e colaboradores (2005), avaliou a associação entre o IMC na meia-idade e o agrupamento de vários fatores de risco vasculares com demência e doença de Alzheimer em idade mais avançada e mostrou que a correlação entre obesidade e déficit cognitivo existe, e que o risco aumenta de maneira aditiva com a presença de fatores de risco vascular. É importante ressaltar que, embora essas correlações sejam robustas e tenham sido encontradas em diversos estudos longitudinais e transversais (Sellbom e Gunstad, 2012), não está totalmente claro se o comprometimento cognitivo e o risco elevado de desenvolver demência são características que precedem o desenvolvimento da obesidade, ou ainda, se o próprio desenvolvimento da obesidade está causando deficiências cognitivas que levam à demência. Além disso, dado que altos níveis de adiposidade e obesidade são resultado, e são exacerbados, pelo consumo excessivo de fatores alimentares não saudáveis comuns à dieta ocidental, as contribuições relativas da dieta hiperlipídica sobre o comprometimento cognitivo ainda não estão totalmente entendidas.

Assim, pesquisas anteriores sugerem que: i) o hipocampo está envolvido na regulação da ingestão de energia, através da mediação de sinais internos de fome e saciedade e memória episódica e, ii) o consumo de uma dieta hiperlipídica prejudica a função do hipocampo em animais, desencadeando a disfunção cognitiva.

### 1.3 A INGESTÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E OS TRANSTORNOS DE HUMOR

O aumento da ingestão de gorduras saturadas e da prevalência de obesidade coincide com o aumento de transtornos de humor e fatores psicológicos adversos, principalmente transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) na infância, impulsividade, depressão e ansiedade (Puder e Munsch, 2010). Evidências indicam que os transtornos de obesidade e humor estão intrinsecamente ligados e compartilham uma série de fatores clínicos, neurobiológicos, genéticos e ambientais. Devido à limitação em determinar a causalidade dos distúrbios psicológicos humanos, com sua heterogeneidade fenotípica e fisiopatológica, a natureza dessa associação permanece pouco compreendida. Existem inconsistências significativas nos estudos que avaliam distúrbios metabólicos e de humor, e como resultado, várias questões persistem sobre a validade e a generalização dos resultados.

Experimentalmente, ao avaliar o efeito de uma dieta rica em gordura, Xu e colaboradores (2018) demonstraram que camundongos obesos desenvolveram um comportamento tipo-ansioso após o consumo da dieta por 4 semanas. Outro estudo experimental recente demonstrou que o comportamento tipo-ansioso de camundongos submetidos à uma dieta hiperlipídica por 12 semanas estava vinculado a alterações metabólicas (hiperinsulinemia, intolerância à glicose) e sinais pró-inflamatórios no núcleo acumbens (NAc), uma região cerebral implicada nos déficits hedônicos associados à ansiedade e no controle de comportamentos motivados por alimentos (Décarie-Spain et al., 2018).

Além disso, dados epidemiológicos e de coorte indicam associação convergente e bidirecional entre as alterações metabólicas e a depressão, e alguns autores tentaram descrever um subtipo específico de transtorno de humor caracterizado por uma maior incidência de obesidade e problemas metabólicos (revisado em Mansur et al., 2015). Em um estudo de base populacional de adultos jovens, mulheres com síndrome metabólica na infância apresentaram níveis mais altos de sintomas depressivos na idade adulta, e a gravidade desses sintomas aumentou de acordo com a exposição à síndrome metabólica ao longo da vida (Pulkki-Raback et al., 2009). Ao tratar farmacologicamente pacientes idosos para a depressão, o estudo de Mulvahill e colaboradores (2017) demonstrou que os indivíduos com alterações no metabolismo da glicose e dislipidemias estavam associados à maior gravidade dos sintomas e

cronicidade da depressão, além de obterem um tempo prolongado para a remissão dos sintomas. De forma similar, em um estudo de coorte com homens idosos a associação entre a obesidade e os sintomas depressivos foi encontrada em um período de 10 anos (Almeida et al., 2009). É de especial interesse investigar esta associação em populações idosas, uma vez que ambas as condições aumentam com a idade e produzem consequências adversas na qualidade de vida. Além disso, há a hipótese de que um subtipo vascular de depressão pode existir, o qual está etiologicamente ligado a alterações metabólicas através de doenças vasculares (Marazziti et al., 2014). Se esta associação for verdadeiramente causal, a redução da prevalência da obesidade e das alterações metabólicas poderia levar a um declínio na prevalência e incidência de depressão na vida adulta.

#### 1.4 MECANISMOS SUBJACENTES ÀS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERLIPÍDICA

##### 1.4.1 Fator de risco vascular e seu papel na integridade da BHE

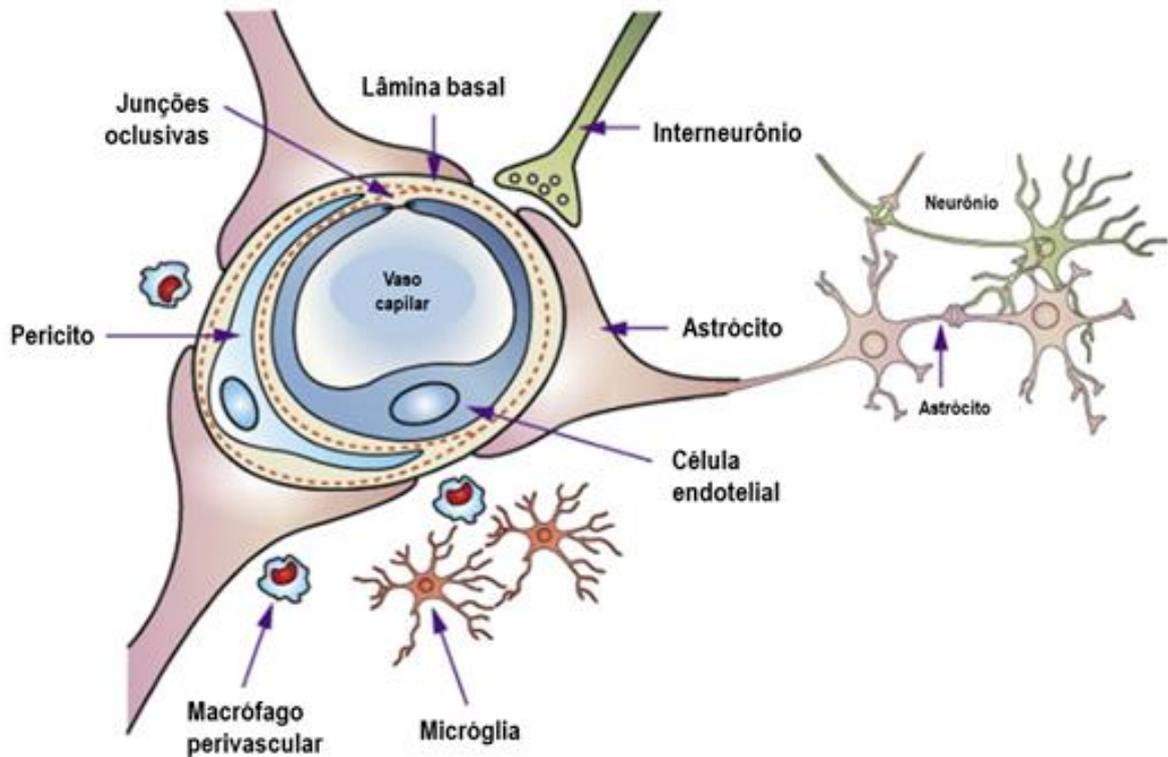
Diversas evidências na literatura indicam que a doença cerebrovascular parece preceder o declínio cognitivo em ensaios clínicos e em modelos animais de doenças neurodegenerativas (Bell e Zlokovic, 2009; Chen et al., 2010). Alterações anatômicas vasculares, observadas em pacientes com doença de Alzheimer apontam para a conexão entre os distúrbios vasculares e o comprometimento da cognição. Entre estas alterações encontram-se i) atrofia e irregularidades de arteríolas e capilares cerebrais, ii) inchaço e aumento do número de vesículas pinocíticas nas células endoteliais, iii) aumento do colágeno IV e proteoglicanos, iv) ruptura da membrana basal, v) redução da densidade microvascular total e vi) inchaço ocasional dos pés dos astrócitos (Kalaria e Pax, 1995; Farkas e Luiten, 2001; Bailey et al., 2004). Kalaria e Hedera (1995) demonstraram uma redução na coloração dos marcadores endoteliais CD34 e CD31 em cérebros de pacientes com demência, sugerindo que há uma extensa degeneração do endotélio durante a progressão da doença. Mais recentemente, ao avaliar o perfil genômico de células endoteliais cerebrais, um estudo revelou que a expressão extremamente baixa do gene *homeobox 2* do mesênquima restrito ao endotélio vascular de indivíduos com doença de Alzheimer leva à angiogênese aberrante e à quebra prematura de redes capilares, resultando em reduções na microcirculação cerebral (Wu et al., 2005). Dessa forma, a disfunção bioquímica e

estrutural do endotélio vascular (periférico e central) decorrente da exposição aos fatores de risco vascular desempenha papel de relevância na patogênese de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. O estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, entre outros eventos comuns às doenças neurodegenerativas, estão associados com a disfunção endotelial. (Schultheiss et al., 2006; Grammas, 2011; Grammas et al., 2011; Yunfu et al., 2014).

A monocamada hermeticamente fechada das células endoteliais cerebrais que formam os capilares no SNC é o principal componente da barreira hematoencefálica (BHE). A BHE foi considerada durante muito tempo como uma simples barreira física entre o sistema periférico e o SNC. Atualmente sabe-se que a funcionalidade da BHE é primordial para a preservação da integridade e função neuronal e da homeostase do SNC, uma vez que impede a troca passiva de solutos entre o sangue e o cérebro (Neuwelt et al., 2008; Grammas et al., 2011). A BHE é formada pelas junções oclusivas (claudina, ocludina e zônula occludens) presentes entre as células endoteliais dos capilares que perfundem o parênquima cerebral e são as principais reguladoras da permeabilidade celular (Bazzoni e Dejana, 2004). O comprimento total dos capilares humanos no SNC é de aproximadamente 600 km, com uma área de superfície capilar de cerca de 20 m<sup>2</sup>. Na realidade, quase todo neurônio é perfundido pelo seu próprio capilar, o que evidencia a dimensão desta interface entre o sangue e o parênquima no SNC (Begley e Brightman, 2003). Fisiologicamente, próximos às células endoteliais dos capilares cerebrais estão a membrana basal extracelular, os pericitos adjacentes, os astrócitos e a microglia, que são partes integrantes do sistema de suporte da BHE. Juntamente com os neurônios vizinhos, esses componentes constituem o que é denominado unidade neurovascular (UNV) (Figura 2), um conceito proposto para ressaltar as interações funcionais que controlam a integridade da BHE (Weiss et al., 2009). Os pericitos envolvem o endotélio e comunicam-se diretamente com as células endoteliais através de contatos especializados de "peg-socket" (pino-tomada) (von Tell et al., 2006). Os pericitos possuem papel essencial na manutenção da estabilidade dos microvasos, e também demonstraram modular o fluido cerebrospinal (FCE) (Peppiatt et al., 2006). Os pés astrocíticos também entram em contato com a superfície capilar abluminal, fornecendo suporte físico ao SNC. A microglia esporádica pode ser encontrada na área pericapilar no encéfalo normal. Um SNC saudável depende de todas as células da UNV

para exercer sua funcionalidade adequada e se comunicar umas com as outras, permitindo que as sinapses e os circuitos neuronais mantenham as funções cognitivas normais.

**Figura 2. Representação esquemática da barreira hematoencefálica (BHE) e componentes da unidade neurovascular (UNV).**



Adaptado de Chen e Liu, 2012. A BHE é formada por células endoteliais que ficam alinhadas com os capilares, impedindo ou dificultando a passagem de substâncias do sangue para o tecido nervoso e passagem de nutrientes e substâncias ocorre através das junções oclusivas. Como suporte para a manutenção da homeostase da BHE encontram-se a lâmina/membrana basal, pericitos, astrócitos e microglia e neurônios vizinhos, compondo a UNV.

Várias descobertas recentes sugerem que fatores dietéticos e metabólicos podem interferir na integridade da BHE. Banks e colaboradores (2008) demonstraram que os triglicerídeos da dieta podem alterar os mecanismos de transporte ativo da BHE de hormônios relacionados à alimentação, incluindo leptina e grelina em roedores. Kanoski e colaboradores (2010) demonstraram que a ingestão de DHF por 90 dias foi acompanhada por uma redução na expressão das proteínas ocludina, Claudina-5 e Claudina-12 no sistema capilar da BHE. Das proteínas de junção oclusivas, acredita-se que as claudinas sejam as principais proteínas que estabelecem as propriedades de junção das células endoteliais e são consideradas importantes

na restrição da permeabilidade (Wolburg e Lippoldt, 2002). Consistente com a expressão reduzida dessas proteínas, a DHF também foi associada a um aumento da permeabilidade, desde a vasculatura para o parênquima hipocampal, do corante fluoresceína de sódio (NaFl), uma molécula de alto peso molecular incapaz de ultrapassar a barreira intacta. No hipotálamo, Ramalho e colaboradores (2018) demonstraram uma perda precoce de integridade da BHE em camundongos submetidos à DHF por 1 semana.

Estudos longitudinais apontam a relação entre o alto índice de massa corporal (IMC) e a obesidade, em indivíduos de meia idade, com um risco aumentado de ruptura da BHE (Gustafson et al., 2007) e demência (Whitmer et al., 2008) em idade mais avançada. Os danos à BHE estão fortemente correlacionados com o desenvolvimento de comprometimento cognitivo leve (CCL) e doença de Alzheimer e, em alguns casos, demonstraram preceder o aparecimento dos sintomas clínicos em pacientes com doença de Alzheimer e em modelos animais da doença (Ujii et al., 2003; Kanoski e Davidson, 2011).

O padrão desses resultados sugere que o consumo de uma dieta hiperlipídica altera a permeabilidade da BHE, levando a disfunções em todo SNC e às doenças neurodegenerativas. É possível que uma BHE com vazamento permita que toxinas, citocinas, metais como cobre, chumbo e ferro e outras substâncias prejudiciais transportadas pelo sangue entrem no SNC. Pensa-se que alguns metais contribuam para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas via influxo através da BHE (revisado em Yokel, 2006). Também é possível que a ruptura da BHE contribua para o comprometimento cognitivo facilitando a entrada sanguínea do peptídeo  $\beta$ -amiloide no cérebro, o constituinte primário das placas amiloides na doença de Alzheimer. No entanto, precisamente como essas alterações ocorrem ainda é uma questão em aberto.

#### **1.4.2 Estado redox e a funcionalidade mitocondrial**

Em eucariotos, as mitocôndrias são organelas essenciais que permitem a produção eficiente de energia através da cadeia respiratória para sustentar reações biológicas. O objetivo primário da UNV é acoplar a demanda metabólica cerebral com o aporte de glicose e oxigênio através do sangue, bem como ajustar a resistência vascular cerebral adequadamente a influências sistêmicas, como gases sanguíneos e pH, hormônios circulantes e neurotransmissores, pressão sanguínea e tensão de cisalhamento (Busija et al., 2004; Duckles e

Krause, 2011). Além de produzir energia na forma de ATP para apoiar as atividades das células que compreendem a UNV, as mitocôndrias ao despolarizarem e/ou ao liberarem espécies reativas de oxigênio (EROs) iniciam eventos de sinalização que protegem o endotélio e os neurônios contra estresses letais via pré- / pós-condicionamento, bem como promovem mudanças no tônus vascular encefálico (Gaspar et al., 2008; Katakam et al., 2013; 2016). Assim, a mitocôndria pode representar um elo de sinalização entre a taxa metabólica e o fluxo sanguíneo, bem como um mediador da alteração vascular de acordo com o estado fisiológico (Busija et al., 2016).

No sistema periférico, a ação prejudicada da insulina é capaz de alterar a biogênese e a função das mitocôndrias (Kelley et al., 2002; Petersen et al., 2004). O estudo clínico de Kelley e colaboradores (2002), mostra que uma redução no número, localização e morfologia das mitocôndrias está fortemente associada à resistência à insulina no músculo esquelético. A insulina é capaz de aumentar os níveis de transcrição mitocondrial, síntese protéica e produção de ATP em pessoas saudáveis, mas não em pessoas com diabetes tipo 2. Assim, argumenta-se que a sinalização da insulina é necessária para a manutenção das mitocôndrias musculares e que a resistência à insulina resulta em disfunção mitocondrial (Petersen et al., 2004).

Evidências recentes indicam que as mitocôndrias são importantes elementos na função vascular cerebral durante a saúde e a doença (Doll et al., 2015; Mikhed et al., 2015; revisado em Angelova e Abramov, 2018). Altamente dinâmicas, essas organelas respondem a mudanças no ambiente celular e adaptam sua morfologia e localização para otimizar a função celular. Estudos mostraram que as gorduras da dieta podem perturbar a dinâmica das mitocôndrias nas células do SNC e isso impacta diretamente na regulação da homeostase energética do corpo inteiro (De Souza et al., 2005; Dietrich et al., 2013). O estudo de Dietrich e colaboradores (2013) demonstrou que, em animais submetidos à dieta hiperlipídica, ocorre uma alteração na morfologia mitocondrial, com redução no número de mitocôndrias, porém com seu tamanho aumentado nos neurônios orexígenos AgRP, o que acaba por estimular o comportamento alimentar. Ao tratar camundongos com dieta hiperlipídica por 7 dias, Carraro e colaboradores (2018) observaram uma redução transitória da proteína envolvida no processo de fusão mitocondrial (mitofusina-2) após 24 horas de indução da dieta hiperlipídica, aumentando após 7 dias. A ingestão da dieta por 7 dias não alterou a respiração mitocondrial hipotalâmica nos

animais, no entanto, induziu reduções no número de contato entre mitocôndrias e retículo endoplasmático, após 3 dias de indução da dieta (Carraro et al., 2018).

A influência prejudicial da dieta rica em gordura na bioenergética do córtex cerebral também foi demonstrada, em que camundongos C57Bl/6J que consumiram a dieta por 18 semanas apresentaram alteração da função e eficiência mitocondrial, e estresse oxidativo. Tais alterações foram observadas também nas frações sinaptossomais das mitocôndrias (Cavaliere et al., 2019). As mitocôndrias especificamente localizadas nas sinapses desempenham um papel fundamental no fornecimento de energia para apoiar as funções sinápticas e a plasticidade, portanto, seus defeitos podem levar à falha sináptica, que é uma característica comum das doenças neurodegenerativas. Vale ressaltar que as disfunções das mitocôndrias pré-sinápticas podem ser um dos mecanismos subjacentes que contribuem para o declínio cognitivo das doenças neurodegenerativas (Devine e Kittler, 2018).

### **1.4.3 Plasticidade sináptica**

Uma propriedade fundamental das sinapses é que elas transmitem sinais entre os neurônios de uma maneira em constante mudança. Em particular, o efeito de um sinal transmitido sinápticamente de um neurônio para outro pode variar bastante, dependendo do histórico da atividade em um ou ambos os lados da sinapse, e essas variações podem durar de milissegundos a meses (Citri e Malenka, 2008). As mudanças dependentes de atividade da transmissão sináptica surgem de um grande número de mecanismos, conhecidos coletivamente como plasticidade sináptica.

Dependendo da escala de tempo desses mecanismos, a plasticidade sináptica pode ser dividida em três grandes categorias: (1) plasticidade de curto prazo, a qual refere-se a alterações que ocorrem em milissegundos a minutos, como por exemplo, depressão ou facilitação da liberação de neurotransmissores, permitindo às sinapses executar funções computacionais críticas em circuitos neurais (Abbott e Regehr, 2004); (2) plasticidade de longo prazo, que envolve mudanças que podem durar horas, dias, semanas ou até meses (Abraham, 2003), e inclui a plasticidade clássica do Hebbian na forma de potencial de ação de longo prazo (LTP) que supostamente sustenta a aprendizagem e a memória (Martin et al., 2000); (3) plasticidade homeostática, que pode considerar sinapses e neurônios e permite que os circuitos neurais

mantenham níveis adequados de excitabilidade e conectividade, apesar das mudanças no ambiente circundante provocadas pelo metabolismo (Turrigiano, 2011).

Uma questão fundamental no estudo da plasticidade sináptica é como os circuitos neurais que sofrem alterações plásticas mantêm a estabilidade e a função (Watt e Desai, 2010). A plasticidade associativa (de Hebbian) resultante da atividade correlacionada de queima pré e pós-sináptica gera um processo de feedback positivo (Dayan e Abbott, 2001). A atividade que fortalece (enfraquece) as sinapses é reforçada (diminuída) pela plasticidade hebbiana, que leva à maior (menor) atividade e à outras modificações sinápticas. Dessa forma, a menos que as mudanças na força sináptica em várias sinapses sejam coordenadas adequadamente, o nível de atividade em um circuito neural pode crescer ou encolher de maneira descontrolada, enquanto os neurônios individuais podem perder a seletividade para diferentes padrões de entrada (De Pittà et al., 2016).

A busca por mecanismos subjacentes ao comprometimento cognitivo induzido por dieta hiperlipídica que afetam negativamente o aprendizado e a memória têm se tornado constante. O desempenho da memória de referência espacial está especificamente associado à função do receptor N-metil-D-aspartato do hipocampo e foi correlacionado com a plasticidade sináptica hipocampal, como LTP (Morris et al., 1986). Alguns estudos relatam que a alta ingestão de gorduras na dieta pode alterar a morfologia e a estrutura das sinapses, os níveis de neurotransmissores e a plasticidade sináptica no hipocampo (Calvo-Ochoa et al., 2014; Krishna et al., 2015; Wang et al., 2019). Além disso, estudos pré-clínicos em animais demonstraram que ao consumir a dieta hiperlipídica, ocorre uma redução na plasticidade sináptica no córtex pré-frontal, levando a dificuldades de aprendizado e memória (Val-Laillet et al., 2011). O mecanismo envolvido no efeito do consumo da dieta hiperlipídica na memória dependente do hipocampo permanece controverso, embora vários mecanismos potenciais venham sendo propostos.

Enquanto isso, um estudo recente demonstrou que os efeitos prejudiciais do consumo da dieta hiperlipídica na aprendizagem e na memória também podem ser mediados em parte pela alteração da plasticidade sináptica por meio da regulação negativa da expressão de BDNF no cérebro (Xia et al. al., 2015). Dados apontam também que o sistema imunológico, especialmente durante processos inflamatórios centrais, tem o potencial de influenciar a

plasticidade cerebral e o funcionamento das redes neuronais, alterando a função sináptica e a memória (Cibelli et al., 2010; Di Filippo et al., 2008; 2013).

