



ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona

**Impacte d'un tractament dietètic i de l'exercici físic
sobre paràmetres biomètrics, metabòlics i conductuals
en un model d'obesitat induïda per dieta de cafeteria
en rates mascle i femella**

Adam Alvarez Monell

Tesi doctoral

Doctorat en Neurociències

Dirigida per:

Dra. Montserrat Solanas Garcia

Dra. Rosa Maria Escorihuela Agulló

Juny de 2023

Finançament

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada en el marc del projecte concedit a les Dra. Rosa Maria Escorihuela i Dra. Montserrat Solanas titulat "RESISTENCIA A LOS SABORES DULCES EN LA OBESIDAD: RECUPERACIÓN MEDIANTE EJERCICIO FÍSICO Y TRATAMIENTO DIETÉTICO" amb referència PSI2016-77234-R.

El doctorand Adam Alvarez ha estat finançat amb un contracte de Personal Investigador en Formació (PIF-2018).

Els dos treballs publicats que formen part d'aquesta tesi són:

Alvarez-Monell A, Subias-Gusils A, Mariné-Casadó R, Belda X, Gagliano H, Pozo OJ, Boqué N, Caimari A, Armario A, Solanas M, Escorihuela RM. Restricted cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats. *Sci Rep.* 2022;12(1):19545. doi:10.1038/s41598-022-23464-7

Alvarez-Monell A, Subias-Gusils A, Mariné-Casadó R, Boqué N, Caimari A, Solanas M, Escorihuela RM. Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats. *Nutrients.* 2022;15(1):144. doi:10.3390/nu15010144

Agraïments

Bé, al final hem arribat i ja esta la tesi escrita, primer he d'agrair a la família, tant a la mama, Fina, al papa, Joan i germà, Damià, i a la resta de la família, que són masses per nombrar-los un a un. Per donar sempre suport incondicional, encara que no s'entengui massa de que va això de fer una tesi.

Després, a les meves directores, Rosa i Montse, per haver-me donat aquesta oportunitat de fer recerca, per guiar i aconsellar sempre estupendament, i per tot el coneixement transmès, pensava que sabia el que em feia abans de començar i resulta que encara em faltava molt. Moltes gràcies.

Seguint a la UAB també s'ha d'agrair a molta gent més, començant pel Dr. Antonio Armario, l'Humberto i el Xavi, vaig aprendre moltíssim aquells mesos a la unitat fent RIAs sense parar. També agrair a tots els professors i tot el personal la unitat de Fisiologia Mèdica i també de Psicologia Mèdica.

Per tota l'ajuda en el treball de camp, preparant dietes, fent tandes de treadmill, i fent conducta a l'estabulari, a totes les estudiants del màster que han passat pel grup a fer el TFM, l'Eva, la Sandra, la Núria, la Xisca, la Cris, l'Eva i el Gonzalo.

I a tota la gent de Psico, Dani, Toni, Carles, Anastasia, Aida, Ignasi, Paula, Bernat, Juan, Daniel i Daniela, per tots els dinars durant anys (excepte quan estàvem tancats a l'estabulari) i per totes les cervesetes divendres a les tardes i els dinars de tant en tant, un grup genial i no se si estariem aquí sense aquest grup. I la menció ben especial a l'Àlex, company de tesi, company a l'estabulari, company de pis durant un temps i tot, pels bons moments entre fer dietes i tota la feinada que vam arribar a fer tancats a l'estabulari, gràcies!!

I parlant de l'estabulari, també s'ha d'agrair a tot el personal de l'estabulari de Mundet, uns cracks tots solucionant tots els problemes que teníem amb les rates, en especial a la Laia, però també a la resta, Carla, Aina i David.

I per acabar sortim del món de la tesi, als amics, constància estant sempre allà, aguantant les queixes de la tesi i per les bones converses i sopars casi semanals, Sergi i Pau; i al Jordi també.

Resum

La prevalença de l'obesitat ha augmentat a nivell mundial en les últimes dècades, i varis estudis predictius indiquen que aquesta tendència es mantindrà en el futur fins al punt que la mitat de la població es podrà considerar obesa d'aquí unes dècades. Aquest augment de l'obesitat va acompanyat d'un augment de varies malalties associades al fenotip obès, com la Diabetis Mellitus tipus II, les malalties cardiovasculars o el desenvolupament d'alguns trastorns psiquiàtrics com ara la depressió o l'ansietat. L'augment de l'obesitat pot ser deguda a canvis en l'ambient, pel subministrament i la facilitat d'accés a aliments calòricament densos, saborosos i econòmicament assequibles i també per la disminució globalitzada en els nivells d'exercici físic que fan les persones. Les estratègies clíniques més emprades per tractar l'obesitat s'encaren a pal·liar els seus efectes sobre el metabolisme i a reduir el risc de Síndrome Metabòlica, aquestes estratègies es basen majoritàriament en generar un dèficit energètic que es pot aconseguir a través de cirurgies bariàtriques, intervencions dietètiques i/o exercici físic.

En aquesta tesi hem estudiat els efectes d'una dieta obesogènica, la dieta de cafeteria (CAF) en rates mascle i femella de la soca Long-Evans sobre el metabolisme i varis paràmetres conductuals, com ara la conducta exploratòria, l'activitat locomotora basal circadiària, a més d'altres conductes associades al gust dolç, com la conducta apetitiva, la conducta hedònica i la palatabilitat percebuda dels animals. Un altre dels objectius és estudiar els efectes que té en animals amb obesitat induïda amb dieta CAF, una intervenció dietètica a base d'una dieta de cafeteria modificada en que es restringeixen les calories administrades en un 30% (CAFR) i una intervenció d'exercici físic al tapis rodant.

Els resultats indiquen que la dieta CAF administrada *ad libitum* durant 8 setmanes indueix un augment de pes significatiu en ambdós sexes. Addicionalment, aquest efecte va acompanyat d'altres alteracions que es poden associar al desenvolupament de Síndrome Metabòlica, com ara un augment en la resistència a la insulina, una desregulació del perfil lipídic i un increment en l'adipositat abdominal. L'alimentació CAF indueix alteracions conductuals que també es poden associar al perfil obès, com una disminució en l'activitat locomotora basal, detectada en mascles, i una disminució en la conducta apetitiva, detectada en ambdós sexes i que pot ser indicativa del desenvolupament d'un perfil depressiu

associat a l'obesitat. L'alimentació CAFR en animals obesos corregeix parcialment els efectes de la dieta CAF, de manera que, en femelles, l'alimentació CAFR reverteix parcialment la resistència a la insulina, les alteracions en el perfil lipídic i la conducta apetitiva; mentre que els efectes en mascles són menors que en femelles. Globalment, l'exercici físic té uns efectes més modestos que la intervenció amb dieta CAFR en els animals amb obesitat induïda per dieta CAF. Altres efectes de l'exercici són més específics i requeriran de futurs estudis, com ara l'augment dels nivells de leptina i de la conducta exploratòria en els mascles alimentats amb dieta CAF, o la disminució de la conducta apetitiva en les femelles alimentades amb dieta CAF.

Abstract

Obesity prevalence has increased world-wide in the last decades, and several predictive studies point towards this tendency being maintained in the future to the point that half the population could be considered obese in a few decades. This increase in obesity is accompanied by an increase in several conditions associated to the obese phenotype, such as Diabetes Mellitus type II, cardiovascular diseases, or the development of psychiatric conditions like depression or anxiety. The increase in obesity could be caused by changes in the environment, such as the supply and ease of access to calorically dense, palatable and economically affordable foods, and the globalized decrease of exercising. The most used clinical strategies for the treatment of obesity are aimed at palliating its effects on metabolism and at reducing Metabolic Syndrome risk, these strategies are based mainly on generating an energy deficit, this can be achieved through bariatric surgery, dietetic interventions and/or physical exercise.

In this thesis we have studied the effects of an obesogenic diet, the cafeteria (CAF) diet in male and female Long-Evans rats on metabolism and several behavioural parameters, such as exploratory behaviour, baseline circadian locomotor activity, as well as behaviour associated to the sweet taste, such as appetitive behaviour, hedonic behaviour and the perceived palatability. Another objective is to study the effects, on animals with diet induced obesity, of a dietetic intervention based on a modified cafeteria diet in which calories administered are reduced by 30% (CAFR), and of a treadmill exercise intervention.

Results indicate that the CAF diet administered *ad libitum* for 8 weeks induces a significant increase in body weight in both sexes. Additionally, this effect is related to other alterations that can be associated with the development of Metabolic Syndrome, like an increase in insulin resistance, a dysregulation in the lipid profile and an increase in abdominal adiposity. CAF feeding induces behavioural alterations that can also be related to the obese phenotype, such as a decrease in baseline locomotor activity in males, and a decrease in appetitive behaviour in both sexes, which can be indicative of the development of a depressive profile associated with obesity. CAFR feeding in obese animals partially corrected the effects of the CAF diet; CAFR feeding partially reverted insulin resistance and the alterations in

the lipid profile in females, meanwhile, the effects of CAFR in males are milder than in females. Globally, physical exercise has milder effects than the CAFR intervention has on diet induced obesity. Other effects of exercise are more specific and will require future studies, such as the increase in leptin levels and in exploratory activity in CAF males, or the decrease of appetitive behaviour in CAF females.

