



LUCAS FRANCISCO RIBEIRO DO NASCIMENTO

**ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 INDUZEM NEUROGÊNESE
PREDOMINANTEMENTE DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM POMC
NO HIPOTÁLAMO**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento

**ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 INDUZEM NEUROGÊNESE
PREDOMINANTEMENTE DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM POMC NO
HIPOTÁLAMO**

Orientador: Licio Augusto Velloso

Tutor: Licio Augusto Velloso

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO LUCAS FRANCISCO RIBEIRO DO NASCIMENTO
E ORIENTADA PELA PROF. LICIO AUGUSTO VELLOSO

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

N17a Nascimento, Lucas Francisco Ribeiro do, 1983-
Ácidos graxos ômega-3 induzem neurogênese predominantemente de células que expressam POMC no hipotálamo / Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Lício Augusto Velloso.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Neurogênese. 4. Hipotálamo. 5. Ácidos graxos ômega-3. I. Velloso, Lício Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Omega-3 fatty acids induce neurogenesis predominantly of POMC-expressing cells in the hypothalamus

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Inflammation

Neurogenesis

Hypothalamus

Fatty acids, Omega-3

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Lício Augusto Velloso [Orientador]

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Isclia Teresinha Lopes Cendes

Alicia Juliana Kowaltowski

Fernanda Guarino De Felice

Data de defesa: 13-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

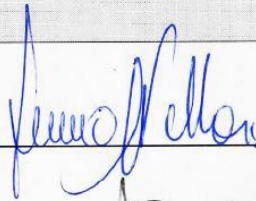
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUCAS FRANCISCO RIBEIRO DO NASCIMENTO

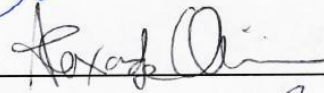
Orientador (a) PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

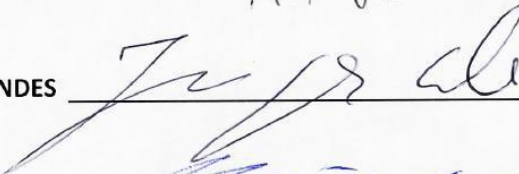
1. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO



2. PROF(A). DR(A). ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA



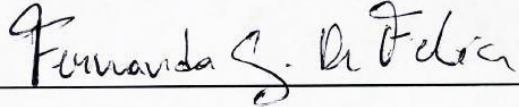
3. PROF(A). DR(A). ISCIA TERESINHA LOPES CENDES



4. PROF(A). DR(A). ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI



5. PROF(A). DR(A). FERNANDA GUARINO DE FELICE



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 13 de março de 2014

Aos meus pais e irmãos, com carinho.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento.

À Universidade Estadual de Campinas, pela infraestrutura e pela contribuição na minha formação.

Ao professor Lício Augusto Velloso, pelo exemplo, dedicação e oportunidade de realização deste trabalho. Obrigado pela orientação e por poder trabalhar junto ao seu grupo e crescer cada dia mais.

Aos professores Hernandes F. Carvalho e Alexandre L. R. de Oliveira, e aos seus alunos, por me acolherem em seus laboratórios e pelas valiosas sugestões.

Às imprescindíveis contribuições de Guilherme Barbosa, Sheila Victorio e Raquel Arminda na padronização da imunomarcação.

À equipe do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Sinalização Celular, pelo suporte técnico, pela troca diária de experiência e apoio na realização dos meus projetos. Um obrigado especial àqueles que se envolveram de forma mais íntima com o trabalho, Gabriela F. P. Souza, Joseane Morari, Carina Solon, Rodrigo F. Moura, Letícia M. Ignácio-Souza e Daniela S. Razolli.

Aos amigos que fiz em Campinas, pela cumplicidade e carinho que os fizeram minha família nesta cidade.

Aos meus pais e irmãos, pela presença constante, força e incentivo na minha busca por realização profissional.

Por ultimo, mas não menos importante, A Deus, por me permitir percebê-lo sempre ao meu lado, abençoando minha caminhada.

Janela sobre a utopia

Ela está no horizonte - diz Fernando Biriri. - Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.

Por mais que eu caminhe, jamais a alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para caminhar. (Eduardo Galeano)

RESUMO

NASCIMENTO, L.F.R. – **Ácidos graxos ômega-3 induzem neurogênese predominantemente de células que expressam POMC no hipotálamo.** Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2014.

Em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta rica em gordura há desenvolvimento de resistência hipotalâmica à leptina decorrente da ativação de uma resposta inflamatória específica no hipotálamo. Estudos recentes revelaram que além da indução da inflamação, a dieta rica em gordura ativa também vias de sinalização apoptóticas que culminam com a morte de neurônios em regiões hipotalâmicas envolvidas com o controle da fome e do gasto energético. Acredita-se que a perda de sub-populações específicas de neurônios no hipotálamo acarrete em dano dos mecanismos de controle do balanço entre consumo calórico e gasto energético, resultando no desenvolvimento ou perpetuação da obesidade. A composição de ácidos graxos da dieta tem papel central na resposta inflamatória hipotalâmica, sendo os ácidos graxos saturados de cadeia longa os mais lesivos. Por outro lado, em outras regiões do cérebro, alguns ácidos graxos insaturados podem desempenhar papel anti-inflamatório e induzir reparo funcional através da neurogênese. Neste trabalho, nós avaliamos os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados α -linolênico (ALA C18:3-n3), e docosaexaenoico (DHA 22:6-n3) sobre a indução de neurogênese no hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD). Nossos resultados mostram que ácidos graxos ômega-3 administrados tanto na dieta ou diretamente no cérebro, são capazes de modular a neurogênese no hipotálamo de camundongos obesos, favorecendo a proliferação de neurônios anorexigênicos POMC, mas sem redução da ingestão alimentar. Embora esses animais não comam menos, eles se movimentam mais e exibem um discreto aumento do gasto energético. A suplementação com ômega-3 em HFD reduz a inflamação e a apoptose no hipotálamo, além de melhorar o metabolismo glicêmico e proteger os animais do ganho de peso. Aparentemente, os neurônios recém-formados surgem a partir da proliferação de células com características de células progenitoras, presentes na parede do terceiro ventrículo. Nesse processo, o receptor de ácidos graxos livres, GPR40, e o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF, desempenham papel fundamental, mas a participação dessas proteínas em tais eventos parece ser dependente do estado nutricional e metabólico do animal.

Palavras-chave: obesidade, inflamação, hipotálamo, neurogênese, ômega-3

ABSTRACT

NASCIMENTO, L.F.R. – **Omega-3 fatty acids induce neurogenesis predominantly of POMC-expressing cells in the hypothalamus.** PhD Thesis - Faculty of Medical Sciences, University of Campinas , São Paulo , 2014.

In experimental models of high-fat diet (HFD)-induced obesity there is a development of hypothalamic leptin resistance due to the activation of a specific inflammatory response in the hypothalamus. Recent studies have revealed that besides the induction of inflammation, a fat-rich diet can also activate apoptotic signaling pathways that culminate in neuronal death in hypothalamic areas responsible for the control of feeding and energy expenditure. It is believed that the loss of specific hypothalamic neuronal subpopulations deteriorates mechanisms involved in the control of caloric intake and energy expenditure, resulting in the development and perpetuation of obesity. The fatty acid composition of diet, particularly the saturated fatty acid content, can modulate immune activity in the hypothalamus, inducing an inflammatory response. However, in other regions of the brain, some unsaturated fatty acids can act as anti-inflammatory agents and induce functional repair through neurogenesis. In this study we evaluated the effects of polyunsaturated fatty acids α -linolenic (ALA C18:3-n3) and docosahexaenoic (DHA 22:6-n3) on the induction of hypothalamic neurogenesis in HFD-induced obese animals. Our results show that omega-3 fatty acids administered either in the diet or directly into the brain are able to modulate neurogenesis in the hypothalamus of obese mice, leading to the proliferation of anorexigenic POMC neurons. This effect is not accompanied by changes in food intake, but increase unstimulated physical activity resulting in a discrete increase in energy expenditure. In addition, omega-3 supplemented HFD reduces inflammation and apoptosis in the hypothalamus, improve glucose metabolism and protect the mice against body mass gain. Apparently, these newly formed neurons arise from progenitor cell proliferation present in the wall of the third ventricle. In this process, free fatty acid receptor, GPR40, and brain-derived neurotrophic factor, BDNF, play a key role; however, the involvement of these proteins in such events appears to be dependent on the nutritional and metabolic status of the animal.

Keywords : Obesity, inflammation, hypothalamus, neurogenesis, omega - 3

LISTA DE ABREVIATURAS

AGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene Agout

ALA – Ácido α

AMPC – Monofosfato Cíclico de Adenosina

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BRDU - Bromodeoxiuridina

CART – Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina

CCK - Colecistocinina

CGC – Capillary Gas Chromatograph

CNTF – Fator Neurotrófico Ciliar

CREB - Proteína Ligante ao Elemento de Resposta do AMPc

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCX – Doublecortina

DHA – Ácido Docosahexanóico

ENDEF – Estudo Nacional de Despesa Familiar

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

GAPDH – Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

GIP - Polipeptídeo Inibitório Gástrico

GLP-1 – Peptídeo Glucagon-Like

GPR40 – Receptor Acoplado à Proteína G-40

GTT – Teste de Tolerância à Glicose

HFD – Dieta Hiperlipídica

ICV - Intracérebroventricular

IKK – Quinase I κ B

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corpórea

IP - Intraperitoneal

IP3 – Inositol 3-Fosfato

IR – Receptor de Insulina

ITT – Teste de Tolerância à Insulina

KITT – Constante de Decaimento da Glicose

-Linolênico

LTT – Teste de Tolerância à Leptina

MCH – Hormônio Concentrador de Melanina

NFD – Dieta Normolipídica

NPY – Neuropeptídeo Y

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PKC – Proteína Kinase C

PLC – Fosfolipase C

PNSN – Pesquisa Nacional Sobre Saúde e Nutrição

POMC – Pró-Ópio Melanocortina

PPV – Pesquisa Sobre Padrões de Vida

PUFA – Ácido Graxo Poliinsaturado

PYY – Peptide YY

SGZ – Zona Subgranular

SNC – Sistema Nervosa Central

SVZ – Zona Subventricular

TLR-4 – Receptor do Tipo Toll Like 4

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

TRH – Hormônio Liberador de Tirotrofina

α -MSH – Hormônio Melanócito Estimulante- α

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	28
ARTIGO	29
APÊNDICE	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

INTRODUÇÃO

A capacidade de manter o balanço energético num ambiente em constante mudança ou em resposta a alterações fisiológicas é essencial para a sobrevivência. Há mais de meio século nós sabemos que esse balanço é mantido através de um sistema complexo controlado pelo cérebro e que é capaz de modular a ingestão alimentar e gasto energético (Anand & Brobeck, 1951). Nas últimas duas décadas, avanços significativos têm sido feitos revelando novas subpopulações neuronais, mediadores químicos e mecanismos de transdução dos sinais que participam desse controle (Meister, 2007).

Em vertebrados, a principal estrutura neural envolvida no controle do balanço energético é o hipotálamo, uma pequena região do sistema nervoso central, responsável pela recepção e integração de informações periféricas sobre o estado nutricional e metabólico do indivíduo (Meister, 2007). Em mamíferos, mais especificamente, essas informações provenientes da periferia incluem nutrientes, sinais mecânicos gerados pela distensão gástrica, hormônios entéricos (PYY, CCK, GLP-1, GIP e grelina) e outros hormônios não entéricos. Destes, a leptina, juntamente com a insulina são os dois principais sinais que cumprem um papel adipostático, controlando em longo prazo o balanço energético e a massa corpórea (Blouet & Schwartz, 2010; Morton *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2000).

A insulina é um hormônio peptídico secretado exclusivamente pelas células β -pancreáticas, principalmente em resposta à concentração plasmática de nutrientes. Já a leptina é um hormônio com características estruturais de citocina produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco numa relação diretamente proporcional à

massa deste tecido. O principal sítio de ação da leptina e da insulina no sistema nervoso central são os neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (Elmqvist *et al.*, 1998; Friedman & Halaas, 1998). Para alcançar tais neurônios a leptina e a insulina utilizam um sistema saturável de transporte mediado por receptores específicos, presentes tanto no plexo coróide como em capilares cerebrais (Schwartz *et al.*, 2000). Além disso, esses hormônios, bem como outros sinais periféricos, têm acesso facilitado ao núcleo arqueado devido à ausência de barreira hematoencefálica na região da eminência média do hipotálamo médio-basal (Meister, 2007).

No núcleo arqueado do hipotálamo existem duas regiões homólogas, uma composta por células produtoras de neuropeptídeos orexigênicos, NPY e AgRP, e a outra composta por células produtoras de neuropeptídeos anorexigênicos, α -MSH e β -endorfina (clivados a partir de POMC) e CART. Além de expressarem receptores para leptina (ObRb - forma mais predominante nesta região anatômica), tais subgrupos de neurônios expressam também receptores para insulina (IR), hormônio este que desempenha um papel fundamental na modulação da ação da leptina (Carvalheira *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2000).

Tanto a leptina quanto a insulina, mas principalmente ambos, agindo de forma combinada, têm a capacidade de inibir neurônios produtores de NPY/AgRP e ativar neurônios produtores de POMC/CART (Torsoni *et al.*, 2003; Carvalheira *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2000). Neurônios NPY/AgRPérgicos apresentam maior atividade durante o jejum e em resposta a uma diminuição da massa total de tecido adiposo quando, em ambos os casos, os níveis circulantes de leptina e insulina são menores. Nestas circunstâncias, conexões axonais entre neurônios do núcleo arqueado e neurônios dos núcleos

paraventricular e hipotalâmico lateral levam à inibição da produção de neuropeptídios anorexigênicos e ativadores do gasto energético (TRH e CRH) no núcleo paraventricular, resultando na ativação da produção de neuropeptídeos orexigênicos e inibidores do gasto energético (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral. O resultado desta regulação é o aumento da fome e redução do gasto energético. Por outro lado, em períodos pós-prandiais e quando os estoques de energia no tecido adiposo são maiores há aumento dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, o que leva à inibição dos neurônios NPY/AgRPérgicos e ao estímulo dos neurônios POMC/CARTérgicos. O resultado é a inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TRH, com subsequente saciedade acompanhada de aumento do gasto energético (Elmquist *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2000) (Figura 1).