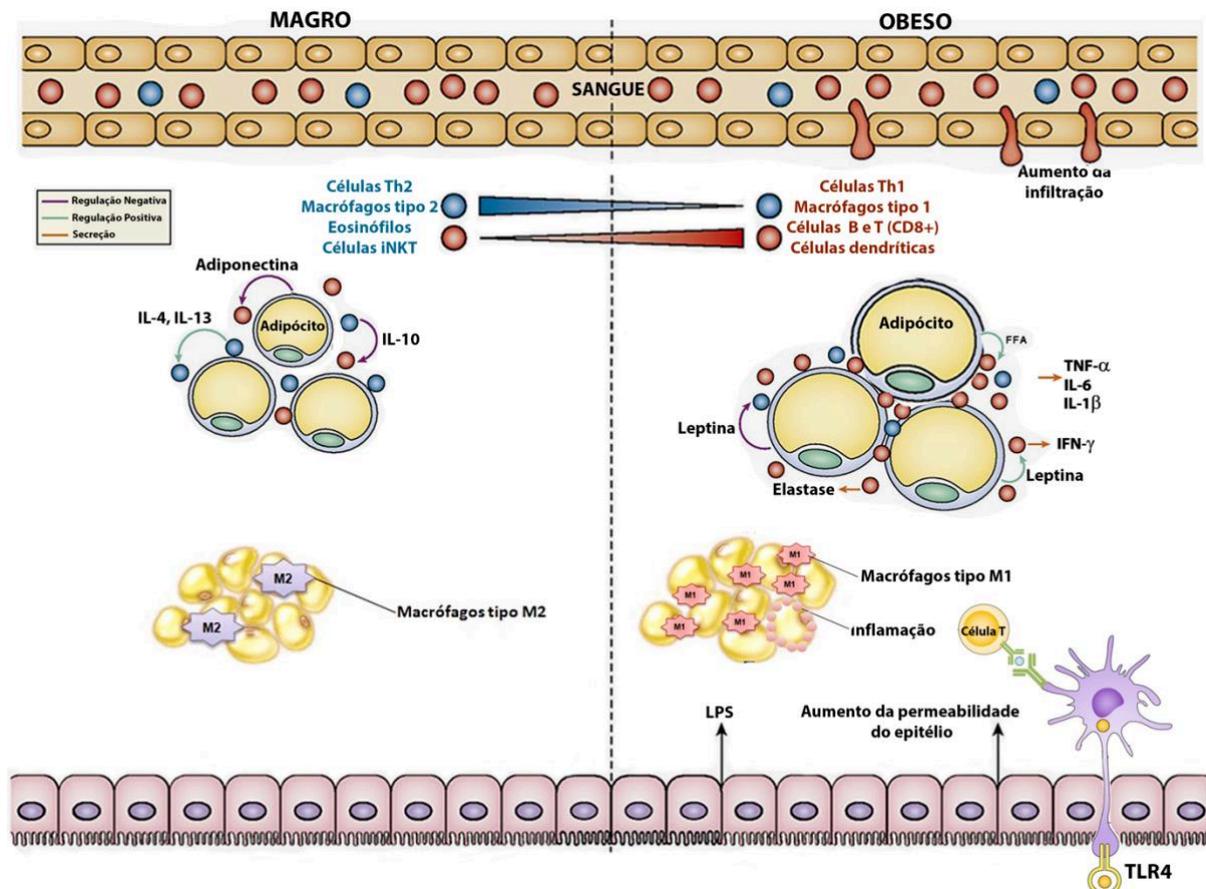
#### **1.4.4 Processo inflamatório no desbalanço energético**

O papel do sistema imunológico tornou-se um foco recente em estudos que investigam os mecanismos que medeiam as alterações metabólicas induzidas pela DHF e obesidade (de Heredia et al., 2012; Boulangé et al., 2016; Thaler et al., 2012). Estudos demonstram que o aumento de peso corporal advindo do alto consumo de gorduras saturadas causa inflamação sistêmica através da ação de vários mecanismos. Muito do que foi aprendido sobre a resposta imune à obesidade veio de estudos no tecido adiposo. Os depósitos adiposos normalmente contêm várias células imunes que, juntas, mantêm a integridade e a sensibilidade hormonal dos adipócitos. Como demonstrado na figura 3, em animais saudáveis, essas células imunológicas operam em um estado geral de Th2 ou tipo 2, que controla coordenadamente a integridade e o metabolismo dos tecidos, controlando a atividade de subconjuntos de linfócitos T. Essas células liberam uma cascata de citocinas que regulam coordenadamente outras células imunes, incluindo eosinófilos e mastócitos que mantêm macrófagos residentes em um estado polarizado em M2 ou ativado alternadamente (Lumeng et al., 2007). Por sua vez, os macrófagos polarizados em M2 secretam interleucina-10 (IL-10), contribuindo para a manutenção da sensibilidade à insulina nos adipócitos.

Os ácidos graxos oriundos da dieta desencadeiam a sinalização do receptor toll do tipo 4 (TLR4) em adipócitos e macrófagos, induzindo a ativação do sistema imunológico inato. Esses macrófagos sofrem mudanças drásticas durante a obesidade, com um aumento no número geral de macrófagos que se deve em grande parte ao recrutamento de macrófagos polarizados por M1, que exibem um fenótipo pró-inflamatório e secretam citocinas inflamatórias (Saltiel & Olefsky, 2017). O aumento no número de macrófagos, bem como o aumento da proporção de macrófagos M2 para M1, é uma característica da inflamação do tecido adiposo que acompanha a obesidade e está associada ao desenvolvimento de resistência à insulina e doença metabólica (Lumeng et al., 2007) (Figura 3). Portanto, os macrófagos servem como efetores de um complexo programa imunológico desencadeado pela obesidade. Esse programa é caracterizado por uma resposta imune Th1 ou tipo 1 geral que geralmente é ativada como

resposta à infecção. No entanto, no caso da obesidade, essa reação imune inicia uma resposta crônica no tecido adiposo que envolve uma variedade de células T efetoras, células  $\beta$ , células NK e outras que produzem as citocinas que governam a acumulação e a atividade dos macrófagos pró-inflamatórios M1 (Lackey & Olefsky 2016).

**Figura 3. Perda da regulação imune e ativação pró-inflamatória no tecido adiposo associado à obesidade**



Representação comparativa de função metabólica no tecido adiposo de indivíduos normais (esquerda) e obesos (direita). O tecido adiposo magro contém células imunes reguladoras (azul) que suprimem células imunes pró-inflamatórias (vermelhas) e sustentam a ativação alternativa de macrófagos por citocinas associadas a Th2. Os adipócitos no tecido adiposo magro são de tamanho normal e produzem adiponectina, que possui propriedades anti-inflamatórias. Por outro lado, o tecido adiposo obeso é infiltrado com células imunes pró-inflamatórias que produzem grandes quantidades de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Os macrófagos M1 se acumulam em estruturas do tipo coroa em torno de adipócitos hipertróficos que aumentam a taxa de lipólise e secretam ácidos graxos livres que podem servir como sinais de perigo endógenos para estimular a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ . Os adipócitos no tecido adiposo obeso também aumentam a produção de leptina, que promove as células Th1. O epitélio intestinal é afetado na obesidade, fazendo com que AGs e padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeos (LPS), entram no tecido adiposo e estimulam a inflamação. Além disso, as células imunes no sangue migram para o tecido adiposo em resposta à produção aumentada de quimiocinas. Adaptado de Han e Levings, 2013.

Diversas citocinas pró-inflamatórias possuem importantes efeitos metabólicos, incluindo efeitos diretos na modulação das respostas fisiológicas responsáveis pelo tecido adiposo. Leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) são algumas das citocinas mais relevantes no metabolismo dos adipócitos (De Luis et al., 2011). Os adipócitos secretam TNF- $\alpha$  que, em camundongos obesos, causa inflamação sistêmica (Hotamisligil et al., 1993), e *in vitro* atua suprimindo a expressão da maioria dos genes específicos do tecido adiposo, incluindo as enzimas envolvidas na lipogênese (Torti et al., 1985).

A natureza da inflamação induzida pela DHF difere de outros paradigmas inflamatórios, pois envolve a ativação tônica do sistema imunológico inato que afeta a homeostase metabólica ao longo da vida. A inflamação também leva a respostas não adaptativas, como fibrose e necrose, que podem causar danos significativos aos tecidos (Saltiel & Olefsky, 2017). Além disso, a inflamação induzida pela dieta hiperlipídica é única, pois envolve múltiplos órgãos, incluindo tecido adiposo, pâncreas, fígado, músculo esquelético, coração e cérebro. Essas características da inflamação representam um desafio para a compreensão dos mecanismos subjacentes e da maneira pela qual eles afetam os sistemas metabólicos.

Além da disfunção metabólica nos órgãos periféricos, a obesidade e a inflamação associada ao consumo de DHF também estão relacionadas a alterações na função cerebral, particularmente em áreas que regulam a homeostase energética e o metabolismo sistêmico.

A existência da BHE é, em parte, responsável pelo conceito de que o encéfalo é um local “imune-privilegiado”, com passagem restrita de células do sistema imune periférico para o SNC (Engelhardt e Coisne, 2011; revisado em Greenwood et al., 2011; Shrestha et al., 2013). Todavia, como já descrito anteriormente, durante processos inflamatórios sistêmicos ocorrem alterações na cinética das junções oclusivas e, conseqüentemente, disfunção da BHE. O aumento na atividade imuno periférica e conseqüente aumento na permeabilidade da BHE podem afetar o SNC, levando à ativação de células fagocitárias cerebrais (microglias), ativação astrocitária, invasão local de células imunes circulantes e produção aumentada de

mediadores pró-inflamatórios, gerando neuroinflamação (Takeda et al., 2014). Neste contexto, uma característica importante da fisiopatologia de distúrbios metabólicos é a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias periféricas (Ferreira et al., 2014).

A dieta hiperlipídica é capaz de induzir um processo inflamatório no hipotálamo, que interfere com as vias intracelulares de sinalização pelos hormônios leptina e insulina, resultando em hiperfagia, diminuição do gasto de energia e, por fim, obesidade (Carvalheira et al., 2001; Thaler e Schwartz, 2010). O hipotálamo controla os circuitos neuroendócrinos, incluindo o sistema da melanocortina, que regulam o comportamento alimentar e o gasto energético. Foi demonstrado que dietas ricas em gorduras / calorias induzem processos inflamatórios no hipotálamo antes da indução desses eventos nos tecidos periféricos. Jais e Brüning (2017) descrevem as contribuições de diferentes tipos de células neuronais e não neuronais para a inflamação hipotalâmica. Por outro lado, ao inibir farmacologicamente a inflamação hipotalâmica, a resistência à insulina no fígado é revertida (Milanski et al., 2012). De Souza e colaboradores (2005) estudaram o efeito da DHF sobre o padrão de expressão gênica no hipotálamo de ratos e reportaram um aumento significativo na expressão de citocinas de resposta inflamatória, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 após 16 semanas de dieta hiperlipídica.

Evidências obtidas por intermédio de estudos de neuroimagem e avaliação de marcadores inflamatórios no líquido cefalorraquidiano de indivíduos obesos sugerem que alterações semelhantes podem estar presentes também em seres humanos (van de Sande-Lee et al., 2011; Thaler et al., 2012). Sendo assim, a neuroinflamação torna-se um dos principais componentes adjuntos às alterações no SNC, e um dos principais eventos que conecta as mudanças metabólicas às doenças cerebrovasculares e neurodegenerativas (Grundy et al., 2005; revisado em Monteiro e Azevedo, 2010).

### 1.5 MODULAÇÃO DO APETITE ATRAVÉS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Através da integração dos sentidos e estímulos sensoriais, os animais e humanos são capazes de detectar situações de perigo e modular comportamentos para sobrevivência. No entanto, nem todos os perigos em potencial podem ser detectados através dos sentidos padrão que normalmente consideraríamos. Microorganismos, vírus e outros patógenos são, na maioria dos casos, irreconhecíveis pelos sistemas sensoriais, mas apresentam alguns dos maiores riscos à sobrevivência dos animais. A "detecção" desses patógenos está no sistema imunológico, que

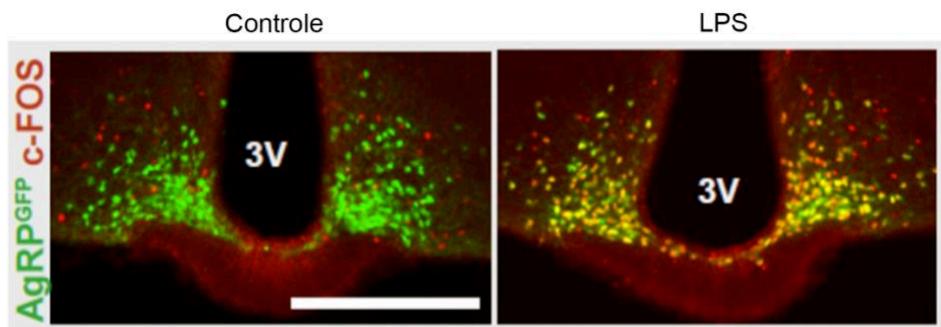
evoluiu para responder adequadamente a esses desafios e promover mudanças no organismo a fim de combater infecções e aumentar a taxa de sobrevivência durante a doença. Essas mudanças no organismo podem ser divididas em três tipos: respostas locais, sistêmicas e centrais. As respostas locais e sistêmicas incluem respectivamente alterações que ocorrem especificamente no local da infecção (como atração de macrófagos ou dilatação capilar) (Headland e Norling, 2015; Zhang e Wang, 2014) ou em outras partes do organismo (como aumento da hematopoiese em medula óssea ou lipólise no tecido adiposo) (Zaretsky et al., 2014, Schäffler e Schölmerich, 2010). No entanto, o aspecto comum entre esses dois tipos de respostas é que ambas são mediadas diretamente pelo sistema imunológico. Por outro lado, a resposta central durante uma reação de fase imune aguda é mediada por alterações no SNC, que levam à febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e alterações no comportamento como letargia, atividade sexual reduzida ou anorexia.

Em termos de energia, a inflamação é um processo altamente exigente e a atividade imunológica pode potencialmente se beneficiar da ingestão de nutrientes para combater a doença. No entanto, a perda dramática de apetite é uma das principais mudanças no comportamento observadas durante períodos inflamatórios sistêmicos (revisado em Gautron e Layé, 2009). Embora inicialmente contra intuitivamente, a anorexia pode desempenhar um papel benéfico nos mecanismos por trás da defesa do hospedeiro, por exemplo, reduzindo a disponibilidade direta de nutrientes para os patógenos ou reduzindo o gasto de energia relacionado à digestão (Exton, 1997). Essa hipótese foi testada precocemente e potencialmente confirmada ao demonstrar que camundongos infectados por injeção da bactéria *Listeria monocytogenes* apresentaram taxas de sobrevivência aumentadas quando ocorreu comportamento anorético em comparação com camundongos alimentados via gavagem (Murray e Murray, 1979).

Estudos preliminares não publicados, realizados no laboratório D'Agostino (Rowett Institute), mostraram que durante a inflamação sistêmica, os neurônios AgRP estão amplamente ativos (Figura 4). De fato, verificou-se que a proteína de fluorescência verde (GFP), cuja expressão foi induzida nos neurônios AgRP, está co-localizada com a imunocoloração c-FOS, um marcador substituto da atividade neuronal. A co-localização foi evidente em camundongos tratados com lipopolissacádeos (LPS) durante a anorexia, mas não em camundongos controle,

sugerindo que os neurônios AgRP permanecem ativos durante a inflamação, embora não promovam o consumo de alimentos. Portanto, a anorexia tem sido considerada parte de um programa adaptativo cognitivo mediado pelo cérebro, conhecido como “comportamento de doença”, no entanto, os efeitos e os mecanismos biológicos subjacentes à sua natureza adaptativa permanecem desconhecidos. A razão para essa lacuna no conhecimento é que, até o momento, não foi possível desconectar experimentalmente a inflamação sistêmica da anorexia.

**Figura 4: Atividade neuronal de AgRP durante a inflamação sistêmica.**



Os camundongos foram injetados com LPS para induzir inflamação sistêmica ou solução salina (controle saudável). A expressão da proteína de fluorescência verde (GFP) foi induzida em neurônios contendo AgRP. Foi realizada imunocoloração para c-Fos (marcador de atividade neuronal, em vermelho). Somente em camundongos LPS, a co-localização de AgRP e c-Fos (indicada pela cor amarela) pode ser observada.

O possível envolvimento dos neurônios AgRP na resposta inflamatória sistêmica ainda não foi investigado. O ARC hipotalâmico, onde encontram-se esses neurônios, torna-se um alvo em potencial para o sistema imunológico induzir os efeitos anoréxicos do comportamento da doença. Entretanto, permanece a questão de como as informações do sistema imunológico podem alcançar o sistema de melanocortina para que ocorra a modulação do apetite. Existem três mecanismos principais para transferir informações do sistema imunológico para o SNC: humoral (caracterizado por mediadores plasmáticos como citocinas que atingem o SNC), neuronal (principalmente pela enervação do nervo vago nos compartimentos imunes relevantes) e o recrutamento direto de células imunes periféricas para o SNC. Desses três, é provável que o primeiro e o último mecanismo estejam envolvidos no ARC, pois esse núcleo do hipotálamo é particularmente capaz de detectar sinais circulantes.

Já se sabe que a integridade da BHE não é homogênea em todo o encéfalo. Em certas regiões, particularmente nas circunventriculares, a BHE é mais flexível e pode permitir uma

certa extensão de permeabilidade, uma espécie de "janelas do cérebro", como o pesquisador pioneiro em permeabilidade da BHE, Karl Knigge se referiria (Knigge et al., 1975). Portanto, é provável que o mecanismo humoral da comunicação imune-cerebral e o recrutamento de células imunes periféricas no SNC ocorram nesses órgãos circunventriculares, como a eminência média adjacente ao ARC. Em termos de comunicação humoral, é bem estabelecido que receptores direcionados por citocinas, como o TLR4, são expressos em órgãos circunventriculares, incluindo a eminência média, e transportam informações imunes periféricas para o SNC (Laflamme e Rivest, 2001). Mais recentemente, relatos de infiltração de leucócitos e patógenos na eminência média apresentaram indicações precoces de que essa região circunventricular também pode mediar as células imunes periféricas de recrutamento (Mottahedin et al., 2017; Bentivoglio et al., 2018). No entanto, não existem dados atuais que elucidem quais mecanismos estão envolvidos na comunicação imune-cérebro durante a inflamação e subsequente modulação do apetite.

Para abordar a questão de como o sistema imunológico pode modular o apetite, dietas crônicas com alto teor de gordura em estudos sobre obesidade, têm sido amplamente relatados como indutores de inflamação hipotalâmica (Lee et al., 2018; revisado em Ávalos et al., 2018). De forma interessante, alguns estudos demonstraram aumento da expressão do inibidor de serina protease A3N (Serpina3N) no ARC durante a fase aguda inflamatória (Dalby et al., 2018; Sergi et al., 2018). A Serpina3N inibe a enzima elastase leucocitária (Elane), liberada durante a inflamação ao detectar a infiltração de linfócitos T no SNC (Vicuña et al., 2015), apresentando um potencial elo para interação imune-cérebro. Alterações na expressão da Serpina3N hipotalâmica também foram relatadas após lesão cerebral traumática leve em ratos (Samal et al., 2015), uma indicação adicional de que as alterações na expressão de Serpina3N são consistentemente conservadas através de respostas inflamatórias induzidas de maneira diferente.

Em suma, pode-se inferir que, além dos já bem estabelecidos mecanismos desencadeadores das disfunções metabólicas oriundas de hábitos alimentares ocidentais, o cérebro, como um órgão regulador da homeostase energética do organismo, também é suscetível a disfunções que levam à neurodegeneração. Muito tem sido investigado acerca das alterações centrais causadas pelo alto consumo lipídico e, como descritas na revisão

bibliográfica acima, incluem déficit cognitivo e transtornos de humor, disfunção mitocondrial, sináptica e da BHE, além de neuroinflamação. No entanto, como e quando essas alterações ocorrem ainda é uma lacuna em aberto na literatura, sendo necessário um maior número de estudo para o entendimento.

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os hábitos e estilo de vida da modernidade são representados por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares usualmente relacionados à deposição central de gordura ou à obesidade, oriundos de um maior consumo de dieta hiperlipídica, em especial gorduras saturadas. É importante destacar a associação do alto consumo de gorduras saturadas com a doença cardiovascular, aumentando a mortalidade geral em cerca de 1,5 vezes e a cardiovascular em cerca de 2,5 vezes, tendo grande importância do ponto de vista epidemiológico. Além disso, o ambiente obesogênico em que a população ocidental vive tem aumentado cada vez mais o número de casos de transtornos neuropsiquiátricos, como ansiedade e depressão. Não obstante, o alto consumo de gorduras saturadas da dieta também está correlacionado ao comprometimento cognitivo em adultos jovens e ao aumento dos casos de demência na população idosa.

É de grande interesse por parte da saúde pública decifrar os mecanismos subjacentes às consequências das alterações causadas pela dieta hiperlipídica no SNC. Por isso, hipotetizamos que o consumo de dieta com alto teor de gordura saturada, uma condição inflamatória periférica, apresenta alterações funcionais e neuroquímicas hipocampais, associadas a um aumento da susceptibilidade do SNC à neurodegeneração.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do consumo de dieta rica em gordura saturada sobre parâmetros metabólicos, neuroquímicos, inflamatórios e comportamentais, bem como estudar os mecanismos biológicos centrais subjacentes à regulação do apetite durante endotoxemia no sistema nervoso central.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, de forma temporal, os efeitos da exposição a uma dieta rica em gordura em camundongos sobre:

- i) parâmetros comportamentais associados à aprendizagem e memória e emocionalidade;
- ii) função e integridade da BHE em diferentes regiões encefálicas como o bulbo olfatório, córtex pré-frontal e hipocampo;
- iii) o metabolismo energético e função mitocondrial hipocampal;
- iv) marcadores inflamatórios e plasticidade sináptica no hipocampo.

- Investigar o papel do neuropeptídeo orexigênico AgRP sob estado de inflamação sistêmica através da:

- i) ativação seletiva de neurônios AgRP;
- ii) avaliação da integridade da barreira hematohipotalâmica;
- iii) expressão de proteases específicas envolvidas no processo de defesa imunológica;
- iv) expressão proteica e gênica de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo e em órgãos do sistema periférico, respectivamente;
- v) avaliação do recrutamento do sistema imune adaptativo.

## CAPÍTULO I

## **Rapid impairment of hippocampal function by intervention of high-fat diet in mice**

Gabriela Cristina de Paula<sup>1</sup>, Herver S. Brunetta<sup>2</sup>, Daiane F. Engel<sup>3</sup>, Joana M. Gaspar<sup>1</sup>, Licio A. Velloso<sup>3</sup>, Jade de Oliveira<sup>4</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>1,5\*</sup>

*<sup>1</sup>Biochemistry Department, Federal University of Santa Catarina, Brazil*

*<sup>2</sup>Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Brazil*

*<sup>3</sup>Laboratory of Cell Signaling, Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, Brazil*

*<sup>4</sup>Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil*

*<sup>5</sup>Department of Physiological Science, University of Brasilia, Brasilia, Brazil*

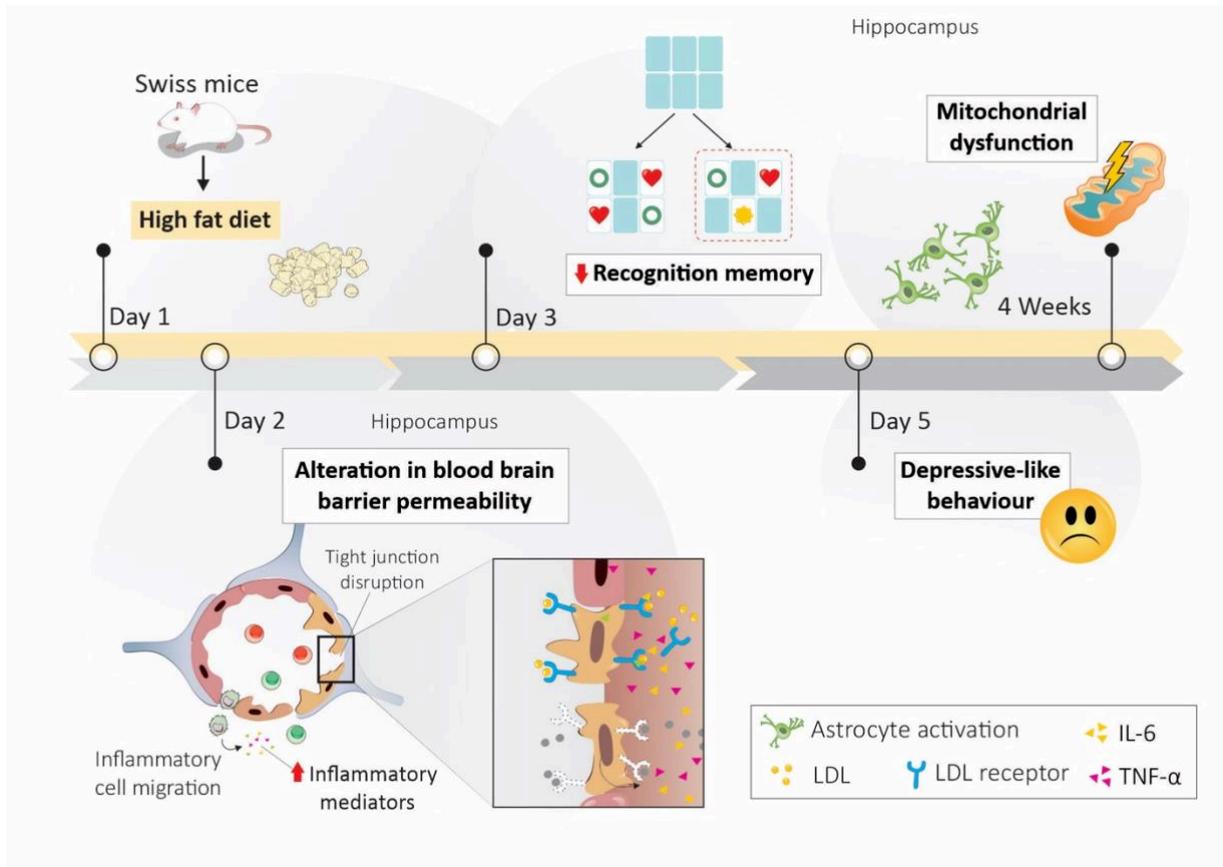
\*Corresponding author:

Andreza Fabro de Bem, PhD

Department of Physiological Science, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

E-mail address: debemandreza@gmail.com

Phone: +55 61 3107-2902



## ABSTRACT

Worldwide, especially in Western civilizations, most of the staple diets contain high amounts of fats, carbohydrates and comparatively low quantities of protein, leading to the increasing number of overweight and obese individuals. The well recognized association between energy dense diets and metabolic disorders also leads to an increasing investigation of its impact on the brain, behavior and cognition. Here we demonstrate that mice recognition memory and mood behavior are compromised after only three and five days of HFD, respectively, and these changes are accompanied by increased BBB permeability, followed by reduction on synaptic plasticity on day seven. Hippocampal mitochondrial function is also affected, even after a longer period of HFD consumption, as well as astrogliosis. An early overexpression of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) occurs, and when treated with the anti-inflammatory drug, Infliximab, behavioral and BBB alterations were prevented. These results indicate a more rapid effect than previously reported of the consumption of HFD leading to cognition and mood disorders, possibly by disrupting BBB homeostasis, a process that

contribute to neuroinflammation. These findings have important implications for the contribution HFD intake to the development of neurodegenerative disorders.