Índex:

Abreviatures.....	p. 1
1. Introducció General.....	p. 3
1.1. L'epidèmia de l'obesitat.....	p. 4
1.2. Regulació de la ingesta.....	p. 5
i. Regulació homeostàtica.....	p. 5
ii. Regulació hedònica.....	p. 6
1.3. Tractament de l'obesitat.....	p. 7
i. Tractaments dietètics.....	p. 7
ii. Intervencions basades en augmentar l'activitat física.....	p. 10
iii. Efectivitat dels tractaments de l'obesitat.....	p. 11
1.4. Models animals per a l'estudi de l'obesitat.....	p. 13
i. Models genètics.....	p. 13
ii. Models de lesions.....	p. 14
iii. Models d'obesitat induïda per la dieta.....	p. 14
- Dieta de cafeteria.....	p. 16
1.5. Models animals d'exercici físic.....	p. 17
1.6. Obesitat, estrès i ansietat.....	p. 19
i. Efectes de les intervencions dietètiques.....	p. 20
ii. Efectes de l'exercici físic.....	p. 21
iii. Obesitat i eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal (HPA).....	p. 21
iv. Concepte de menjar de confort o <i>comfort food</i>	p. 23
1.7. Efectes de la ingesta i l'obesitat sobre la funció gustativa.....	p. 24
i. Leptina i gust dolç.....	p. 26
1.8. Obesitat i funció cognitiva.....	p. 27
i. Efectes de les intervencions.....	p. 28
2. Hipòtesis i Objectius.....	p. 31
3. Resultats.....	p. 33
3.1. Capítol 1: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates mascle sobre la conducta exploratòria, la conducta ansiosa, l'activitat locomotora basal i l'eix HPA.....	p. 34
3.2. Capítol 2: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates mascle i femella sobre la	

conducta associada al gust dolç.....	p. 49
3.3. Capítol 3: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates femella sobre la conducta de reconeixement d'objectes nous i de localització.....	p. 71
4. Discussió General.....	p. 83
4.1. L'obesitat induïda per dieta CAF en rates mascle i femella.....	p. 84
4.2. Els efectes de la dieta de cafeteria restrictiva en les rates obeses.....	p. 92
4.3. Els efectes de l'exercici moderat al tapís rodant en les rates obeses.....	p. 97
4.4. L'estudi cognitiu de les intervencions sobre reconeixement d'objectes.....	p. 102
5. Conclusions.....	p. 104
6. Referències.....	p. 107

Abreviatures

ACTH: Hormona Adrenocorticotròpica

AgRP: Pèptid relacionat amb Agouti

ARC: Nucli Arcuat

BDNF: Factor Neurotròfic derivat del cervell

CAF: Cafeteria

CAFR: Cafeteria Restrictiva

CART: Transcrit relacionat amb cocaïna i amfetamina

CCK: Colecistoquinina

CRH: Hormona lliberadora de corticotropina

D1/D2: Receptor de dopamina 1/2

EPM: Laberint en creu elevat

HB: Taula de forats

HCA: test d'actimetria

HDL: lipoproteïna d'alta densitat

HFD: Dieta alta en grasses

HPA: eix hipotalàmic-pituïtari adrenal

HSD: dieta alta en sucres

IL-1/IL-6: interleuquina 1/6

IMC: Índex de massa corporal

KO: knock-out

LDL: Lopoproteïna de baixa densitat

NA: Nucli Accumbens

NPY: Neuropeptid Y

OID: Obesitat induïda per la dieta

OLEFT: rates Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

POMC: Propiomelanocortina

PVN: Nucli Paraventricular

SM: Síndrome Metabòlica

SNC: Sistema Nervios Central

STD: Dieta Estàndard

T1R2/3: Receptor de gust 2/3

TAB: Teixit adipós blanc

TN: Tail nick

VTA: Area Tegmental Ventral

WHO : World health organization

ZDF: Rates Zucker Diabetic Fatty

1. Introducció General

1.1. L'epidèmia d'obesitat

L'obesitat està definida com una acumulació anormal o excessiva de teixit adipós que representa un risc per la salut de l'individu (World Health Organization, WHO., 2021). Des d'un punt de vista diagnòstic, un individu es considera obès quan presenta un Índex de Massa Corporal (IMC o BMI) superior a 30 kg/m², mentre que un IMC entre 25 i 30 kg/m² es considera indicatiu de sobrepès (Ward et al., 2019). Actualment s'estima que una tercera part de la població mundial té sobrepès o obesitat (Chooi et al., 2019). La prevalença de l'obesitat i el sobrepès ha augmentat en els últims 30 anys (The GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017) i s'estima que a Estats Units arribarà al 50% a l'any 2030 (Ward et al., 2019). A nivell espanyol, aproximadament un 20% de la població és obesa, i a Catalunya aquest percentatge disminueix al 15% (Aranceta-Bartrina et al., 2016), de manera que en ambdós casos la prevalença d'obesitat és inferior a la mundial.

L'obesitat i el sobrepès tenen efectes sobre pràcticament totes els funcions fisiològiques i suposen una afronta als sistemes públics de salut (Tremmel et al., 2017). Així, l'obesitat augmenta el risc de desenvolupar múltiples alteracions patològiques, com poden ser la diabetis tipus 2 (Ferguson et al., 2013), malalties cardiovasculars (Piché et al., 2018), varis tipus de càncers (Shinoda et al., 2022; Ye et al., 2020), i afectacions sobre la salut mental i l'estat d'ànim de l'individu (Abdalla et al., 2022; Abiri et al., 2022) entre d'altres.

L'obesitat es considera una malaltia multifactorial que es desenvolupa com a conseqüència d'un desequilibri energètic positiu crònic (Chooi et al., 2019). Presenta un component genètic i s'ha determinat que l'heretabilitat del fenotip obès és d'un 40-70% (Maes et al., 1997). Tot i això, es considera que el ràpid augment de la prevalença en les últimes dècades no es pot explicar únicament a través de mecanismes genètics, ja que el perfil genètic poblacional no ha canviat de forma significativa en un període de temps relativament curt (Lustig et al., 2022); i que els canvis en l'ambient, com ara l'augment de la disponibilitat d'aliments econòmicament assequibles, gustosos i energèticament densos a tota hora i arreu tenen un paper fonamental (M. J. Morris et al., 2015; Swinburn et al., 2011). Així, l'augment en el subministrament d'aquest tipus d'aliments als Estats Units des de l'any 1970 s'ha associat a l'augment en la prevalença de l'obesitat en aquest país,

suggerint que una modificació en els hàbits alimentaris ajudaria a controlar l'epidèmia d'obesitat (Hall et al., 2009).

Un altre factor ambiental a tenir en compte en l'etiopatogènia de l'obesitat és el desenvolupament d'un estil de vida més sedentari, és a dir, la disminució de l'activitat física. S'estima que un 30% de la població Nord-Americana no compleix els mínims recomanats d'activitat física (Macera et al., 2003), i a nivell mundial s'observa una tendència de disminució de l'activitat física en les últimes dècades que es preveu que es mantingui en un futur (Ng & Popkin, 2012). Al nostre continent, un estudi de la Unió Europea dut a terme amb l'objectiu de determinar els nivells d'activitat física de la població va reportar que més de la mitat de persones enquestades no fan exercici físic intens, i un 47% no fan exercici físic moderat. El mateix estudi va mostrar que a Espanya aquests percentatges empitjoren, de manera que el 67% de la població no fa exercici intens, i el 60% no fa exercici moderat (*Special Eurobarometer 472 Sport and Physical Activity Report Fieldwork*, 2017).

1.2. Regulació de la ingesta

i. Regulació homeostàtica

Un dels mecanismes implicats en la regulació de la ingesta i del pes corporal és el conegut com a sistema homeostàtic. Aquest sistema s'encarrega de regular les necessitats energètiques fisiològiques necessàries pel dia a dia i està basat en l'augment de la ingesta d'aliments quan les reserves energètiques de l'organisme disminueixen.

Un factor important en aquest control homeostàtic és l'adipoquina leptina, una hormona peptídica sintetitzada principalment pel teixit adipós i secretada de forma proporcional a la quantitat de teixit adipós (Maffei et al., 1995).. Així, canvis relativament petits en el pes corporal i l'adipositat es regulen de forma homeostàtica de manera que en una persona adulta sana el pes es manté majoritàriament estable (Y. H. Yu et al., 2015).

El control homeostàtic de la ingesta està localitzat principalment en l'hipotàlem. Els senyals hormonals i nerviosos provinents del tracte gastrointestinal i del teixit adipós blanc (TAB), es reben inicialment al nucli arcuat (ARC), que expressa receptors d'hormones clau com la insulina, la leptina i la grelina; una altre via a

travès de la qual arriben senyals provinents del tracte gastrointestinal al SNC és el nervi vague, que recull informació sobre la secreció de grelina (Wilson & Enriori, 2015). En l'ARC hi ha dues poblacions neuronals distingides, una sintetitza pèptids orexigènics com el neuropèptid Y i el pèptid relacionat amb agouti (NPY/AgRP) i l'altra sintetitza pèptids anorexigènics com la proopiomelanocortina i el transcrit regulat per cocaïna i metamfetamina (POMC/CART) (Matafome & Seïça, 2017). Des d'aquestes neurones de primer ordre s'envien senyals a les neurones de segon ordre localitzades al nucli paraventricular (PVN), on s'integren amb senyals emocionals i d'estrès. El PVN exerceix un control fisiològic sobre el metabolisme a través de projeccions a regions extra-hipotalàmiques, com el nucli del tracte solitari, que es considera crucial per a la resposta de sacietat (Sutton et al., 2016). En condicions normals l'activació d'aquestes vies es tradueix en el desenvolupament de respostes adaptatives que modifiquen la ingesta d'aliments i la despesa energètica en base a les demandes del dia a dia de l'organisme, amb l'objectiu de mantenir estables els nivells d'adipositat a mig-llarg termini (D. L. Morris & Rui, 2009; Myers et al., 2010).