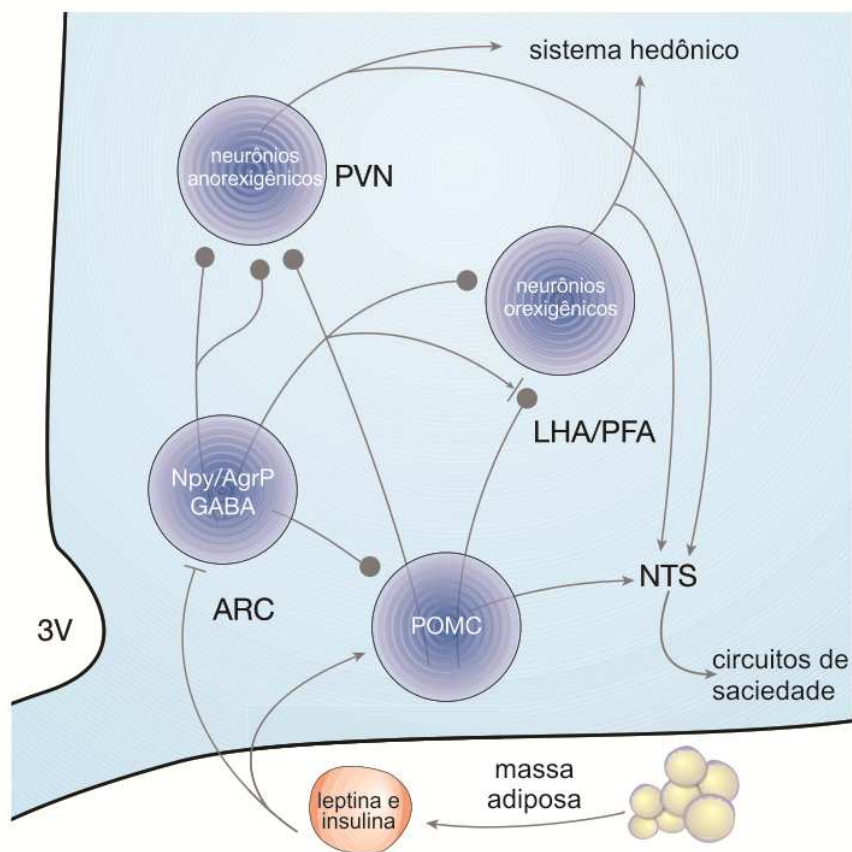


Figura 1: Esquema do sistema de melanocortina no hipotálamo – Extraído e modificado de Morton et al. (2006).

Interferências nesse sistema fino de controle do metabolismo podem resultar em desequilíbrio energético com comprometimento da saúde do indivíduo. As causas para o desequilíbrio compreendem a interação entre fatores genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais ainda não totalmente esclarecidos, mas que podem favorecer um balanço energético positivo. Nesse contexto, as mudanças no padrão de vida, com redução de atividades físicas e superalimentação facilitada por um aumento na produção, industrialização e distribuição de alimentos hipercalóricos, principalmente daqueles ricos

em gordura, exercem impacto importante no controle hipotalâmico do metabolismo e favorecem o desenvolvimento da obesidade (Velloso & Schwartz, 2011; Elmquist *et al.*, 1998; Friedman & Halaas, 1998).

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e é um importante fator de risco para doenças não transmissíveis, como diabetes mellitus tipo 2, problemas cardiovasculares, aterosclerose, doenças hepáticas e alguns tipos de câncer, com forte impacto na qualidade de vida e nas taxas de mortalidade da população (Swinburn *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas houve um aumento considerável da obesidade em diversas regiões do planeta, e esta vem se revelando um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Mais de 300 milhões de pessoas no mundo são consideradas obesas, com índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 30. Nos Estados Unidos quase um terço dos adultos são obesos, e em muitos países europeus tem sido observada uma tendência similar, apesar de não atingir os mesmos níveis dos americanos (Swinburn *et al.*, 2011). Além disso, a obesidade hoje não se resume mais a um problema apenas nos países ricos, ela afeta cada vez mais parcelas dos estratos populacionais menos favorecidos economicamente. No Brasil, o sobrepeso/obesidade cresceu entre as décadas de 70 e 2000, e as análises comparativas entre os inquéritos antropométricos nacionais ENDEF (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Censo Demográfico de 1970), PNSN (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Censo demográfico 2000) regionais PPV (Pesquisa sobre Padrões de Vida), permitiram identificar a amplitude e gravidade do problema. Os três estudos revelam uma tendência ao aumento do sobrepeso com índice de massa corpórea (IMC) > 25 nos adultos, sendo que esta tendência chega a ser

maior que o dobro daquela observada em 1975, com exceção das mulheres na região sudeste (Monteiro *et al.*, 2007).

A preocupação com o aumento da prevalência mundial da obesidade e das comorbidades associadas a ela têm impulsionado a busca por alternativas às mudanças comportamentais, dietas e exercícios para promover a perda de peso, entre elas, o desenvolvimento de fármacos. Alguns medicamentos que induzem a perda de massa corpórea foram desenvolvidos para reduzir o apetite, aumentar a saciedade ou diminuir a absorção de nutrientes. No entanto, nenhum desses fármacos alcançou resultados satisfatórios na perda de massa e, em muitos casos, os indivíduos voltaram a ganhar massa depois de um tempo de tratamento. Além disso, alguns desses medicamentos foram retirados do mercado por medida de segurança devido aos riscos de eventos adversos que oferecem (Kim *et al.*, 2014). Mesmo a cirurgia bariátrica, intervenção com maior sucesso na indução da perda de massa corpórea, tem se mostrado incapaz de manter estável o peso dos indivíduos (Dayyeh *et al.*, 2011).

As dificuldades de tratamento da obesidade podem ser explicadas em grande parte por perdas funcionais hipotalâmicas observados tanto em pacientes obesos (McNay *et al.*, 2012; Sande-Lee *et al.*, 2011) quanto em animais com obesidade induzida pelo consumo de uma dieta rica em gordura saturada, num padrão de alimentação semelhante ao ocidental (McNay *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2009; Milanski *et al.*, 2009; White *et al.*, 2009; De Souza *et al.*, 2005). De acordo com um estudo realizado pelo nosso grupo, animais experimentais tratados com dieta contendo aproximadamente 40% de gordura saturada por 16 semanas apresentaram um aumento da expressão de citocinas inflamatórias no hipotálamo, entre elas: TNF- α , IL-1 β e IL-6 (De Souza *et al.*, 2005). Na presença de níveis

elevados destas citocinas, proteínas com atividade serinaquinase catalisam a fosforilação em serina de importantes mediadores da via de sinalização da insulina e da leptina, o que leva a uma resistência molecular à ação desses hormônios no hipotálamo (White *et al.*, 2009; De Souza *et al.*, 2005).

A resistência à ação da insulina e da leptina depende, pelo menos em parte, da ativação de receptores do tipo *Toll-like*. Nosso grupo observou que ácidos graxos saturados presentes na dieta ativam a sinalização celular através de TLR4 no hipotálamo, resultando no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a resistência local à insulina e leptina (Milanski *et al.*, 2009). A perpetuação da resposta inflamatória resulta ainda em ativação de vias apoptóticas que levam à perda de neurônios do núcleo arqueado, principalmente os anorexigênicos POMC (Moraes *et al.*, 2009). A perda definitiva desses neurônios deve acentuar ainda mais a redução dos sinais de saciedade que acompanham a resistência à ação da insulina e da leptina no hipotálamo e deve contribuir de forma considerável para o desenvolvimento e manutenção da obesidade. Uma pergunta que emerge desses estudos é se o processo de morte de neurônios no hipotálamo, desencadeado pela inflamação induzida por dieta rica em gordura, seria de alguma forma reversível.

Durante anos a ciência ficou presa ao dogma de que o cérebro adulto seria uma estrutura estática e a neurogênese, definida como um processo de geração de neurônios funcionais a partir de outros precursores ocorreria somente no embrião e durante a fase perinatal em mamíferos. A primeira evidência anatômica da formação de novos neurônios no sistema nervoso central de mamíferos adultos foi descrita no giro denteado do hipocampo por Altman & Das (1965). No entanto, a relevância funcional desses achados não estava clara naquele momento e levou décadas para despertar grande interesse. Mesmo

com os achados de Paton & Nottebohm (1984) em aves cantoras adultas, mostrando que, nesses animais, os neurônios recém-formados eram responsivos a estímulos sonoros, a ideia de integração funcional desses neurônios não foi amplamente aceita (Lee & Blackshaw, 2012; Ming & Song, 2011).

Avanços metodológicos na microscopia eletrônica mostraram que os neurônios hipocampais formados em mamíferos adultos poderiam sobreviver por um longo período e fazer conexões sinápticas, sugerindo que a neurogênese seria capaz de modificar circuitos neurais (Kaplan & Bell, 1984). Progressos na imunohistoquímica combinados com H³-timidina demonstraram que a neurogênese era um fenômeno robusto (Cameron *et al.*, 1993). A detecção de marcadores neuronais por imunohistoquímica e a introdução de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo sintético de timidina capaz de marcar a replicação de DNA (Kuhn *et al.*, 1996) impulsionou os estudos de neurogênese em mamíferos adultos, incluindo em humanos (Erikson *et al.*, 1998).

Em condições normais, a neurogênese em adultos é espacialmente restrita a duas regiões específicas do cérebro: a zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo, onde novas células granulares são formadas; e a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais, onde novos neurônios são formados, migram para o bulbo olfatório e se tornam interneurônios (Gage, 2000). É um processo dinâmico, finamente controlado e sujeito a vários estímulos fisiológicos, patológicos e farmacológicos.

Em outras regiões do SNC, acredita-se que a neurogênese seja muito limitada sob condições fisiológicas, mas que possa ser induzida especialmente após algum dano (Pierce & Xu, 2010; Gould, 2007), embora em níveis absolutos menores do que o observado nas SGZ e SVZ *in vivo*. No entanto, uma quantidade muito pequena de neurônios gerados em

regiões clássicas, como no hipocampo, tem se mostrado crítica na regulação da formação de memória (Han *et al.*, 2009). Por isso, mesmo que os níveis de neurogênese sejam baixos, não significa que eles não sejam fisiologicamente importantes.

Enquanto os estudos de neurogênese fora das regiões SGZ e SVZ em adultos representam uma pequena fração dos dados publicados, a neurogênese no hipotálamo vem ganhando interesse substancial devido ao papel crítico que essa região desempenha não apenas na manutenção da homeostase energética, mas também no controle de diversas outras funções comportamentais e fisiológicas como temperatura corpórea, sede, fadiga, agressividade, sono, ritmos biológicos e comportamento sexual. Por isso, a formação de novos neurônios e sua integração em circuitos neurais nessa região pode resultar em efeitos fisiológicos e comportamentais importantes.

Pelo menos uma parte do processo que garante a ciclagem de células do hipotálamo é dependente de leptina e do fator neurotrófico ciliar (CNTF), podendo induzir a formação de células que expressam neurotransmissores envolvidos no controle da homeostase energética (Kokoeva & Flier, 2005). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a quantidade de neurônios hipotalâmicos recém-formados pode ser alterada pelo consumo de dietas ricas em gordura saturada (McNay *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). De fato, as células-tronco do hipotálamo médio-basal de animais adultos parecem ser danificadas pelos sinais inflamatórios causados pela gordura presente na dieta (Li *et al.*, 2012). Como resultado, além de uma maior perda neuronal no núcleo arqueado, especialmente de neurônios POMC (McNay *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2009), observa-se uma redução da capacidade de proliferação do tecido (McNay *et al.*, 2012).

Os benefícios da incorporação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) na dieta são conhecidos há muito tempo (Knoops *et al.*, 2004). Alguns resultados foram demonstrados em nível epidemiológico, tais como o efeito protetor sobre o sistema cardiovascular conferido pela dieta mediterrânea ou pelo consumo de óleo de peixe por esquimós (Estruch *et al.*, 2013; Knoops *et al.*, 2004; Bjerregaard *et al.*, 1997); bem como em nível celular e molecular, na regulação da função dos linfócitos ou na ativação da síntese de mediadores antiinflamatórios (Fowler *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 1984).

Recentemente, nosso grupo mostrou que a substituição da gordura saturada da dieta por PUFAS reduz a inflamação hipotalâmica associada à obesidade, e resulta em melhora à da resposta leptina com redução da massa corpórea (Cintra *et al.*, 2012). Outros trabalhos têm mostrado a capacidade dos PUFAS, em especial do ômega-3, de induzir reparo tecidual e funcional no hipocampo de ratos adultos (Dyall *et al.*, 2010; Wuet *et al.*, 2004). A suplementação com ácidos graxos ômega-3 foi capaz de restaurar os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), de sinapsina e da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) no cérebro de animais com lesão cerebral induzida. Estes efeitos conferiram proteção contra redução da plasticidade neural e contra prejuízos de aprendizagem (Wu *et al.*, 2004).

Apesar dos efeitos dos PUFA sobre a plasticidade neural serem bem descritos (Yamashita, 2012; Ma *et al.*, 2010; Kawakita *et al.*, 2006), o mecanismo de sinalização pelo qual eles atuam ainda é desconhecido. Alguns achados mostraram que a ligação de PUFAS ao receptor acoplado à proteína G 40 (GPR40) induz ativação da fosfolipase C (PLC) e a produção de inositol trifosfato (IP3) (Ma *et al.*, 2010). Em seguida, foi mostrado que no cérebro de primatas o GPR40 é abundantemente expresso e esses achados levaram Boneva

e Yamashita (2011) a proporem uma via pela qual os PUFA's poderiam induzir neurogênese. No modelo proposto pelos autores, a ligação do IP3 ao seu receptor promoveria o influxo de Ca^{2+} para o citosol. O influxo aumentado de Ca^{2+} seria capaz de induzir atividade da proteína kinase C (PKC), responsável pela fosforilação de CREB. No núcleo, a pCREB promoveria a transcrição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), responsável pela manutenção de neurônios já existentes e pela formação de novos neurônios e novas sinapses (Yamashita, 2012; Noble *et al.*, 2011). Ensaios *in vitro* mostraram que o ômega-3 foi capaz de induzir diferenciação de células-tronco neurais de ratos através da sua ligação ao GPR40 (Ma *et al.*, 2010). No entanto, a participação dessa via na indução da neurogênese *in vivo* ainda não foi investigada.

Os ácidos graxos ômega-3, α -linolênico (ALA 18:3-n3), eicosapentaenóico (EPA 20:5-n3) e docosahexanóico (DHA 22:6-n3) (Tabela 1) são gorduras essenciais e só podem ser incorporados através da ingestão de alimentos que contenham tais nutrientes.