**Keywords:** High-fat diet; Cognition; Depression; Hippocampus; Mitochondrial function; BBB permeability, synaptic plasticity.

## INTRODUCTION

Although we are aware that the mantra 'Eat right and Exercise' is the secret to promote weight stability and good health, the obesogenic environment in which Western society lives often leads to the increased consumption of high fat diets (HFD) by the population, the Western diet (Reardon et al., 2003; Asfaw, 2011). Studies show the adverse health consequences generated by high consumption of energy dense diets, especially with regard to disruption of the homeostasis, leading to metabolic disorders and the development of chronic diseases, such as type 2 diabetes (Freeman et al., 2014) and cardiovascular disease (Kratz et al., 2013). Equally worryingly, more recent evidence points to the impact of dietary fat on brain function and behavior (Davidson et al., 2013; Cordner and Tamashiro, 2015).

A large number of studies have shown that the consumption of HFD predominantly affects the hypothalamus. Because it's directly relation to appetitive behavior and gut afferent information, the hypothalamus plays a major role in understanding the metabolic changes that are due to the Western diet [Reviewed in (Velloso and Schwartz, 2011)]. Interestingly, contrary to what was thought of other regions were spared, there are good grounds to believe that the hippocampus may also be particularly susceptible to damage by dietary factors (Davidson et al., 2007). As the major region responsible for learning and memory processes, the hippocampus becomes vulnerable to the early phases of neurodegenerative dementias, including vascular dementia and Alzheimer`s disease (AD) (Kanoski and Davidson, 2011). Through the vascular hypothesis for AD, strong positive correlations exist between Western diet habits and cognitive deficiencies (Knopman et al., 2001). Epidemiological studies have shown the development of cognitive deficits in elderly by the Western diet habits (Morris et al., 2006). Similarly, preclinical investigations in rodents have corroborated epidemiological data showing that the HFD can induce spatial memory impairment after weeks or months of diet (Cordner and Tamashiro, 2015).

In addition to disturbances in cognitive function, consumption of HFD is also strongly related to mood swings. Epidemiological data indicate that obese individuals have an increased risk of developing the most prevalent type of depression, known as the major depressive disorder (MDD) (Mansur et al., 2015). Two-dimensionally, patients diagnosed with MDD are about 50% more likely to develop overweight (Toups et al., 2013). Given this effect of HFD consumption on cognition and mood disorders, evidence underlying neurobiological mechanisms linking metabolic derangement to neuropathologies is beginning to accumulate.

Although many questions about this association still remain unanswered and the precise way in which damage to the hippocampus occurs is incompletely understood, the consumption of HFD affecting cognitive and emotional abilities involves several independent mechanisms, including a) inflammatory process, glia activation and recruitment of immune system (Pistell et al., 2010), b) abnormalities in cellular bioenergetics, mainly mitochondrial function (Carraro et al., 2018), c) increase in blood-brain barrier permeability (Kanoski et al., 2010) and d) impairment on synaptic plasticity. However, the time-course in which these events take place is not yet well established.

In this regard, in the present study we aimed to investigate key elements involved in the steps of alterations in the hippocampus of mice fed a HFD in a time-course evaluation. We show that cognitive impairment and depressive-like behavior occur in a short period of HFD ingestion. These events are accompanied by detectable changes in pre-synaptic neurons prior to mitochondrial dysfunction and astrocyte activation. We also demonstrate BBB disruption and inflammation being the earliest markers undergoing modulation by the diet.

## METHODS

**Animals.** Six-week-old male Swiss mice were obtained from Federal University of Santa Catarina, Brazil. Experimental protocols and procedures adhered regulations in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Federal University of Santa Catarina's Ethical Review Committee for Animal Experimentation (Protocol number 6191300316). Animals were housed on grid floors and maintained on a 12:12 hour light:dark cycle with temperature-controlled environment (22

$\pm 1^\circ\text{C}$ ) and access to food and water *ad libitum*. Mice were randomly assigned into specified experimental groups at the beginning of the experiment.

**Experimental diet and study design.** For all experiments, mice were divided into two groups fed either standard chow (SD), composed by 10% calories from fat (Nuvilab® CR-1, Nuvital, PR, Brazil), or a high-fat diet (HFD) composed by 60% calories from fat (31.2% lard; 11.55% maize starch; 20% casein; 13.2% dextrinized starch; 10% sucrose; 4% soy oil; 5% microcrystalline cellulose; 3.5% in mineral mix 93 g; 1% in vit mix; 0.3% L-cystine; 0.25% choline bitartrate; 0.0028% BHT - PragSolutions Bioscience® n-60, SP, Brazil). The first step of experiments mice received SD or HFD for 1, 2, or 4 weeks, followed by memory and depression related behaviors tasks performed in different cohorts of animals ( $n = 8-10$ ) (fig 1a-c). At the end of the different experimental periods, mice were euthanised by exsanguination under terminal anaesthesia, blood was collected to total plasma cholesterol evaluation and hippocampi were dissected for either mitochondrial function analysis or BBB permeability assessment ( $n = 5-7$ ). Another cohort of animals was transcardially perfused and had their brains removed for immunohistochemical assay.

In some experiments, mice were randomly selected for feeding on SD or HFD for 1 up to 6 days. Same behavioral tests were performed in different groups of animals followed by hippocampal dissection for BBB permeability or gene expression evaluation ( $n = 8-10$ ). During the last series of experiments SD or HFD-fed mice were treated concomitantly with the infliximab anti-inflammatory for 7 days (fig 4a). At the end of the treatment period, animals underwent the behavioral tests described in the previous experimental designs ( $n = 8-10$ ), and the BBB permeability was evaluated in the hippocampi ( $n = 4-5$ ). Body mass gain, food, and water intake were evaluated in all experimental groups.

### **Behavioral tasks.**

*Novel Object Recognition (NOR)*. All sessions were performed between 8 am and 3 pm. The task was carried out in an open field arena as described before (De Paula et al., 2020) with some alterations. Briefly, after 3-day habituation sessions on the arena, animals were submitted to a 5-minute long session of training (with two identical objects) followed by the test session (with a novel object distinct in shape, color and size) after 30 minutes (fig 1b). Increased exploration

of the novel object indicatives functioning recognition memory. Results were expressed as percentage of time exploring each object during the test session. A discrimination index was calculated –  $(T_{\text{novel}} \times 100) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$ , where  $T_{\text{novel}}$  was the time spent by the animals exploring the novel object and  $T_{\text{familiar}}$  was the time spent by the animals exploring the known object.

*Tail suspension test (TST).* TST consists of suspending mice above the ground by their tails based on the fact that animals subjected to this short-term inescapable stress will develop an immobile posture (fig 1c). The test is useful in assessing depression related behaviours, as increased immobility time indicates depressive-like behaviour. In summarize, mice were acoustically and visually isolated and suspended 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded during a 6 min period. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. The immobility time was recorded by observers blind to the diet treatment (Steru et al., 1985).

**Fluorescein penetration assay.** To assess BBB leakage, sodium fluorescein (NaF 0.5 kDa, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland) was diluted in 0.9% saline and injected in the dorsal penile vein (40mg/ml) of mice anesthetized with isoflurane and allowed to circulate in the blood stream for 30 minutes (fig 1f). Animals were then transcardially perfused with 50 ml of 0.9% saline and hippocampus were quickly dissected, weighed and put on ice for subsequent analyses. The tissues were homogenized in 7,5% trichloroacetic acid, and centrifuged for 10 min at 10,000 x g. To 0.1 ml of the supernatant was added 250  $\mu$ l of potassium phosphate (TFK) buffer pH 7.0 to precipitate the proteins. The fluorescence of was scanned at an excitation and emission wavelengths of 485 nm and 538 nm respectively, using a fluorescence Microplate Reader (Spectramax Paradigm).

**Immunofluorescence staining and image analysis.** Animals were anesthetized with tribromoethanol and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Fixed brains were removed, embedded in 4% PFA for 24 h, and cryoprotected in a 30% sucrose solution in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C. The brains were then frozen

and stored in  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis. Serial coronal sections ( $30\ \mu\text{m}$ ) of hippocampi were obtained with a cryostat (Leica) at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Groups of 6–8 sections per animal were incubated at room temperature for 2 h with 5% horse serum (HS) solution in PBS containing 2% Triton X-100. After blocking step, free-floating sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP, mouse polyclonal, 1:400, Sigma, G3893) and synaptophysin (SYP, mouse polyclonal, 1:150, abcam, ab8049) in 1% HS diluted in 0.5% PBS-Tx. Sections were then washed in PBS and incubated for 2 h with anti-mouse Alexa 488 (1:400, Invitrogen, A-11001) in 1% HS diluted in 0.5% PBS-Tx. After a final washing step, sections were mounted with CC/Mount (Sigma) and covered with coverslips. Images from mouse hippocampi were acquired on an OLYMPUS BX41 and Confocal Zeiss Upright LSM780-NLO microscopy and quantified using ImageJ software.

**High-Resolution Respirometry.** The Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) was used for measurements of respiration to mitochondrial function evaluation. Hippocampus homogenate were performed in a high-calcium respiration buffer (Sims & Blass, 1986) using substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocols (Makreeka-kuka et al., 2015) with modifications. Pyruvate and malate (5 mM and 2.5 mM, respectively) were used to determine Complex I (CI) linked LEAK respiration. ADP was added at  $550\ \mu\text{M}$  final concentration, which was saturating for oxygen flux to obtain OXPHOS capacity linked to CI. Succinate (5 mM) was added to reconstitute convergent CI&II-linked respiration. Titrations with the uncoupler FCCP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) were performed to determine electron transfer system (ETS) capacity. Rotenone ( $1\ \mu\text{M}$  to inhibit Complex I) was added for determination of phosphorylating CII (CII<sub>p</sub>). All experiments were performed at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Real Time PCR.** For the expressions of TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$  and IL-6, mRNAs were measured in the hippocampus of mice submitted to SD or HFD up to 6 days. Intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an endogenous control for normalization in different samples. The following primers were purchased from Applied Biosystems: GAPDH (4351309), TNF- $\alpha$  (Mm99999068\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm00434228\_m1) and IL-6 (Mm99999064\_m1). The optimal concentrations of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were

obtained through five-point, 2-fold dilution curve analysis for each gene. For the relative quantification of genes under study, real-time PCR reactions were performed in triplicate from 3.0 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nm of each specific primer, TaqMan™ (Applied Biosystems), and RNase free water to a final volume of 20 µl. The values of relative gene expression data were performed in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems).

**Statistics and data representation.** Statistical analysis and graphs were done using the software GraphPad Prism7® (GraphPad Software, La Jolla, CA). Unless noted otherwise two groups were compared by unpaired *t*-test. Data from object recognition test expressed as Discrimination Index as described in De Paula et al (2020), and difference between groups was assessed by performing unpaired *t* test. Statistical significance was set to  $p < 0.05$ . Outliers were only excluded when a problem was noted during the experiment or sample processing as described above. Values are represented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

## RESULTS

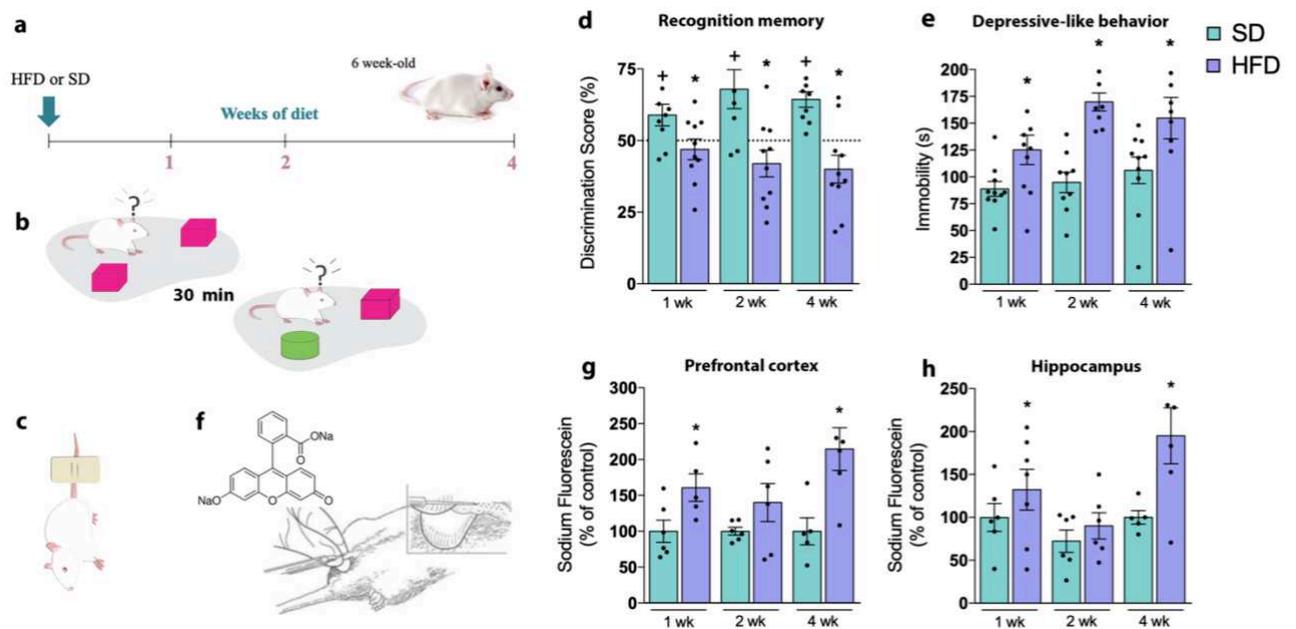
### **Metabolic and brain alterations in a short time exposure of high-fat diet**

Evaluating the metabolic response after an introduction of HFD for 1, 2 or 4 weeks, we recently demonstrated that although fasting blood glucose was similar between the groups, HFD decreased glucose clearance and increased the area under the curve (AUC) from 1 up to 4 weeks compared to SD group. The impairment on glucose homeostasis was accompanied by higher body mass gain in HFD animals and an increase on plasma cholesterol levels was observed after 2 weeks of HFD remaining elevated until 4 weeks of treatment (Brunetta et al., 2018).

Here we investigated the effect of HFD on CNS of mice as shown in figure 1. Initially, mice were subjected to a hippocampal-dependent recognition cued version of the novel object recognition test for evaluation of cognitive capacity. Animals fed a SD demonstrated normal recognition memory, as shown by increased exploratory behavior towards the novel object used in the test session at all period of evaluation (fig 1d). However, the HFD group did not reach the exploratory percentage of the novel object above the theoretical value of 50% from the first week of evaluation, maintaining memory impairment up to 4 weeks of diet.

Mice were further tested in the tail suspension test (TST) to evaluate depressive-like behavior, where immobility time was recorded (fig 1e). Our results indicate a longer immobility time in the animals submitted to HFD compared to the SD group, a difference already observed in the first week of diet and persisting up to 4 weeks [F(1 wk) = 3.882; F(2 wk) = 1.451; F(4 wk) = 2.18,  $P < 0.05$ ].

We thus asked whether an increase in BBB permeability could be evoked by HFD consumption on prefrontal cortex and hippocampus assessed by the sodium fluorescein functional test (fig. 1f). Figure 1g and 1h shows mean NaFl concentration (g NaFl/mg brain tissue) in the prefrontal cortex and hippocampus, respectively. A significant higher NaFl concentration was observed with 1 week of treatment in prefrontal cortex ( $F = 1.271$ ,  $P < 0.05$ ) and hippocampus ( $F = 1.492$ ,  $P < 0.05$ ). Intriguingly, at 2 weeks of HFD the NaFl concentration of both structures was similar to the SD-fed group [F(1 PC) = 23.29; F(Hip) = 1.363], increasing again after 4 weeks of diet [F(1 PC) = 3.003; F(Hip) = 20.66,  $P < 0.05$ ]. These results demonstrate that the consumption of a hyperlipid diet even for a short period can cause, besides metabolic alterations, important central changes that may culminate in neurodegeneration.



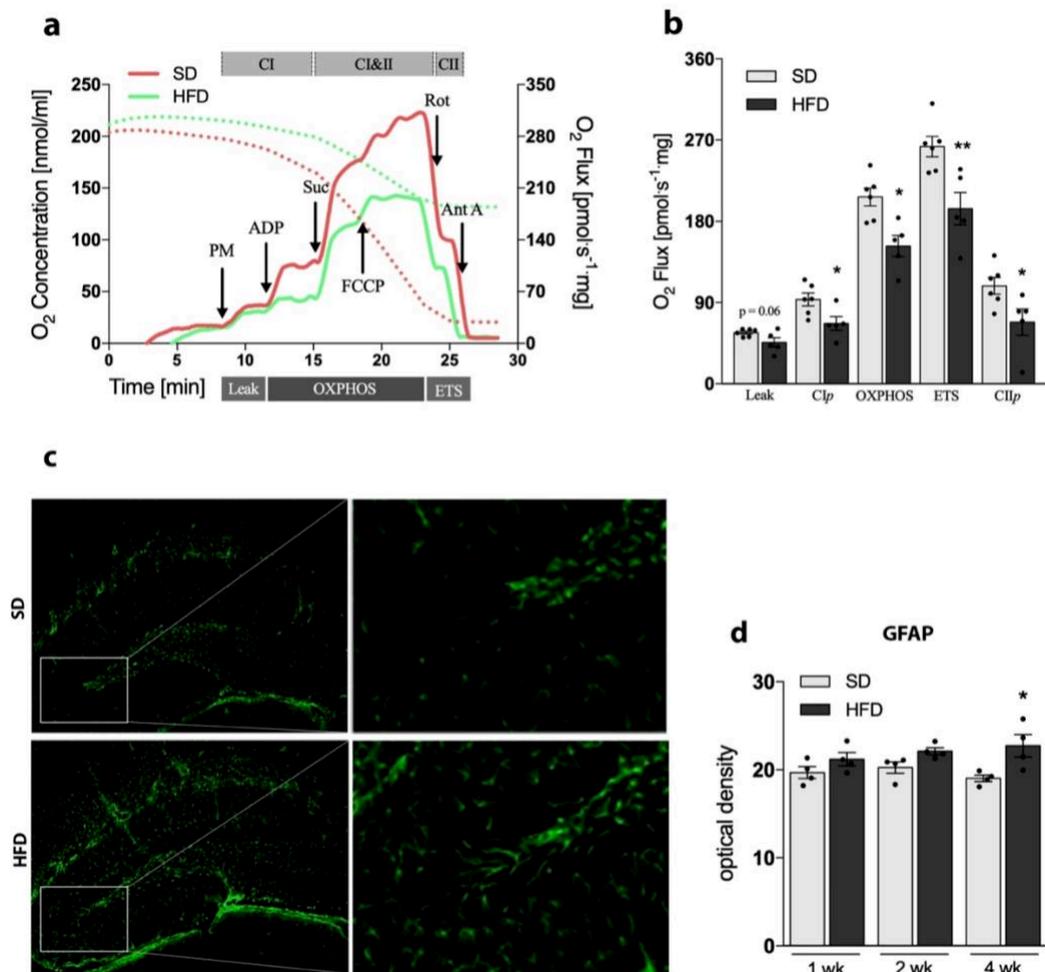
**Figure 1. Hippocampal abnormalities of mice fed a high-fat diet.** a) Experimental design and the b) behavioral tests approach. Novel object recognition (NOR) and tail suspension tests (TST) were performed in mice fed SD or HFD for 1, 2 and 4 weeks. c) Cognitive performance of SD and HFD-treated mice was accessed by NOR (n= 8-10/group; one-sample t test with hypothetical value of 50%). d) Time of immobility in TST in order to evaluate depressive-like behaviour [n= 8-10; unpaired *t* test

for 1, 2 and 4 weeks of diet respectively ( $F= 3.882; 1.451; 2.18$ ). **e**) Sodium fluorescein assay to evaluate BBB permeability on **f**) prefrontal cortex ( $F= 1.271; 23.291; 3.003$ ) and **g**) hippocampus ( $F= 1.492; 1.363; 20.66$ ) [ $n= 5-7$ ; unpaired  $t$  test for 1, 2 and 4 weeks of diet respectively]. Values are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  SD vs. HFD.

### **Hippocampal alterations after 4 weeks of high-fat diet consumption**

Characterization of mitochondrial activity was further performed from hippocampus homogenate by high resolution respirometry. Animals fed with HFD for 4 weeks showed a significant reduction in mitochondrial function when compared with those submitted to SD (figure 2a and 2b). We used a multi-substrate protocol to measure proton leak (LEAK, PM), complex I linked OXPHOS capacity ( $CI_p$ , PM+ADP) and oxidative phosphorylation (OXPHOS, PM+ADP+S) participation in the  $O_2$  consumption rate of hippocampal homogenate from mice (figure 2a). LEAK stimulation with PM, in the nonphosphorylating state, showed significant lower  $O_2$  consumption with 4 weeks of HFD (fig 2b,  $F= 7.978$ ,  $P = 0.063$ ). Addition of succinate (S) to  $CI_p$  induced an increase of respiratory OXPHOS capacity in both groups, however animals submitted to HFD were 25% lower ( $F= 1.169$ ,  $P < 0.05$ ). To obtain a measure for ETS, i.e., the maximal capacity of the electron transfer system under the conditions examined, a step-by-step titration with uncoupler FCCCP was performed, showing that HFD caused a significant reduction of ETS capacity ( $F= 2.061$ ,  $P < 0.05$ ). The inhibitory effect of rotenone (Rot) on Complex I permits the evaluation of the complex II linked OXPHOS capacity ( $CII_p$ ), showing a 60% more activity on SD-fed mice (fig 4b,  $F=2.077$ ,  $P < 0.05$ ). No significant differences were observed on mitochondrial function up to 2 weeks of HFD (Supplementary fig 1a and b).

Astrogliosis is a hallmark of CNS injury and several mouse models of neurodegeneration have recapitulated this outcome of functional alterations in glial cells by using immunohistochemistry. Immunoreactivity for GFAP (fig 2d) was significantly increased in the hippocampus of mice that received HFD for 4 weeks ( $F = 11.39$ ,  $P < 0.05$ ), remaining unchanged in previous periods [Supplementary fig 1c,  $F(1 \text{ wk}) = 1.271$ ;  $F(2 \text{ wk}) = 2.561$ ].