Estudis en animals i humans indiquen que l'obesitat s'associa a una alteració en la senyalització de la leptina a través del desenvolupament de resistència a aquesta adipoquina. Aquesta alteració de la senyalització modificaria el punt homeostàtic i resultaria en un augment de la ingesta i una disminució de la despesa energètica, i en conseqüència un increment del pes corporal (Lustig et al., 2022; Macht et al., 2017). La resistència a la leptina es creu que pot estar provocada en part per la hiperinsulinèmia i per la conseqüent resistència a la insulina en el sistema nerviós central (SNC) (Münzberg & Myers, 2005).

ii. Control hedònic

El mecanisme hedònic de control de la ingesta esta regulat principalment pel sistema dopaminèrgic corticomesolímbic i circuits prefrontals encarregats del control de la impulsivitat (Kessler et al., 2016; Lustig et al., 2022). Els aliments saborosos indueixen l'alliberació de dopamina en el Nucli Accumbens (NA) de forma semblant a l'acció de les drogues d'abús i altres conductes addictives en aquest sistema (Avena et al., 2008), generant processos que poden desenvolupar en trastorns de la ingesta compulsiva (Kessler et al., 2016). En una exposició crònica a aliments saborosos es detecten modificacions en la funcionalitat del sistema corticomesolímbic semblants a les provocades per l'ús crònic de drogues d'abús

(Avena et al., 2008), o a les observades en addiccions conductuals o factors ambientals (ludopatia, xarxes socials, videojocs o compra compulsiva) (Clark & Zack, 2023). Aquests canvis afecten, entre d'altres, als receptors de dopamina D1 i D2 i la síntesis de dopamina en l'àrea tegmental ventral (VTA), que projecta al NA (Ong et al., 2013). Aquests canvis acaben provocant una disminució de la sensibilitat a la recompensa a través d'una disminució de la senyalització dopaminèrgica que acaba generant un augment de la ingesta en presència de aliments saborosos (Lustig et al., 2022).

1.3. Tractament de l'obesitat

S'han desenvolupat diferents estratègies per tractar l'obesitat, principalment a través de canvis en la dieta, l'augment de l'activitat física i la cirurgia bariàtrica (Heffron et al., 2021). Les cirurgies bariàtriques estan indicades en els casos més extrems (IMC superior a 40 kg/m² o superiors a 35 kg/m² amb complicacions metabòliques) (Jensen et al., 2014), mentre que en la major part d'individus obesos s'indica majoritàriament un canvi en els hàbits alimentaris i un augment de l'activitat física.

i. Tractaments dietètics

Per generar una pèrdua de pes a través d'una intervenció dietètica és necessari induir un dèficit energètic. Actualment, les directrius oficials recomanen restringir la ingesta de calories en 500-750 kcal, o aproximadament en un 30% (Jensen et al., 2014). Varis estudis han conclòs que aquesta dieta hipocalòrica continuada és efectiva a l'hora de generar una pèrdua de pes corporal (D. Liu et al., 2022; Sadeghian et al., 2021; Seimon et al., 2020). Aquestes dietes hipocalòriques, tot i ser efectives a l'hora de generar una pèrdua de pes a curt-mig termini, poden presentar varis afectes adversos, com poden ser deshidratació, hipoglucèmia, letàrgia, halitosis, hipoproteinèmia, hipocalcèmia o alopecia, (Muscogiuri et al., 2019) i induir una disminució en l'adherència dels pacients a la dieta. Aquesta possible disminució en l'adherència és un element clau perquè genera una disminució en l'eficàcia del tractament. De fet, s'ha documentat que un dels factors determinants en l'eficàcia de les dietes hipocalòriques és l'adherència (del Corral et al., 2009). En aquest estudi, aquesta es va mesurar en 227 dones amb sobrepès amb una dieta restringida calòricament en un 40 com el percentatge entre la quantitat de calories perdudes reals i les esperades segons la dieta. Aquest càlcul va donar un 75%

d'adherència, indicant que per cada 4 calories menys que dictava la dieta recomanada, els participants van restringir la seva ingesta en 3. Aquesta mesura es va correlacionar amb el percentatge de pèrdua de pes corporal, de manera que les dones amb una adherència major a la dieta van aconseguir una pèrdua de pes corporal major.

Dins de les dietes hipocalòriques, recentment el dejuni intermitent ha augmentat en popularitat, tot i que els resultats sobre la seva eficàcia no són concluent. Aquest es basa en reduir la finestra de temps per ingerir aliments i per tant augmentar el temps que l'organisme està en estat de dejuni (Yannakoulia et al., 2019). Hi ha varis patrons d'ingesta per fer dejuni intermitent (Patterson et al., 2015): (i) un dejuni complet en dies alterns, de manera que es restringeix la ingesta en un 100% durant 24h certs dies; (ii) un dejuni modificat en dies determinats, de manera que es redueix la ingesta en un 75-80% de la ingesta habitual en dies no consecutius; i (iii) una alimentació restringida temporalment, de manera que només es permet la ingesta d'aliments durant certes hores de forma diària. Un estudi de meta-anàlisi recent on es van comparar els efectes del dejuni intermitent amb els de la restricció calòrica continuada (Wang et al., 2021) va determinar que el primer genera una disminució del pes corporal i de l'IMC marginalment major (aproximadament 1kg més de pèrdua de pes en el grup de dejuni). Els treballs analitzats en aquest meta-anàlisi comparaven els efectes d'una dieta hipocalòrica continua amb una dejuni parcial en dies determinats, de manera que entre 1 i 3 dies a la setmana es permetia una ingesta d'aproximadament unes 500 kcal durant almenys 2 mesos. Tot i això, va concloure que els efectes d'aquestes dues estratègies pel tractament de la obesitat són comparables i que el dejuni intermitent no aporta un benefici addicional significatiu en la regulació de la glucèmia ni en el perfil lipídic respecte la restricció calòrica continuada.

Un altre gran grup de tractaments dietètics molt utilitzats es basen en modificar la composició de macronutrients de la dieta, és a dir la ingesta de carbohidrats, grasses i proteïnes (Yannakoulia et al., 2019). Diversos meta-anàlisis que han revisat les dades d'assajos clínics han conclòs que la restricció de carbohidrats és més efectiva a l'hora de generar efectes sobre el pes corporal i millorar la salut cardiovascular que la restricció de grasses (Bueno et al., 2013; Mansoor et al., 2016; Tobias et al., 2015). Tot i l'efectivitat d'aquestes dietes, tant la restricció de

carbohidrats com la de grasses presenten problemes associats a l'adherència a la dieta i a la seguretat a llarg termini. En general, a llarg termini es produeix una disminució en l'adherència comparable entre ambdues dietes i, en conseqüència, en l'efectivitat del tractament (Alhassan et al., 2008; T. Hu et al., 2016). En referència a les dietes baixes en carbohidrats també s'han documentat varis efectes secundaris adversos que poden disminuir l'adherència. A curt termini poden aparèixer astènia, cefalea, debilitat muscular, restrenyiment i nàusea. A llarg termini, alguns d'aquests efectes adversos, com el restrenyiment (Moreno et al., 2014), poden persistir, indicant que el manteniment a llarg termini de dietes baixes en carbohidrats pot tenir efectes perjudicials per la salut de l'individu. En un meta-anàlisi en què es van analitzar dades de més de 400.000 homes i dones entre 20 i 85 anys, amb individus normopès, amb sobrepès i obesos, es va establir una relació en forma de U entre la mortalitat i la ingesta de carbohidrats, de manera que ingestes baixes (<40%) i altes (>70%) de carbohidrats presenten taxes de mortalitat semblants i més altes que ingestes intermèdies (Seidemann et al., 2018).

Un altre tipus d'intervencions basades en la modificació de la ingesta de macronutrients es basa en augmentar la ingesta de proteïnes amb l'objectiu de reduir la pèrdua de massa magra que es produeix durant el període de pèrdua de pes (Yannakoulia et al., 2019). Aquestes intervencions s'han demostrat efectives a l'hora de perdre pes. En un assaig clínic amb 105 homes i dones entre 20 i 60 anys i amb un IMC mitjà de 31 kg/m² es van comparar els efectes de dues dietes restringides calòricament en 500 kcal, una normoproteica i una hiperproteica isocalòrica (augment de la ingesta de proteïnes en un 40% respecte la normoproteica) durant 6 mesos, i la dieta hiperproteica va generar una pèrdua de pes major que la dieta normoproteica (Campos-Nonato et al., 2017). En un altre estudi amb més de 800 homes i dones entre 30 i 70 anys amb sobrepès o obesitat, també es va relacionar una ingesta major de proteïnes (mesurada a través de l'excreció urinària de nitrogen) amb una pèrdua de pes major després de 2 anys d'intervenció (Bray et al., 2017). Altres estudis, però, no han sigut capaços d'establir una relació entre la ingesta de proteïnes i una major pèrdua de pes corporal, ja sigui: i) comparant dues dietes calòricament restrictives, una dieta hiperproteica (34% de la ingesta calòrica provinent de proteïnes) amb una dieta normoproteica (17%) en 88 homes i dones entre 18 i 65 anys i un IMC major de 35 kg/m² durant 1 any (Dalle Grave et al., 2013), ii) comparant en 63 homes i dones entre 18 i 70 anys i un IMC

superior a 25 kg/m² una dieta sense restricció calòrica hiperproteica (32% de la ingesta calòrica provinent de proteïnes) amb una dieta isocalòrica normoproteica amb suplementació d'exercici físic durant 6 mesos (N. A. Watson et al., 2018), o iii) comparant en 323 dones post-menopàusiques amb un IMC major de 27 kg/m², una dieta restrictiva calòricament hiperproteica (33% de la ingesta calòrica provinent de proteïnes) amb una isocalòrica normoproteica en individus amb sobrepès (Jesudason et al., 2013).

ii. Intervencions basades en augmentar l'activitat física

Les recomanacions generals per a la població adulta sana respecte l'activitat física consisteixen en fer exercici físic aeròbic d'intensitat moderada, com caminar lleuger, durant un mínim de 250 minuts per setmana, que correspon a uns 35 min/dia (Donnelly et al., 2009). També es recomana l'exercici de resistència 2 dies a la setmana (HHS, 2018) com a complement de l'exercici aeròbic amb l'objectiu de mantenir la massa muscular (Schoenfeld, 2010). En recomanacions més recents, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) recomana un mínim de 150 minuts d'exercici aeròbic moderat, complementat amb 2 sessions setmanals d'exercici de resistència.