As principais fontes alimentares do ácido α -linolênico são nozes e os óleos vegetais, em especial os de canola, de soja e de linhaça (Kris-Etherton *et al.*, 2011). Embora o ácido α -linolênico possa ser convertido em EPA ou DHA, a magnitude dessa conversão é modesta e um pouco controversa. Os peixes são a principal fonte de EPA e DHA, no entanto, as quantidades dessas gorduras variam entre as espécies e de acordo com variáveis ambientais, como o tipo de alimento consumido pelos peixes. Países, como Canadá, Suécia, Reino Unido, Austrália e Japão, bem como a Organização Mundial de Saúde e o Tratado do Atlântico Norte, estabeleceram recomendações dietéticas de ômega-3 baseadas nas necessidades populacionais. As recomendações variam entre 0,3 a 0,5 g/d de EPA + DHA e de 0,8 a 1,1 g/d de ácido-linolênico. Estas recomendações seriam facilmente atingidas se

fosse possível o consumo de duas refeições de peixe por semana, com ênfase em peixes gordos (ex. salmão, arenque e cavala) e através da utilização de óleos vegetais líquidos que contenham ácido α -linolênico (Kris-Etherton *et al.*, 2003).

Tabela 1: Nomenclatura e estrutura dos ácidos graxos ômega-3

Ácido α -linolênico (ALA – 18:3-n3)	
Ácido eicosapentanoico (EPA – 20:5-n3)	
Ácido docosahexanoico (DHA – 22:6-n3)	

No presente trabalho, mostramos que ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, α -linolênico (ALA – 18:3 n3) e docosahexanoico (DHA – 22:6 n3), administrados na dieta ou diretamente no cérebro, são capazes de modular a neurogênese no hipotálamo de camundongos obesos, favorecendo a proliferação de células que expressam POMC. Esse efeito, somado ao efeito antiinflamatório e à melhora do perfil metabólico, incluindo perda ou manutenção da massa corpórea, apontam o ômega-3 como nutriente com papel potencialmente importante no tratamento e prevenção da obesidade induzida por dieta.

OBJETIVOS

- Avaliar a capacidade dos ácidos graxos ômega-3 de indução de neurogênese no hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta.
- Investigar a identidade dos neurônios recém formados e avaliar os efeitos metabólicos decorrentes dos tratamentos com ômega-3.
- Propor e investigar vias que participam da indução de neurogênese através da ação dos ácidos graxos ômega-3.

ARTIGO

Regular Manuscript

OMEGA-3 FATTY ACIDS INDUCE NEUROGENESIS OF PREDOMINANTLY POMC-EXPRESSING CELLS IN THE HYPOTHALAMUS

¹Lucas F. R. Nascimento, ¹Gabriela F. P. Souza, ¹Joseane Morari, ²Guilherme O. Barbosa,
¹Carina Solon, ¹Rodrigo F. Moura, ¹Sheila C. Victório, ¹Letícia M. Ignácio-Souza, ¹Daniela
S. Razolli, ²Hernandes F. Carvalho, ¹Lício A. Velloso

¹Laboratory of Cell Signaling, ²Department of Cell Biology, University of Campinas,
Brazil

LAV is the corresponding author: Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas,
13084-761, Campinas SP, Brazil. Email: lavelloso.unicamp@gmail.com

Abstract

The apoptotic loss of hypothalamic neurons involved in the control of feeding and energy expenditure is believed to play an important role in the development and perpetuation of obesity. Recent studies have shown that similar to the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone of the dentate gyrus, the hypothalamus presents constitutive and stimulated neurogenesis, suggesting that obesity-associated hypothalamic dysfunction may be repaired. Here, we explored the hypothesis that ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) induce hypothalamic neurogenesis. Both in the diet and injected directly into the hypothalamus, PUFAs were capable of increasing hypothalamic neurogenesis to levels similar or superior to the effect of BDNF. These effects were accompanied by reduced body mass gain and increased spontaneous locomotor activity. Most of the neurogenic activity induced by PUFAs resulted in increased numbers of POMC but not of NPY neurons. Thus, we provide the first evidence for hypothalamic neurogenesis induced by diet components.

Introduction

The consumption of dietary fats is regarded as one of the most important epidemiological factors leading to the increased prevalence of obesity in the world (1; 2). Due to their energetic value, dietary fats have a direct impact on overall caloric consumption, which can, per se, favor increases in body mass. However, studies performed over the last ten years have unveiled additional mechanisms linking dietary fats to obesity. In rodents, long chain saturated fatty acids induce hypothalamic inflammation through the activation of TLR4 signaling and endoplasmic reticulum stress (3; 4). In the short-term, the hypothalamic neurons involved in the control of energy homeostasis are affected at the functional level and develop resistance to the adipostatic signals delivered by leptin and insulin (5; 6). However, over time, neurons may become permanently damaged and undergo apoptosis (7; 8).

Neuronal plasticity contributes to the cyclic renewal of hypothalamic neurons and is known to play an important role in the physiological regulation of whole-body energy homeostasis (9). A part of the renewal process that warrants the continuous turnover of hypothalamic cells depends on leptin and ciliary neurotrophic factor (CNTF), which induce the neurogenesis of the cells that express neurotransmitters involved in the control of feeding and thermogenesis, as well as proteins involved in the response to leptin (10; 11). However, recent studies have shown that the turnover of hypothalamic neurons is disrupted by the consumption of dietary fats (12; 13). In fact, the adult neural stem cells of the

mediobasal hypothalamus are damaged by the inflammatory signals induced by dietary fats, placing diet-induced hypothalamic inflammation in an upstream position related to hypothalamic neurogenesis defects in obesity (13).

The beneficial outcomes of the dietary consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have been known for many years (14). These outcomes have been shown at the epidemiological level, such as the cardiovascular protective effect of the Mediterranean diet and the consumption of fish oil by the Eskimos (14-16), and at the cellular and molecular level, including the regulation of lymphocyte function and the activation of anti-inflammatory mediator synthesis(17; 18). In a recent study, we showed that the dietary substitution of saturated fat by PUFAs reduce obesity-associated hypothalamic inflammation, resulting in increased responsiveness to leptin and body mass reduction (19). Here, we asked whether PUFAs induce hypothalamic neurogenesis. Our results show that when administered either via diet or injection directly into the hypothalamus, ω -3 PUFAs preferentially increase the hypothalamic neurogenesis of the POMC neurons.

Materials and Methods

Experimental Animals and Protocols. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee at the University of Campinas. Five-week-old male *Swiss albinus* mice were maintained in individual cages at 21 ± 2 °C, with a 12/12 h dark-light cycle and diet and water *ad libitum*.

The mice were submitted to five different experimental protocols. In protocol #1, the mice were fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks and then randomly divided into four groups fed either a HFD or a HFD with partial (10% or 20%) or total (30%) substitution of the predominantly saturated fat content with flaxseed oil containing approximately 45% C18:3 (ω -3) for another 8 weeks. In protocol #2, the mice were fed a HFD for 8 weeks and then randomly divided into four different groups that were fed for another 8 weeks on either a HFD, a HFD with a partial substitution of the fat content corresponding to replacing 20% of the predominantly saturated fat content with flaxseed oil containing approximately 45% C18:3 (ω -3), chow (NFD) or NFD with 2.3% (w/w) supplementation with flaxseed oil containing approximately 45% C18:3. During the final 10 days, the mice were treated with a solution containing 50 mg/kg of BrDU (#B5002, Sigma-Aldrich, Inc.) intraperitoneally (ip) twice a day. In protocol #3, the mice were fed a HFD for 8 weeks and then randomly divided into three different groups treated for ten days with a daily intracerebroventricular (icv) injection of either saline (2.0 μ l), BDNF (#B3795, Sigma-Aldrich, Inc.) (10 ng in 2.0 μ l), or DHA (#D2534, Sigma-Aldrich, Inc.) (10 ng in 2.0 μ l); additionally, the mice were treated with a solution containing 50 mg/kg of BrDU ip twice a day and were then transferred to NFD for another twenty days. In protocol #4, the mice were fed on a HFD for 8 weeks and thereafter randomly divided into three different groups that were treated ip for ten days with saline (100 μ l), DHA (1.0 mg/kg in 100 μ l) or a higher concentration of DHA (5.0 mg/kg in 100 μ l). In protocol #5, the mice were fed a HFD for 8 weeks

and then randomly divided into the following four groups: in two groups, the mice were transferred to a NFD with 2.3% (w/w) supplementation with flaxseed oil containing approximately 45% C18:3 and treated with either an anti-BDNF antibody (#sc546, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) [0.8 µg (in 100 µl, twice a week, ip] or a similar volume of a pre-immune serum (#R9133, Sigma-Aldrich, Inc.), and in the remaining two groups, the mice were transferred to a HFD with a partial substitution of the fat content with 20% flaxseed oil containing approximately 45% C18:3 and treated with either an anti-BDNF antibody [0.8 µg (in 100 µl, twice a week, ip] or a similar volume of a pre-immune serum.

Intracerebroventricular instrumentation. Several mice were stereotaxically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus to implant a cannula. The stereotaxic coordinates were as follows: anteroposterior, 0.34 mm; lateral, 1.0 mm; and depth, 2.2 mm to the lateral ventricle. The cannula efficiency was tested one week after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by the icv injection of 10^{-6} M angiotensin II (#A9525, Sigma-Aldrich, Inc.). The mice that scored positive in the angiotensin test were used in the studies.

Analysis of the fatty acid composition. The methyl esters of fatty acids were prepared as previously described (20) using a CGC Capillary Gas Chromatograph Agilent 6850 Series GC System equipped with a capillary column Agilent DB-23 (50% cyanopropyl- methylpolysiloxane) that was 60 m long with a 0.25 mm internal diameter and a 0.25 mm film. The analyses were performed at 110 °C (5 min) to 215 °C (24 min), with the detector temperature at 280 °C and the injector

temperature at 250 °C. Helium was used as a carrier gas. The split ratio was 1:50, and the injected volume was 1.0 µl. The qualitative composition was determined by comparison of the retention times of the peaks of the individual fatty acid standards.

Glucose tolerance test (GTT). After 6 h of fasting, the blood glucose was measured, and then a glucose solution (2.0 g/kg) was administered ip. The blood glucose was measured after 30, 60, 90 and 120 min.

Insulin tolerance test (ITT). After 6 h of fasting, the blood glucose was measured, after which an insulin solution (1 U/Kg) was administered ip. The blood glucose was measured after 5, 10, 15, 20 and 25 min.

Blood glucose and insulin. The blood glucose was measured using a glucometer from Abbott (Opptimum, Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA, USA). The insulin level was determined using ELISA kits (#EZRMI-13K, Millipore, Billerica, MA, USA).

Leptin Tolerance Test. After 12 h of fasting, 10^{-6} M of leptin (#429705, Calbiochem, Darmstadt, Germany) was administered intraperitoneally at 6 PM, and the spontaneous food intake was measured for 12 and 24 hours.

Determination of energy expenditure and spontaneous activity. The energy expenditure was calculated using oxygen consumption/carbon dioxide production and the respiratory quotient (RQ), which were measured over a 24 h period in fasting mice using a computer-controlled open circuit calorimeter system, the

LE405 Gas Analyzer (Panlab-Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The air flow within each chamber was monitored by an Air Supply and Switching sensor (Panlab-Harvard Apparatus). The gas sensors were calibrated prior to the onset of the experiments with primary gas standards containing known concentrations of O₂ and CO₂ (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). The data were obtained for 6 min for each chamber, and the mean for each 6 min of measurement was used for data analysis. The outdoor air reference values were sampled after every four measurements. The VO₂ and VCO₂ were calculated by Metabolism 2.2v software based on the Withers equation, and the RQ was calculated using VCO₂/VO₂. The spontaneous activity was registered by a sensor platform Physiocage (Panlab-Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) during the energy expenditure acquisition data.

Immunoblotting. The hypothalamus was homogenized using a tissue homogenizer (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) at maximum speed in an anti-protease cocktail (10 mmol/L imidazole, pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 1 mmol/L aprotinin, 2.5 mg/L leupeptin, 30 mg/L trypsin inhibitor, 200 µmol/L DTT and 200 µmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride). An aliquot of homogenate was collected, and the total protein content was determined by the dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Samples containing 75 µg of protein from each experimental group were incubated for 5 minutes at 95°C with 4x concentrated Laemmli sample buffer (1.0 mmol + sodium phosphate/L, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% SDS, 2% mercaptoethanol) and then

separated on 10% or 12% polyacrylamide gels for approximately 2 h. The electrotransfer of the proteins to the nitrocellulose membranes (Bio-Rad) was performed using a Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 20 min at 25 V (constant) in buffer containing methanol and SDS. After confirming the efficiency of the transfer by staining with Ponceau S, the membranes were blocked with 5% skimmed milk in TTBS (10 mmol Tris/L, 150 mmolNaCl/L, 0.5% Tween 20) overnight at 4°C. Doublecortin (#4604, Cell Signaling, Boston, MA, USA), Bax, Bcl-2, BDNF, GPR40 and β -actin (#sc493, #sc492, #sc546, #sc32905, #sc130656, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were detected in the membranes after overnight incubation at 4°C with the respective primary antibodies diluted 1:500 in TTBS containing 3% dry albumin. The membranes were then incubated with a secondary specific IgG antibody (diluted 1:5000 in TTBS 40 containing 1% dry skimmed milk) for 2 h at room temperature. Enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Pierce) after incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used for detection by autoradiography. The band intensities were quantified by optical densitometry (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

RNA extraction and Real Time PCR. The samples were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The total RNA content was then isolated according to the manufacturer's instructions, quantified and analyzed by spectrophotometry (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The integrity of the RNA was assessed by running a denaturing agarose gel. The cDNA

synthesis was performed in 3.0 µg of total RNA according the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA). The mRNA levels of BDNF and GPR40 were measured in the hypothalamus by Real Time PCR (ABI Prism 7500 detection system – Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). The intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems (Mn01334043_m1 and Mm00809442_s1, respectively). GAPDH (#4352339E, Applied Biosystems) was used as the endogenous control. Each PCR contained 40 ng of reverse-transcribed RNA, 25 µL of each specific primer, Taqman Universal master mix #4369016, and RNase free water to a 10 µL of final volume.