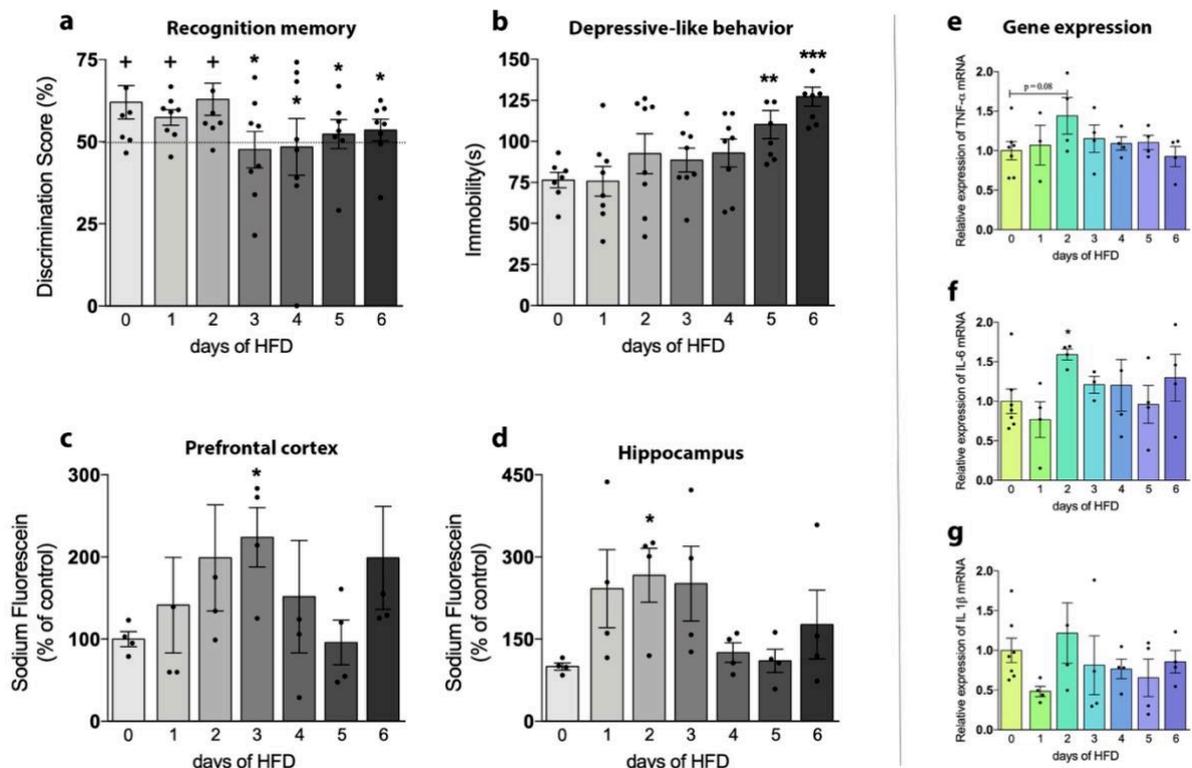
**Figure 2. Hippocampal alterations followed by 4 weeks of HFD.** **a**) Representative experiment in SUIT protocol. **b**) Respirometric measurements by oxygen flux using PM as initial substrates (leak;  $F=7.978$ ,  $P=0.063$ ), followed by ADP ( $Clp$ ;  $F=1.027$ ), S (Oxphos;  $F=1.169$ ), FCCP titrations (ETS;  $F=2.061$ ) and finally inhibited by Rot ( $ClIp$ ;  $F=2.077$ ) and Ant A in the hippocampus of mice submitted to 4 weeks of SD or HFD ( $n=5-6$ ; unpaired  $t$  test). **c**) Representative images of GFAP immunolabeling in the hippocampus of 4 weeks SD and HFD-treated mice (scale bar = 75  $\mu$ m), along with **d**) quantification of GFAP immunoreactivity ( $n=4$ /group; unpaired  $t$  test for 1, 2 and 4 weeks of diet respectively ( $F=1.271$ ; 2.561; 11.39). Values are mean  $\pm$  SEM. \* $P<0.05$  SD vs. HFD.

### Short-term high-fat diet compromises brain function

In order to assess exactly the onset of brain alterations, we evaluated the same parameters in an early time-course of dietary feeding. Figure 3a shows that the cognitive impairment appears with only 3 days of HFD, while depressive-like behavior can be visualized after day 5 [fig 3b,  $F(\text{day } 5) = 3.763$ ,  $P < 0.01$ ;  $F(\text{day } 6) = 1.759$ ,  $P < 0.0001$ ]. Despite the high blood-brain barrier plasticity to injury situations, an increase in its permeability could be

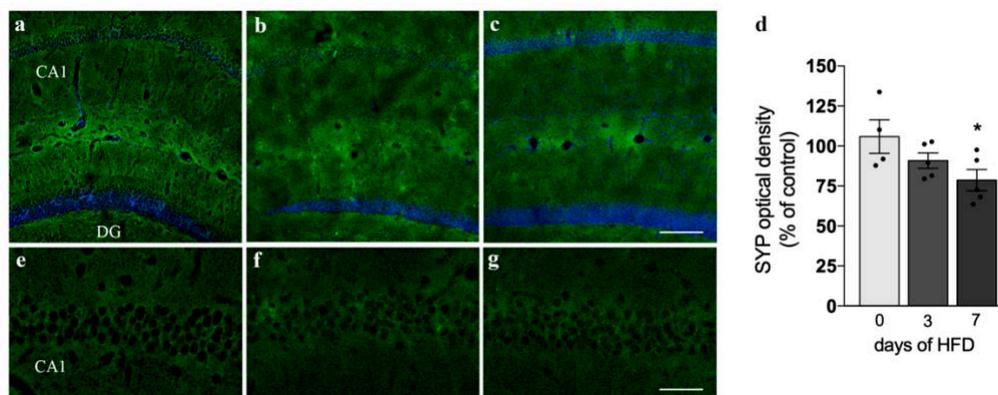
observed on the third day of hyperlipidic diet in the prefrontal cortex (fig 3c,  $F= 15.59$ ) and after 2 days in the hippocampus (fig 3d,  $F= 57.77$ ).

Given that dietary fats are important triggers for changes in BBB permeability, this disordered connection between the peripheral and CNS may induce activation of an inflammatory process. Therefore, we seek to evaluate the gene expression of the main proinflammatory cytokines involved in this process in the hippocampus of animals. Although there were no significant changes of the hippocampal expression of IL 1 $\beta$  between the groups during the 6 days of dietary feeding (fig 3g), at the second day, mice showed a trend of increasing in TNF- $\alpha$  (fig 3e,  $F= 2.31$ ) and a remarkable increase of IL-6 (fig 3f,  $F= 8.948$ ).



**Figure 3. Evaluation of the high-fat diet effects in an early time-course.** Assessment of the initial moment of changes in **a**) cognition ( $n= 6-8$ /group; one-sample  $t$  test with hypothetical value of 50%), **b**) depressive-like behaviour ( $n= 6-8$  unpaired  $t$  test), BBB permeability in **c**) prefrontal cortex and **d**) hippocampus in mice fed HFD from 1 up to 6 days ( $n= 3-4$  unpaired  $t$  test), as well as proinflammatory cytokines represented by **e**) TNF- $\alpha$ , **f**) IL-6 and **g**) IL 1 $\beta$  ( $n= 4-6$  unpaired  $t$  test). \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$  SD vs. HFD.

We next investigated whether mice consuming HFD for up to seven days would exhibit alterations in synapse number. IHC staining for the presynaptic marker synaptophysin (SYP) was conducted in the hippocampal CA1 region (Fig. 4a-c and e-g) to visualize presynaptic specializations. The intensity of SYP was analyzed by reactive synaptic optical density, which displayed a 25.7% decrease (Fig. 4d,  $F= 1.97$ ) of mice submitted to 7 days of HFD compared with control.

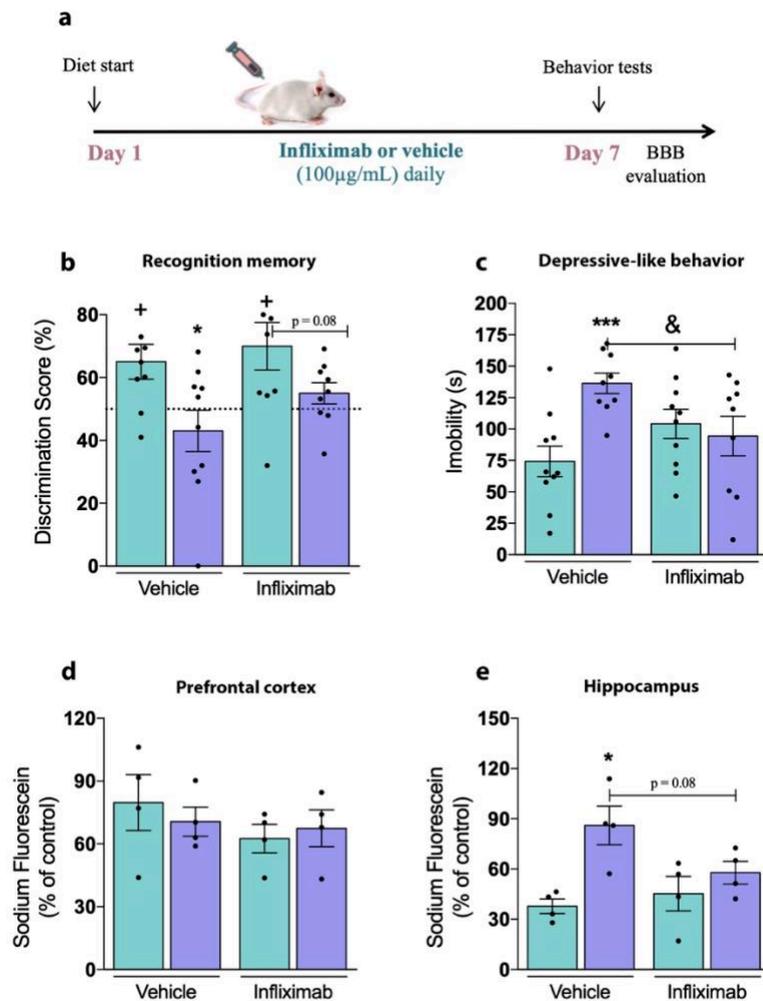


**Figure 4. Decrease of synaptic density after seven days of HFD.** a-c, e-g) IHC analysis for the expression and localization of the pre-synaptic terminals immunolabeled for pre-synaptic marker synaptophysin (SYP) in hippocampal CA1 region of mice submitted standard diet, 3 or 7 days of HFD (n= 4-5, unpaired *t* test). Scale bar = 50  $\mu$ m (a-c) and 20  $\mu$ m (e-g) d) quantitative analysis for the relative intensity of SYP. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  SD vs. HFD.

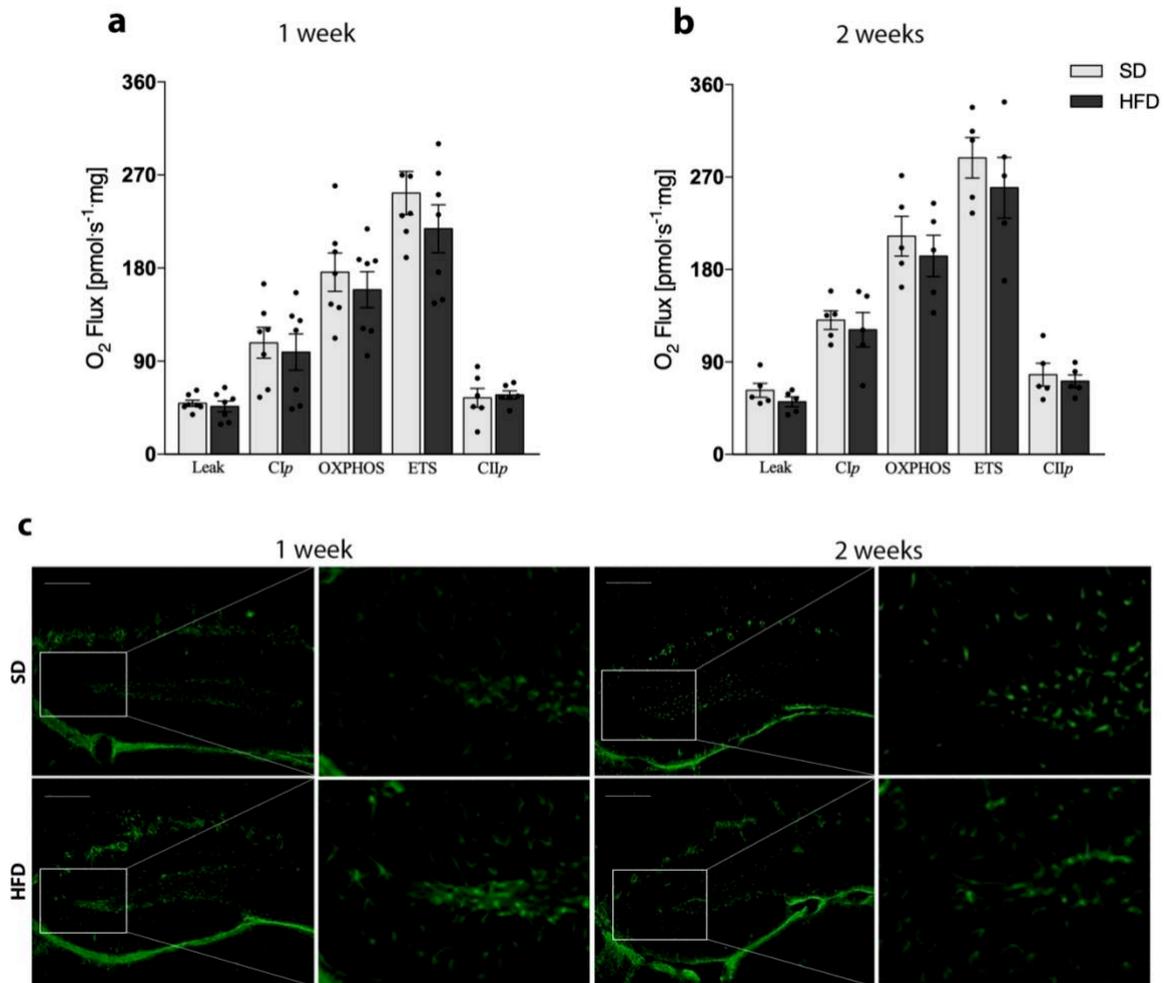
### Infliximab modulates diet-induced brain alterations

In clinical practice, the inhibition of TNF- $\alpha$  activity has proven to have beneficial effects in chronic inflammatory diseases and blood glucose control. Our aim in this experimental design was to evaluate the effect of the TNF- $\alpha$  blocking monoclonal antibody infliximab on mice fed an HFD for 1 week (fig 5a). Our results show that the impaired recognition memory observed in mice after 1 week of HFD consumption is reversed by the cotreatment with infliximab (fig 5b). The inhibition of TNF- $\alpha$  activity also reduces diet-induced depressive-like behavior as shown by the lower immobility period in TST compared to the vehicle group in figure 4c ( $F= 3.732$ ,  $P < 0.05$ ). Seven days of treatment with infliximab resulted in no significant changes in prefrontal cortex NaFl concentration regardless of the diet (figure 5d). In hippocampus on the other hand, the HFD produced a significant increase in BBB

permeability in vehicle group (figure 5e;  $F= 7.18$  vehicle SD vs. HFD,  $P < 0.05$ ) and the pharmacological inhibition of TNF- $\alpha$  activity seems to reduce NaFl leakage to the central nervous system ( $F= 2.896$  HFD vehicle vs. infliximab,  $P = 0.08$ ).



**Figure 5. Anti-inflammatory effect on CNS alterations induced by high-fat diet.** **a**) Experimental design of mice fed either SD or HFD for 7 days and treated with saline or infliximab (10 mg/kg). **b**) Cognitive performance of treated mice ( $n= 8-10$ /group; one-sample  $t$  test with hypothetical value of 50%). **c**) Time of immobility in TST [ $n= 8-10$ ; unpaired  $t$  test ( $F= 2.479$  vehicle SD vs. HFD) ( $F= 3.732$  HFD vehicle vs. infliximab)]. **d**) Sodium fluorescein assay prefrontal cortex and **e**) hippocampus ( $n= 4$ /group;  $F= 7.18$  vehicle SD vs. HFD;  $F= 2.896$  HFD vehicle vs. infliximab). Values are mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  SD vs. HFD and & $P < 0.05$  vehicle vs. infliximab.



**Supplementary Figure 1. Mitochondrial function and astrocyte activation within 1 and 2 weeks of HFD.** **a-b)** Respirometric measurements by oxygen flux in the hippocampus of mice submitted to 1 (a) and 2 (b) weeks of SD or HFD ( $n = 5-6$ ; unpaired  $t$  test). **c)** Representative images of GFAP immunolabeling in the hippocampus of 1 and 2 weeks SD and HFD-treated mice (scale bar = 75  $\mu\text{m}$ ). Values are mean  $\pm$  SEM.

#### REFERENCES

- Reardon T, Timmer CP, Barret CB, Berdegue JA (2003) The rise of supermarkets in Africa, Asia, and Latin America. *American Journal of Agricultural Economics*. 85:1140–1146.
- Asfaw A (2011). Does consumption of processed foods explain disparities in the body weight of individuals? The case of Guatemala. *Health Economics*. 20(2):184–195.
- Freeman LR, Haley-Zitlin V, Rosenberger DS, Granholm AC (2014) Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. *Nutr Neurosci* 17(6):241–251.
- Kratz M1, Baars T, Guyenet S (2013) The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *Eur J Nutr*. 52(1):1-24.

- Davidson TL, Hargrave SL, Swithers SE, Sample CH, Fu X, Kinzig KP, Zheng W (2013) Inter-relationships among Diet, Obesity and Hippocampal-dependent Cognitive Function. *Neuroscience*. 253:110-22.
- Cordner ZA, Tamashiro KL (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav*. 152:363-71.
- Velloso LA, Schwartz MW (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int. J. Obes*. 35:1455-1465.
- Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ and Benoit SC (2007) A Potential Role for the Hippocampus in Energy Intake and Body Weight Regulation. *Curr Opin Pharmacol*. 7(6): 613–616.
- Kanoski SE & Davidson TL (2011) Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & Behavior*. 103:59–68.
- Knopman D, Boland LL, Mosley T, Howard G, Liao D, Szklo M, McGovern P, Folsom AR (2001) Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology*. 56(1):42-8.
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS, Scherr PA (2006) Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol*. 63(8):1085-8.
- Mansur RB, Brietzke E, McIntyre RS (2015) Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 52, 89–104.
- Toups MS, Myers AK, Wisniewski SR, et al. (2013) Relationship between obesity and depression: characteristics and treatment outcomes with antidepressant medication. *Psychosom Med*. 75(9):863–872.
- Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK and Bruce-Keller AJ (2010) Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J. Neuroimmunol*. 219:25–32.
- Carraro RS, Souza GF, Solon C, Razolli DS, Chausse B, Barbizan R, Victorio SC, Velloso LA (2018) Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 460:238-245.
- Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL (2010) The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimers Dis*. 21(1):207-19.
- De Paula GC, de Oliveira J, Engel DF, Lopes SC, Moreira ELG, Figueiredo CP, Prediger RD, Fabro de Bem A (2020) Red wine consumption mitigates the cognitive impairments in low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr<sup>-/-</sup>) mice. *Nutr Neurosci*. 1-11.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 85:367-370.
- Sims NR & Blass JP (1986) Expression of Classical Mitochondrial Respiratory Responses in Homogenates of Rat Forebrain. *J Neurochem*. 47(2):496-505.
- Makrecka-Kuka M, Krumschnabel G and Gnaiger E (2015) High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules*. 5:1319-1338.

Brunetta HS, de Paula GC, de Oliveira J, Martins EL, Dos Santos GJ, Galina A, Rafacho A, de Bem AF, Nunes EA (2019) Decrement in resting and insulin-stimulated soleus muscle mitochondrial respiration is an early event in diet-induced obesity in mice. *Exp Physiol.* 104(3):306-321.

## CAPÍTULO II

## **Appetite regulation during endotoxin-mediated systemic inflammation**

### INTRODUCTION

The central nervous system plays an important role controlling food consumption and maintaining metabolic homeostasis. Within the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC), a subset of neurons expressing agouti-related protein (AgRP) is known to promote feeding under food deprivation and hunger (Betley et al., 2015). Among other mechanisms, the activity of these neurons is also regulated by the stomach, which releases, upon starvation, the hormone peptide ghrelin. Central or peripheral injection of ghrelin activates AgRP neurons within minutes after administration, promotes food intake and leads to body weight gain, in a dose dependent manner (Nakazato et al., 2001). Ghrelin levels increase of about two-fold during starvation, and immediately fall back to baseline upon re-feeding or oral glucose administration (Tschop et al., 2000). In this context, the initiation of food consumption, or just the sight of food, leads to a rapid and strong inhibition of 96% of AgRP neurons (Betley et al., 2015).

Eating behavior also occurs by activating AgRP neurons using calcium imaging (Andermann & Moore, 2008). However, recently it has been shown that artificial activation of AgRP neurons does not promote ingestive behavior in presence of lipopolysaccharides (LPS), an endotoxemic stimulus with known anorectic effects (Liu et al., 2016). Capitalising on these findings, here the possible link between AgRP neurons and inflammation was investigated in order to shed light on the biological mechanism governing an apparent paradox, such as having reduced food consumption during a highly energy demanding process like systemic inflammation.

In awake, freely moving animals, the neural recording modality of fiber photometry has become an important tool in identifying correlates of behavior and neural circuits. Fiber photometry uses genetically encoded optical reporters to link specific cellular activity in stereotaxically targeted brain structures to specific behaviors in real-time (Simone et al., 2018). In the present study, we first investigated the effects of LPS-induced endotoxemia on appetitive behavior under selective activation of AgRP neurons by calcium imaging in fiber photometry. From this, we evaluated the gene expression levels of several cytokines involved in the systemic inflammatory process in peripheral tissues and hypothalamus in fed and fasting mice under

endotoxemia, as well as the expression of tight junctions present in the blood-hypothalamic barrier (BHB) and its permeability.

## METHODS

**Ethical Statement.** All animal experiments were performed under strict adherence to UK Home Office regulations according to the Animals (Scientific Procedures) Act, 1986, and were licensed by a UK Home Office Project License.

**Animals.** AgRP<sup>tm1(cre)</sup>Lowl (JAX #012899) were obtained from The Jackson Laboratory. Animals were provided with standard chow and water ad libitum and were housed in seal-safe individual ventilated cages (Techniplast) under controlled temperature/humidity (22-24 °C – 55%) and 12-hr light/dark cycles.

**Experimental design 1.** This first experimental protocol was carried out following Boudjadja M., as a way to learn the technique used in this methodology. The results of the experimental design presented here belongs to the project elaborated by Mehdi as part of his PhD study.

We used the newest real time *in vivo* neuronal activity assessment methodology to verify the activity of AgRP hunger-promoting neurons under LPS-induced endotoxemia. For this, animals were placed inside isolated cages and the photometric fiber was linked to the light cable connected to the photodetector. After recording basal neuronal activity, the animals received LPS (100 µg/kg i.p.) or saline (0,9%) injection and tests such as food presentation, caged food or ghrelin injection were performed.

**Stereotaxic Fiber Implantation and Virus Injection.** To achieve cell-type specific Cre-inducible calcium indicator (jRCaMP7s) expression in the arcuate nucleus of the hypothalamus, 10-week-old male mice were injected with AAVvirus. Stereotaxic surgery was performed under 5% (v/v) isoflurane in oxygen anesthesia and fixed into a stereotactic frame (Kopf Instruments) using ear bar with head angled at roughly 45° on a heated pad. Sedation was maintained at 1.5–2.5% isoflurane during surgery. Under magnification, craniotomy was performed to target the

ARC region (A/P, -1.46; M/L, 0.10; D/V, 5.90 from the obex). A glass micropipette (diameter 20–40  $\mu\text{m}$ ) was used to deliver 150 nl of virus/side with multiple microinjections over 2–3 minutes, under air pressure using a PLI-100A Pico-Injector (Harvard Apparatus, Cambridge, UK) and allowed to diffuse for 10 min before the needle was withdrawn. Animals received subcutaneous administration of 5 mg/kg Carprofen and 0.1 mg/kg Buprenorphine pre-operatively to provide pain relief upon recovery. Chronically implantable optic fibers (Doric Lenses) with 400  $\mu\text{m}$  core, 0.48 NA optic fiber threaded through metal ferrules were then implanted above the viral injection site. Recordings began a minimum 3 weeks after surgery to allow sufficient time for stable and robust virus expression.

***In vivo* calcium imaging.** Fiber photometry allows for the measurement of neuronal calcium transients in real time (Calipari et al, 2016; Gunaydin et al, 2014). Two light emitting diodes at 473 nm (jRCaMP stimulation wavelength) and 405 nm (control for artifactual fluorescence) (Thorlabs) were reflected off dichroic mirrors (FF495; Semrock) and coupled to a 400  $\mu\text{m}$  0.4 N.A. optical fiber (BFH48-600, Thorlabs) using a 400  $\times$  0.4 N.A. microscope objective (Olympus) and fiber launch (Thorlabs). The emission light was collected by the same optical fiber, passed through a GFP filter and focused onto a photodetector (model 2151 femtowatt photoreceiver; Newport) where the two output signals were separated based on modulation frequency. Samples were collected at a frequency of 381 Hz. Recordings were made from ARC region in mice and data were extracted and analyzed using custom-written scripts in Matlab R2016b (The MathWorks).