En relació al tractament de l'obesitat, a diferència de les intervencions dietètiques, les basades en l'exercici físic moderat no acostumen a generar una pèrdua de pes significativa. Així, s'ha descrit que en una mostra de 156 dones amb un estil de vida sedentari d'entre 20 i 60 anys i un IMC de 25 kg/m² o superior, una intervenció controlada de 3 dies a la setmana, amb sessions de 50 minuts d'exercici aeròbic (caminar i ballar) durant 6 mesos genera una pèrdua mitjana de pes d'un 2% (Alves et al., 2009). A més de generar una lleugera pèrdua de pes, les intervencions d'exercici aeròbic generen altres efectes. En un meta-anàlisi en el que es van analitzar dades de 13 treballs amb 762 participants en total, es va determinar que un exercici aeròbic moderat (caminar o bicicleta estàtica) genera una disminució en l'adipositat abdominal. El patró d'intervenció que incloïen els treballs inclosos en aquest estudi era un 'exercici de 3-5 dies a la setmana, amb una durada de les sessions de 20-75 minuts per dia, durant un període de 12 setmanes a 1 any (Sabag et al., 2017). Un altre meta-anàlisi amb les dades de 32 treballs i més de 1400 participants va determinar que l'exercici aeròbic (caminar) en sessions d'entre 20 i 60 minuts, de 2 a 7 dies a la setmana, durant un període de 8 setmanes a 1 any genera

una millora en el risc cardiovascular (Murtagh et al., 2015). Finalment, en un altre meta-anàlisi en que es van estudiar els efectes de l'exercici de resistència a partir de les dades de més de 3000 participants amb normopès i obesos, en 56 treballs on s'hi havia fet intervencions d'almenys 4 setmanes de durada, es va concloure que els efectes sobre l'adipositat i el pes corporal són semblants entre l'exercici de resistència i altres modalitats d'exercici, com caminar (Wewege et al., 2022).

iii. Síndrome metabòlica i efectivitat dels tractaments

Encara que totes aquestes intervencions estiguin encarades a generar una pèrdua de pes i una disminució de l'IMC, en principi aquests efectes per sí mateixos no són indicatius d'una millora en l'estat de salut de l'individu, ja que les mateixes afectacions que es poden trobar en individus obesos (desregulació de la glucèmia, dislipidèmia o hipertensió) es poden trobar en individus no obesos (Blüher, 2020). Així, l'objectiu principal de les dietes és reduir els marcadors de malaltia i, en conseqüència, reduir el risc de desenvolupar síndrome metabòlica i altres patologies associades. La síndrome metabòlica (SM) és un conjunt de condicions que augmenten el risc de patir malalties cardiovasculars. Es considera una condició patològica i es caracteritza per la presència d'adipositat abdominal, resistència a la insulina, hipertensió i dislipèmia (Han & Lean, 2015; Saklayen, 2018). Des d'un punt de vista diagnòstic es fan servir 5 criteris per establir la presència de SM (Taula 1), i en presència de 3 o més d'aquestes condicions es considera que s'ha desenvolupat SM (Alberti et al., 2009).

Paràmetre	Punts de tall
Circumferència Abdominal	Homes Caucàsics: ≥ 94 cm Dones Caucàsiques: ≥ 80 cm
HDL-Colesterol	Homes: < 40 mg/dL (1mM) Dones: < 50 mg/dL (1,3mM)
Pressió Arterial	PA Sistòlica: ≥ 130 mmHg PA Diastòlica: ≥ 85 mmHg
Trigliceridèmia	≥ 150 mg/dL (1,7 mM)
Glucèmia	≥ 100 mg/dL (5,55 mM)

Taula 1. Paràmetres i punts de tall a partir dels quals s'efectua el diagnòstic de SM. En la pràctica clínica, l'ús de medicació per controlar la colesterolèmia, la triglicèridèmia o la glucèmia es consideren indicadors alternatius de SM. Les dades de circumferència abdominal són les proporcionades per l'Organització Mundial de la Salut i recomanades per l'ús en població caucàsica. Per altres grups ètnics es recomanen mesures lleugerament diferents per tal de tenir en compte diferències ètniques. Taula adaptada d'Alberti et al., 2009.

En estudis de meta-anàlisis tant els tractaments dietètics com les intervencions d'exercici físic han demostrat ser intervencions efectives a l'hora de reduir els marcadors de SM. Les intervencions dietètiques basades en una reducció de la ingesta de carbohidrats s'han mostrat més efectives per a disminuir la triglicèridèmia i la pressió arterial, tant sistòlica com diastòlica, que les intervencions basades en la reducció de grasses; en canvi, la colesterolèmia sembla més susceptible a millorar en les intervencions baixes en grasses (Bueno et al., 2013; Mansoor et al., 2016). En relació a la glucèmia i la insulínèmia, tant les dietes baixes en carbohidrats com les dietes baixes en grasses milloren els dos paràmetres de forma semblant (Mansoor et al., 2016; H. Zhao et al., 2022). Per tant, ambdós tipus de dietes es consideren adequades per a millorar els marcadors de SM.

Les intervencions basades en l'exercici aeròbic generen també un efecte positiu sobre els marcadors de SM. En un meta-anàlisi realitzat amb dades de més de 300 individus es va determinar que l'exercici aeròbic, en intervencions de 8 a 36 setmanes amb combinació o no amb exercici de resistència, pot disminuir la pressió arterial sistòlica i l'adipositat, i millorar el control de la glucèmia (Stoner et al., 2016). La millora en el control de la glucèmia fou semblant a la del tractament amb metformina (Alanazi, 2013), un dels medicaments més usats en el tractament de la diabetis, indicant que l'exercici físic pot ser tant efectiu com un tractament farmacològic a l'hora de regular la glucèmia.

Altres autors han proposat l'exercici físic com a teràpia adjuvant als tractaments dietètics per tal de millorar els resultats (Rajaie et al., 2022). La combinació d'ambdós tractaments provoca una disminució major de l'adipositat i serveix per exercir una funció protectora sobre la massa muscular (Stoner et al., 2016). A més, també millora la glucèmia i la insulínèmia (ben Ounis et al., 2008; Ho et al., 2013),

però no el perfil lipídic (Ho et al., 2013). Tenint en compte aquests resultats es pot concloure que la combinació d'un tractament dietètic i d'una intervenció d'exercici físic genera resultats més marcats que cadascun dels dos tractaments per separat.

1.4. Models animals per a l'estudi de l'obesitat

S'han desenvolupat diversos models animals en rosegadors per a l'estudi de l'obesitat humana. Aquests models es basen principalment en (i) modificacions genètiques que predisposen els animals a l'obesitat, (ii) induir l'obesitat a través de lesions mecàniques o químiques, o (iii) induir obesitat a través de la dieta.

i. Models genètics

Els models animals genètics poden ser monogenètics i poligenètics, i dintre dels primers es poden diferenciar els espontanis i els induïts. Els models monogenètics espontanis més utilitzats són les rates Zucker i les rates Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEFT) (Kleinert et al., 2018). Les rates obesas Zucker tenen una mutació a la posició 269 de la porció del receptor de leptina comuna a totes les isoformes del receptor (Phillips et al., 1996). Aquesta mutació provoca que el receptor quedi internalitzat a la cèl·lula generant una deficiència en la senyalització de la leptina (Phillips et al., 1996; Schwartz et al., 1996). En conseqüència, aquests animals presenten varies característiques típiques d'individus obesos, com ara hiperfàgia, una despesa energètica disminuïda i desregulacions en la funció insulínica. Les rates OLEFT tenen un dèficit en el receptor A de la colecistoquinina (CCK) (Kleinert et al., 2018). Aquesta és una hormona peptídica sintetitzada per cèl·lules enteroendocrines de l'intestí prim en resposta a la ingesta d'aliments rics en grasses o proteïnes (Dockray, 2009) com a senyal de sacietat. Altres models s'han desenvolupat a través de la cria selectiva a partir d'aquestes soques de rates. Per exemple, les rates ZDF que es van obtenir a través de la cria selectiva de rates Zucker hiperglicèmiques presenten una mutació autosòmica en la maquinària transcripcional de les cèl·lules beta-pancreàtiques i símptomes de diabetis severa (Kleinert et al., 2018).

Els models monogenètics són útils per estudiar defectes genètics que generen obesitat. En referència als models monogenètics induïts, actualment, la tecnologia d'edició genètica fa possible l'estudi detallat en rosegadors de pràcticament qualsevol mutació genètica obesogènica o potencialment obesogènica que es vulgui estudiar (Kleinert et al., 2018). Per proporcionar un exemple, en l'estudi de

Fernández-Gayol et al. (2019) es va usar un model genètic de ratolins en el que es va generar un KO condicional de IL-6 en neurones, de manera que el KO de IL-6 protegeix completament a les femelles dels efectes d'una dieta alta en grasses, però no als mascles. Aquest estudi proporciona un exemple d'un model monogenètic induït.