Histology and cell counting. The mice were perfused with 4% paraformaldehyde. The brains were immersed in 30% sucrose (w/v), embedded in OCT compound (Sakura Finetek, Torance, CA) and cut into 12-µm coronal sections using a cryostat. The sections were washed in PBS buffer and incubated with 2.0 N HCl for 10 min at 37 °C followed by 0.1 M of sodium borate for 10 min at room temperature. Thereafter, the sections were incubated with a 5% goat serum (#G9023, Sigma-Aldrich, Inc.) blocking solution in TPBS (0.2% of Triton X-100) for 30 min at 37 °C followed by an overnight incubation with 1:100 primary antibodies against BrDU, NPY, POMC (#sc32323, #sc28943, #sc20148 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), NeuN (#MAB377C3, Millipore, Temecula, CA, USA), and Nestin (#ab93666, AbCam, Cambridge, UK) diluted in the same blocking solution. Then, the sections were incubated with secondary antibodies conjugated to FITC

or rhodamine (#sc2777; #sc2092, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and covered and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). The images were acquired using a confocal laser microscope (LSM510, Zeiss, New York, NY), and 3 consecutive sections for every 3 animals were used for quantification. Positive stains were counted by a blinded observer and automatically using ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and produced equivalent results. Moreover, ImageJ was used to calculate the colocalization of the double stain using the JACoP plugin and the numbers determined by Manders' coefficient.

Statistical analysis. The results are presented as the means $\pm$ SE. After evaluating the distribution of all the data, the results were analyzed by t-test or by One-way ANOVA followed by Tukey test or Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak method to determine the significance of the individual differences. The level of significance was set at $p < 0.05$, and the data were analyzed using the Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc, Point Richmond, CA, USA).

Results

Dietary ω -3 PUFA reduces body mass and improves metabolic parameters. Swiss mice were fed a HFD for eight weeks and then randomly divided into four groups that were fed for another eight weeks on the same HFD or on HFD with partial (10% or 20%) or total substitution (30%) of the predominantly saturated fat content by flaxseed oil containing approximately 45% C18:3 (ω -3). The lipid

composition of the flaxseed oil was determined by gas chromatography (Fig. 1 and Table 1). The experimental protocol is depicted in Figure 2A. The ω -3 substitution resulted in reduced body mass gain (Fig. 2B), increased caloric intake (Fig. 2C), improved responsiveness to leptin (Fig. 2D), increased spontaneous activity (Fig. 2E), reduced levels of fasting blood glucose (Fig. 2F), reduced area under the curve during a GTT (Fig. 2G and 2H) and increased responsiveness to insulin during an ITT (Fig. 2I-2K).

Dietary ω -3 PUFA increases hypothalamic cell proliferation. In the preceding experiment, the substitution of dietary fat by 20% flaxseed oil presented the most consistent results regarding the improvement of metabolic parameters; therefore, we next evaluated the Swiss mice fed a HFD initially for eight weeks and then randomly divided the mice into four groups that were fed either chow (NFD), NFD supplemented with 2,3% flaxseed oil, HFD or HFD supplemented with 20% flaxseed oil for another eight weeks (Fig. 3A). The supplementation of flaxseed oil on the HFD resulted in the increased expression of hypothalamic doublecortin (Fig. 3B), reduced expression of hypothalamic BAX (Fig. 3C) and reduced BAX/Bcl2 ratio (Fig. 3D and 3E). Moreover, the flaxseed oil supplementation resulted in increased numbers of cells undergoing proliferation in mice fed on both the NFD and HFD (Fig. 3F-3G).

DHA icv increases hypothalamic neurogenesis. Obese Swiss mice were treated icv with either DHA or BDNF for ten days, and neurogenesis was determined (Fig. 4A). Both BDNF and DHA induced neurogenesis in the hypothalamus (Fig. 4B-4C).

Interestingly, DHA exerted an apparently more potent neurogenic effect than BDNF, although this difference was not significant (Fig. 4B-4C). Another interesting feature of the treatment with DHA was the presence of BrDU-positive cells originating from the lateral wall of the third ventricle (Fig 4D); this effect was virtually absent in the mice treated with BDNF. The origin of DHA-stimulated new cells from the lateral wall of the third ventricle was strongly evident when staining for nestin (Fig. 5).

DHA icv increases neurogenesis of POMC but not NPY neurons. Using the same experimental approach as described in Figure 4, we evaluated the co-expression of BrDU with POMC or NPY neurons. As depicted in Figures 6A-6D, DHA induced a significant increase in POMC neurogenesis but not in NPY neurogenesis. This effect was accompanied by the increased spontaneous activity of the mice (Fig. 6E and 6F).

DHA induces the increased expression of GPR40 in the hypothalamus. GPR40 is a well-known receptor for PUFAs that has been implicated in adult neurogenesis in brain regions other than the hypothalamus. We tested whether the increased dietary content of ω -3 PUFA resulted in the increased expression of GPR40. To this end, we evaluated the hypothalami of mice fed according to the same protocol as shown in Figure 3A. As depicted in Figures 7A and 7B, the increased dietary content of fat, irrespective of type, induced the expression of both BDNF and GPR40. No difference in the expressions was observed of either protein when comparing mice fed on the HFD with mice fed on the HFD supplemented by 20%

with flaxseed oil. To evaluate whether the effect of the dietary fats was partially due to ω -3 PUFA, we treated obese mice with DHA injected intraperitoneally for 10 days. As depicted in Figures 7C and 7D, systemic DHA did not induce an increased expression of BDNF but increased the hypothalamic expression of GPR40. The effect of DHA was accompanied by an increase in spontaneous activity (Fig. 7E and 7F).

The inhibition of BDNF does not modify the effect of dietary ω -3 PUFA to increase hypothalamic neurogenesis. To evaluate the role of BDNF as a candidate mediator of the effects of ω -3 PUFA to increase hypothalamic neurogenesis, obese mice were fed for eight weeks on a NFD or HFD with 20% flaxseed oil and treated (for 8 weeks) with pre-immune serum or with anti-BDNF antiserum (Fig. 8A). As depicted in Figure 8B, the use of the anti-BDNF antiserum resulted in a maximum reduction of 40% of hypothalamic BDNF expression. However, the inhibition of BDNF resulted in no change in hypothalamic neurogenesis (Fig. 8C and 8D) as well as no modification of spontaneous activity (Fig. 8E and 8F).

Discussion

One of the most important problems during the treatment of obesity is the high rate of recurrence that follows an initial period of body mass reduction (21-23). Even patients who undergo bariatric surgery experience body mass regain after some time (24). During the development of obesity, a continuous and progressive resetting of the hypothalamic adipostat is thought to exist, which is partially due to

the development of hypothalamic resistance to leptin and insulin (25; 26). At first, adipostatic hormone resistance was regarded as a molecular phenomenon; however, recent studies have shown that hypothalamic neurons may undergo apoptosis during diet-induced obesity (7; 8), which provides a cellular basis for the loss of the coordinated control of caloric intake and energy expenditure.

Apparently, hypothalamic neurons involved in the control of body mass are differentially affected by obesity. In at least three studies, preferential reductions of POMC compared to NPY/AgRP neurons occurred in the hypothalamus of mice with hypothalamic inflammation triggered by increased fat intake or induced by genetic approaches (7; 8; 13). Thus, the relative numbers of POMC neurons in the medium-basal hypothalamus appear to play an important role in the control of body adiposity. Accordingly, a recent study provided a major advance in the field using a reversible rodent model of obesity in which POMC expression was blocked in neurons of the hypothalamus. POMC reactivation during early obesity caused a complete reversal of the phenotype; however, late reactivation was insufficient to promote the normalization of the body weight (27).

If the high rate of recurrence associated with obesity is partially a result of the loss of certain hypothalamic neuronal populations, a definitive therapeutic solution for obesity may only be achieved by the restoration of the correct neural circuitries. In this context, stimulating the neurogenesis of hypothalamic neurons emerges as a potential mechanism to be explored for the development of more efficient approaches to treat obesity.

BDNF was the first factor shown to promote neurogenesis of hypothalamic neurons (28); however, hypothalamic neurogenesis associated with changes in whole body energy homeostasis was first demonstrated in response to CNTF (10). The study was designed to investigate the mechanisms behind the clinical and experimental evidence for sustained body mass reduction following the transient use of CNTF or its analog, Axokine(29; 30). CNTF promotes the neurogenesis of leptin-responsive neurons in the hypothalamus, and the sustained action of CNTF, which can last for weeks after the interruption of its use, was proposed to be due to the rewiring of the hypothalamic circuitries involved in whole body energy homeostasis (10). In addition to BDNF and CNTF, other biological factors and drugs induce adult hypothalamic neurogenesis, such as estrogens (31), IGF-1 (32), ethanol (33), nicotine (34) and fluoxetine (35).

In addition to neurogenesis induced by different types of stimuli, the hypothalamus also presents constitutive neurogenesis (36) similar to the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone of the dentate gyrus (37; 38), which places this region among the few anatomical sites capable of continuously producing new neurons during adult life (38). Two recent studies have shown that tanycytes of the median eminence are the source of at least some of the newborn hypothalamic cells, and, interestingly, these cells are responsive to dietary factors (39; 40).

An important aspect of diet-induced hypothalamic neurogenesis involves the simultaneous induction of the apoptosis of neurons and neurogenesis in animals

fed a HFD (7; 12; 13); however, in opposition to an apparently beneficial compensation for apoptotic loss, the neurogenesis induced by a HFD results in increased production of NPY/AgRP neurons (12); therefore, widening the imbalance between orexigenic and anorexigenic neuronal populations. A recent study has probed this issue by showing that the defect in neurogenesis associated with the consumption of a HFD is due to the activation of inflammation, specifically through IKK (13).

In the present study, we evaluated whether ω -3-PUFAs are capable of inducing hypothalamic neurogenesis. Recent studies have unveiled new anti-inflammatory mechanisms linked to the beneficial effects of PUFAs in metabolic conditions (41; 42). Defective neurogenesis generated by a HFD is due to the activation of hypothalamic inflammation (13); therefore, we reasoned that the anti-inflammatory properties of PUFAs correct the defect. In fact, in a recent study we showed that PUFAs in the diet and injected directly in the hypothalamus reduce HFD-induced inflammation, resulting in body mass reduction (19).

In the first part of the study, we show that when present in the diet and acting directly in the hypothalamus, ω -3-PUFAs increase neurogenesis in the hypothalamus. This effect is accompanied by the reduction of apoptosis markers, increased responsiveness to leptin and reduced body mass gain as previously reported (19). A moderate increase in caloric intake and a remarkable increase in spontaneous activity occurred, which may explain the body mass reduction.

When injected directly into the hypothalamus, DHA is capable of inducing neurogenesis at a magnitude higher than the level induced by BDNF, which is an important outcome considering the fact that, in parallel with CNTF, BDNF is one of the most potent inducers of neurogenesis in the brain, and, particularly in the hypothalamus (43; 44). Interestingly, DHA produced a neurogenic response in the hypothalamus that affected the numbers and also the distribution and subtypes of cells differently than BDNF. In contrast to previous reports concerning the neurogenesis induced by HFD, which induces the generation of newborn cells particularly from the tanycytes of the median eminence (39), DHA but not BDNF induced the generation of new cells from the wall of the third ventricle. Additionally, unlike BDNF and, to our knowledge, all previously reported factors capable of inducing neurogenesis in the hypothalamus (10; 12; 13; 31-35), DHA induced the preferential neurogenesis of POMC neurons.

Due to the well-known role of BDNF as an endogenous inducer of neurogenesis and because dietary PUFAs were capable of increasing BDNF, we hypothesized that BDNF is the mediator of the neurogenic activity of PUFAs. To test this hypothesis, we immunoneutralized hypothalamic BDNF. Although we obtained an up to 30% reduction of BDNF, this effect was insufficient to change the outcome of dietary PUFAs to promote neurogenesis.

In conclusion, dietary PUFAs are capable of inducing hypothalamic neurogenesis. Importantly, the effect appears to be directed towards the POMC neuronal population, providing a dietary approach to potentially correct the imbalance in

hypothalamic neuronal subpopulations, which is a hallmark of experimental obesity.

Acknowledgements. We thank Erika Roman, Gerson Ferraz and Marcio Cruz, from the University of Campinas, for technical assistance. The support for the study was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The laboratory of Cell Signaling belongs to the Obesity and Comorbidities Research Center and National Institute of Science and Technology – Diabetes and Obesity.

References

1. Moussavi N, Gavino V, Receveur O: Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:7-15
2. Goris AH, Westerterp KR: Physical activity, fat intake and body fat. *Physiol Behav* 2008;94:164-168
3. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D: Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008;135:61-73
4. 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: Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009;29:359-370
5. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA: Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192-4199
6. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS: Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000;105:1827-1832

7. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA: High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 2009;4:e5045
8. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschop MH, Schwartz MW: Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012;122:153-162
9. Dietrich MO, Horvath TL: Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci* 2009;30:1688-1696
10. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS: Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 2005;310:679-683
11. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL: Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 2004;304:110-115
12. McNay DE, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS: Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 2012;122:142-152
13. Li J, Tang Y, Cai D: IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* 2012;14:999-1012

14. Knuops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA: Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 2004;292:1433-1439
15. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, Ruiz-Gutierrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pinto X, Basora J, Munoz MA, Sorli JV, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA: Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-1290
16. Bjerregaard P, Mulvad G, Pedersen HS: Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland. *Int J Epidemiol* 1997;26:1182-1190
17. Fischer S, Weber PC: Prostaglandin I₃ is formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature* 1984;307:165-168
18. Fowler KH, Chapkin RS, McMurray DN: Effects of purified dietary n-3 ethyl esters on murine T lymphocyte function. *J Immunol* 1993;151:5186-5197
19. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA: Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* 2012;7:e30571
20. Hartman L, Lago RC: Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 1973;22:475-476 passim
21. Haber S: Effective treatment of obesity produces remission, not cure. *Int J Obes* 1980;4:265-267

22. Goodrick GK, Foreyt JP: Why treatments for obesity don't last. *J Am Diet Assoc* 1991;91:1243-1247
23. Kraschnewski JL, Boan J, Esposito J, Sherwood NE, Lehman EB, Kephart DK, Sciamanna CN: Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:1644-1654
24. Kalarchian MA, Marcus MD, Courcoulas AP, Cheng Y, Levine MD, Josbeno D: Optimizing long-term weight control after bariatric surgery: a pilot study. *Surg Obes Relat Dis* 2012;8:710-715
25. Munzberg H, Myers MG, Jr.: Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005;8:566-570
26. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289-295
27. Bumashny VF, Yamashita M, Casas-Cordero R, Otero-Corchon V, de Souza FS, Rubinstein M, Low MJ: Obesity-programmed mice are rescued by early genetic intervention. *J Clin Invest* 2012;122:4203-4212
28. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB: Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 2001;21:6706-6717
29. Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB, Bray GA, Roberts WG, Heyman ER, Stambler N, Heshka S, Vicary C, Guler HP:

Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* 2003;289:1826-1832

30. Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ: Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4652-4657

31. Fowler CD, Liu Y, Wang Z: Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev* 2008;57:342-351

32. Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Lopez-Avalos MD, Gomez-Pinedo U, Garcia-Verdugo JM, Fernandez-Llebrez P: IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci* 2010;31:1533-1548

33. Chang GQ, Karatayev O, Liang SC, Barson JR, Leibowitz SF: Prenatal ethanol exposure stimulates neurogenesis in hypothalamic and limbic peptide systems: possible mechanism for offspring ethanol overconsumption. *Neuroscience* 2012;222:417-428

34. Chang GQ, Karatayev O, Leibowitz SF: Prenatal exposure to nicotine stimulates neurogenesis of orexigenic peptide-expressing neurons in hypothalamus and amygdala. *J Neurosci* 2013;33:13600-13611

35. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R: Neurogenesis-dependent and -independent

effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 2009;62:479-493

36. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS: Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol* 2007;505:209-220

37. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD: Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005;75:321-341

38. Ming GL, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:223-250

39. Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S: Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 2012;15:700-702

40. Haan N, Goodman T, Najdi-Samiei A, Stratford CM, Rice R, El Agha E, Bellusci S, Hajihosseini MK: Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci* 2013;33:6170-6180

41. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM: GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010;142:687-698

42. Li P, Spann NJ, Kaikkonen MU, Lu M, Oh da Y, Fox JN, Bandyopadhyay G, Talukdar S, Xu J, Lagakos WS, Patsouris D, Armando A, Quehenberger O, Dennis

EA, Watkins SM, Auwerx J, Glass CK, Olefsky JM: NCoR repression of LXRs restricts macrophage biosynthesis of insulin-sensitizing omega 3 fatty acids. *Cell* 2013;155:200-214

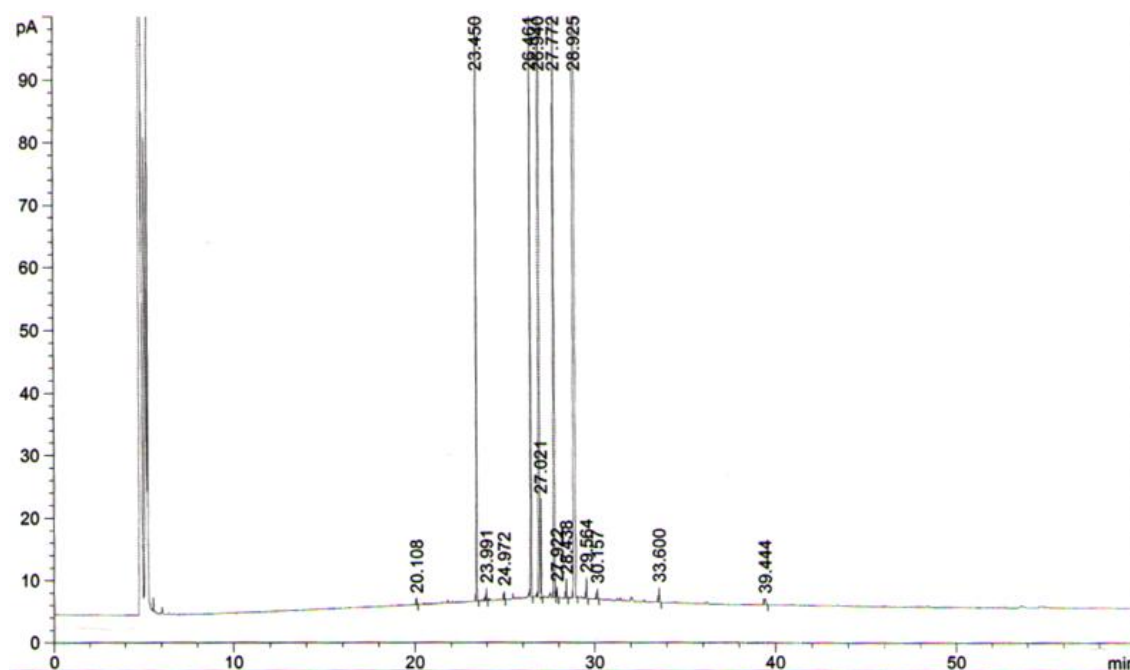
43. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C: The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R1053-1069

44. Sousa-Ferreira L, Almeida LP, Cavadas C: Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2013

Table and figures

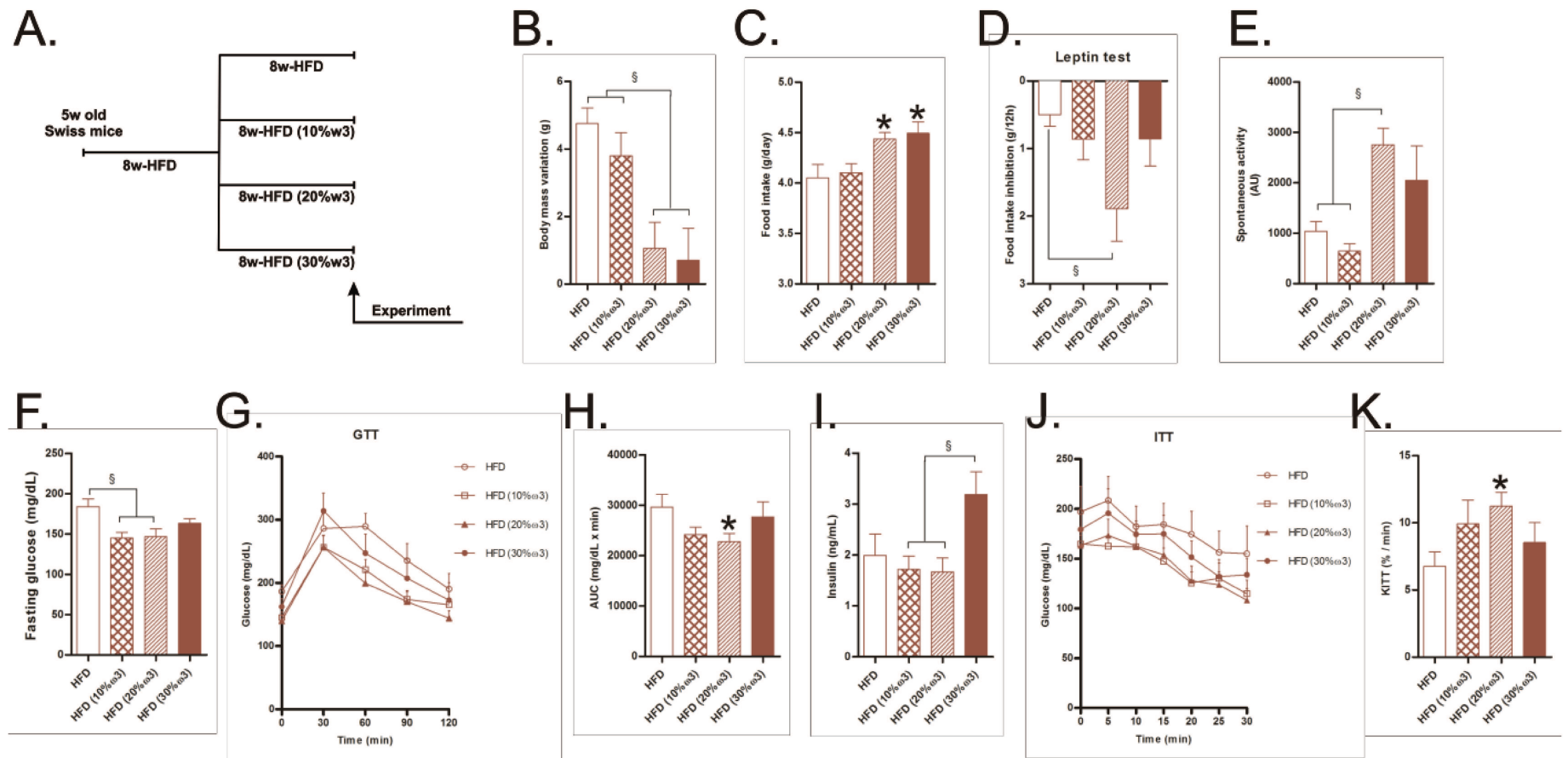
Table 1. Fatty acid composition of the flaxseed oil as analyzed by gas chromatography.

<i>Fatty acid</i>	<i>%</i>
<i>C 14:0</i>	<i>0.05</i>
<i>C 16:0</i>	<i>6.34</i>
<i>C 16:1</i>	<i>0.10</i>
<i>C 17:0</i>	<i>0.07</i>
<i>C 18:0</i>	<i>6.66</i>
<i>C 18:1 (ω-9)</i>	<i>24.05</i>
<i>C 18:2 (ω-6)</i>	<i>15.36</i>
<i>C 18:3 (ω-3)</i>	<i>46.64</i>
<i>C 20:0</i>	<i>0.21</i>
<i>C 20:1</i>	<i>0.11</i>
<i>C 22:0</i>	<i>0.21</i>
<i>C 24:0</i>	<i>0.13</i>



Nascimento *et al.*, Fig 1

Figure 1. The lipid composition of flaxseed oil. A sample of flaxseed oil used to prepare the diets was analyzed by gas chromatography. The details of the composition are presented in Table 1. The figure depicts a representative spectrum obtained from three distinct determinations.



Nascimento *et al.*, Fig 2

Figure 2. The metabolic outcomes of increased consumption of dietary PUFAs. Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in A. Body mass variation (B) and mean daily food intake (C) were determined throughout the study. At the end of the experimental period, the mice were submitted to a leptin tolerance test (D); the evaluation of spontaneous activity (E); the measurement of fasting blood glucose levels (F); the glucose tolerance test (G, mean values; H, area under the curve); the measurement of fasting blood insulin levels (I); and the insulin tolerance test (J, mean values for blood glucose; K, constant for glucose decay). In all experiments, N = 6; *p<0.05 vs. HFD; §p<0.05 vs. conditions as depicted in the panels. GTT, glucose tolerance test; HFD, high-fat diet; ITT, insulin tolerance test; kITT, constant for glucose decay during the insulin tolerance test.

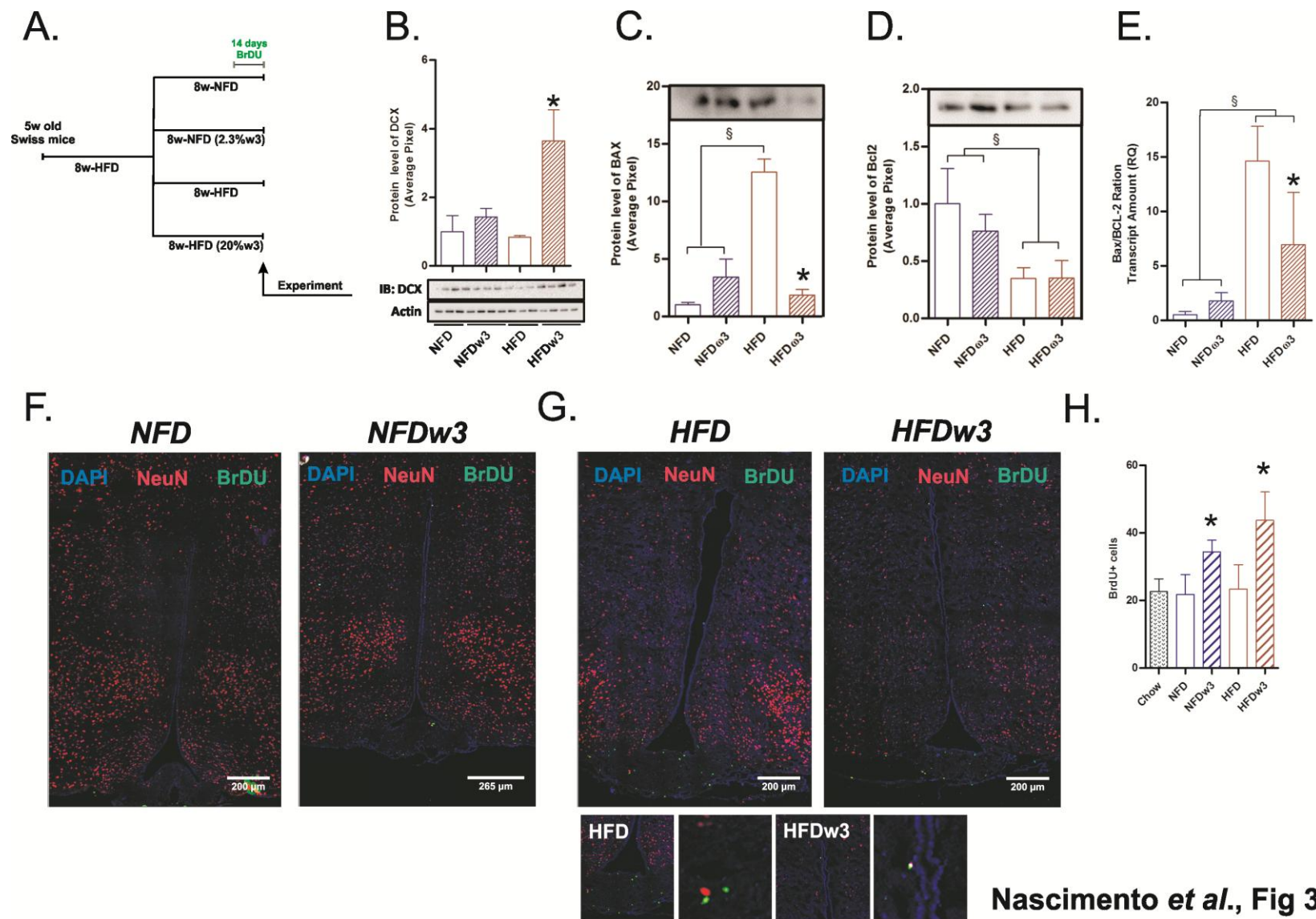
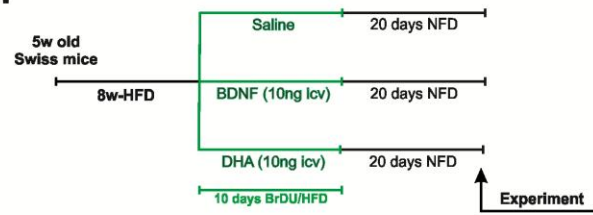
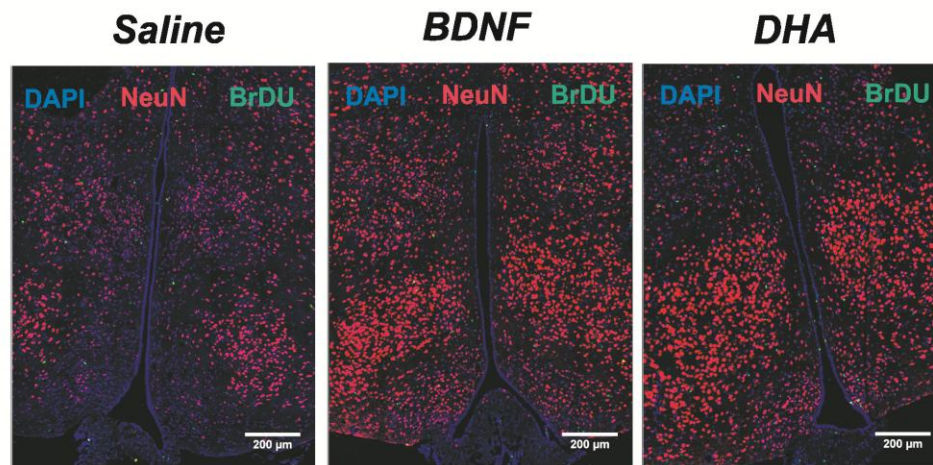


Figure 3. Dietary PUFAs induce hypothalamic cell proliferation. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in A. At the end of the experimental period, hypothalamic samples were utilized to determine the protein expressions of doublecortin (B), Bax (C) and Bcl-2 (D) by immunoblotting. The quantitative results obtained in C and D were employed to determine the Bax/Bcl-2 ratio (E). Panels F and G depict representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of Neu-N and BrDU colocalization studies in the hypothalamus. Panel H depicts the quantitative evaluation of Neu-N and BrDU double-positive cells in the hypothalamus. In all experiments, n = 6. * $p < 0.05$ vs. respective control on non-substituted diet; § $p < 0.05$ vs. conditions as depicted in the panels. BrDU, bromodeoxyuridine; DCX, doublecortin; HFD, high-fat diet; NFD, chow.