**Experimental design 2.** This experimental trial aims to define the biological mechanism underlying sickness-related loss of appetite. For this, fed and fasted mice (heathy or under endotoxemia) had their blood, tissues and brain removed for posterior evaluation. Analysis of gene and proteins expression involved in the inflammatory process were performed, as well as specific markers of BHB permeability homeostasis.

**Drug treatments and tissue harvest.** All mice were injected with 0.9% saline or 2.5 mg/kg LPS (Sigma, L4391). For all these IP injections 25 G needles were used; volumes of administered solutions were within the LASA guidelines. Small samples of blood were

collected by tail nick at 2 and 4h post LPS injection; serum was obtained by centrifuging blood at 5000 rpm for 5 min at 4 °C and stored at -80 °C until use for ELISA assessment. Four hours after LPS injection, mice were killed by carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) method and tissues were harvested in RNALater (Sigma R0901). Hypothalamus, liver, colon and spleen were collected from each mouse and stored at -80 °C until use. Another batch of animals was transcardially perfused with saline followed by 10% formalin + 1% labelling agent (Evans blue) and had their brains removed for BHB permeability analysis at the brainstem level.

**RNA extraction & real time qPCR.** RNA isolation and purification from hypothalamus, colon, spleen and liver samples were performed using TRI-Reagent (Sigma, 15596026) and QIAGEN RNeasy Mini Kit (74104) respectively, according to the manufacturer's protocol. The RNA concentration and purity were determined using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) with the spectral absorption at 260 and 280 nm. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from RNA templates using High capacity cDNA reverse transcription kits (ThermoFisher, 4368814) and GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (from Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR experiments were carried out using a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) using the Quantifast SYBR green detection method (Qiagen, 204054). For hypothalamus, liver and spleen samples gene expression was compared with Gapdh, while for colon samples gene expression was compared with Hprt. The following genes were used: *claudin*, *occludin* and *ZO-1* (for hypothalamus) and *Tnf*, *Il6*, *Il2*, *Il1b*, *Ifng*, *Saa3*, *Foxp3* (for colon, spleen and liver) (see Table 2 for the oligonucleotide primer list).

**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).** TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  protein levels in serum samples were assayed using mouse TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  ELISA Kit (R&D system, MTA00B) respectively, according to the manufacturer's protocol. Serum samples were diluted 1:10 in reagent diluent buffer.

**Blood-hypothalamus-barrier permeability.** The analysis of BHB permeability was done by transcardially perfusion of Evans blue (EB), a dye with high affinity for serum albumin and is

commonly used to assess the permeability of the blood-brain barrier (BBB) (Mullier et al., 2010). Mice were deeply anesthetized (1% pentobarbital, 10 ml/kg) and perfused transcardially with 0.1 M PBS, followed by 10% formalin containing 1% EB. After decapitation, fixed brains were removed, postfixed in 10% formalin for 24 h, and dehydrated in a 30% sucrose solution at 4°C. The brains were prepared for coronal brain sectioning (30 µm) of hypothalami on vibratome at -25°C and the red autofluorescence of EB was directly visualized and imaged with a fluorescent microscope.

**Experimental design 3.** This study step aimed to identify changes in protein expression occurring at the ARC and ME following induced activation of the immune system during a sustained inflammatory response. To achieve this the dextran sodium sulfate (DSS) colitis murine model was used (Eichele & Kharbanda, 2017). DSS is a polysaccharide specifically toxic to colon epithelial cells which causes disruption of the gut epithelial barrier, resulting in endotoxemia as the gut microbiota reaches blood circulation. Animals were transcardially perfused with saline followed by 10% formalin and had their brains removed for immunohistochemistry assay.

**DSS-induced colitis model.** All mice had their body weights recorded previously to the start of experiment. Following this, mice used for the colitis murine model were provided 2.5% DSS in water as their only water source (n=6-8 each group). Symptoms of ulcerative colitis were measured daily for all mice and scored according to three parameters: body weight loss (0 – no weight loss, 4 - <80% weight), stool consistency (0 – healthy, 4 – diarrhea) and presence of blood in the faeces (0 – no blood, 4 – bloody stools) in a scale from 0 to 12.

**Immunohistochemistry (IHC).** ARC serial slices (30 µm) used for IHC were selected (10-12 per brain) and washed with PBS for 30 minutes, changing PBS every 10 minutes, followed by blocking for 60 minutes with 10% goat serum and 0.25% Triton X-100 in PBS. Brain slices were then incubated overnight at room temperature with 5% goat serum and 0.25% Triton X-100 in PBS solution containing the primary antibody goat anti-CD3 (1:200, BD Biosciences cat. no. 555273). On the following day slices were washed again for 30 minutes with PBS, and then incubated for 2.5 hours with 5% goat serum and 0.25% Triton X-100 in PBS solution

containing the secondary antibody: anti-goat-AF594 (1:200, Abcam cat. no. ab150160). A final wash in PBS was performed and slices were mounted onto Superfrost slides to be further imaged in AXIOSCOP II microscope (Zeiss, Germany). Neuroanatomical landmarks were identified using the Allen Brain Mouse Atlas (Allen Institute, Seattle, US).

**Western Blot.** Hypothalamic excisions from the brain of control and colitis model (2.5% DSS for 6 days) mice were homogenized using zirconium beads, centrifuged to remove lipid content and protein concentrations determined using a bicinchoninic acid assay (BCA) protein assay kit (ThermoFisher). Protein extracts were used to prepare western blot samples in 1X Laemmli Buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS and 2%  $\beta$ -mercaptoethanol in dH<sub>2</sub>O). Protein samples (37 $\mu$ g of protein per well) were run in a 15% poly-acrylamide gel (15% acrylamide, 25% 1.5M Tris pH 8.8, 1% SDS, 1% APS and 0.1% TEMED in dH<sub>2</sub>O) for 60 minutes at constant 150V in running buffer (25mM Tris, 192mM glycine and 0.1% SDS in dH<sub>2</sub>O, pH 8.3) and then transferred onto methanol-activated PVDF membranes at constant 300mA for 60 minutes in transfer buffer (20mM Tris, 150mM glycine, 0.1% SDS and 20% methanol in dH<sub>2</sub>O). The resulting membranes were Ponceau stained (Ponceau staining solution: 0.1% Ponceau S dye and 1% acetic acid in dH<sub>2</sub>O) to identify protein bands and were then cut into two strips to separate the actin-containing band (43kDa) from the CD3-containing band (25kDa), using for this purpose a dual colour standard protein ladder (Bio-Rad, cat. no. 1610374) run simultaneously with the protein samples. Membranes were then blocked for 60 minutes at room temperature with TBST solution (20mM Tris, 150mM NaCl and 0.1% Tween-20 in dH<sub>2</sub>O) containing 3% bovine serum albumin (BSA). Membranes were incubated overnight at 4°C in a roller with primary antibodies for CD3 (1:250, BD Biosciences cat. no. 555273) or housekeeping protein (actin: 1:4000, Abcam cat. no. ab8227) in antibody diluent buffer (25mM Tris, 0.5mM NaCl, 0.05% Tween-20 and 0.5% BSA in dH<sub>2</sub>O pH 7.4). In the following morning membranes were washed in 6 10-minute intervals with TBST at room temperature, then incubated at room temperature for 60 minutes with secondary HRP-conjugated antibodies (1:1000 anti-rat for CD3 and 1:10000 anti-mouse for actin) in antibody diluent buffer, followed by 6 10-minute intervals of washes with PBS. Membranes were

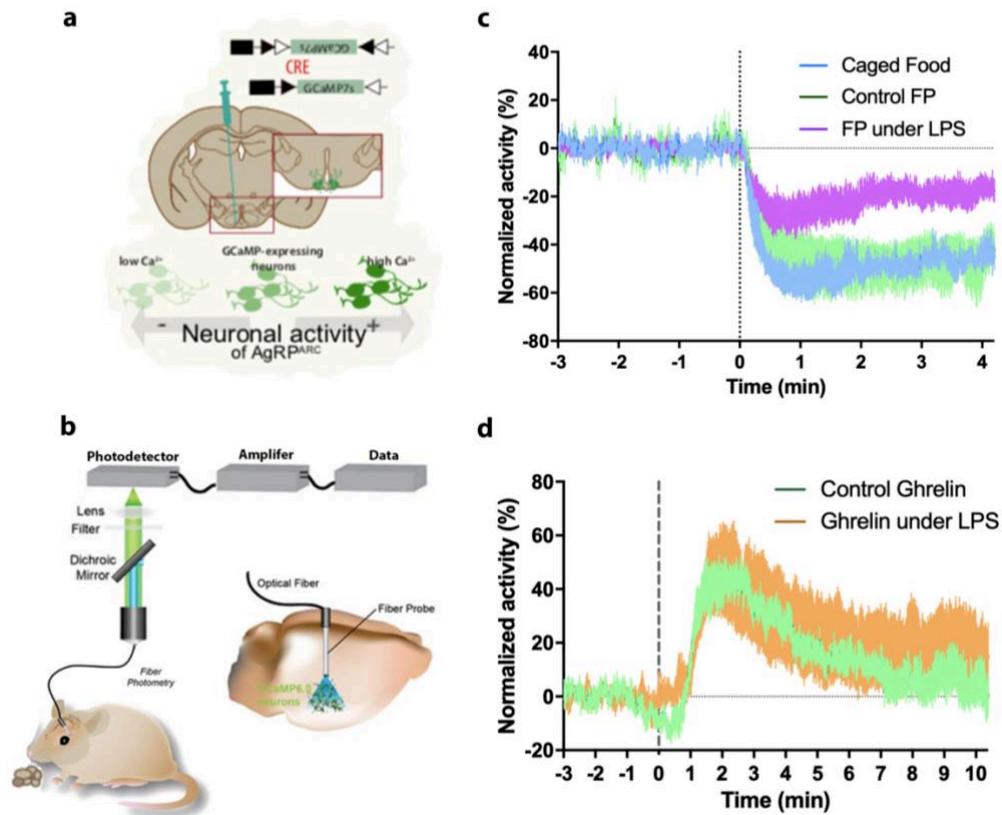
developed using Luminata Crescendo (ThermoFisher) and imaged with a LAS-3000 Fujifilm imaging system. Images were processed using Fiji Imaging Software.

**Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were analyzed using student t-test: unpaired, two tailed, parametric distribution. N represents independent biological replicates. Data are presented as mean  $\pm$  Standard Derivation (SD) and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### **AgRP neurons are able to detect negative balance but fail to promote feeding during inflammation**

In order to access AgRP neuronal activity on appetite-controlling behavior of animals under inflammation induction, we performed *in vivo* fiber photometry approach. The basic principles of the technique are represented in Figure 1a-b. As shown in Figure 1c, AgRP neurons are rapidly inhibited upon sensory detection of palatable food in both accessible and caged form (minute 0) and their activity remains inhibited respectively during consumption or olfaction in healthy mice. However, despite a slight drop in activity upon food presentation, feeding-promoting AgRP neurons remain active during systemic inflammation (Figure 1c) without being able to promote feeding. Moreover, under inflammation the response of AgRP neurons to ghrelin (a hormone signaling hunger) remains similar to that observed in control mice (Figure 1d), demonstrating that these neurons maintain their ability to detect caloric deficiency, but fail to induce food ingestion.

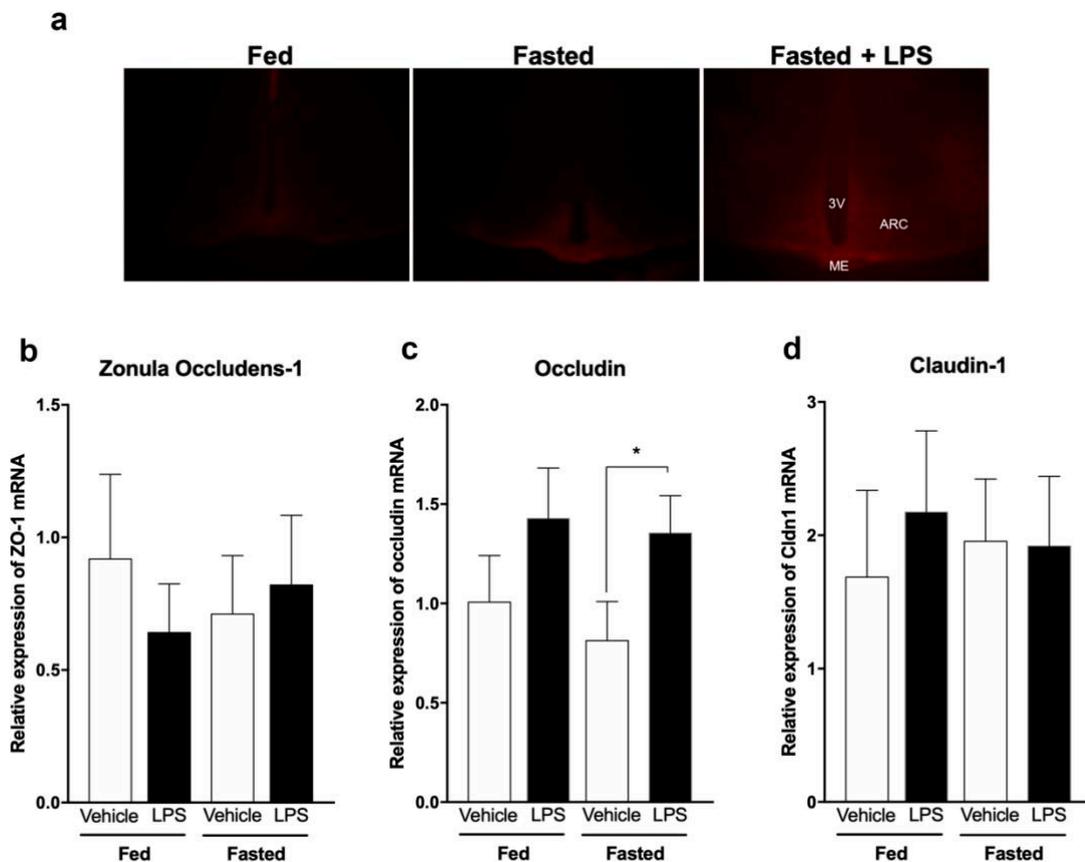


**Figure 1. In vivo calcium imaging of AgRP neurons in freely behaving mice on the detection of feeding behavior during inflammation.** (a-b) Schematics representing basic principles of *in vivo* fiber photometry. a) AgRP<sub>ARC</sub> neurons are targeted with a Cre-inducible calcium indicator (jRCaMP1e) via stereotaxic surgery in AgRP-Cre reporter mice. b) A fiber probe is implanted above the ARC to collect bulk changes in calcium-mediated fluorescence using fiber photometry. The activity-dependent fluorescence is then spectrally separated, filtered, and focused onto a photodetector for quantification. (c-d) Representative results of *in vivo* recordings showing that AgRP<sub>ARC</sub> neurons activity to c) food presentation (FP) and d) ghrelin injection (n=4 each group).

### **Analysis of the blood-hypothalamus-barrier permeability following low-grade immune challenges**

The extravasation of Evans blue (EB) dye from blood vessels, a sensitive estimate of BHB permeability, was measured and compared in the hypothalami of mice fed *ad libitum*, deprived of food for 24h and those 24h-deprived of food post-LPS. We observed that in animals under LPS-induced endotoxemia there is a greater extravasation of EB in the hypothalamic medium eminence, being diffused also to the ARC (Figure 2a), showing a higher permeability of BHB through the circumventricular region. To investigate the role of BHB plasticity in the adaptive response to fasting during inflammation and reveal the molecular mechanisms

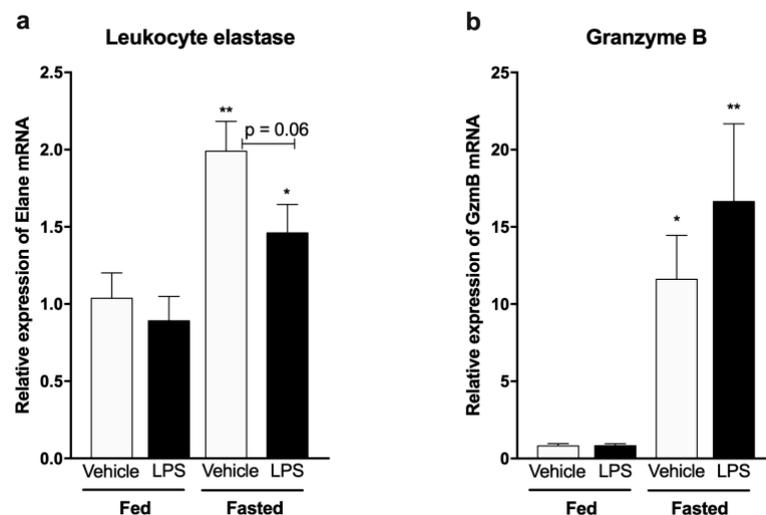
determining the degree of increase in BHB permeability, the expression changes of tight junction (TJ) proteins including ZO-1, occludin and claudin-1 were measured (Figure 2 b-d). Tight junctions are required for cellular adhesion between adjacent cerebrovascular endothelial cells and can limit the transfer of water and other substances through the BHB. Visually, we can see that systemic inflammation alters the organization of the tight junction complexes in the hypothalamus (Figure 2 b-d), although it is only significant in the mRNA occludin expression levels during fasting (Figure 2c).



**Figure 2. BHB rearrangement during anorexia and endotoxemia.** a) Evans Blue dye diffusion in the hypothalamic tuberal region in fed, fasted and fasted under LPS mice (n=6 animals for each group). RTqPCR analysis of b) ZO-1, c) Occludin and d) Claudin-1 tight junction genes involved in BHB plasticity in the hypothalamus of all groups. Results are presented as mean  $\pm$  SD. \*p<0.05.

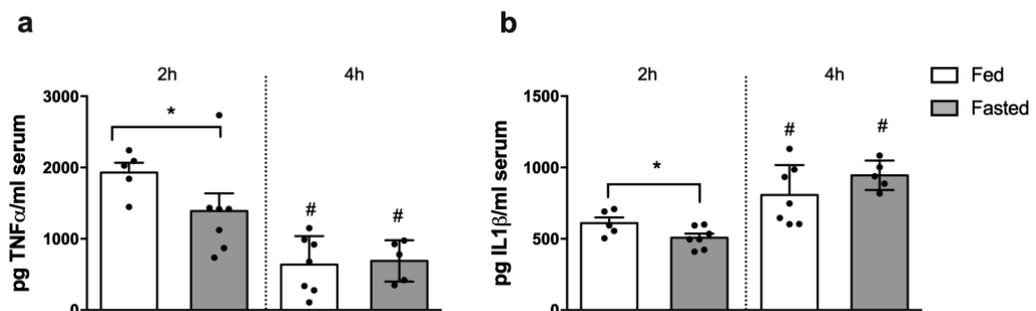
### Interaction between circulating immune cells and hypothalamic appetite-regulating neurons

In a previous study by Dr. D'Agostino's group, it was shown that AgRP neurons largely express SerpinA3N, a serine protease inhibitor (unpublished data). Knowing that during fasting and systemic inflammation states a rearrangement of the BHB occurs, we hypothesize that quite possibly a consequent T lymphocyte infiltration in the CNS is also occurring. Therefore, we sought to evaluate the expression of the T cell release product, leukocyte elastase (Elane), a serine protease that has been associated with inflammation but poorly investigated in the nervous system (Lee & Downey, 2001; Vicuña et al., 2015). During fasting, we observed a significant increase in relative levels of Elane expression in the hypothalamus of animals compared to fed group. However, during the LPS-induced inflammatory process, these levels are reduced (Figure 3a), probably inhibited by SerpinA3N. The expression of granzyme B (GzmB), an enzyme found in the granules of cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells with proteolytic activity during chronic inflammation (Hiebert & Granville, 2012) was also evaluated. In figure 2b we demonstrate increased GzmB levels in fasted mice, with an exacerbation of its expression during endotoxemia (Figure 3b).



**Figure 3. Serine proteases immune regulation during anorexia and endotoxemia.** Hypothalamic mRNA expression of a) leukocyte elastase and b) granzyme B markers in fed and fasted healthy or under systemic inflammation mice (n=6). Animals received 0.9% saline or 2.5mg/kg LPS. Results were normalized with the housekeeping gene *Gapdh*. Results are presented as mean  $\pm$  SD. \*\*p<0.01, \*p<0.05 Fed vs. Fasted.

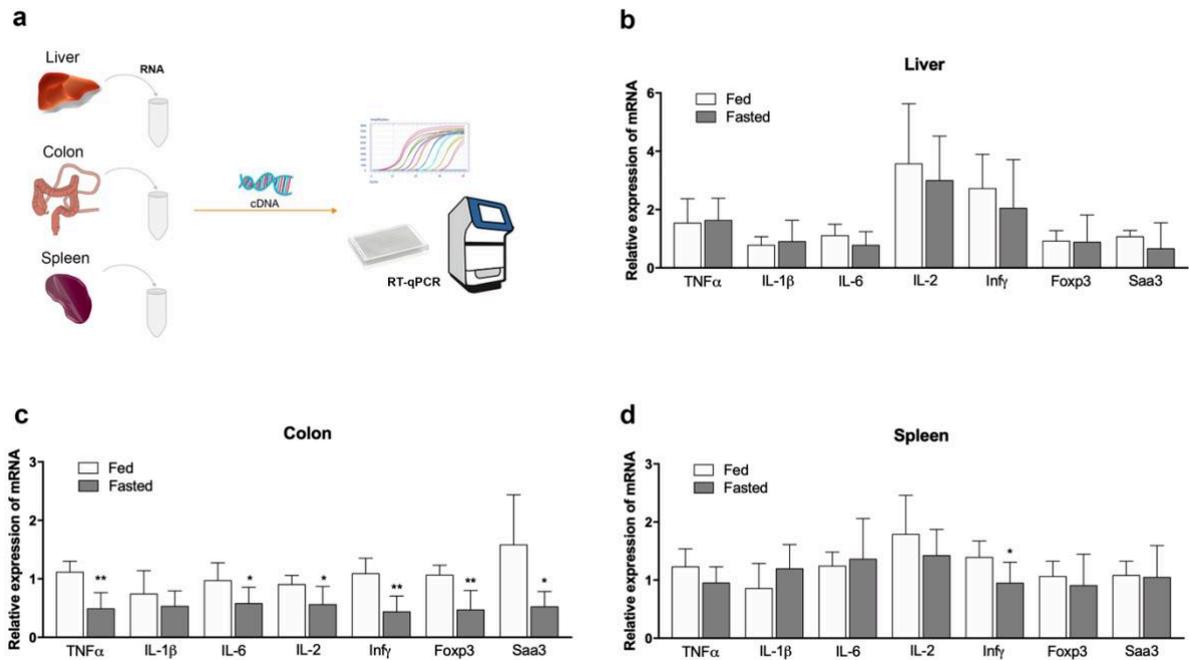
In response to systemic inflammation, inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) are generated. These cytokines circulate in the blood and communicate with neurons in the brain. There are different ways in which peripheral inflammation communicates with the brain. But it is more likely that cytokines can bypass BBB in the circumventricular organs, and there bind to macrophage receptors within these organs, activating them. With the aim of elucidating the possible involvement of AgRP neurons in the regulation of the systemic inflammatory response, fed (AgRP usually inhibited) and fasted (AgRP activated) mice received 0.9% saline or 2.5 mg/kg LPS. We then investigated whether there would be differences in proinflammatory cytokine protein levels in serum after two and four hours of LPS injection between the groups. As shown in Figure 4, we observed that under the acute phase of endotoxemia (2h after LPS injection), fasting animals showed a dynamic decrease in serum TNF- $\alpha$  (figure 4a) and IL-1 $\beta$  (figura 4b) levels compared to the fed group, with no significant difference in protein expression of both cytokines after 4h. In a time-course way, TNF- $\alpha$  levels are interestingly lower after 4h, while IL-1 $\beta$  levels increase.



**Figure 4. Serum protein levels of proinflammatory cytokines during anorexia and endotoxemia.** Serum taken 2h and 4h after LPS injection, was analyzed through ELISA to quantify a) TNF- $\alpha$  and b) IL-1 $\beta$  (n=6). Results are presented as mean  $\pm$  SD. \*p<0.05 (vs fed group), #p<0.05 (vs 2h group).