Els models poligenètics d'obesitat es basen principalment en diferències individuals en quant a la resistència o predisposició innata a l'obesitat que mostren els animals d'una mateixa soca (Kleinert et al., 2018). Un exemple és la soca de rata Sprague-Dawley, en la qual una alimentació alta en grasses provoca que aproximadament el 50% dels animals desenvolupin obesitat (Levin et al., 1987). Aquestes diferències es deuen a que els animals predisposats a l'obesitat presenten una sensibilitat a la insulina i la leptina reduïda a nivell del sistema nerviós central que és detectable abans de que aparegui l'obesitat (Clegg et al., 2005; Levin & Dunn-Meynell, 2002).

ii. Models de lesions obesogèniques

Els models d'obesitat bastats en lesions es centren principalment en lesionar àrees del SNC, principalment de l'hipotàlem ventromedial i lateral, que intervenen en la regulació de la ingesta o del pes corporal (Kleinert et al., 2018). Aquestes lesions generen efectes importants i a l'inici de ser utilitzades van permetre identificar l'hipotàlem com a una regió clau en el control del metabolisme, la ingesta i el pes corporal (Albert et al., 1971; Hoebel, 1965). En l'actualitat les tècniques emprades es centren en la disrupció genètica dirigida de poblacions neuronals específiques (King, 2006).

iii. Models d'obesitat induïda per la dieta

L'altre gran grup de models animals per l'estudi de l'obesitat són els models d'Obesitat Induïda per la Dieta (OID). És considera que aquests models tenen una validesa aparent major que els models genètics i de lesions per estudiar l'obesitat humana (Nilsson et al., 2012). Si el gran increment en la prevalença de l'obesitat en humans en els últims anys és independent de canvis genètics, l'estudi de l'obesitat en models no genètics sembla més adequada que la utilització de models genètics.

Els models OID es centren en l'administració de dietes obesogèniques (altes en carbohidrats i/o en grasses; high-sugar diets, HSD; i high-fat diets, HFD). Aquests

models presenten diverses característiques semblants al desenvolupament de l'obesitat en humans, com ara una ingesta hipercalòrica, un desenvolupament gradual de l'obesitat i un desenvolupament natural dels problemes associats com per exemple la resistència a la insulina (Kleinert et al., 2018). A l'hora d'utilitzar aquests models hi ha diversos aspectes a considerar, com ara la soca, el sexe, l'edat i la dieta a administrar.

Diferents soques de rates responen de forma diferent a les dietes. Amb l'excepció de soques seleccionades genèticament per presentar resistència a l'OID, les rates desenvolupen obesitat, però en funció de la soca utilitzada l'obesitat pot ser més o menys severa. Per exemple, 20 setmanes d'alimentació amb una dieta alta en grasses provoca un augment de pes corporal del 50% en la soca Wistar, però només d'un 25% en la soca Sprague-Dawley (Schemmel et al., 1970).

Un altre factor a tenir en compte és el sexe dels animals. Sorprenentment a dia d'avui hi ha un nombre molt reduït de bibliografia que compari els efectes del sexe en el desenvolupament de l'OID. Sembla que el desenvolupament de l'obesitat és molt més marcat en mascles que en femelles quan s'administren dietes altes en grasses, degut a que els mascles consumeixen més grasses que les femelles (Maric et al., 2022). En canvi, si s'utilitzen dietes altes en carbohidrats simples, les femelles presenten una resposta hiperfàgica major que els mascles i un guany de pes també major (Eckel & Moore, 2004).

En els models d'OID també s'ha de considerar el tipus de dieta administrada. Tradicionalment, molts d'estudis s'han fet amb dietes que consisteixen en l'administració de pellets amb un contingut alt en grasses i/o carbohidrats i/o sucres i que s'administren de forma semblant a la dieta de manteniment estàndard (Lalanza & Snoeren, 2021). Aquests dissenys esdevenen un model amb validesa aparent en què els animals desenvolupen obesitat a través de la ingesta d'una dieta hipercalòrica (Small et al., 2018) de manera similar a com ocorre en els humans. L'avantatge principal que tenen aquestes dietes a l'hora d'estudiar l'obesitat és un alt nivell de control sobre la ingesta dels animals ja que la composició dels pellets administrats és homogènia, la qual cosa contribueix a augmentar la reproductibilitat dels experiments. Aquest avantatge però pot ser un inconvenient si es volen considerar altres variables que intervenen en el desenvolupament de l'obesitat en humans. Per exemple, els humans no segueixen aquest patró de ingesta

basat en un sol aliment, necessiten varietat. Tampoc basen la seva tria exclusivament en la composició de macronutrients que té cada aliment, sinó també tenen en compte altres aspectes molt rellevants com la seva palatabilitat, olor, textura o experiències prèvies (Mccrickerd & Forde, 2016). Addicionalment, en estudis d'OID en que s'usen dietes altes en grasses i/o sucres en format de pellet es pot observar una hipofàgia a llarg termini que pot ser deguda a la manca de varietat en la dieta (Lalanza & Snoeren, 2021). Aquests problemes fan que els models d'OID, tot i la seva validesa aparent, no siguin representatius de tots els factors implicats en el procés a partir del qual els humans esdevenen obesos.

- Dieta de cafeteria

A mitjans de la dècada de 1970 es van començar a realitzar els primers estudis amb un tipus de dieta que més endavant es va anomenar dieta de cafeteria (Sclafani & Springer, 1976). En aquestes dietes el pinso estàndard es suplementa amb varis aliments preparats pel consum humà, com poden ser snacks, galetes, bacó, formatge, pastissos, paté, laminadures, etc... Aquestes dietes segueixen tenint un component obesogènic ja que la seva composició de macronutrients és alta en grasses i en sucres, i no generen la hipofàgia de les dietes de pellets ja que els aliments són variats i saborosos. A més a més de mantenir la validesa aparent de les dietes altes en grasses i/o sucres, les dietes de cafeteria introdueixen la validesa de constructe ja que incorpora el factor hedònic, el qual s'ha relacionat també amb el desenvolupament de l'obesitat en humans (Lalanza & Snoeren, 2021).

Des dels primers estudis amb dieta de cafeteria han aparegut i se n'han fet servir diverses modalitats. Les diferències principals entre elles són el nombre d'ítems que les componen, i si aquests ítems s'administren tots alhora cada dia, o agrupats de 5 en 5 (de 4 en 4 o de 6 en 6, o altres combinacions depenent dels estudis) al llarg de diferents dies de forma rotativa. Es poden trobar estudis que utilitzen dietes de tres ítems (Kendig et al., 2016) fins a dietes de 96 ítems presentats de forma rotativa (Palframan & Myers, 2016). De mitjana, una dieta de cafeteria típica consisteix en 8-9 ingredients. És important que contingui una barreja d'ingredients alts en grasses i en sucres, així com aliments salats i altament saborosos amb l'objectiu d'augmentar la ingesta dels animals (Lalanza & Snoeren, 2021). Afegir un component rotatiu a la dieta de cafeteria pot ajudar a augmentar la varietat de productes presentats i a mantenir el component de novetat per mantenir una ingesta elevada. Tot i això, la

hiperfàgia també es pot aconseguir presentant sempre els mateixos aliments (Cigarroa et al., 2016; Subias-Gusils et al., 2021 a,b). Com ja s'ha comentat, la dieta de cafeteria afegeix validesa de constructe als estudis d'OID, però la gran variabilitat de protocols utilitzats per diferents laboratoris disminueix la reproductibilitat dels resultats. Recentment s'han fet esforços per intentar generar una dieta de cafeteria estandarditzada tenint en compte la palatabilitat dels ingredients, la novetat i la varietat de productes (Lalanza & Snoeren, 2021).

En estudis en que s'ha comparat la dieta de cafeteria amb altres dietes obesogèniques basades en l'administració dels pellets anteriorment comentats, s'ha determinat que els efectes de la dieta de cafeteria són més severos. En un estudi en que es va comparar una exposició de 15 setmanes amb dieta de cafeteria amb una dieta alta en grasses, la dieta de cafeteria va resultar en una ingesta calòrica i en un pes corporal aproximadament un 20% major, així com en un augment més elevat de la glucèmia, l'adipositat i la infiltració de macròfags al teixit adipós, indicativa del desenvolupament de processos inflamatoris (Sampey et al., 2011). En un altre estudi en que es va comparar una intervenció de 10 setmanes amb dieta de cafeteria o amb dieta alta en grasses i sucres també es va detectar una ingesta calòrica i un pes un 20% major en els animals alimentats amb dieta de cafeteria, resultant en una adipositat i uns nivells de leptina més elevats a més a més de disbiosis (Gual-Grau et al., 2019).

Per tant, l'obesitat induïda per dieta de cafeteria no només pot presentar més validesa aparent i de constructe com a model de l'obesitat humana, sinó que a més indueix efectes més severos que altres models.

1.5. Models animals d'exercici físic

Varis models d'exercici físic s'han utilitzat per estudiar els efectes de l'exercici aeròbic en rosegadors. Entre aquests, els més utilitzats són el model d'exercici al tapís rodant i el model en rodes d'activitat (Feng et al., 2019). Aquestes dues intervencions presenten diferències notables, entre les quals es poden destacar el control que es té sobre el protocol d'exercici, el nivell i tipus d'estrès que generen en els animals, i la similitud amb les conductes humanes d'exercici.