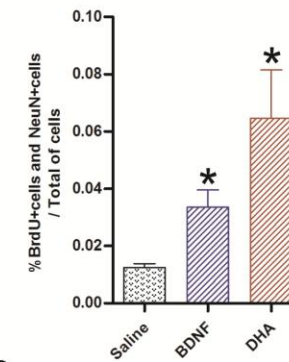
A.



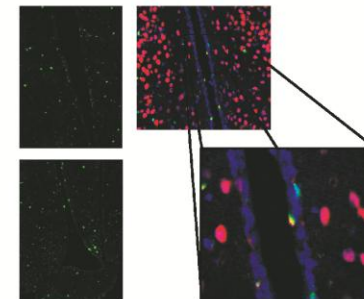
B.



C.

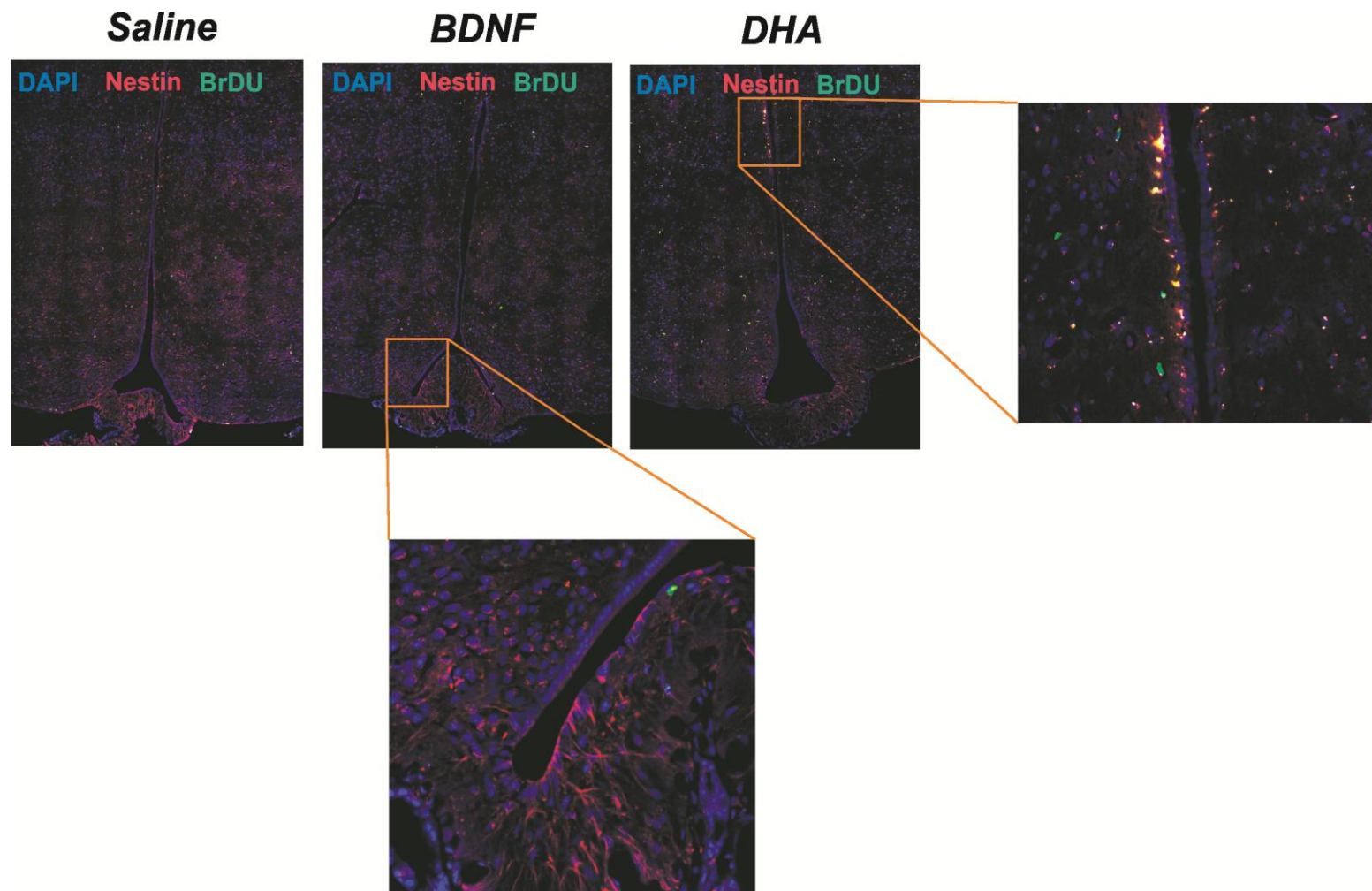


D.



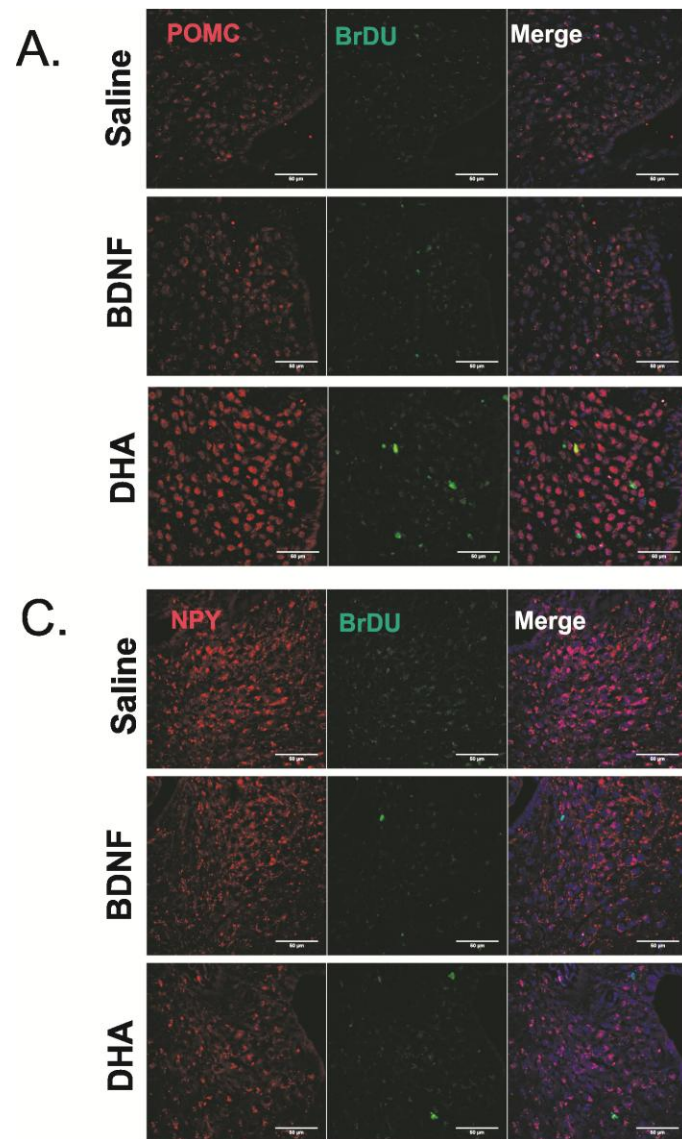
Nascimento *et al.*, Fig 4

Figure 4. Intracerebroventricular docosahexaenoic acid induces hypothalamic neurogenesis. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches depicted in A. Panel B depicts representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of Neu-N and BrDU colocalization studies in the hypothalamus. Panel C depicts the quantitative evaluation of Neu-N and BrDU double-positive cells in the hypothalamus. Panel D depicts a detailed view of Neu-N and BrDU double-positive cells in the wall of the third ventricle of the hypothalamus. In all experiments, n = 6. *p<0.05 vs. saline. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrDU, bromodeoxyuridine; DHA, docosahexaenoic; HFD, high-fat diet; NFD, chow.

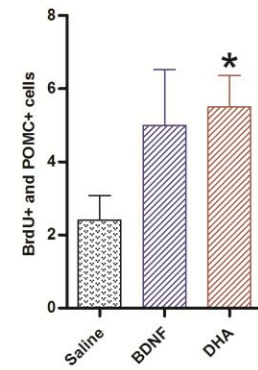


Nascimento *et al.*, Fig 5

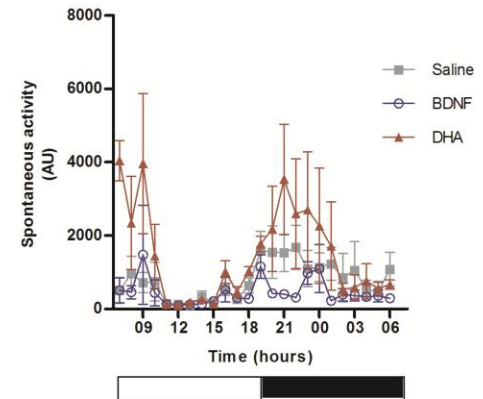
Figure 5. Intracerebroventricular docosahexaenoic acid notably induces neurogenesis in the wall of the third ventricle. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in Figure 4A. Panel A depicts representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of nestin and BrDU colocalization studies in the hypothalamus. Panel B depicts a detailed view of nestin and BrDU double-positive cells in the wall of the third ventricle of the hypothalamus. In all experiments, n = 6. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrDU, bromodeoxyuridine; DHA, docosahexaenoic; Nest, nestin.



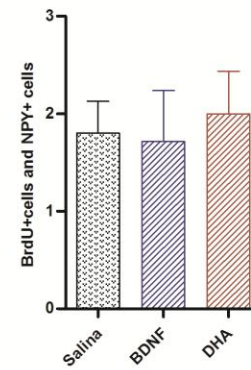
B.



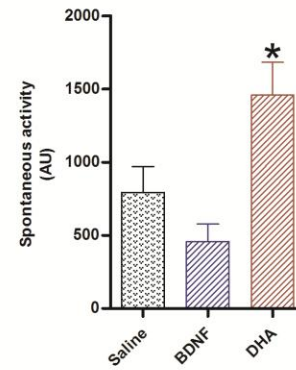
E.



D.

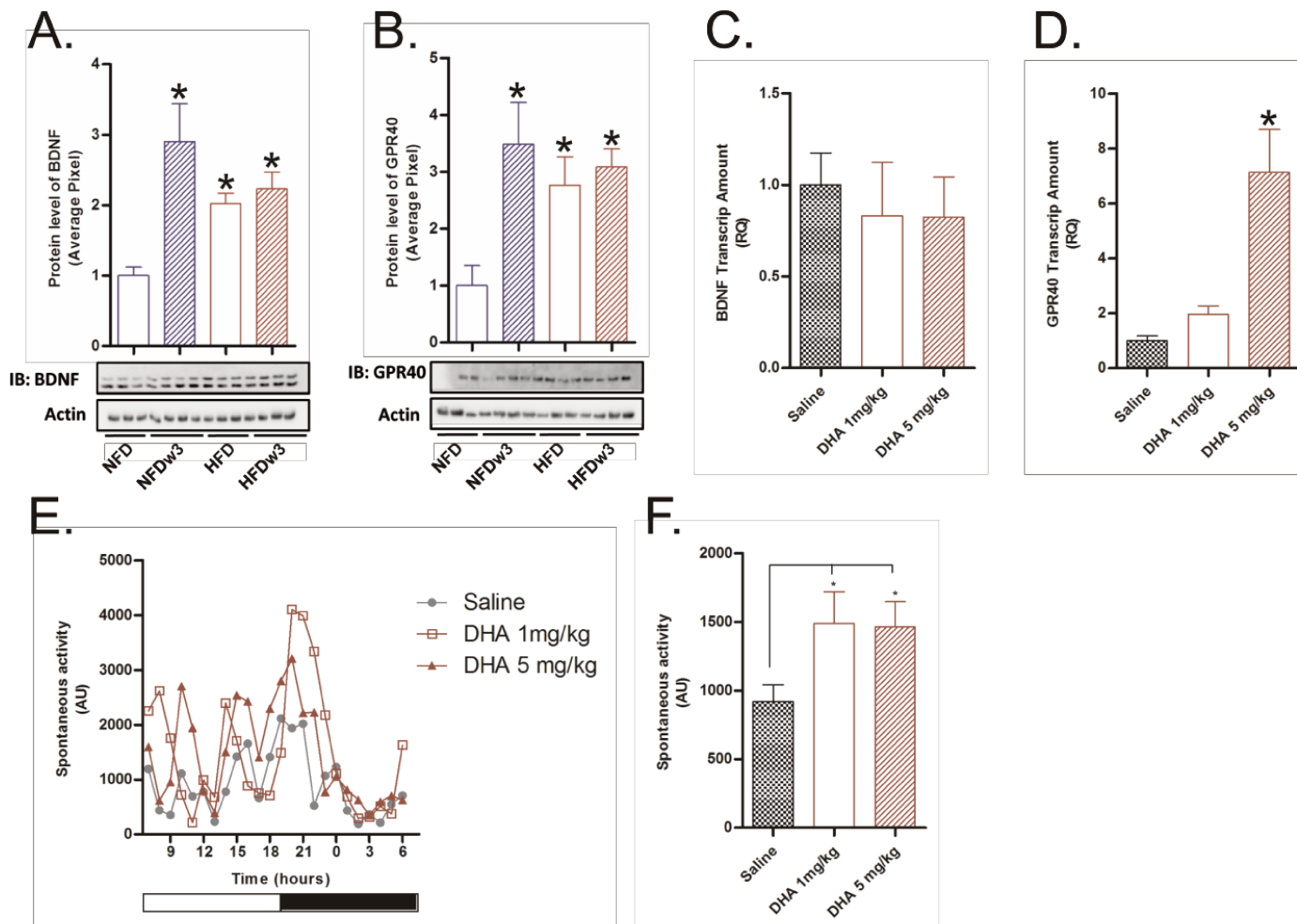


F.