Gene expression of pro-inflammatory markers in liver, colon and spleen were analyzed by RT-qPCR. No significant differences between fed and fasted groups were found in liver samples (Figure 5b). In colon however, the levels of most mRNA cytokines were significantly reduced in the fasted group except only IL-1 $\beta$  (Figure 5c). In addition, a significant difference

was observed in the potent activator of macrophages - interferon gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) expression in the spleen (Figure 5d).

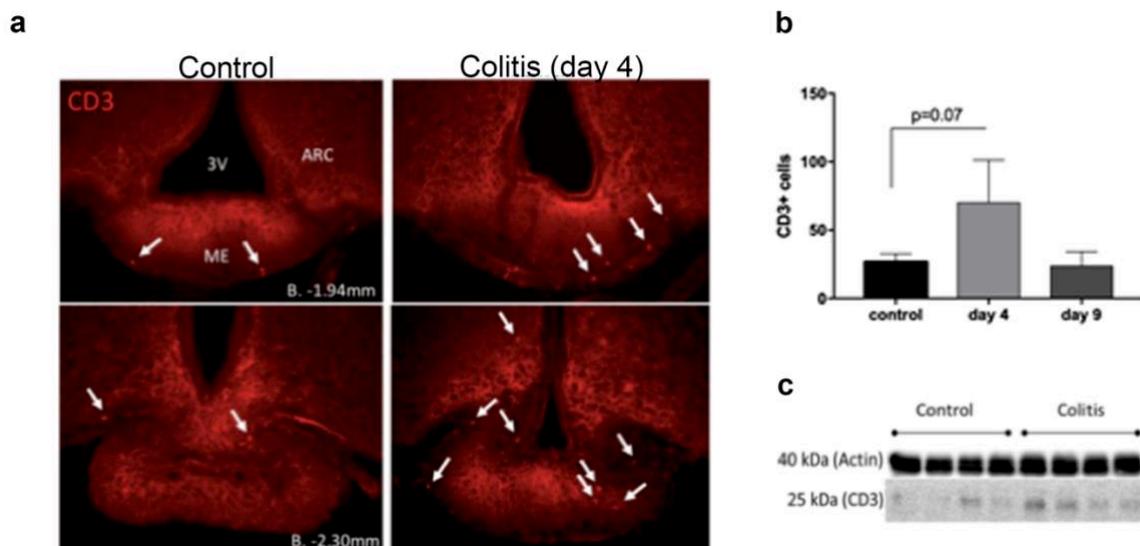


**Figure 5. Tissue gene expression of pro-inflammatory cytokines during anorexia and endotoxemia.** a) Real-time PCR analysis of b) liver, c) colon and d) spleen. Samples were taken 4h after LPS injection (n=6). Results are presented as mean  $\pm$  SD. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 (vs fed group).

### Frequency of T cells in the ARC and ME is increased during colitis

Serpina3N is increasingly expressed at the ARC of the hypothalamus during colitis, and it is at hunger-promoting AgRP neurons where expression primarily occurs. Knowing this, the following step for this study was to elucidate which substrate Serpina3N could be targeting at this area of the CNS. Serpina3N, as stated earlier, is an inhibitor of leukocyte-derived elastase, so it was of interest to find a specific population of leukocytes which frequency at the ARC and ME was increased similarly to the increases seen in Serpina3N. Recently, Serpina3N has been shown to reduce neuropathic pain following spinal cord injury by inhibiting specifically T cell-derived leukocyte elastase (Vicuña et al., 2015). Therefore, our scope for immune cells at the ARC was initially narrowed down from leukocytes to T cells (for which the general marker cluster of differentiation 3 - CD3 - was used).

As seen in Figure 6a, an increase in frequency of T cells at the ARC and ME after 4-day administration of colitis-inducing DSS was observed, as the CD3<sup>+</sup> cells were clearly visible in bright red (shown by white arrows). This increase (approximately two-fold) was reflected throughout the ARC at different Bregma levels. Most of these T cells were localized at the ME, but some were also observed at the ARC. Furthermore, all positive cells for each entire ARC were counted using a fluorescence microscope. The results of the cell counting show a significant difference in CD3<sup>+</sup> cell frequency between control and colitis mice during chronic stage of the disease (day 4), showing a decrease in total number of infiltrating cells among the recovery phase (Figure 6b). In addition, western blot analysis of hypothalamic protein extracts of control and colitis mice was done to observe changes in CD3 expression. The preliminary results, yet to be optimized due to the very low overall concentration of CD3, show indication of increased CD3 expression in colitis mice compared to control (Figure 6c).

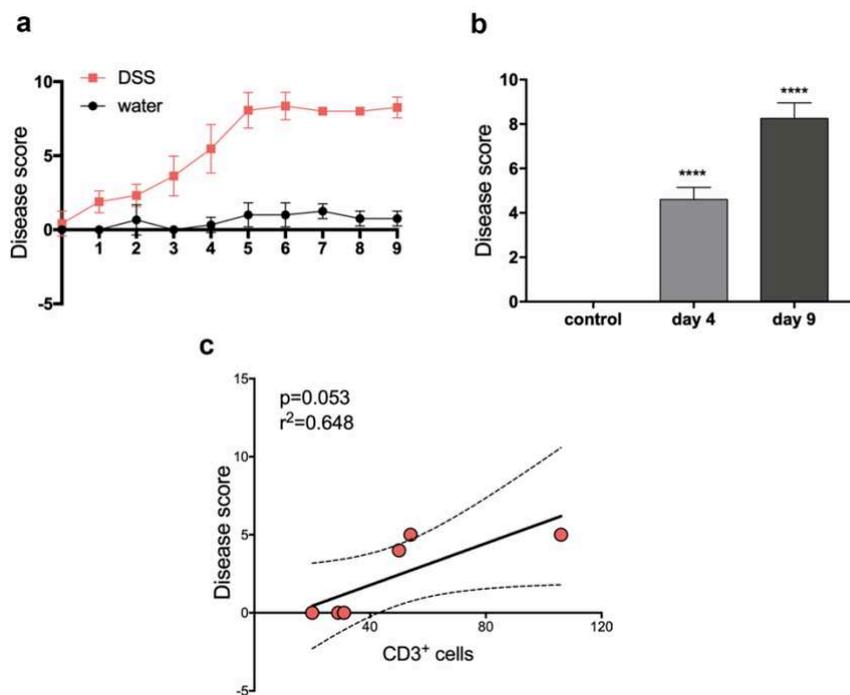


**Figure 6. Sustained inflammatory response in DSS colitis murine model.** a) CD3<sup>+</sup> (narrows in bright red) cells in a representative fluorescence microscopy images from immunohistochemically labelled control and 4-day colitis model (2.5% DSS in water for 4 days) mice brain slices (Bregma levels: top – 1.94mm, bottom -2.33mm). b) Quantification of CD3<sup>+</sup> cells in hypothalamus of control and colitis model mice (n=6-8). c) Preliminary Western Blotting of hypothalamic protein extracts of control and colitis model (2.5% DSS for 6 days) mice were run to test for CD3 expression (n=4).

### T cells infiltration is positively correlated with colitis disease score

The previous results consistently showed how induction of colitis leads to increase of T cells at the ARC and ME. However, progression of disease is always slightly different between different mice, so the changes of T cell frequency at the hypothalamus observed could also accordingly vary. As individual disease scores had been carried out it was possible and of interest to find if there was a direct correlation between the number of T cells in the ARC and ME of mice and their individual disease score at day 4 of colitis or in a control setup.

As expected, the disease score was significantly higher for those mice being administered 2.5% DSS in water in comparison to control mice (Figure 7a) in time-dependent manner (Figure 7b). Interestingly, as shown in figure 7c, a significant positive correlation was indeed found between the disease score of each mouse and the number of CD3+ cells at the ARC and ME counted at the fluorescence microscope (n=6, Pearson correlation  $p=0.053$   $r^2=0.648$ ).



**Figure 7. Positive correlation between colitis disease score and number of CD3 cells in hypothalamus.** a) Colitis disease score of control and colitis model (2.5% DSS in water for 4 up to 9 days) mice. b) Increasing disease score among the days. c) Correlation between individual colitis disease score and total numbers of CD3+ cells counted in the hypothalamus following immunohistochemical analysis. \*\*\*\* $p<0.0001$  vs control group (day 0).

## 6 DISCUSSÃO

A grande maioria dos estudos apoia a conclusão de que a exposição à dieta hiperlipídica pode ter um impacto dramático e duradouro no balanço energético a nível do sistema nervoso central. No presente estudo, demonstramos alterações neuroquímicas, neurofuncionais e comportamentais no hipocampo de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica de modo temporal. Nossos resultados corroboram evidências clínicas que demonstram uma comorbidade entre a obesidade e neuropatologias, como depressão (Mulvahill et al., 2017; Shinkov et al., 2017) e demência (Ng et al., 2016; Fan et al., 2017) e comprovam que o processo das disfunções induzidas pela dieta ocorrem muito precocemente do que previamente mostrado na literatura. Além disso, apontamos haver um papel crucial do neuropeptídeo orexígeno AgRP no controle/combate ao estado de inflamação sistêmica e buscamos compreender melhor o mecanismo pelo qual esse peptídeo age.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência mundial de obesidade dobrou nas últimas 3 décadas e atualmente, pelo menos um terço dos adultos com mais de 20 anos está com sobrepeso ou obesidade. Além do decréscimo na qualidade de vida, os custos anuais estimados em saúde nos EUA para as vítimas de obesidade ultrapassam US\$ 140 bilhões (Finkelstein et al., 2009). Outro desafio de saúde dispendioso que as culturas ocidentais enfrentam é o aumento de casos de demência, principalmente a doença de Alzheimer, cuja projeção para os próximos 40 anos é de um aumento em quatro vezes de sua incidência na população mundial, atingindo cerca de 160 milhões de indivíduos (Lane et al., 2018). Assim, é de suma importância a identificação dos fatores de risco e estratégias para prevenir ou retardar o início e a progressão de ambos os distúrbios.

Nosso estudo aponta que o déficit cognitivo induzido pelo consumo de dieta hiperlipídica ocorre rapidamente, demonstrando claramente que o processo de disfunção cognitiva induzida por dieta em roedores começa muito mais cedo do que o mostrado anteriormente (Kanoski e Davidson, 2011; Cordner e Tamashiro, 2015). Após consumir a dieta hiperlipídica por três dias, observamos nos camundongos um comprometimento de memória espacial de referência através do teste do reconhecimento do objeto. O teste baseia-se na tendência espontânea dos roedores - anteriormente expostos a dois objetos idênticos - em explorar mais tarde um dos objetos que foi substituído por outro de cor, forma e textura

diferente, por mais tempo do que exploram o objeto familiar. Ou seja, os animais com memória preservada passam mais tempo explorando o novo objeto ao invés do objeto familiar, indicando que ele se lembra do objeto apresentado anteriormente (Greco et al., 2010). Este teste fornece um índice qualitativo de aprendizagem. Demonstramos que os camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica não exploraram por maior tempo o objeto novo. Por outro lado, os animais do grupo SD exploraram o objeto novo por um período de tempo maior, como indicado pelo aumento significativo no índice de reconhecimento em comparação com um valor teórico de 50%. O comprometimento de memória se mantém até o término do período testado (28 dias). O rápido comprometimento nas tarefas de memória de reconhecimento sugere disfunção cognitiva induzida por dieta hiperlipídica no córtex perirrenal e no hipocampo. Outro estudo usando o reconhecimento do objeto para testar o efeito de dietas hiperlipídicas na memória de camundongos encontrou efeitos diversos (Cordner e Tamashiro, 2015). Essas diferenças podem ser devido à diferentes quantidades de gordura na dieta (ou seja, 40% ou 60% de energia a partir de gordura) e/ou modificações na execução do teste de reconhecimento do objeto utilizando intervalos de retenção entre as fases de treino e de teste diversificados (Antunes e Biala, 2012).

Dentre as neuropatologias associadas à obesidade, talvez a mais frequente seja relacionada aos transtornos do humor. Acredita-se que essa associação seja bidirecional, em que indivíduos obesos tendem a desenvolver um quadro de ansiedade e depressão e ao mesmo tempo aqueles que possuem comportamento depressivo acabam por adotar uma dieta hipercalórica, levando ao aumento gradual de peso corporal (Pulkki-Raback et al., 2009; Mansur et al., 2015; Mulvahill et al., 2017). O conceito de uma relação bidirecional entre a obesidade e os transtornos do humor baseia-se não apenas no risco preditivo recíproco de cada doença, mas também nas diferenças relatadas, nas declarações clínicas do homem e na resposta ao tratamento associados a essa coocorrência. Além disso, sobreposições de uma série de fatores de risco ambientais, bem como de mecanismos patológicos periféricos e centrais já foram descritos (Lustman et al., 1992; Sullivan et al., 2005; De Venter et al., 2013). Evidências de estudos clínicos em indivíduos com transtorno bipolar indicam que a obesidade predispõe a uma doença predominantemente depressiva, na medida em que a duração dos episódios depressivos tende a ser mais longa e a hospitalização por depressão é mais frequente (Goldstein et al., 2011). Um curso mais severo e crônico, com maior capacidade funcional e maior risco

de suicídio foram relatados (McIntyre et al., 2008; Calkin et al., 2009). Transtornos de ansiedade comórbidos também são mais comuns (Calkin et al., 2009). Além disso, indivíduos obesos / acima do peso com transtorno bipolar demonstraram ter um desempenho cognitivo ruim e pior desempenho nos testes que medem a atenção, quando comparados a pacientes com peso normal.

A partir desses dados, buscamos avaliar o efeito do consumo da dieta hiperlipídica sobre o comportamento tipo-depressivo dos camundongos através do teste de suspensão pela cauda, modelo de desespero comportamental. Este teste foi desenvolvido para avaliar atividade antidepressiva de compostos e sua validade é baseada na observação de que, em roedores, o tempo de imobilidade é reduzido por várias classes de antidepressivos (Steru et al., 1985). Embora este teste seja rotineiramente empregado para buscar substâncias antidepressivas, também vem sendo muito utilizado para determinar fenótipos tipo-depressivos em diversos modelos animais (Martin-de-Saavedra et al., 2013; Romano et al., 2014), o que valida sua utilização para além de uma simples ferramenta de caracterização farmacológica de compostos. Nós observamos que o grupo alimentado com dieta hiperlipídica apresentou comportamento tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda a partir do sexto dia dos períodos comportamentais avaliados. Nossos resultados corroboram o estudo de Strelakova e colaboradores (2015), no qual o mesmo teste foi utilizado para demonstrar que o consumo de uma dieta rica em gordura (por 21 dias) resultou em comportamento tipo-depressivo em camundongos C57BL/6.

As contribuições vasculares ao comprometimento cognitivo são cada vez mais reconhecidas enquanto estudos de fatores de risco cardiovasculares comuns - como tabagismo, hipertensão, dislipidemia e diabetes - e a depressão produzem resultados variados fornecendo suporte para uma associação (Mast et al., 2008; Yochim et al., 2003 e 2006). Junto aos fatores de risco vasculares, o alto consumo de gorduras saturadas, que eleva os níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos e altera o metabolismo da glicose, podem afetar funcionalmente a homeostase da BHE. Em condições normais, os ácidos graxos presentes na corrente sanguínea não são livremente difusíveis no cérebro (Mitchell e Hatch, 2011), dependendo de sistemas de transporte específicos presentes nas estruturas da barreira (Betsholtz, 2014). A função e distribuição adequadas desses sistemas de transporte são de grande importância no desenvolvimento e fisiologia do cérebro ao longo da vida, porque a maioria dos ácidos graxos

que constituem os fosfolipídios do SNC não pode ser sintetizada *de novo* e, portanto, deve ser importada da periferia (Betsholtz, 2014, Nguyen et al., 2014). Por isso, em condições fisiológicas e sob o consumo de dietas que contenham quantidades nutricionais adequadas de gordura, a BHE apresenta um certo grau de permeabilidade e permissividade a determinados nutrientes, incluindo ácidos graxos (Obici e Rossetti, 2003). No entanto, o aumento do consumo de gorduras alimentares é capaz de aumentar ainda mais a permeabilidade da BHE a tal ponto que a composição de ácidos graxos no SNC é modificada por abordagens alimentares.

Em um estudo prévio do nosso grupo, camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram elevada imunorreatividade para aquaporina-4 (AQP-4, principal canal de água expresso no SNC) no hipocampo (de Oliveira et al., 2014). A AQP-4 está concentrada nos processos astrocíticos próximos às células endoteliais, localização essencial para o papel dos astrócitos na indução, desenvolvimento e manutenção da integridade da BHE, o que garante um ambiente cerebral adequado para a função neuronal (Nicchia et al., 2004). Uma elevada expressão de AQP-4 em células gliais perivasculares parece estar correlacionada com os primeiros sinais de disfunção da BHE (Tomas-Camardiel et al., 2005). Nesse contexto, a BHE permite interações dinâmicas entre os capilares sanguíneos e a rede neuronal, a fim de proporcionar um controle adequado das moléculas que são transportadas dentro e fora do SNC.

Ao avaliarmos a integridade da BHE através da injeção de fluoresceína de sódio via veia peniana, observamos que os camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por 7 dias apresentaram níveis significativamente maiores da substância fluorescente no hipocampo e córtex pré-frontal, caracterizando aumento da permeabilidade da BHE nesse período. Esse processo se estabilizou, igualmente ao grupo controle, aos 14 dias e novamente mostrou-se alterado aos 28 dias de exposição à dieta. Isso nos mostra que a funcionalidade e estrutura da BHE é sensível a inserção da dieta rica em gordura, e embora essa resposta tenha desaparecido temporariamente, sugerindo que os mecanismos neuroprotetores podem inicialmente limitar o dano, a continuidade de exposição à dieta hiperlipídica retoma a disfunção da BHE e possivelmente a torna permanente. De forma semelhante, quando avaliamos os efeitos da dieta hiperlipídica em um *timecourse* precoce, observamos um aumento na permeabilidade da BHE após 2 dias de indução da dieta, se estabilizando até 6 dias. Essa alteração pode ter levado às alterações comportamentais observadas nesse mesmo período de tempo de ingestão da dieta.

De fato, alterações na estrutura e função da BHE - que afetam a acessibilidade do encéfalo aos nutrientes e a saída de toxinas - são encontradas em diversas patologias que, por sua vez, podem perturbar a função cerebral e a sinalização de nutrientes (Velloso e Schwartz, 2011; Haddad-Tóvulli et al., 2017). Especificamente, o estado metabólico, bem como o consumo de ácidos graxos saturados, podem danificar a BHE e alterar a sensibilidade de detecção de nutrientes nos tanicitos, células da glia radial, especializadas no controle do transporte de nutrientes e hormônios metabólicos no parênquima cerebral (revisado em Ganong, 2000; Mullier et al. 2010).

Evidências experimentais identificaram pelo menos três mecanismos envolvidos no desenvolvimento de alterações neuronais decorrentes do aumento da permeabilidade da BHE na obesidade induzida por dieta: i) inflamação (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009, Thaler et al., 2012); ii) estresse do retículo endoplasmático (Zhang et al., 2008; Milanski et al., 2009); e iii) anormalidades mitocondriais (Dietrich et al., 2013b; Carraro et al., 2018). No entanto ainda é desconhecido qual desses mecanismos é primeiramente ativado em resposta ao consumo de grandes porções de gorduras alimentares.

Estudos experimentais vêm mostrando que as gorduras dietéticas podem perturbar a dinâmica das mitocôndrias nos neurônios hipotalâmicos e isso afeta diretamente a regulação da homeostase de energia do corpo inteiro (Dietrich et al., 2013b; Carraro et al., 2018). Dietrich e seus colaboradores (2013) demonstraram, através de microscopia eletrônica, que a alimentação com alto teor de gordura por 16 semanas modificou a morfologia e densidade das mitocôndrias hipotalâmicas em camundongos. Por outro lado, ao investigar os efeitos de uma dieta rica em gordura por períodos menores (de 3 horas a 7 dias de dieta), o recente estudo de Carraro e colaboradores (2018) demonstrou que não houve alterações na respiração mitocondrial hipotalâmica durante o período experimental, porém houve reduções nos locais de contato do retículo endoplasmático / mitocôndria, a partir de 3 dias após a introdução à dieta. A avaliação mitocondrial em ambos estudos foi avaliada no hipotálamo dos animais.

Aqui, utilizando a abordagem de respirometria de alta resolução, avaliamos a função e atividade mitocondrial hipocampal em camundongos submetidos à dieta padrão ou dieta hiperlipídica por 7, 14 e 28 dias. Nossa hipótese inicial seria de que a disfunção mitocondrial poderia estar envolvida no gatilhamento do comprometimento cognitivo e comportamento tipo-depressivo, todavia observamos que as alterações no consumo de oxigênio mitocondrial no

hipocampo ocorreram somente após 28 dias de oferta da dieta rica em gordura. Este dado nos sugere que alterações preliminares estão ocorrendo no SNC e refletem sobre a função cognitiva e emocional dos animais. Parece existir um mecanismo de proteção das mitocôndrias apesar da toxicidade resultante do aumento da permeabilidade da BHE, como forma de compensação. No entanto, a exposição mais prolongada às gorduras saturadas (28 dias) resulta em disfunção mitocondrial dos neurônios hipocampais.

Sabe-se que o SNC e o sistema imunológico estão envolvidos em uma intensa conversa cruzada bidirecional e que o consumo de grandes porções de gorduras na dieta pode desencadear uma resposta inflamatória no SNC e contribuir para o controle disfuncional da ingestão calórica e do gasto energético comumente presente na obesidade. Os modelos roedores de obesidade induzidos pelo consumo de dieta hiperlipídica são caracterizados por inflamação tanto nos tecidos periféricos como nas regiões do SNC críticas para a homeostase energética. O estudo de Thaler e colaboradores (2012) relata que, ao contrário da inflamação nos tecidos periféricos, que se desenvolve como consequência da obesidade, a sinalização inflamatória no SNC é evidente em camundongos e ratos já nos primeiros dias (1 a 3 dias) do início da exposição à dieta hiperlipídica, antes do aumento substancial de peso corporal. Especificamente, tanto a glicose reativa quanto os marcadores sugestivos de lesão neuronal foram evidentes no ARC hipotalâmico dos roedores na primeira semana de alimentação com essa dieta.

Um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, demonstrou ativação astrocitária (GFAP) e morte neuronal no hipocampo de camundongos modelo de hipercolesterolemia familiar (de Oliveira et al., 2014). A GFAP é uma proteína de filamento intermediário comumente utilizada na detecção de neuroinflamação, uma vez que reporta a ativação de células gliais, como os astrócitos, característicos do processo inflamatório neuronal (revisado em Brenner, 2014). Observamos aqui que a ativação astrocitária ocorre somente após 28 dias do consumo da dieta. O recente estudo de Chong e seus colaboradores (2019), demonstra um aumento da reatividade ao GFAP com consequente aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em ratos com traumatismo craniano induzido, e alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão por 8 semanas. No entanto, essas diferenças foram restritas à contusão no córtex cerebral, independente da dieta adotada (Chong et al., 2019). Por outro lado, Bok e colegas (2019) sugerem um vínculo

mecanístico entre a restrição calórica e a redução da neuroinflamação induzida pela ativação astrocitária e da microglia, atenuando especialmente distúrbios cerebrais relacionados ao envelhecimento.

A inflamação decorrente de uma dieta hiperlipídica culmina na ativação da sinalização de TLR4 da microglia e do retículo endoplasmático, induzindo a expressão de quimiocinas (fractalcina e MCP1), e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6) que atuam sobre neurônios chave do SNC levando a resistência à leptina e à insulina e, eventualmente, à apoptose neuronal (De Souza et al., 2005; Araújo et al., 2016). Dadas as evidências que sugerem que o consumo de dietas ricas em gordura pode levar à expressão de citocinas pró-inflamatórias (especialmente no hipotálamo) antes mesmo das alterações metabólicas, em nosso estudo investigamos se os níveis de expressão desses fatores encontram-se aumentados no hipocampo dos animais submetidos à dieta hiperlipídica pelos períodos de 1 a 7 dias. Observamos que os níveis de RNAm de IL-6 e de TNF- $\alpha$  aumentam após 2 dias de introdução à dieta, enquanto os níveis de IL1- $\beta$  permanecem inalterados ao longo dos períodos experimentais avaliados. Esses dados apontam que o processo inflamatório mediado através da síntese dessas citocinas ocorre muito precocemente após o aumento de ingesta de gordura saturada.