En referència al control que es té sobre el protocol d'exercici, el tapís rodant ofereix una controlabilitat major, ja que la durada, la freqüència, i la intensitat de

l'exercici que fan els animals es pot fixar, de manera que aquests paràmetres siguin els mateixos en tots ells i per tant garantint que tots fan el mateix programa d'exercici. En canvi, en les rodes d'activitat que es col·loquen dins la gàbia, cada animal decideix quan fa exercici i quant exercici fa (Leasure & Jones, 2008). D'altra banda, com que l'animal no pot entrar i sortir del tapís rodant per ell mateix i sí que ho fa de la roda, al model de la roda d'activitat se'l coneix com a exercici voluntari i al del tapís rodant exercici forçat. Tot i que la controlabilitat estigui en general associada al tapís rodant, també es poden dissenyar intervencions d'exercici físic forçat en animals amb rodes d'activitat motoritzades (Greenwood et al., 2013).

El tapís rodant i les rodes d'activitat també generen un estrès diferent en els animals. Es considera que el tapís rodant genera uns nivells d'estrès més elevats que la roda d'activitat. Això és deu a que, a part de l'estrès fisiològic associat a l'exercici físic en sí mateix, en alguns estudis s'ha detectat que l'exercici forçat al tapís rodant en sessions puntuals i en períodes curts de temps induïx nivells de corticosterona més elevats que el voluntari (Uysal et al., 2015). Aquest estrès psicològic augmenta amb la intensitat de l'exercici, especialment si es fa servir estimulació elèctrica aversiva per a motivar els animals, cosa que els augmenta l'ansietat (Khataei et al., 2021).

En relació a la similitud amb les conductes humanes, les rodes d'activitat ofereixen als animals la llibertat de fer exercici de forma voluntària, i amb la durada i intensitat que vulguin. Això és més semblant a com la majoria de persones fan activitat física de forma lúdica. D'altra banda, l'exercici de caràcter forçat que es fa al tapís rodant, sembla més adequat per modelar l'exercici físic que fan les persones a qui no agrada fer-ne però se'ls ha recomanat per prescripció mèdica (Greenwood et al., 2013).

A l'hora de determinar quina modalitat d'exercici es fa servir en un estudi amb animals, un dels aspectes a considerar és si la intervenció és de caràcter aïllat o si es fa en conjunció amb una altre intervenció. En aquesta tesi, l'exercici el fan animals a qui prèviament s'ha induït obesitat a través de la dieta. En la bibliografia hi ha resultats contradictoris pel que fa als efectes de l'exercici en les rodes d'activitat en animals amb OID, de manera que en alguns estudis en rates una dieta alta en grasses induïx un augment de l'activitat voluntària (Mifune et al., 2015), mentre que en altres estudis s'ha descrit una reducció (Judge et al., 2008). Independentment de si

l'OID provoca un augment o una disminució de l'exercici voluntari a les rodes d'activitat, l'única manera d'assegurar que "la quantitat d'exercici" que fan tots els animals sigui la mateixa en durada, freqüència i intensitat, és fent servir el tapís rodant.

1.6. Obesitat i estrès i ansietat

Un dels processos afectats per l'obesitat és el desenvolupament de depressió i ansietat. En un estudi amb una població nord-americana de 177.047 pacients es va relacionar un BMI elevat amb diagnòstics de depressió i ansietat (G. Zhao et al., 2009). Un altre estudi amb 30.337 homes i dones entre 15 i 105 anys va relacionar un augment en el nombre de factors de risc metabòlic (hipertensió, hipertrigliceridèmia, baix colesterol HDL, hiperglucèmia, i proteïna C-reactiva elevada) amb un augment del risc de desenvolupar depressió (Jokela et al., 2014). En animals amb OID també s'ha detectat un augment de la conducta ansiosa i depressiva. En un estudi amb ratolins alimentats durant 12 setmanes amb una dieta alta en grasses el temps passat als braços oberts del laberint en creu elevat va disminuir i la immobilitat en el test de natació forçada va augmentar, indicant un augment de la conducta ansiosa i depressiva respectivament (Sharma & Fulton, 2013). D'altra banda, en rates alimentades amb dieta de cafeteria durant 16 setmanes es va detectar un resultat semblant al test de natació forçada, observant un augment de la immobilitat, indicant un augment en simptomatologia depressiva, mentre que no es van detectar efectes en la conducta ansiosa al laberint en creu elevat (da Costa Estrela et al., 2015). Aquest resultat negatiu en rates respecte la conducta ansiosa també ha estat replicat pel nostre grup després de 8 setmanes d'alimentació amb dieta de cafeteria en rates mascle adultes (Lalanza et al., 2014).

La relació entre obesitat i trastorns depressius i d'ansietat és de naturalesa recíproca, de manera que no només l'obesitat incrementa el risc de desenvolupar depressió, sinó que la depressió augmenta el risc de desenvolupar obesitat (Fulton et al., 2022). En condicions experimentals, tant en humans com en rosegadors, un estrès físic o emocional augmenta la ingesta d'aliments saborosos en individus saciats (Dallman, 2010). A més, s'ha demostrat que aquest augment de la ingesta d'aliments saborosos disminueix la resposta hormonal a un episodi d'estrès, com l'exposició a 30 minuts d'immobilització forçada, en termes d'alliberació de l'hormona hipofisària ACTH (la Fleur et al., 2005).

Aquest efecte de disminució de la resposta hormonal a l'estrès, juntament amb la manca d'afectació de la conducta ansiosa en animals alimentats amb dieta de cafeteria en comparació amb els efectes ansiogènics d'alimentació HFD, apunten a un efecte ansiolític o "anti-estrès" diferencial depenent de la palatabilitat de la dieta. De fet, els resultats d'un estudi fet al nostre laboratori amb animals joves indicaren que la dieta de cafeteria disminueix la conducta ansiosa al laberint en creu elevat i incrementa la conducta de joc (Lalanza et al., 2014).

i. Efectes de les intervencions dietètiques sobre l'estrès i l'ansietat

Degut a l'alta comorbiditat que presenten l'obesitat i els trastorns depressius i d'ansietat en humans, els possibles efectes pal·liatius de les intervencions dietètiques i d'exercici físic s'han estudiat extensivament. Els resultats de varis meta-anàlisis han demostrat una relació positiva entre una disminució de la simptomatologia depressiva i intervencions de restricció calòrica (Ein et al., 2019), intervencions dietètiques en general (Firth et al., 2019) i intervencions conductuals basades en canvis de dieta i augment de l'activitat física (Jones et al., 2021). Els resultats d'estudis sobre les conductes d'ansietat demostren una manca general d'efecte de les intervencions sobre la conducta ansiosa, de manera que els efectes de les intervencions orientades a perdre pes són més marcats a l'hora de pal·liar el perfil depressiu que l'ansiós. Tot i això, l'estudi de Firth et al., 2019 va analitzar de forma separada les dades obtingudes de 16 assajos clínics amb dades de 54.826 homes i dones entre 21 i 85 anys i va determinar que en dones una intervenció dietètica sí que pot tenir efectes positius sobre les conductes ansioses, i que els efectes positius sobre la conducta depressiva són més marcats que en homes.

Els efectes d'intervencions dietètiques altes o baixes en carbohidrats sobre símptomes de depressió i/o d'ansietat sembla que no són substancialment diferents, de manera que individus amb una dieta baixa en carbohidrats i alta en grasses, o bé alta en carbohidrats i baixa en grasses no mostren diferències en aquestes variables (Brinkworth et al., 2016; Halyburton et al., 2007). No obstant, hi ha estudis que reporten una millora més accentuada en indicadors de depressió i ansietat en individus amb una dieta alta en carbohidrats i baixa en grasses en comparació amb una dieta baixa en carbohidrats i alta en grasses (Brinkworth et al., 2009). El fet que els mateixos autors hagin obtingut resultats contradictoris en diferents estudis (Brinkworth et al., 2009, 2016) indica que si hi ha diferències entre intervencions

dietètiques, aquestes poden dependre de variables com les eines usades per determinar la simptomatologia depressiva, la intervenció específica usada en cada estudi i la presència o no de patologies associades a l'obesitat com la diabetis tipus 2.

ii. Efectes de l'exercici físic sobre l'estres i l'ansietat

En referència als efectes de l'exercici físic sobre la depressió i l'ansietat, en un meta-anàlisi recent de 117 assajos clínics publicats en els últims 35 anys, amb un total de 6456 participants, es van examinar els efectes de l'exercici físic sobre la salut mental i es va concloure que l'exercici físic aeròbic té un efecte positiu sobre la simptomatologia depressiva i d'ansietat, i sobre la salut mental en general. Addicionalment, l'exercici de resistència va exercir un efecte correctiu sobre el perfil depressiu més alt que l'aeròbic, tot i que aquest resultat es va obtenir a partir de només 2 assajos clínics. Els autors van concloure que tant l'exercici aeròbic com el de resistència així com una intervenció mixta tenen efectes positius sobre la salut mental, que una intervenció mixta és la teràpia més efectiva per millorar la simptomatologia depressiva, i que l'exercici de resistència és el més efectiu per millorar l'ansietat (Q. Yu et al., 2022).