Nascimento *et al.*, Fig 6

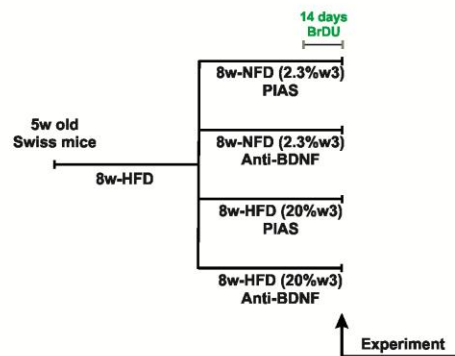
Figure 6. Intracerebroventricular docosahexaenoic acid induces preferential neurogenesis of the POMC neurons. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in Figure 4A. Panel A depicts representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of POMC and BrDU colocalization studies in the arcuate nucleus of hypothalamus. Panel B depicts the quantitative evaluation of POMC and BrDU double-positive cells in the hypothalamus. Panel C depicts representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of the NPY and BrDU colocalization studies in the hypothalamus. Panel D depicts the quantitative evaluation of NPY and BrDU double-positive cells in the hypothalamus. Panels E and F depict the measurements of spontaneous activity of mice. In E, the actual recordings of activity per hour are shown, and in F, the total activity during the 24 h recordings is depicted. In all experiments, $n = 6$. * $p < 0.05$ vs. saline. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrDU, bromodeoxyuridine; DHA, docosahexaenoic; NPY, neuropeptide Y; POMC, proopiomelanocortin.



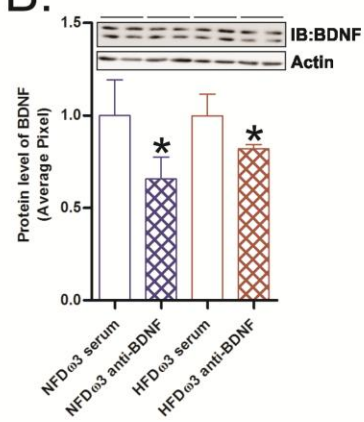
Nascimento *et al.*, Fig 7

Figure 7. Dietary PUFAs increase hypothalamic BDNF and GPR40. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in Figure 3A, except that no BrDU was administered. At the end of the experimental period, hypothalamus samples were obtained and used in immunoblotting experiments to determine the expression of BDNF (A) and GPR40 (B). In another set of experiments, the obese Swiss mice (fed for 8 w on high-fat diet) were treated for 10 days with intraperitoneal injections of DHA according to the doses depicted in the figure. At the end of the experimental period, the hypothalamus was obtained to measure the transcript expression of BDNF (C) and GPR40 (D). In addition, the spontaneous activities of the mice were recorded (E and F). In E, the actual recordings of activity per hour are shown, and in F, the total activity during the 24 h recordings is depicted. In all experiments n = 6. In A and B, *p<0.05 vs. NFD. In D and F, *p<0.05 vs. saline. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DHA, docosahexaenoic.

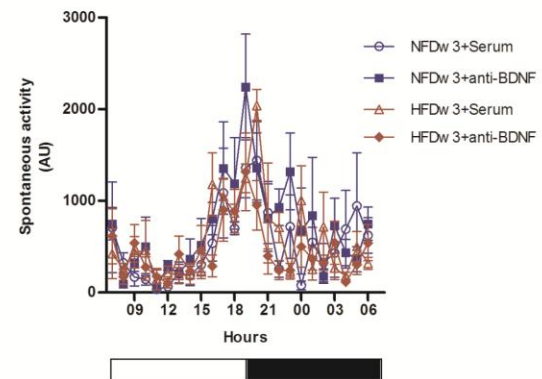
A.



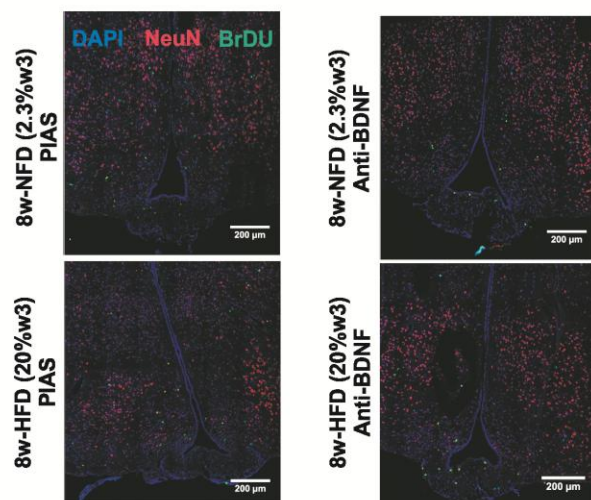
B.



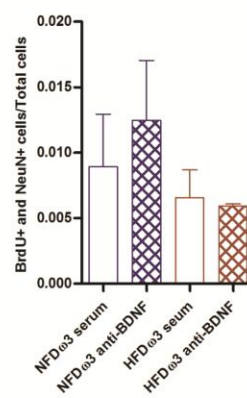
E.



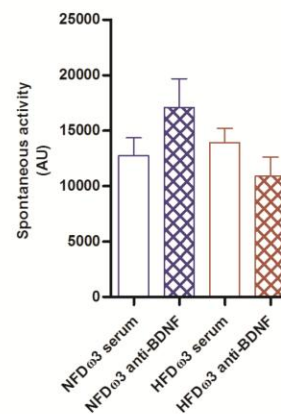
C.



D.



F.



Nascimento *et al.*, Fig 8

Figure 8. The inhibition of BDNF does not modify hypothalamic neurogenesis induced by dietary PUFAs. The Swiss mice were submitted to one of the dietary approaches as depicted in A. At the end of the experimental period, the samples of the hypothalamus were obtained and used in immunoblot experiments to determine the expression of BDNF (B). Panel C depicts representative images obtained from the immunofluorescence evaluation of Neu-N and BrDU colocalization studies in the hypothalamus. Panel D depicts the quantitative evaluation of Neu-N and BrDU double-positive cells in the hypothalamus. Panels E and F depict the measurements of spontaneous activity of mice. In E, the actual recordings of activity per hour are shown, and in F, the total activity during the 24 h recordings is depicted. In all experiments, $n = 6$. $*p < 0.05$ vs. respective control without PUFAs substitution. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrDU, bromodeoxyuridine; NFD, chow.

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais e protocolos

Camundongos *Swiss albinus* com 5 semanas de vida foram mantidos em caixas individuais à 21 ± 2 °C, com ciclo de claro-escuro 12/12h e receberam água e alimento *ad libitum*. Em todos os experimentos, os animais foram previamente alimentados com uma dieta rica em gordura saturada (HFD, contendo 31% - g/g - de banha de porco) por oito semanas. Em seguida, os camundongos foram divididos e submetidos a novas dietas por mais oito semanas compondo os seguintes grupos:

Protocolo # 1

1. mantidos em HFD;
2. transferidos para uma dieta (HFD 10% ω 3) onde a banha de porco foi parcialmente (10% g/g) substituída por óleo de linhaça contendo aproximadamente 46% de ácido linolênico;
3. transferidos para uma dieta (HFD 20% ω 3) onde a banha de porco foi parcialmente (20% g/g) substituída por óleo de linhaça;
4. transferidos para uma dieta (HFD 30% ω 3) onde a banha de porco foi completamente substituída pelo óleo de linhaça.

Procolo # 2

1. transferidos para uma dieta normolipídica (NFD), sem gordura saturada, contendo 4% de óleo de soja;
2. transferidos para uma dieta normolipídica (NFD ω 3), onde o óleo de soja foi parcialmente (2,3% g/g) substituído por óleo de linhaça contendo aproximadamente 46% de ácido linolênico;
3. mantidos em HFD;
4. transferidos para a dieta HFD (20% ω 3).

Durante as duas últimas semanas de suplementação, os animais receberam uma solução (50 mg/Kg) de BrdU (#B5002, Sigma-Aldrich, Inc.) administrada via intraperitoneal 2 vezes ao dia.

Protocolo # 3

Os animais foram submetidos à cirurgia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral direito com o auxílio de um estereotáxico Stoelting. As coordenadas foram: anteroposterior, 0.34 mm; lateral, 1.0 mm; e profundidade, 2.2mm. A eficiência da cânula, foi testada uma semana após a cirurgia através da resposta de sede dos animais, avaliada pela ingestão hídrica, após injeção intracerebroventricular de 10^{-6} M de angiotensina II (#A9525, Sigma-Aldrich, Inc.) diluída em 2 μ L de solução salina. Em seguida, os animais foram divididos em três grupos:

1. tratados com injeção ICV de 10 ng em 2 μ L de DHA (#D2534, Sigma-Aldrich, Inc.) por 10 dias;
2. tratados com injeção ICV de 10 ng em 2 μ L de BDNF (#B3795, Sigma-Aldrich, Inc.) por 10 dias;

3. tratados com 2 μ L de salina por 10 dias.

Ao mesmo tempo, os animais receberam uma solução (50 mg/Kg) de BrdU (#B5002, Sigma-Aldrich, Inc.) administrada via intraperitoneal 2 vezes ao dia. O BDNF foi usado como controle positivo, uma vez que seu efeito sobre a neurogênese hipotalâmica já havia sido previamente descrito por Pencea *et al.* (2001). Nós adotamos um protocolo similar ao usado pelos autores e, após o tratamento, os animais foram alimentados com ração e mantidos nessa condição por mais 20 dias.

Protocolo # 4

Os animais foram divididos em três grupos e tratados via intraperitoneal por dez dias com salina (100 μ L), DHA (1,0 mg/kg em 100 μ L), ou DHA (5,0 mg/Kg em 100 μ L). Durante o tratamento, os animais foram mantidos em HFD e, em seguida, foram alimentados com ração por mais 30 dias.

Protocolo # 5

1. Transferidos para NFD ω 3 e tratados com 100 μ L de solução contendo soro não imunizado (#R9133, Sigma-Aldrich, Inc.) ou 100 μ L de solução contendo 0,8 μ g de anticorpo anti-BDNF (#sc546, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) administradas via intraperitoneal duas vezes na semana por oito semanas;
2. transferidos para HFD ω 3 e tratados com 100 μ L de solução contendo soro não imunizado (# R9133, Sigma-Aldrich, Inc.) ou 100 μ L de solução contendo 0,8 μ g de anticorpo anti-BDNF (#sc546, Santa Cruz

Biotechnology, CA, USA) administradas via intraperitoneal duas vezes na semana por oito semanas.

Durante as duas últimas semanas de suplementação, os animais receberam uma solução (50 mg/Kg) de BrdU (#B5002, Sigma-Aldrich, Inc.) administrada via intraperitoneal 2 vezes ao dia.

Análise da composição de ácidos graxos

Foi empregado o método AOCS (2009). Os ésteres de metal dos ácidos graxos foram preparados de acordo com Hartman & Lago (1973) usando um cromatógrafo de gás capilar CGC Agilent 6850 Series GC System equipado com uma coluna capilar Agilent DB-23 (50% cyanopropil- metilpolisiloxano), com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura. As análises foram feitas entre 110 °C (5min) e 215 °C (24 min), com o detector de temperatura à 280 °C e a temperatura de injeção à 250 °C. Gás hélio foi usado como carreador. A proporção de divisão foi de 1:50 e o volume injetado 1,0 µL. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos dos respectivos padrões de ácidos graxos.

Glicemia plasmática e medidas hormonais

Teste de tolerância à glicose (GTT) – Após 6 horas de jejum, a glicose plasmática foi medida e uma solução de glicose (2.0 g/kg) foi administrada via intraperitoneal. A glicose foi novamente medida após 30, 60, 90 e 120 min

Teste de tolerância à insulina (ITT) – Após 6 horas de jejum, a glicose plasmática foi medida em seguida uma solução de insulina 1U/Kg) foi administrada via intraperitoneal. A glicose foi novamente medida após 5, 10, 15, 20 e 25 min.

Para medir a glicose foi usado glicosímetro Abbott (Opptimum, Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA, USA). Os níveis de Insulina and de leptina foram determinados através de kits para ELISA (#EZRMI-13K and #EZML-82K, Millipore, Billerica, MA, USA).

Teste de tolerância à leptina

Após 12 horas de jejum, foi administrado via intraperitoneal uma solução 10^{-6} M de leptina (#429705, Calbiochem, Darmstadt, Germany) às 18h e a ingestão alimentar espontânea foi medida após 12 e 24 horas.

Determinação de gasto energetic e atividade espontânea

O gasto energetic foi calculado através do consumo de oxigênio/produção de CO₂ e quociente respiratório (QR). As medidas foram feitas durante 24 horas sem acesso a alimento, usando um sistema de calorimetria-aberta acoplado a um computador LE405 Gas Analyzer (Panlab-Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). O fluxo de ar para cada camera foi monitorado por um sensor Air Supply and Switching (Panlab-Harvard Apparatus). Os sensors de gases foram calibrados previamente usando cilindros com valores conhecidos de O₂ e CO₂ (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). Os dados foram coletados por 6 minutos para câmara e a média para cada 6 minutos de medidas foi usada para

análise. O ar da sala foi usado como referência sempre após coleta dos dados nas câmaras. Amostras do ar passaram sequencialmente através dos sensores de O₂ e de CO₂ para determinação do conteúdo de O₂ e CO₂ nas câmaras. Os dados foram usados para cálculo do consumo de oxigênio (VO₂) e da produção de dióxido de carbono (VCO₂), usados para estimar o gasto energético. O VO₂ e o VCO₂ foram calculados pelo software Metabolism 2.2v baseados na equação de Withers e o QR foi calculado usando a razão VCO₂/VO₂. A atividade espontânea dos animais foi acompanhada durante as medidas de gasto energético e os registros feitos através da plataforma Physiocage (Panlab-Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), sensível aos movimentos dos animais.