Além disso, o sistema imunológico tem o potencial de influenciar a plasticidade do cérebro e o funcionamento das redes neuronais (Di Filippo et al., 2008; 2013). Durante a inflamação direta do SNC, bem como durante a inflamação sistêmica, periférica, a modulação exercida pelos mediadores neuroinflamatórios sobre a plasticidade sináptica pode influenciar negativamente o funcionamento das redes neuronais cerebrais, alterando a função sináptica e a memória (Vereker et al., 2000; Cibelli et al., 2010). Em particular, as citocinas pró-inflamatórias sinalizam e se comunicam de diferentes maneiras com as sinapses do SNC para induzir um espectro de alterações comportamentais / cognitivas conhecidas como "comportamento da doença" (Cibelli et al., 2010). Além disso, as células da glia, que participam ativamente da resposta imune no SNC, podem representar um terceiro elemento da sinapse, além dos neurônios pré e pós-sinápticos, com o potencial de influenciar a transmissão sináptica e processos de plasticidade sináptica específicos (Di Filippo et al., 2008).

No presente trabalho, estudamos a densidade sináptica no hipocampo, devido à sensibilidade particular dessa estrutura neuronal à neuroinflamação. De fato, o hipocampo é particularmente propenso a desenvolver déficits de transmissão sináptica e plasticidade durante

processos inflamatórios e é particularmente sensível ao efeito prejudicial das citocinas pró-inflamatórias (Haus-Wegrzyniak et al., 2002; Costello et al., 2011). Aqui notamos que após sete dias de consumo com a dieta hiperlipídica, os animais apresentaram uma redução da densidade pré-sináptica na região CA1 hipocampal. Esses achados estão de acordo com os estudos de Liu (2015) e Hwang e colaboradores (2012), porém nestes estudos a alteração na plasticidade sináptica foi visualizada após um período maior de consumo de dieta hiperlipídica (12 semanas e 9-12 meses, respectivamente). Acredita-se que a plasticidade desempenhe um papel fundamental no desenvolvimento fisiológico dos circuitos neurais e evidências sugerem que o comprometimento dos mecanismos da neuroplasticidade pode contribuir para a patogênese de vários distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos importantes (Calabresi et al., 2006; Di Filippo et al., 2008; Ghiglieri et al., 2009). Curiosamente, em muitos distúrbios neurológicos coexistem inflamação, degeneração neuronal e disfunções sinápticas (Di Filippo et al., 2013). Além disso, os sintomas de distúrbios neurológicos são frequentemente agravados na presença de infecções sistêmicas (revisado em Perry, 2004).

Considerando as alterações hipocampais nos parâmetros inflamatórios e a vulnerabilidade da BHE observadas neste estudo, nós hipotetizamos que a ativação inflamatória precoce do SNC induzida pela obesidade é um dos principais mecanismos gatilhadores das alterações comportamentais. Dessa forma, propusemos a utilização de uma intervenção farmacológica anti-inflamatória concomitante à alimentação com dieta hiperlipídica, no intuito de avaliar seu efeito sobre as alterações comportamentais e de permeabilidade da BHE previamente observadas. Araújo e colaboradores (2007) demonstraram que a administração periférica do anti-TNF- $\alpha$ , Infliximab (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), é capaz de restaurar a homeostase da glicose num modelo animal de obesidade e diabetes induzidas pelo alto consumo de gorduras saturadas derivadas da dieta. Nosso trabalho demonstra que, embora o prejuízo cognitivo não tenha sido revertido completamente (avaliado por um teste qualitativo), a análise não paramétrica não aponta diferenças significativas entre os índices de discriminação dos animais alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica dentro do grupo tratado com Infliximab. O estudo de Dadsetan e colaboradores (2016) mostra que a redução da inflamação periférica e central com Infliximab impede o prejuízo de memória espacial em ratos com encefalopatia hepática, no

entanto ainda não há relatos que demonstrem seu papel na prevenção do déficit cognitivo induzido pelo alto consumo de dietas hiperlipídicas.

Adicionalmente, observamos uma reversão tanto no comportamento tipo-depressivo, quanto no aumento da permeabilidade da BHE nos animais tratados com anti-inflamatório e submetidos à dieta hiperlipídica. Tais resultados instanciam ainda mais a relevância dos processos inflamatórios e do sistema imunológico na fisiopatologia dos transtornos do humor e de cognição e fornecem o ímpeto para o desenvolvimento de tratamentos escaláveis direcionados à inflamação e ao sistema imunológico para mitigar distúrbios dimensionais transdiagnósticos em disfunções cerebrais.

Dentro do que se entende por comportamento de doença, a anorexia é considerada uma das respostas adaptativas conhecidas. No entanto, o impacto da anorexia nos resultados da doença permanece desconhecido. Ao longo da evolução, os animais desenvolveram estratégias para combater infecções e curar patologias. É intuitivo que se exija energia para sustentar essas funções, no entanto, em muitas doenças, incluindo as inflamatórias, ocorre uma perda dramática de apetite. Compreender os mecanismos biológicos que conduzem esse aparente paradoxo é de grande utilidade para compreender como o apetite é regulado, podendo fornecer novos alvos para intervenções terapêuticas. Demonstramos aqui que, os neurônios AgRP conseguem detectar um balanço energético negativo no estado de jejum, porém não promovem o consumo de alimentos em estado de inflamação aguda. Embora pareça contraditório que os neurônios promotores da fome expressem uma proteína anorética, esses dados corroboram a hipótese de que a endotoxemia desencadeia alterações transcricionais discretas e reversíveis para diminuir a capacidade dos neurônios AgRP de promover a alimentação. Também demonstramos que a capacidade dessas células em detectar deficiência de energia permanece inalterada, para que a consciência energética do corpo seja mantida e que ajustes metabólicos apropriados possam ser feitos, representando uma estratégia de defesa distinta que permite melhorar a resolução da inflamação.

Estudos preliminares sugerem que a superexpressão de SerpinA3N nos neurônios AgRP durante a endotoxemia é uma das alterações transcricionais descritas (Dalby et al., 2018; Sergi et al., 2018). As serpinas exercem sua função ligando e inibindo determinadas serina proteases, as quais podem ser substratos para a SerpinA3N *in vitro* (Gettins, 2002; Sipione et al., 2006). A expressão dessa proteína é particularmente interessante, pois tem sido relacionada à inibição

da dor neuropática produzida pela Elane (Vicuña et al., 2015). A Elane é produzida em leucócitos sanguíneos, principalmente neutrófilos (Lee e Downey, 2001) e seu mRNA é expresso em linfócitos T, encontrados no SNC durante estados de inflamação (Vicuña et al., 2015). Dessa forma, neste estudo buscamos avaliar os níveis de expressão de Elane no hipotálamo dos animais e observamos que seus níveis estão aumentados sob estado de jejum, porém diminuem durante inflamação sistêmica. A diminuição dos níveis de Elane durante a inflamação é, muito provavelmente devido aos níveis aumentados de seu inibidor SerpinA3N.

Outra família de serina proteases derivadas de células T são as granzimas, enzimas segregadas por grânulos, que desempenham um papel importante na morte celular programada (apoptose) de células infectadas por vírus por meio de mecanismos independentes e dependentes de caspase (revisado em Boivin et al., 2009). A apoptose mediada pelas granzimas depende de sua entrada no citoplasma da célula-alvo, um processo que requer o rompimento da membrana da proteína perforina (Kagi et al., 1994). Essas descobertas desencadearam um grande número de pesquisas sobre o entendimento da via apoptótica de granzima-perforina e, durante grande parte das duas décadas seguintes, a pesquisa de granzimas se concentrou principalmente na apoptose mediada por granzima / perforina. No entanto, nos últimos anos, o entendimento fisiopatológico tradicional das granzimas foi desafiado e entrou-se em uma nova era de estudos com papéis intracelulares e extracelulares redefinidos para essas enzimas. As granzimas não são mais consideradas apenas enzimas citotóxicas, mas são conhecidas por serem uma família de serina proteases com atividades diversas e generalizadas.

A granzima B (GzmB), em particular, recebe maior atenção neste trabalho por sua habilidade de contribuir com a patogênese da doença através de mecanismos extracelulares e citotóxicos. Além de iniciar a apoptose por mecanismos intracelulares, ela também age de forma extracelular, clivando vários substratos diferentes, incluindo proteínas da matriz extracelular (MEC) e proteoglicanos (Choy et al., 2004; Hiebert et al., 2009). E atualmente é conhecida por processar citocinas (Afonina et al., 2011). Também estão surgindo evidências crescentes do importante papel patológico que a GzmB desempenha nas doenças inflamatórias crônicas relacionadas à idade (Boivin et al., 2009; Hendel et al., 2010). Ao investigarmos a expressão de GzmB nos animais com atividade de AgRP aumentada (jejum) e sob concomitante

inflamação, observamos um aumento em seu nível hipotalâmico em ambas condições, mostrando que esta enzima também desempenha um papel no processo inflamatório sistêmico.

Sabemos que a barreira hematohipotalâmica possui um grau homeostático de permeabilidade na região da EM, e que essa permissividade é crucial para as conexões neuroendócrinas. No entanto, como relatado anteriormente que processos inflamatórios podem alterar sua plasticidade, nossa hipótese inicial é de que, durante a inflamação, a BHH está mais permeável, permitindo a infiltração de células do sistema imune adaptativo dentro no SNC. Dessa forma, utilizamos um teste funcional da BHH com o corante azul de Evans (do inglês *evans blue* – EB) e avaliamos também a expressão de proteínas de junções oclusivas. Demonstramos que durante o jejum + LPS ocorre aumento da permeabilidade da barreira, com alteração de ocludina sob as mesmas condições. A mesma abordagem foi utilizada para estudar as alterações na permeabilidade do ARC e da EM durante o jejum, mostrando que a BHH nessas regiões pode variar em permeabilidade, com um aumento do extravasamento do corante EB e mudanças claras na organização das proteínas de junções oclusivas (Langlet et al., 2013). Indiscutivelmente, isso pode aumentar a capacidade dos neurônios do ARC hipotalâmico em detectar a concentração de metabólitos e hormônios no sangue, uma adaptação benéfica durante a fome.

O aumento na BHH também favorece a síntese e liberação de citocinas inflamatórias, além de permitir a infiltração de células do sistema imune. A endotoxina na superfície celular de bactérias gram-negativas, como o LPS, é reconhecida pelo TLR-4, um dos principais responsáveis pela indução de inflamação sistêmica (Poltorak et al., 1998). Após a ligação do LPS ao TLR-4, a sinalização de NF- $\kappa$ B e AP-1 ocorre, culminando na alta produção de citocinas (Lin et al., 2010). As principais citocinas pró-inflamatórias amplamente estudadas desempenham papel crucial no comportamento da inflamação e doença. Demonstramos aqui que os níveis protéicos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  decresce nos animais em jejum na fase aguda de endotoxemia, em comparação com o grupo alimentado, comprovando que há de fato o envolvimento do neurônio AgRP na resposta inflamatória.

A produção de citocinas não apenas promove e mantém sua própria concentração alta através de feedback positivo, mas também tem efeitos importantes nas células imunológicas. Por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão envolvidos na amplificação e na regulação positiva de outras citocinas, como demonstrado por investigações *in vitro* (Deforge et al., 1992). Particularmente,

o TNF- $\alpha$  é crucial na inflamação sistêmica, pois é o principal responsável pelo efeito letal do LPS (Beutler et al., 1985; Xaus et al., 2000) e modula a cinética de outras citocinas (Amiot et al., 1997). Já a IL-6 está implicada na febre, anorexia e letargia induzidas por LPS (Harden et al., 2006). Demonstrou-se ainda que a IL-2 aumenta a expressão de TLR-4 na membrana celular de monócitos, exacerbando a resposta inflamatória (Mita et al., 2002), além de regular a maturação e as funções das células T e das células natural killer (NK) (Fehniger et al., 2003). A atividade da NK também é controlada pelo interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Palladino et al., 1984). Outro marcador inflamatório é o amilóide sérico A3 (saa3), uma apolipoproteína de alta densidade, cuja expressão aumenta em resposta a citocinas inflamatórias (Meek e Benditt, 1986).

Embora certas citocinas sejam responsáveis principalmente por um efeito inflamatório específico, é importante ter em mente que elas geralmente causam comportamentos de doença de maneira sinérgica e, portanto, mecanismos redundantes estão presentes (Bluthe et al., 2000; Harden et al., 2008). Um subconjunto de células T reguladoras, chamadas células Treg, é extremamente importante para atenuar a resposta inflamatória e evita uma resposta excessiva das células imunes que podem levar à inflamação crônica e danos aos tecidos. As células Treg inibem a proliferação excessiva de células T e a produção de citocinas. Todas as células Treg expressam e são reguladas pelo fator de transcrição Foxp3, sendo considerado um marcador de atividade anti-inflamatória (Hori et al., 2003).

A análise da expressão de citocinas no baço, cólon e fígado, 4 horas após a injeção de LPS nos camundongos, foi realizada para fornecer uma visão abrangente da resposta inflamatória sistêmica induzida por LPS nesses órgãos e para investigar a potencial modulação da ativação de AgRP. Registramos uma diminuição das citocinas inflamatórias no cólon dos animais em jejum, indicando que os neurônios da AgRP podem modular localmente a expressão dessas citocinas, modulando também a atividade do sistema imunológico inato. Portanto, os neurônios AgRP ativos durante a inflamação podem realmente ser um exemplo de comunicação cérebro-sistema imune e reguladores da atividade imune mediada pelo SNC.

Recapitulando as alterações na integridade da BHH como consequência de modificações nas junções oclusivas que formam essa barreira, mudanças na frequência das células T no ARC e na ME podem ser mediadas. A resposta mais direta para essas mudanças é

o aumento da infiltração das células T. Em termos do papel funcional das células T no ARC e na EM, mais perguntas do que respostas surgem de nossa pesquisa. As células T são encontradas esporadicamente contornando o parênquima cerebral, embora um número muito grande tenha sido encontrado no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Smolders et al., 2013). Apesar disso, achados muito recentes apresentam indicações de que mesmo uma população potencialmente pequena de células T do parênquima ainda pode detectar a ativação do vírus neurotrópico latente (Smolders et al., 2018). Além do papel homeostático das células T no SNC, está bem estabelecido que essas células desempenham um papel importante na resposta imune relacionada à infecção ou autoimunidade do SNC (Siffrin et al., 2007, Gazzinelli et al., 1992). Tudo isso levado em consideração, o aumento da frequência das células T no hipotálamo pode ser atribuído ao aumento da vigilância do parênquima cerebral, por ser um “portador de mensagens” para induzir o comportamento da doença ou ambos. Tomado em conjunto com nossos resultados, mostrando maior frequência de células T, Elane e GzmB no ARC, a SerpinA3N pode, portanto, ter um papel neuroprotetor durante a inflamação.

Esses estudos têm implicações médicas importantes. Pacientes criticamente doentes são frequentemente tratados com suplementação de nutrientes, que por sua vez altera a atividade de neurônios sensores de energia. Assim, definir a contribuição líquida desses neurônios na inflamação fornece insights para entender se e quando as intervenções nutricionais são benéficas. É importante ressaltar que, ao revelar o fenótipo neuroquímico de neurônios distintos que controlam o apetite e suas funções imunorreguladoras, esses achados abrirão a possibilidade de explorar farmacologicamente mecanismos anti-inflamatórios endógenos e previamente imprevisíveis.

## 7 CONCLUSÕES

Podemos inferir que as evidências experimentais demonstradas no primeiro capítulo deste estudo apontam que o consumo da dieta hiperlipídica, em camundongos:

- Causa alterações comportamentais com déficit cognitivo e comportamento tipo-depressivo após 3 e 5 dias de consumo, respectivamente;
- O processo inflamatório e aumento da permeabilidade da BHE no hipocampo dos animais são os mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais;
- A disfunção mitocondrial e ativação astrocitária são responsáveis pela progressão da doença metabólica.

Podemos inferir que as evidências experimentais demonstradas no segundo capítulo deste estudo apontam que os neurônios AgRP durante inflamação sistêmica:

- Permanecem ativos e são capazes de detectar o balanço energético negativo mas não promovem alimentação;
- Modulam a superexpressão de SerpinA3N, inibindo Elane, como uma das alterações pós-transcricionais envolvidas na anorexia;
- É primordial para o processo de defesa do organismo.

## 8 REFERÊNCIAS

- Afonina IS et al. (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1a. **Mol. Cell** 44:265–278.
- Almeida OP, Calver J, Jamrozik K, Hankey GJ, Flicker L (2009) Obesity and metabolic syndrome increase the risk of incident depression in older men: the health in men study. **Am J Geriatr Psychiatry**. 17(10): 889–898.
- Amaral D & Lavenex P (2007) Hippocampal neuroanatomy. In Anderson P, Morris R, Amaral, Bliss T, O'Keefe J (eds.). *The hippocampus book* (first ed.). New York: **Oxford University Press**. p. 37.
- Amiot, F, Fitting C, Tracey KJ, Cavaillon JM, Dautry F (1997) Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Cascade and Lethality In Lt Alpha/Tnf Alpha-Deficient Mice. **Molecular Medicine**. 3:864-875.
- Andermann ML e Lowell BB (2017) Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. **Neuron**. 95:757–778.
- Andermann ML e Moore CI (2008) Mechanical resonance enhances the sensitivity of the vibrissa sensory system to near-threshold stimuli. **Brain Res**. 1235:74-8.
- Angelova PR e Abramov AY (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letter**. 592(5):692-702.
- Antunes M e Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**. 13(2):93–110.
- Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA (2007) Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**. 148(12):5991-7.
- Araujo EP, Moraes JC, Cintra DE, Velloso LA (2016) MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: hypothalamic inflammation and nutrition. **Eur. J. Endocrinol**. 175, R97-R105.
- Ávalos Y, Kerr B, Maliqueo M, Dorfman M (2018) Cell and molecular mechanisms behind diet-induced hypothalamic inflammation and obesity. **Journal of neuroendocrinology**. 30(10)12p.
- Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, Hof PR (2004) The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. **Neurol Res**. 26:573–578.
- Banks W, Burney B, Robinson S. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood–brain barrier. **Peptides**. 29:2061–5.
- Bazzoni G, Dejana E (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol Rev**. 84(3):869-901.
- Begley DJ, Brightman MW (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung **Progres des recherches pharmaceutiques**. 61:39-78.
- Bell RD, Zlokovic BV (2009) Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. **Acta neuropathologica**. 118:103-113.
- Benito-León J, Mitchell AJ, Hernandez-Gallego J and Bermejo-Pareja F (2013) Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: a population- based cross-sectional study (NEDICES). **Eur. J. Neurol**. 20, 899–906, e76–e77.
- Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. (2009) Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. **J Clin Invest**. 119:2577–89.
- Bentivoglio M, Kristensson K, Rottenberg ME (2018) Circumventricular Organs and Parasite Neurotropism: Neglected Gates to the Brain? **Frontiers in immunology**. 9:2877.

- Bergman RN e Ader M (2000) Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends Endocrinol. Metab.** 11, 351–356.
- Berrino F (2002) Western diet and Alzheimer's disease. **Epidemiologia E Prevenzione**, 26, 107–115.
- Betsholtz C (2014) Physiology: double function at the blood-brain barrier. **Nature**. 509:432–3.
- Beutler B, Milsark IW e Cerami AC (1985) Passive-Immunization Against Cachectin Tumor Necrosis Factor Protects Mice From Lethal Effect Of Endotoxin. **Science**. 229:869-871.
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS (1999) The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **J Biol Chem**. 274:30059–30065.
- Bjørbaek C (2009) Central leptin receptor action and resistance in obesity. **J. Investig. Med.** 57:789–794.
- Bluthe RM, Laye S, Michaud, B., Combe, C., Dantzer, R. & Parnet, P. (2000). Role Of Interleukin-1 Beta And Tumour Necrosis Factor-Alpha In Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour: A Study With Interleukin-1 Type I Receptor-Deficient Mice. **European Journal Of Neuroscience**, 12, 4447- 4456.
- Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J. Clin. Invest.** 93, 2438– 2446.
- Boivin WA et al. (2009) Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. **Lab. Invest.** 89:1195–1220.
- Bok E, Jo M, Lee S, Lee BR, Kim J, Kim HJ (2019). Dietary Restriction and Neuroinflammation: A Potential Mechanistic Link. **International Journal of Molecular Sciences**. 20(3):464.
- Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME5 (2016) Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Med.** 8(1):42.
- Brenner M (2014) Role of GFAP in CNS injuries. **Neurosci Letter**. 17(565):7-13.
- Busija DW, Miller AW, Katakam P, Simandle S, Erdos B (2004) Mechanisms of vascular dysfunction in insulin resistance. **Cur Opin Invest Drugs**. 5:929-935.
- Busija DW, Rutkai I, Dutta S, Katakam PV (2016) Role of Mitochondria in Cerebral Vascular Function: Energy Production, Cellular Protection, and Regulation of Vascular Tone. **Compr Physiol**. 6(3):1529-48.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine–acetylcholine synaptic balance. **Lancet Neurol**. 5: 974–983.
- Calkin C, van de Velde C, Ruzickova M, et al. (2009) Can body mass index help pre-dict outcome in patients with bipolar disorder? **Bipolar Disord**. 11(6):650–656.
- Carraro RS, Souza GF, Solon C, Razolli DS, Chausse B, Barbizan R, Victorio SC, Velloso LA (2018) Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 460: 238-245.
- Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Lett**. 500(3):119-24.
- Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, Cimmino F, Pirozzi C, Lama A, et al. (2019) High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 13:509.

- Chen X, Ghribi O, Geiger JD (2010) Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Journal of Alzheimer's disease**: JAD 20 Suppl 1:S127-141.
- Chong AJ, Wee HY, Chang CH, Chio CC, Kuo JR, Lim SW (2019) Effects of a High-Fat Diet on Neuroinflammation and Apoptosis in Acute Stage After Moderate Traumatic Brain Injury in Rats. **Neurocrit Care**.
- Cibelli M, Fidalo AR, Terrando N, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Tarata M, Lever IJ, Nanchahal J, Fanselow MS, Maze M (2010) Role of interleukin-1beta in post-operative cognitive dysfunction. **Ann. Neurol.** 68:360–368.
- Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prévot V e Levine JE (2009) Brain-endocrine interactions: A microvascular route in the mediobasal hypothalamus. **Endocrinology.** 150(12):5509-5519.
- Clemmensen C, Müller TD, Woods SC, Berthoud HR, Seeley RJ, Tschoöp MH (2017) Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. **Cell.** 168:758–774.
- Cohen J I, Yates KF, Duong M e Convit A (2011) Obesity, orbitofrontal structure and function are associated with food choice: a cross-sectional study. **BMJ Open.** 1:e000175.
- Cordner ZA e Tamashiro KLK (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & Behavior.** 152:363–71.
- Costello DA, Watson MB, Cowley TR, Murphy N, Murphy Royal C, Garlanda C, Lynch MA (2011) Interleukin-1alpha and HMGB1 mediate hippocampal dysfunction in SIGIRR-deficient mice. **J. Neurosci.** 31:3871–3879.
- Cowley MA et al (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. **Neuron.** 24:155–163.
- Dadsetan S, Balzano T, Forteza J, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, et al. (2016) Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. **Front Mol Neurosci.** 9:106.
- D'Agostino G, Lyons DJ, Cristiano C, Burke LK, Madara JC, Campbell JN, Garcia AP, Land BB, Lowell BB, Dileone RJ, Heisler LK (2016) Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. **Elife.** 5p.
- Dalby MJ, Aviello G, Ross AW, Walker AW, Barrett P, Morgan PJ (2018) Diet induced obesity is independent of metabolic endotoxemia and TLR4 signalling, but markedly increases hypothalamic expression of the acute phase protein, SerpinA3N. **Scientific Reports.** 8(1).
- Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ and Benoit SC (2007) A Potential Role for the Hippocampus in Energy Intake and Body Weight Regulation. **Curr Opin Pharmacol.** 7(6): 613–616.
- Davidson TL, Kanoski SE, Walls EK, Jarrard LE (2005) Memory inhibition and energy regulation. **Physiol Behav.** 86:731–46.
- Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, Garcia VI, Barker PA, Arbour N, Alquier T, Fulton S (2018) Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. **Mol Metab.**
- Deforge LE, Kenney JS, Jones ML, Warren JS, Remick DG (1992) Biphasic Production Of Il-8 In Lipopolysaccharide (Lps)-Stimulated Human Whole-Blood - Separation Of Lps-Stimulated And Cytokine-Stimulated Components Using Antitumor Necrosis Factor And Anti-Il-1 Antibodies. **Journal Of Immunology.** 148:2133-2141.