Aquests resultats indiquen per tant que les intervencions d'exercici físic tenen un efecte notable sobre l'ansietat, a diferència de les intervencions dietètiques. Només s'ha trobat un estudi en el que es determinen els efectes d'ambdós tipus d'intervenció sobre l'ansietat. En aquest estudi es van reclutar 74 dones xineses amb sobrepès i es va dur a terme una intervenció combinada amb una dieta baixa en carbohidrats (aproximadament 50gr de carbohidrats diaris) i d'exercici aeròbic intens en bicicletes estàtiques 5 dies a la setmana. Les mesures d'ansietat es van realitzar després de 4 setmanes d'intervencions a través de qüestionaris. Els resultats van indicar que la intervenció dietètica tota sola no té efectes significatius sobre l'ansietat, mentre que la mateixa intervenció combinada amb exercici sí millora l'ansietat, indicant que l'exercici pot exercir una funció d'adjuvant a les intervencions dietètiques (M. Hu et al., 2022).

iii. Obesitat i eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA)

L'obesitat i la ingesta d'aliments saborosos també afecten la funció de l'eix HPA. Aquest eix s'activa en resposta a una situació d'estrès amb l'objectiu de generar canvis adaptatius que ajudin a mantenir l'equilibri homeostàtic i fer una resposta

conductual adequada davant l'estímul estressant (Pervanidou & Chrousos, 2016). L'activació de l'eix HPA s'inicia al PVN, on convergeixen i s'integren diversos senyals que informen sobre amenaces externes a l'organisme i sobre l'estat fisiològic intern per tal de generar la resposta adequada (Jiang et al., 2019). Aquesta resposta consisteix en la secreció de l'hormona alliberadora de la corticotropina (CRH) des de la porció parvocel·lular medial dorsal del PVN (PVNmpd) al sistema portal hipofisari (Kovács, 2013). La CRH arriba a l'adenohipòfisi on estimula les cèl·lules corticotropes que sintetitzen i alliberen l'hormona adenocorticotropa (ACTH) al torrent sanguini. L'ACTH viatja fins a la glàndula adrenal on actua sobre el còrtex adrenal a través de la unió amb el receptor de melanocortina tipus 2 amb el que s'inicia una cascada que culminarà amb l'alliberació de glucocorticoides (Armario, 2006).

Els efectes de l'obesitat sobre els nivells de glucocorticoides en circulació són contradictoris (Incollingo Rodriguez et al., 2015). En humans, hi ha varies mesures que permeten determinar els nivells de cortisol, com ara la resposta de cortisol salival al despertar i la producció total diària de cortisol. Les contradiccions es veuen en la resposta de cortisol salival al despertar, de manera que hi ha estudis que indiquen una relació negativa amb l'obesitat, amb més obesitat i menys cortisol salival (Champaneri et al., 2013; Ranjit et al., 2005; Ursache et al., 2012), mentre altres indiquen una relació positiva, amb més obesitat i més cortisol salival (Therrien et al., 2007; Wallerius et al., 2003). Resultats semblants es troben a l'estudiar la producció total diària de cortisol, de manera que alguns indiquen hipocortisolèmia en persones obeses (Travison et al., 2007; Vicennati & Pasquali, 2000) mentre que altres indiquen hipercortisolèmia (Purnell et al., 2004; Rask et al., 2002).

En l'última dècada la mesura de corticosterona en pèl ha guanyat popularitat. Aquesta mesura permet determinar els nivells de cortisol d'un individu d'una manera integral, a llarg termini (mesos), a diferència de les mesures explicades anteriorment que es basen en determinacions a molt curt termini (hores), les quals normalment estan influïdes per diversos paràmetres com ara l'activitat motora, l'alimentació o l'estat emocional. L'estudi del cortisol en pèl ha revelat una associació positiva entre l'obesitat i la cortisolèmia a llarg termini (Abell et al., 2016; Stalder et al., 2017; van der Valk et al., 2021). Tot i això, aquesta relació es considera

poc robusta, de manera que l'augment de cortisol en obesitat és lleuger (van der Valk et al., 2021). En models animals d'OID també s'ha determinat que l'alimentació alta en grasses durant 4 setmanes indueix un augment en els nivells de corticosterona en pèl (Teeple et al., 2023).

Una altra variable important per estudiar com l'obesitat afecta la funció de l'eix HPA és la resposta de cortisol a un estímul estressant. Els resultats són molt més consistents a la literatura que els resultats de cortisolèmia basal (Incollingo Rodriguez et al., 2015). En individus obesos, el nivell d'estrès físic o emocional generat pel dia a dia dels individus i determinat a través d'un qüestionari genera un augment de la cortisolèmia major que en individus normopes (Rosmond et al., 1998). Addicionalment, també s'ha determinat que l'obesitat abdominal genera un augment de cortisol en resposta a l'estrès més gran que l'obesitat perifèrica. Aquest resultat es va relacionar amb la coexistència d'alteracions provocades per l'obesitat abdominal com ara la hiperinsulinèmia basal (Vicennati & Pasquali, 2000).

iv. Concepte de menjar de confort o *comfort food*

Com s'ha comentat anteriorment, una de les principals causes del augment de la prevalença de l'obesitat en les últimes dècades és l'augment de la disponibilitat d'aliments saborosos i altament calòrics. S'ha determinat que un estímul estressant augmenta la ingesta d'aquests aliments (Groesz et al., 2012; Tryon et al., 2013). Aquest fenomen es pot interpretar com a una automedicació amb l'objectiu d'aconseguir els efectes ansiolítics de l'alimentació saborosa (Dallman et al., 2005). Aquest canvi en la ingesta degut a un estímul estressant ha fet que aquests aliments saborosos i calòricament densos es considerin menjar de confort o *comfort food* (Ulrich-Lai et al., 2015). Aquest terme reflexa la idea de que els aliments saborosos tenen un efecte ansiolític i de reducció de l'estrès en ser capaços de reduir la resposta de cortisol a un estímul estressant (Markus et al., 2000). Els efectes de la alimentació saborosa sobre una situació d'estrès emocional experimental, com un simulacre d'entrevista de feina, es va determinar en 85 homes i dones normopès de 18 a 49 anys, i els resultats van indicar que una alimentació que els participants classifiquen com a saborosa abans de l'estímul estressant redueix la resposta de cortisol (McKay et al., 2021).

1.7. Efectes de la ingesta i l'obesitat sobre la funció gustativa

Es considera que la sensibilitat i la intensitat de les sensacions gustatives canvien amb la composició de la dieta (May & Dus, 2020). Una de les primeres evidències que es va tenir d'aquest fenomen en humans és el fet que una dieta baixa en sodi genera a llarg termini una preferència major per concentracions baixes de sodi (Bertino et al., 1982). De forma similar, una ingesta alta en grasses resulta en un augment dels llindars de detecció per grasses, de manera que es pot desenvolupar a llarg termini una disminució de la resposta sensitiva a les grasses així com una ingesta excessiva d'aquestes (Heinze et al., 2018). Un fenomen semblant també ocorre amb la ingesta de sucres, de manera que una ingesta baixa en sucres augmenta la intensitat sensorial percebuda (Wise et al., 2016). Aquests resultats indiquen que la ingesta habitual d'un individu modula la seva percepció gustativa. Cal remarcar que aquest fenomen és independent de l'obesitat ja que aquests estudis es van realitzar en individus no obesos (Bertino et al., 1982; Heinze et al., 2018; Wise et al., 2016).

Tot i que la ingesta pugui modificar la percepció gustativa independentment de la composició corporal, l'obesitat en sí mateixa també té efectes sobre la funció gustativa. Els estudis mostren que els individus obesos experimenten els estímuls dolços de forma menys intensa, encara que la seva avaluació hedònica d'aquests estímuls és més intensa (Bartoshuk et al., 2006). Addicionalment, individus no obesos disminueixen la seva avaluació hedònica de concentracions de glucosa superiors a 1M (180 g/L), mentre que individus obesos l'augmenten (Rodin et al., 1976). Cal remarcar però, que l'estudi de la funció gustativa en humans presenta una alta heterogeneïtat metodològica, de manera que hi ha estudis que mostren una afectació sobre el gust en individus obesos, mentre que altres reporten una manca d'efecte (Ribeiro & Oliveira-Maia, 2021). Aquesta heterogeneïtat metodològica prové dels diferents tests que s'usen per a l'estudi de la funció gustativa. Hi ha dues estratègies complementàries: la primera tracta la intensitat sensorial com a un concepte binari, de manera que el tastant s'identifica com a present o absent; la segona considera la intensitat d'un estímul com a un constructe continu. L'estratègia binària s'usa principalment per la detecció del llindar de detecció (concentració mínima a la que es detecta l'estímul). Hi ha varis tests que usen aquesta estratègia binària: (i) el mètode dels límits, en que varies concentracions es presenten de forma ascendent i el llindar es defineix com a la concentració mínima

a la que es detecta l'estímul (Lawless, 2010); (ii) l'escala de decisió forçada entre dues alternatives, on es presenten varies parelles d'estímuls (aigua i tastant), inciant-se el test presentant aigua i el tastant a una concentració a la que es pot detectar, per posteriorment disminuir la concentració del tastant fins que l'individu no es capaç de discriminar entre l'aigua i el tastant (Cornsweet, 1962); (iii) l'escala amunt-avall, on es presenten varies concentracions de tastant, i quan un estímul s'identifica positivament es presenta una concentració menor, mentre que quan no s'identifica es presenta una concentració major (A. B. Watson, 1983).