Imunoblotting

A porção do cérebro referente ao hipotálamo foi homogeneizada um coquetel anti-protease (10 mmol/L imidazol, pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 1 mmol/L, aprotinina, 2.5 mg/L leupeptina, 30 mg/L inibidor de tripsina, 200 µmol/L DTT e 200 µmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil PMSF) usando um homogeneizador Polytron-Aggregate (Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland). Uma alíquota do tecido homogeneizado foi coletada e o total de proteína determinado através de kit de reação colorimétrica pra dosagem de proteína (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As amostras contendo 75 µg de protein foram incubadas por cinco minutos à 95°C com tampão Laemmli concentrado em 4 vezes (1mmol + fosfato de sódio/L, pH 7.8, 0.1% azul de bromofenol, 50% glicerol, 10% SDS, 2% mercaptoetanol) e então separadas em géis de poliacrilamida de 10% ou 12% por aproximadamente 2 horas. A transferência elétrica das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi feita em um transferidor Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) por 20 minutos à 25V (constante) em tampão contendo metanol e SDS.

Após checar a eficiência de transferência com o marcador proteico Ponceau S, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão TBS-T (10 mmol Tris/L, 150 mmol NaCl/L, 0.5% Tween 20) ‘overnight’ à 4°C.

As proteínas TNF- α , IL-1 β , IL10, Bax, Bcl-2, BDNF, GPR40, β -actina (#sc1351, #sc1250, #sc1783, #sc493, #sc492, #sc546, #sc32905, #sc130656, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); e Dcx (#4604, Cell Signaling, Boston, MA, USA) foram detectadas nas membranas. Inicialmente, as membranas foram incubadas ‘overnight’ à 4 °C com os respectivos anticorpos primários diluídos em tampão TBS-T 1:500, contendo 3% de albumina. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário IgG específico conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 em tampão TBS-T com 1% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, foi usado substrato para peroxidase (SuperSignal West Pico, Pierce) capaz de promover reação de quimioluminescência ao se ligar ao anticorpo secundário presente nas membranas. Essa reação foi usada para detecção das proteínas em auto-radiografia e a intensidade das bandas de proteína foi quantificada por densitometria ótica (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

Extração de RNA e PCR em tempo real

Amostras do hipotálamo dos animais foram homogeneizadas em Trizol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil) usando um homogeneizador (15s) (Polytron-Agregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland). O conteúdo total de RNA foi isolado de acordo com instruções do fabricante, quantificado e analisado por espectrofotometria (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A integridade do RNA foi avaliada

através de corrida em gel de agarose e para síntese de cDNA foi usado 3 µg de RNA total e o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA).

A concentração de RNAm foi medida no hipotálamo através de PCR em tempo real usando o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). Neste sistema é utilizado um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Antes dos experimentos, fizemos a validação do sistema e verificamos que a eficiência de amplificação dos primers foi próxima a 100%. Os primers dos genes alvo utilizados foram obtidos da Applied Biosystems (Mm00445771_m1, Mm00475829_g1, Mm00435874_m1, Mn00489086_m1, Mm01963590_s1, Mm01293920_s1, Mm01242886_g1, Mn01964031_s1; e Mn01334043_m1, Mm00809442_s1, para os seguintes genes: NPY, AgRP, POMC, CART, TRH, CRH, MCH, ORX, e BDNF, GPR40, respectivamente). O gene GAPDH (#4352339E, Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação.

Histologia e quantificação celular

Os camundongos foram perfundidos com salina e solução de paraformaldeído 4%, pH 7,4. Os cérebros foram retirados e permaneceram em paraformaldeído por 24 horas. Em seguida, foram transferidos para solução contendo 30% (g/mL) de sacarose, onde permaneceram por 48 horas. Depois disso, os cérebros foram reduzidos à região do hipotálamo, imersos no composto OCT (Sakura Finetek, Torance, CA) colocados em formas plásticas para congelamento em n-hexano. Os blocos foram cortados em criostato,

produzindo cortes de 12 μ m em secção coronal e colocados em lâminas para microscopia. Os cortes foram lavados em tampão PBS e incubados em solução 2N de HCl por 10 minutos à 37 °C, seguida de incubação em solução 0,1 M de borato de sódio por mais 10 minutos à temperatura ambiente.

Depois disso, os cortes foram incubados com solução de bloqueio contendo 5% de soro de cabra (#G9023, Sigma-Aldrich, Inc.) diluído em tampão TBS-T (0,2% of Triton x-100) por 30 min à 37 °C seguido de incubação ‘overnight’ com os anticorpos primários contra BrdU, NPY e POMC (#sc32323, #sc28943, #sc20148 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) NeuN (#MAB377C3, Millipore, Temecula, CA, USA), e Nestina (#ab93666, AbCam, Cambridge, UK), diluídos na mesma solução de bloqueio (1:100). No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpos secundários conjugados com FITC ou rhodamina (#sc2777; #sc2092, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Em seguida os cortes foram lavados, cobertos e montados com meio de montagem Vectashield Mounting Medium com DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA).

As imagens foram obtidas usando um Microscópio Confocal à laser (LSM510, Zeiss, New York, NY) e 3 cortes consecutivos na região do hipotálamo medio-basal foram usados para quantificação em 3 animais diferentes por grupo. A contagem de células marcadas foi feita por um observador cego e automaticamente usando o programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) que produziu resultados equivalentes. Além disso, o ImageJ foi usado para calcular a colocalização de marcação dupla usando o plugin JACoP e os números dados pelo coeficiente de Manders.

Análise estatística

Os Resultados foram apresentados como média $\pm$ SE. Após checar a distribuição de todos os dados, os dados foram analisados por teste-t de Student ou por ANOVA de uma variável, seguida pelo teste de Tukey ou pela ANOVA de duas variáveis seguida do método de Holm-Sidak para determinar a significância das diferenças individuais. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$ e os dados foram analisados usando o programa estatístico Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc, Point Richmond, CA, USA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, W.S., and Hilton, D.J. (2004) The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Ann Rev Immunol* 22, 503-529.
- Altman, J.; Das, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampus neurogenesis in rats. *J. Comp. Neur* 124: 319-336.
- Anand, B.K.; Brobeck, J.R. (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med.* p123-140.
- Blouet, C.; Schwartz, G.J. (2010) Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209: 1-12.
- Boneva, N., Yamashita, T. (2011) New insights into GPR40-CREB interaction in adult neurogenesis specific for pimates. *Hippocampus* 1-10.
- Boneva, N.B.; Kikuchi, M.; Minabe, Y.; Yamashima, T. (2011) Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: Implication of Fatty Acid-Binding Proteins (FABP) and G Protein-Coupled Receptor 40 (GPR40) in adult neurogenesis. *J PharmacolSci* 116, 163-172.
- Cameron, H.A; Wooley, C.S.; McEwen, B.S.; Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56(2): 337-344.
- Carvalho, J. B., Ribeiro, E. B., Folli, F., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2003) Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *BiolChem* 384, 151-159.

- Carvalho, J. B., Siloto, R. M., Ignacchitti, I., Brenelli, S. L., Carvalho, C. R., Leite, A., Velloso, L. A., Gontijo, J. A., and Saad, M. J. (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500, 119-124.
- Charbonneau, A.; Unson, C.G.; Lavoie, J.M. (2007) High-fat-diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in a rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise. *J Physiol* 579.1, 255-267.
- Cintra, D.E.; Ropelle, E.R.; Moraes, J.C.; Pauli, J.R.; Morari, J.; de Souza, C.T.; Grimaldi, R.; Stahl, M.; Carvalho, J.B.; Saad, M.J.; Velloso, L.A. (2012) Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity 7, e30571
- Dayyeh, B.K.A.; Lautz, D.B.; Thompson, C.C. (2011) Gastrojejunal Stoma Diameter Predicts Weight Regain after Roux-en-Y Gastric Bypass. *ClinGastroenterolHepatol*. 9(3): 228–233.
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199
- Dyall, S.C.; Michael, G.J.; Michael-titus, A.T. (2010) Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptor and increase neurogenesis in old rats. *J. Neurosci Res* 88:2091-2101.
- Elmqvist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B., and Flier, J. S. (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1, 445-450.

- Eriksson, P.; Perfilieva, E.; Björk-Eriksson, T.; Alborn, A.M.; Nordborg, C.; Peterson, D.A.; Gage, F.H.(1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11): 1313-1317.
- Evans, J., Sumners, C., Moore, J., Huentelman, M. J., Deng, J., Gelband, C. H., Shaw, G. (2002) Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. *J. Neurophysiol*, 87, 1076-1085.
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Gauthier, M.S.; Couturier, K.; Latour, J.G.; Lavoie, J.M. (2003) Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J ApplPhysiol* 94, 2127-2134.
- Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neur* 8 (6), 481–488.
- Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Hsiang, H.L., Buch, T., Waisman, A., (2009) .Selective erasure of a fear memory.*Science*. 323(5920): 1492–1496..
- Hotamisligil, G. S. (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int J ObesRelatMetabDisord* 27 Suppl 3, S53-55.
- Kaplan, M.S.; Hinds, J.W. (1984) Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094.
- Kawakita, E.; Hashimoto, M.; Shido, O. (2006) Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis *in vitro* and *in vivo* *Neuroscience* 139 (2006) 991–997

- Kokoeva, M. V., Yin, H., Flier, J. S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, 30, 679-683.
- Kopelman, P.G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
- Kris-Etherton, P.M.; Harris, W.S.; Appel, L.J. (2003) Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 23:e20-e31.
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., Aja, S., Ford, E., Fishell, G., Blackshaw, S. (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature* 15 (5), 700-702.
- Lee, D.A.; Blackshaw, S. (2012) Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *Int.J. Devl Neuroscience* 30: 615–621.
- Ma, D.; Zhangb, M.; Larsena, C.P.; Xua, F.; Huaa, W.; Yamashimac, T.; Maoa, Y.; Zhoua, L. (2010) DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Res* 1330:1-8.
- McCowen, K.C.; Malhotra, A.; Bistran, B. R. (2001) Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin* 17, 107-124.
- McNay, D.E.G.; Briançon, N.; Kokoeva, M.V.; Maratos-Flier, E.; Flier, J.S. (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122(1), 142-152.
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., Pillon, D. (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative

- study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *European Journal of Neuroscience* 32, 2024-2052.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., Tsukumo, D. M. L., Anhe, G., Amaral, M. E., Takahashi, H. K., Curi, R., Oliveira, H. C., Carvalheira, J. B. C., Bordin, S., Saad, M. J., Velloso, L. A. (2009) Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *J. Neurosc.*, 29, p. 359-370.
- Ming, G.L.; Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70 (4): 687–702.
- Monteiro, C.A.; Conde, W.L.; Popkin, B.M.(2007) Income-Specific Trends in Obesity in Brazil: 1975–2003 *American Journal of Public Health*: 1808- 1812.
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R., Romanatto, T., Carvalheira, J. B., Oliveira, A. L. R., Saad, M. J., Volloso, L. A. (2009) High fat diet induces apoptosis in hypothalamic neurons. *Plos One*, 4(4), e5045.
- Morton, G. J.; Cummings, D. E.; Baskin, D. G.; Barsh, G. S. e Schuartz, M. W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443, 289-295.
- Oble, E.E.; Billington, C.J.; Kotz, C.M.; Wang, C.F. (2011) The lighter side of BDNF. *Am J. PhysiolRegulIntegr Comp Physiol* 300:R1053-R1069.
- Paton, J.A., Nottebohm, F.N., 1984. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225 (4666): 1046–1048.

- Pencea, V., Bingaman, k. D., Wiegand, S. J., Luskin, M. B.(2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. of Neurosc*, 21(17), 6706-6717.
- Pierce A.A.; Xu, A.W. (2010) De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance.*J Neurosc* 30(2), 723-730.
- Pirola, I., Johnston, A.M., Van Obberghen E. (2004) Modulation of insulin action.*Diabetologia* 47: 170-184.
- Rayner, D.V. (2001) The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc of NutritSoc* 60, 357-364.
- Rosi, s.; Vazdarjanova, A.; Ramirez-Amaya, V.; Worley, P.F.; Barnes, C.A.; Wenk, G.L. (2006) Memantine protects against lps-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142:1303–1315
- Sande-Lee, S.V.; Pereira, F.R.S.; Cintra,D.E.; Fernandes, P.T.; Cardoso, A.R.; Garlipp, C.R.; Chaim, E.A.; Pareja, J.C.; Geloneze,B.; Li,L.M.; Cendes,F.; Velloso, L.A. (2011) Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects. *Diabetes*.60:1699- 1704.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000) Central nervous system control of food intake.*Nature* 404, 661-671.

- Swinburn, B.A.; Sacks, G.; Hall, K.D.; McPherson, K.; Finegood, D.T.; Moodie, M.L.; Gortmaker, S.L. (2011) The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 378: 804-814.
- Thornberry, N.A. and Lazebnick, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281(5281), 1312-1316.
- Torsoni, M. A., Carvalheira, J. B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M. A., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2003) Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 285, E216-223.
- Velloso, L. A., Araujo, E. P., Souza, C. T. (2008) Diet-Induced Inflammation of the Hypothalamus in Obesity, *Neuroimmunomod* 15, 189-193.
- Velloso, L. A., Kampe, O., Hallberg, A., Christmanson, L., Betsholtz, C., and Karlsson, F. A. (1993) Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 91, 2084-2090.
- Velloso, L.A.; Schwartz, M.W. (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *IntJ.Obesity* 35: 1455–1465.
- White, C.L.; Whittington, A.; Barnes, M.J.; Wang, Z.; Bray, G.A.; Morrison, C.D. (2009) HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296(2): E291–E299.

- Wu, A.; ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. (2004) Dietary omega-3 acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 21 (10): 1457-1467.
- Yamashita, T. (2012) Pufa-GPR40-CREB signaling hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Progress in Lipid Research* (uncorrected proof)
- Yeo, G.S. &Heisler, L.K. (2012) Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *NatureNeurosc.*15: 1343–1349.
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G. and Kahn, B.B. (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J BiolChem* 283, 14230-14241.