- de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A (2012) Obesity, inflammation and the immune system. **Proc Nutr Soc.** 71(2):332-8.
- de Luis DA, Aller R, Izaola O, Ovalle HF (2011) The serum profile of adipokines in naïve patients with diabetes mellitus type 2 and obesity. **J Clin Lab Anal.** 25(6):409-13.
- de Oliveira J, Moreira EL, dos Santos DB, Piermartiri TC, Dutra RC, Pinton S, Tasca CI, Farina M, Prediger RD, de Bem AF (2014) Increased susceptibility to amyloid-beta-induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J Alzheimers Dis.** 41:43-60.
- De Paula GC, de Oliveira J, Engel DF, Lopes SC, Moreira ELG, Figueiredo CP, Prediger RD, Fabro de Bem A (2020) Red wine consumption mitigates the cognitive impairments in low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr<sup>-/-</sup>) mice. **Nutr Neurosci.** 1-11.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology** 146:4192-4199.
- De Venter M, Demyttenaere K, Bruffaerts R (2013) The relationship between adverse childhood experiences and mental health in adulthood. A systematic literature review. **Tijdschr Psychiatr.** 55(4):259-68.
- Devine MJ e Kittler JT (2018) Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. **Nat. Rev. Neurosci.** 19:63–80.
- Devore EE, Stampfer MJ, Breteler MM, Rosner B, Hee Kang J, Okereke O, et al. (2009) Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** 32(4):635–640.
- Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R (2011) Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. **Neuroendocrinology.** 94:1–11.
- Dietrich MO, Horvath TL (2013a) Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences.** 36:65–73.
- Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL (2013b) Mitochondrial Dynamics Controlled by Mitofusins Regulate Agrp Neuronal Activity and Diet-Induced Obesity. **Cell.** 155(1):188–199.
- Di Filippo M, Chiasserini D, Gardoni F, Viviani B, Tozzi A, Giampà C et al. (2013) Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. **Neurobiology of Disease** 52: 229–236.
- Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Calabresi P (2008) Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. **Trends Pharmacol. Sci.** 29:402–412.
- Doll DN, Hu H, Sun J, Lewis SE, Simpkins JW, Ren X (2015) Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the Blood–Brain Barrier. **Stroke.** 46:1681–1689.
- Duckles SP, Krause DN (2011) Mechanisms of cerebrovascular protection: Oestrogen, inflammation and mitochondria. **Acta Physiol** 203:149-154.
- Engelhardt B, Coisne C (2011) Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. **Fluids and barriers of the CNS.** 8:4.
- Eskelinen M H, Ngandu T, Helkala E L, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, et al. (2008) Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: A population-based CAIDE study. **International Journal of Geriatric Psychiatry.** 23:741–747.
- Exton MS (1997) Infection-induced anorexia: active host defence strategy. **Appetite.** 29:369–383.

- Fan YC, Chou CC, You SL, Sun CA, Chen CJ, Bai CH (2017) Impact of Worsened Metabolic Syndrome on the Risk of Dementia: A Nationwide Cohort Study. **J Am Heart Assoc.** 12:6(9).
- Farkas E, Luiten PG (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol.** 64:575–611.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA (2003) Cd56(Bright) Natural Killer Cells Are Present In Human Lymph Nodes And Are Activated By T Cell-Derived Il-2: A Potential New Link Between Adaptive And Innate Immunity. **Blood.** 101:3052-3057.
- Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, et al. (2014) Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association.** 10:S76-83.
- Finkelstein EA, Trogon JG, Cohen JW, Dietz W (2009) Annual medical spending attributable to obesity: payer- and service-specific estimates. **Health Aff (Millwood).** 28:822–31.
- Ford ES, Li C, Pearson WS, Zhao G, Mokdad AH (2010) Trends in hypercholesterolemia, treatment and control among United States adults. **Int J Cardiol.** 140(2):226-35.
- Francis HM, Stevenson RJ (2011) Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. **Behavioral neuroscience.**
- Fruhbeck G, Diez-Caballero A, Salvador J, AlvarezCienfuegos J (2000) Chronobiology of recombinant leptin therapy. **JAMA.** 283:1567–1568.
- Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 27(5-6):422-7.
- Gaspar T, Snipes JA, Busija AR, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW (2008) ROS-independent preconditioning in neurons via activation of mitoKATP channels by BMS-191095. **J Cereb Blood Flow Metab.** 28:1090-1103.
- Gautron L e Layé S (2009) Neurobiology of Inflammation-Associated Anorexia. **Front Neurosci.** 3:59.
- Gettins PG (2002) Serpin structure, mechanism, and function. **Chem. Rev.** 102:4751–4804.
- Ghiglieri V, Picconi B, Sgobio C, Bageetta V, Barone I, Paillè V, Di Filippo et al. (2009) Epilepsy-induced abnormal striatal plasticity in Bassoon mutant mice. **Eur. J. Neurosci.** 29:1979–1993.
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A (2006). Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. **Obesity.** 14 (Suppl 1): 41S–49S.
- Glavas MM, Joachim SE, Draper SJ, Smith MS, Grove KL (2007) Melanocortinergic activation by melanotan II inhibits feeding and increases uncoupling protein 1 messenger ribonucleic acid in the developing rat. **Endocrinology.** 148:3279-3287.
- Goldstein BI, Liu SM, Zivkovic N, Schaffer A, Chien LC, Blanco C (2011) The bur-den of obesity among adults with bipolar disorder in the United States. **BipolarDisord.** 13(4):387–395.
- Grammas P (2011) Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation.** 8:26.
- Grammas P, Martinez J, Miller B (2011) Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Expert reviews in molecular medicine.** 13:e19.
- Greco SJ, Bryan KJ, Sarkar S, Zhu X, Smith MA, Ashford JW, Johnston JM, Tezapsidis N, Casadesus G (2010) Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.** 19(4):1155-67.

- Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, et al. (2011) Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood- brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. **Neuropathology and applied neurobiology**. 37:24-39.
- Grill HJ, Hayes MR (2012) Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. **Cell Metabolism**. 16:296–309.
- Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, Xiao XQ, Smith, MS (2005) Development of metabolic systems. **Physiol. Behav**. 86:646-660.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**. 112:2735-2752.
- Gustafson D, Karlsson C, Skoog I, Rosengren L, Lissner L, Blennow K (2007) Mid-life adiposity factors relate to blood-brain barrier integrity in late life. **J Intern Med**. 262:643-650.
- Haddad-Tóvulli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA (2017) Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. **Front Neurosci**. 11:224.
- Harden LM, Du Plessis I, Poole S, Laburn HP (2006) Interleukin-6 And Leptin Mediate Lipopolysaccharide-Induced Fever And Sickness Behavior. **Physiology & Behavior**. 89:146-155.
- Harden LM, Du Plessis I, Poole S, Laburn HP (2008) Interleukin (Il)-6 And Il-1 Beta Act Synergistically Within The Brain To Induce Sickness Behavior And Fever In Rats. **Brain Behavior And Immunity**. 22:838-849.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lynch MA, Vraniak PD, Wenk GL (2002) Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. **Exp. Neurol**. 176:336–341.
- Headland SE e Norling LV (2015) The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in immunology**. 27(3):149-160.
- Hebben N, Corkin S, Eichenbaum H e Shedlack K (1985). Diminished ability to interpret and report internal states after bilateral medial temporal resection: Case H. M. **Behavioral Neuroscience**. 99:1031-1039.
- Hendel A, et al. (2010) Granzymes in age-related cardiovascular and pulmonary diseases. **Cell Death Differ**. 17:596–606.
- Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M (1999) Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. **JAMA**. 282:1568–1575.
- Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD (2012) Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. **Neurobiology of Learning and Memory**. 98:25-32.
- Higgs S (2002) Memory for recent eating and its influence on subsequent food intake. **Appetite**. 39: 159-166.
- Higgs S, Williamson AC, Attwood AS (2008) Recall of recent lunch and its effect on subsequent snack intake. **Physiology and Behavior**. 94:454-462.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**. 299(5609):1057–61.

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. 259:87–91.
- Hwang LL, Wang CH, Li TL, Chang SD, Lin LC, Chen CP, Chen CT, Liang KC, Ho IK, Yang WS, Chiou LC (2010) Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. **Obesity** (Silver Spring). 18(3):463-9.
- Jais A, Brüning JC (2017) Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**. 127(1):24-32.
- Jurdak N, Lichtenstein AH, Kanarek RB (2008) Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. **Nutritional Neuroscience**. 11:48–54.
- Kaczmarczyk MM, Machaj AS, Chiu GS, Lawson MA, Gainey SJ, York JM, et al. (2013) Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. **Psychoneuroendocrinology**. 38(9):1553–1564.
- Kagi, D. et al. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature**. 369:31–37.
- Kaidanovich-Beilin O, Cha DS, McIntyre RS (2012) Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. **F1000 biology reports**. 4:14.
- Kalaria RN, Hedera P (1995) Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease. **Neuroreport**. 6:477–480.
- Kalaria RN, Pax AB (1995) Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. **Brain Res**. 705:349–352.
- Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocke M, Verschuren WM, Kromhout D, Launer LJ (2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. **Neurology**. 62(2):275–280.
- Kanoski SE e Davidson TL (2011) Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiology & Behavior**. 103:59–68.
- Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL (2010) The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. **Journal of Alzheimer's disease**. 21:207-219.
- Katakam PV, Wappler EA, Katz PS, Rutkai I, Institoris A, Domoki F, Gaspar T, Grovenburg SM, Snipes JA, Busija DW (2013) Depolarization of mitochondria in endothelial cells promotes cerebral vascular vasodilation by activation of nitric oxide synthase. **Art Throm Vasc Biol**. 33:752-759.
- Katakam PVG, Dutta S, Grovenburg SM, Sure VN, Gordon A, Peterson NR, Rutkai I, Busija DW (2016) Depolarization of mitochondria in neurons promotes activation of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 310(9):H1097-106.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**. 51:2944–2950.
- Kim JM, Stewart R, Shin IS, Yoon JS (2002): Previous stroke but not vascular risk factors are associated with depression in a cognitively impaired older Korean population. **Int J Geriatr Psychiatry**. 17:453–458.
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A (2005) Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. **Arch Neurol**. 62(10):1556-60.
- Knigge KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S (1975) Brain endocrine interaction II. The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. S. KARGER, BASEL.

- Komulainen P, Lakka TA, Kivipelto M, et al. (2007) Metabolic syndrome and cognitive function: a population-based follow-up study in elderly women. **Dementia and geriatric cognitive disorders**. 23:29-34.
- Lackey DE e Olefsky JM (2016) Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nat Rev Endocrinol**. 12(1):15–28.
- Laflamme N e Rivest S (2001) Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. **FASEB Journal**. 15(1):155-163.
- Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018) Alzheimer's disease. **Eur J Neurol**. 25(1):59-70.
- Lee CH, Kim HJ, Lee Y, Kang GM, Lim HS et al. (2018) Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation. **Cell Reports**. 25(4):934-946.
- Lee WL e Downey GP (2001) Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 164:896–904.
- Lin SC, Lo YC, Wu H (2010) Helical Assembly In The Myd88-Irak4-Irak2 Complex In Tlr/Il-1r Signalling. **Nature**. 465:885-U2.
- Liu Y, Huang Y, Liu T, Wu H, Cui H, Gautron L (2016) Lipopolysaccharide Rapidly and Completely Suppresses AgRP Neuron-Mediated Food Intake in Male Mice. **Endocrinology**. 157(6):2380–2392
- Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, Yin F, Cadenas E (2015) High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. **PLoS One**. 10(5):e0128274.
- Lumeng CN, Bodzin JL, and Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**. 117:175-184.
- Lustman PJ, Griffith LS, Gavard JA, Clouse RE (1992) Depression in adults with diabetes. **Diabetes Care**. 15(11):1631-9.
- Mansur RB, Brietzke E, McIntyre RS (2015) Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. **Neurosci Biobehav Rev**. 52:89–104.
- Marazziti D, Rutigliano G, Baroni S, Landi P, Dell'Osso L (2014) Metabolic syndrome and major depression. **CNS Spectr**. 19(4):293-304.
- Martin-de-Saavedra MD, Budni J, Cunha MP, Gomez-Rangel V, Lorrio S, Del Barrio L, Lastres-Becker I, Parada E, Tordera RM, Rodrigues AL, Cuadrado A, Lopez MG (2013) Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**. 38:2010-2022.
- Mast BT, Miles T, Penninx BW, Yaffe K, Rosano C, Satterfield S, et al. (2008) Vascular disease and future risk of depressive symptomatology in older adults: Findings from the Health, Aging, and Body Composition study. **Biol Psychiatry**. 64:320–326.
- McIntyre RS, Muzina DJ, Kemp DE, et al. (2008) Bipolar disorder and suicide: research synthesis and clinical translation. **Curr. Psychiatry Rep**. 10(1):66–72.
- Meek RL e Benditt EP (1986) Amyloid-A Gene Family Expression In Different Mouse-Tissues. **Journal Of Experimental Medicine**. 164:2006-2017.
- Michaelis EK (2012) “Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: relationship to neurological diseases and mechanisms for differential sensitivity of neurons to stress,”. **The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An Integrative Review**. 54–76.

- Mikhed Y, Daiber A e Steven S (2015) Mitochondrial oxidative stress, Mitochondrial DNA damage and their role in age-related Vascular Dysfunction. **Int. J. Mol. Sci.** 16(7):15918-15953.
- Milanski M, Arruda AP, Coope A, et al. (2012) Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. **Diabetes.** 61:1455-1462.
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J. Neurosci.** 29:359-370.
- Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M (2002) Toll-Like Receptor 4 Surface Expression On Human Monocytes And B Cells Is Modulated By Il-2 And Il-4. **Immunology Letters.** 81:71-75.
- Mitchell RW e Hatch GM (2011) Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 85: 293–302.
- Mittal D, Stevenson RJ, Oaten MJ, Miller LA (2011) Snacking while watching TV impairs food recall and promotes food intake on a later TV free test meal. **Applied Cognitive Psychology**
- Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S (2009) Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. **Obesity (Silver Spring).** 17:1872–1877.
- Monteiro R, Azevedo I (2010) Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators Inflamm.**
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS (2004) Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. **Neurology.** 62(9):1573–1579.
- Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience.** 15:367–378.
- Mottahedin A, Smith PLP, Hagberg H, Ek CJ, Mallard C (2017) TLR2-mediated leukocyte trafficking to the developing brain. **Journal of leukocyte biology.** 101(1):297-305.
- Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B (2010) Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. **J Comp Neurol.** 518(7):943-62.
- Mulvahill JS, Nicol GE, Dixon D, Lenze EJ, Karp JF, Reynolds CF, Blumberger DM, Mulsant BH (2017) Effect of Metabolic Syndrome on Late-Life Depression: Associations with Disease Severity and Treatment Resistance. **J Am Geriatr Soc.** 65(12):2651-2658.
- Murray MJ e Murray AB (1979) Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **American Journal of Clinical Nutrition.** 32(3):593-596.
- Myers MG, Jr e Olson DP (2012) Central nervous system control of metabolism. **Nature.** 491:357–363.
- Naarding P, Tiemeier H, Breteler MM, Schoevers RA, Jonker C, Koudstaal PJ, et al. (2007): Clinically defined vascular depression in the general population. **Psychol Med.** 37:383–392.
- Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, et al. (2008) Strategies to advance translational research into brain barriers. **The Lancet Neurology.** 7:84-96.
- Ng TP, Feng L, Nyunt MS, Feng L, Gao Q, Lim ML, Collinson SL, Chong MS, Lim WS, Lee TS, Yap P, Yap KB (2016) Metabolic Syndrome and the Risk of Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia: Follow-up of the Singapore Longitudinal Ageing Study Cohort. **JAMA Neurol.** 73(4):456-63.

- Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver D (2014) Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. **Nature**. 509:503–6.
- Nicchia GP, Nico B, Camassa LM, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A (2004) The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. **Neuroscience**. 129:935-945.
- Obici S, Rossetti L (2003) Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. **Endocrinology**. 144:5172–8.
- Palladino MA, Shalaby MR e Svedersky LP (1984) Interleukin-2 And Gamma-Interferon Can Augment Natural-Killer Cell-Activity By Different Mechanisms. **Lymphokine Research**. 3:264-264.
- Panza F, Frisardi V, Seripa D, et al. (2011) Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and dementia. **Current Alzheimer research**. 8:492-509.
- Pasinetti GM & Eberstein, JA (2008) Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**. 106:1503–1514.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. **Nature**. 443:700–704.
- Perry VH (2004) The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav. Immun**. 18:407–413.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**. 350:664–671.
- Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ (2010) Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **J Neuroimmunol**. 219(1):25–32.
- Poltorak A, He XL, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective Lps Signaling In C3h/Hej And C57bl/10sccr Mice: Mutations In Tlr4 Gene. **Science**. 282:2085-2088.
- Puder JJ e Munsch S (2010) Psychological correlates of childhood obesity. **Int. J. Obes**. 34(Suppl. 2):S37—S43.
- Pulkki-Raback L, Elovainio M, Kivimaki M, et al. Depressive symptoms and the metabolic syndrome in childhood and adulthood: a prospective cohort study (2009) **Health Psychol**. 28(1): 108–116.
- Ramalho AF, Bombassaro B, Dragano NR, Solon C, Morari J, Fioravante M, Barbizan R, Velloso LA, Araujo EP (2018) Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. **J Neuroinflammation**. 15(1):10.
- Reinert KR, Po'e EK, Barkin SL (2013). The relationship between executive function and obesity in children and adolescents: a systematic literature review. **J. Obes**. 2013:820956.
- Rinaman L (2010) Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain Research**. 1350:18–34.
- Romano A, Pace L, Tempesta B, Lavecchia AM, Macheda T, Bedse G, Petrella A, Cifani C, Serviddio G, Vendemiale G, Gaetani S, Cassano T (2014) Depressive-like behavior is paired to monoaminergic alteration in a murine model of Alzheimer's disease. **Int J Neuropsychopharmacol** 18.

- Rozin P, Dow S, Moscovitch M, Rajaram S (1998) What causes humans to begin and end a meal? A role for memory for what has been eaten, as evidenced by a study of multiple meal eating in amnesic patients. **Psychol Sci.** 9:392–6.
- Sainsbury A, Shi Y, Zhang L, Aljanova A, Lin Z, Nguyen AD, Herzog H, Lin S (2010) Y4 receptors and pancreatic polypeptide regulate food intake via hypothalamic orexin and brain-derived neurotrophic factor dependent pathways. **Neuropeptides.** 44(3):261-268.
- Saltiel AR, Olefsky JM (2017) Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **J Clin Invest.** 127(1):1-4.
- Samal BB, Waites CK, Almeida-Suhett C, Li Z, Marini AM, et al. (2015) Acute Response of the Hippocampal Transcriptome Following Mild Traumatic Brain Injury After Controlled Cortical Impact in the Rat. **Journal of Molecular Neuroscience.** 57(2):282-303.
- Schäffler A e Schölmerich J (2010) Innate immunity and adipose tissue biology. **Trends in immunology.** 31(6):228-235.
- Schultheiss C, Blechert B, Gaertner FC, et al. (2006) In vivo characterization of endothelial cell activation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Angiogenesis.** 9:59-65.
- Sellbom KS e Gunstad J (2012) Cognitive function and decline in obesity. **J. Alzheimers Dis.** 30:S89–S95.
- Sergi D, Campbell FM, Grant C, Morris AC, Bachmair E, et al. (2018) SerpinA3N is a novel hypothalamic gene upregulated by a high-fat diet and leptin in mice. **Genes and Nutrition.** 13(1).
- Shakersain B, Santoni G, Larsson SC, et al. (2015) Prudent diet may attenuate the adverse effects of Western diet on cognitive decline. **Alzheimers Dement.**
- Shinkov A, Borissova AM, Kovatcheva R, Vlahov J, Dakovska L, Atanassova I, Petkova P (2017) **Postgrad Med.** 5:1-7.
- Shrestha R, Millington O, Brewer J, et al. (2013) Is central nervous system an immune-privileged site? **Kathmandu University medical journal.** 11:102-107.
- Sipione S et al. (2006) Identification of a novel human granzyme B inhibitor secreted by cultured sertoli cells. **J. Immunol.** 177:5051–5058.
- Squire LR, Schacter DL (2002) **The Neuropsychology of Memory.**
- Sternson SM (2013) Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. **Neuron.** 77:810– 824.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.** 85:367-370.
- Strekalova T, Evans M, Costa-Nunes J, Bachurin S, Yeritsyan N, Couch Y, Steinbusch HM, Eleonore Kohler S, Lesch KP, Anthony DC (2015) Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. **Brain Behav Immun.** 48:42-47.
- Stewart R, Prince M, Mann A, Richards M, Brayne C (2001): Stroke, vascular risk factors and depression: Cross-sectional study in a UK Caribbean-born population. **Br J Psychiatry.** 178:23–28.
- Sullivan LE, Fiellin DA, O'Connor PG (2005) The prevalence and impact of alcohol problems in major depression: a systematic review. **Am J Med.** 118(4):330-41.
- Takeda S, Sato N, Morishita R (2014) Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Frontiers in aging neuroscience.** 6:171.

- Thaler JP, Schwartz MW (2010) Minireview: inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**. 151(9):4109-15.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO et al. (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**. 122(1):153- 62.
- Tomas-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J (2005) Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. **J Neurosci Res**. 80:235-246.
- Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM (1985) A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. **Science**. 229(4716):867-9.
- Ujiiie M, Dickstein D, Carlow D, Jefferies W (2003) Blood–brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. **Microcirculation**. 10:463–70.
- van de Sande-Lee S, Pereira FRS, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, et al. (2011) Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. **Diabetes**. 60(6):1699-704.
- Vanhanen M, Koivisto K, Moilanen L, et al. (2006) Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. **Neurology**. 67:843-847.
- Velloso LA, Schwartz, MW (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **Int. J. Obes**. 35,1455-1465.
- Vereker E, Campbell V, Roche E, McEntee E, Lynch MA (2000) Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. **J. Biol. Chem**. 275:26252–26258.
- Vicuña L, Strohlic DE, Latremoliere A, Bali KK, Simonetti M, et al. (2015) The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. **Nature medicine**. 21(5):518-523.
- von Tell D, Armulik A, Betsholtz C (2006) Pericytes and vascular stability. **Exp Cell Res**. 312:623–629
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S, et al. (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochimica et biophysica acta**. 1788:842-857.
- Whitmer R, Gustafson D, Barrett-Connor E, Haan M, Gunderson E, Yaffe K (2008) Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. **Neurology**. 711:057- 1064.
- Williams KW, Elmquist JK (2012) From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. **Nat. Neurosci**. 15:1350–1355.
- Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. **Vasc Pharmacol**. 38:323–37.
- Wu Q, Clark MS, Palmiter RD (2012) Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. **Nature**. 483:594– 597.
- Wu Z, Guo H, Chow N et al (2005) Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. **Nat Med** 11:959–965.
- Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada, A. (2000) Lps Induces Apoptosis In Macrophages Mostly Through The Autocrine Production Of Tnf-Alpha. **Blood**. 95:3823- 3831.

- Xu L, Xu S, Lin L, Gu X, Fu C, Fang Y, Li X, Wang X (2018) High-fat Diet Mediates Anxiolytic-like Behaviors in a Time-dependent Manner Through the Regulation of SIRT1 in the Brain. **Neuroscience**. 372:237-245.
- Yochim B, Mast BT, Lichtenberg PA (2003) Cerebrovascular risk factors and depressed mood in inner city older adults. **Clinical Psychologist**. 7:11–20.
- Yochim BP, Kerkar SP, Lichtenberg PA (2006) Cerebrovascular risk factors, activity limitations, and depressed mood in African American older adults. **Psychol Aging**. 21:186–189.
- Yokel RA (2006) Blood–brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. **J Alzheimers Disease**. 10:223–53.
- Yunfu W, Guangjian L, Ping Z, et al. (2014) PINK1 and its familial Parkinson's disease-associated mutation regulate brain vascular endothelial inflammation. **Journal of molecular neuroscience**. 53:109-116.
- Zaretsky AG, Engiles JB, Hunter CA (2014) Infection-induced changes in hematopoiesis. **Journal of Immunology**. 192(1):27-33.
- Zhang L e Wang C (2014) Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**. 13(2):138-152.
- Zhang P, Tian B (2014) Metabolic syndrome: an important risk factor for Parkinson's disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**. 2014:729194.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. 135:61–73.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. 372:425–432.