La segona estratègia considera la percepció com a un continu. En aquesta categoria es troben: (i) l'estimació de magnitud, en aquest test els subjectes es presenten amb varies concentracions de tastant i han d'atribuir un nombre sense una referencia prèvia a la intensitat percebuda de l'estímul (Stevens, 1956); (ii) l'escala de categories, on es demana als subjectes que atribueixin un nombre (generalment, 1 = absència de tastant i 9 = gust extrem) a varies concentracions de tastant (Peryam, 2017); (iii) l'escala de magnitud o hedònica marcada general, que s'usa tant per mesurar intensitat de l'estímul com avaluació hedònica, i que consisteix en una sèrie de concentracions en les que hi ha una àncora superior (sensació mes forta imaginable o avaluació hedònica mes alta experimentada), una àncora inferior (intensitat tot just detectable o avaluació hedònica més baixa experimentada), i varies concentracions intermèdies (Green et al., 1996; Lim et al., 2009).

En models animals d'OID també es detecten alteracions en la conducta apetitiva i en l'avaluació hedònica que fan els animals a un estímul dolç. En rates hi ha varis tests que s'usen per determinar la funció gustativa. Entre aquests tests destaquen: (i) el test de preferència, on es presenten dues ampolles, generalment una amb aigua i l'altra amb una concentració del tastant, i que es pot usar per determinar la conducta apetitiva i també com una mesura d'anhedònia (M. Y. Liu et al., 2018); (ii) el test de reactivitat al tast, on es mesuren les conductes oro-facials generades per un tastant, i que es pot usar per determinar l'avaluació hedònica associada a un estímul (Berridge, 2000, 2009); (iii) el test d'accés curt, on es presenten varies concentracions del tastant durant un període de temps limitat, essent un dels tests més complets ja que permet realitzar una mesura addicional de la conducta

apetitiva, a més de proporcionar informació sobre la palatabilitat percebuda (Johnson, 2018; G. P. Smith, 2001).

Els estudis amb models d'OID duts a terme amb rates en que s'ha determinat la conducta relacionada amb el gust dolç indiquen que una alimentació alta en grasses durant 16 setmanes provoca un canvi en l'avaluació hedònica que fan els animals a diferents concentracions, de manera que aquesta avaluació disminueix per concentracions baixes i augmenta per concentracions altes. Addicionalment també es detecta una disminució en la conducta apetitiva, de manera que l'esforç que els animals estan disposats a fer per aconseguir la recompensa disminueix a concentracions baixes (Shin et al., 2011). Un altre estudi en que es va administrar dieta CAF durant 12 setmanes també va determinar un augment de la preferència per concentracions altes, una disminució de la conducta apetitiva amb un augment de la latència a interaccionar amb l'estímul, i una ingesta menor que els animals control (Fam et al., 2022).

Cal remarcar que els estudis més complets duts a terme sobre els efectes de l'OID en la funció gustativa s'han dut a terme majoritàriament amb rates mascles adults, i no s'ha trobat cap estudi que proporcioni una comparativa directe entre sexes, de manera que, mentre que els efectes en mascles estan relativament ben caracteritzats, hi ha poca bibliografia sobre els efectes en femelles.

i. Leptina i gust dolç

Un dels mecanismes implicats en els efectes de l'obesitat sobre el gust dolç és la senyalització leptinèrgica. El receptor de la leptina està present tant en les cèl·lules sensorials de la llengua que detecten els estímuls dolços (Gutierrez et al., 2020), com al sistema de recompensa mesocorticolímbic, on aproximadament dues tercers part de les neurones que expressen el receptor de leptina a l'àrea tegmental ventral són dopaminèrgiques (de Vrind et al., 2021). En estudis amb rosegadors s'ha demostrat que l'administració de leptina indueix en les cèl·lules sensorials T1R2/3 (heterodímer de T1R2 i T1R3 que componen el receptor del gust dolç) positives un augment dels corrents de potassi, la qual cosa genera una hiperpolarització de la membrana, i fa que sigui necessari un estímul més potent per generar un potencial d'acció (Yoshida et al., 2015). La leptina també ha demostrat tenir un efecte supressor sobre la resposta del nervi de la corda timpànica a l'estímul dolç (Kawai

et al., 2000). Aquests dos efectes podrien implicar que la leptina genera una disminució de la intensitat a la que es percep un estímul dolç.

En humans també s'ha descrit aquesta funció de la leptina com a moduladora de la funció gustativa. Els nivells de leptina en saliva en individus amb normopès segueixen un cicle circadiari, de manera que comencen a augmentar al migdia i arriben al punt màxim cap a la mitjanit, per després disminuir fins al matí (Randeve et al., 2003). Aquest cicle circadiari de la leptina es pot modificar canviant el nombre d'àpats, de manera que si s'elimina el primer àpat del dia (esmorzar), els nivells de leptina comencen a augmentar al següent àpat (dinar), i si s'eliminen el primer i el segon àpat (esmorzar i dinar), aquests nivells comencen a augmentar també quan es fa el següent àpat (sopar) (Nakamura et al., 2008). En individus amb normopès, els llimars de detecció per substàncies dolces estan associats als nivells circulants de leptina, de manera que en un cicle normal de 3 àpats, els llimars de detecció segueixen el cicle circadiari de la leptina, i si aquest cicle es modifica, els llimars de detecció també ho fan (Nakamura et al., 2008).

En un estudi amb 36 homes i dones amb obesitat es va determinar que aquesta relació entre els nivells circadianis de leptina i els llimars de detecció per a les substàncies dolces present en individus normopès es perd en individus obesos (Sanematsu et al., 2018). En estudis *in vitro* amb cèl·lules sensorials T1R3-positives de ratolí s'ha determinat que l'efecte supressor de la leptina sobre el gust dolç presenta un efecte sostre (Yoshida et al., 2015). En individus obesos s'ha hipotetitzat que els nivells basals de leptina són suficients per generar una supressió màxima sobre els receptors del gust dolç, de manera que variacions en els nivells de leptina no tindrien un efecte sobre el gust dolç (Sanematsu et al., 2018).

Aquests estudis proporcionen evidències sòlides de la relació de la leptina amb la palatabilitat del gust dolç i les alteracions que poden haver en condicions d'obesitat. Tot i això, els efectes que tenen les intervencions dietètiques i l'exercici sobre el gust dolç en condicions d'obesitat estan molt poc estudiades.

1.8. Obesitat, intervencions dietètiques i d'exercici, i funció cognitiva

L'obesitat també està relacionada amb la funció cognitiva. Una cerca recent a la base de dades PubMed amb les paraules clau "Obesity" i "Cognition" mostra més de 10.000 resultats.

En estudis en els que s'ha induït l'obesitat a través de dieta CAF s'ha detectat un dèficit en el laberint aquàtic de Morris, de manera que els animals obesos aprenen la tasca pitjor que els animals control i presenten menys memòria sobre a quin quadrant del test està situada la plataforma (Ferreira et al., 2018; Lewis et al., 2019). Un resultat semblant sobre la memòria espacial també s'ha obtingut utilitzant un test de reconeixement de localització, de manera que els animals CAF presenten una capacitat reduïda de recordar la localització d'un objecte en un camp obert (Kendig et al., 2019). Tot i que l'obesitat en sí estigui relacionada amb el dèficit cognitiu i amb un augment del pes corporal i de l'adipositat (Ferreira et al., 2018; Kendig et al., 2019; Lewis et al., 2019), en altres estudis s'ha detectat que l'administració aguda de dieta alta en grasses durant 7 dies no genera un augment del pes corporal, però sí que disminueix la capacitat de recordar la localització d'un objecte en el camp obert (Khazen et al., 2019). Cal remarcar que tots aquests experiments s'han dut a terme amb mascles i que els pocs estudis fets amb ambdós sexes sobre els efectes de l'OID indiquen que les femelles presenten una resistència major que els mascles als efectes sobre la funció cognitiva (Mezo-González et al., 2022). Tot i això, l'estudi en femelles de l'efecte de la dieta CAF sobre la funció cognitiva és molt limitat.

En humans una relació semblant entre obesitat i memòria també està documentada (Loprinzi & Frith, 2018), de manera que hi ha una relació negativa entre el pes corporal i el IMC, i la memòria episòdica. En humans, un augment del IMC s'ha relacionat amb una disminució de la funció cognitiva, de manera que individus amb un IMC major presenten més dificultat per aprendre una llista de paraules i per recordar-les (Cournot et al., 2006). Així mateix, també s'ha reportat una disminució en memòria episòdica, de manera que individus amb un IMC major recordaven menys informació sobre certs objectes i la seva localització (Cheke et al., 2016).

i. Efectes de les intervencions sobre la funció cognitiva

Els efectes de les intervencions dietètiques sobre la funció cognitiva en individus obesos sans es van recollir en un meta-anàlisi recent (McEvoy et al., 2019). que inclou 15 assajos clínics en que es va dur a terme una intervenció dietètica a llarg termini (de 6 mesos a 8 anys), i dades de 9000 persones entre 18 i 80 anys. L'estudi va concloure que amb les intervencions hi havia millora en funció cognitiva global, en funció executiva i en velocitat de processament, però no en memòria. En un altre

estudi, fet en individus obesos d'edat avançada (més de 60 anys) amb dèficit cognitiu, una intervenció dietètica de restricció calòrica durant un any va disminuir el IMC, i aquesta disminució es va associar a una millora en la memòria verbal, la fluïdesa verbal i la funció executiva (Horie et al., 2016). Aquests resultats són consistents amb els d'altres estudis fets en humans (Espeland et al., 2018; Peven et al., 2020; Soldevila-Domenech et al., 2021) i en animals (Grayson et al., 2014; Rojic-Becker et al., 2019, 2021).

Els efectes de l'exercici físic sobre la funció cognitiva s'han estudiat en gent gran amb l'objectiu de determinar si l'exercici té un efecte protector sobre les alteracions cognitives associades a l'envelliment. S'han dut a terme diversos meta-anàlisis analitzant els efectes de l'exercici sobre la memòria, la flexibilitat cognitiva i la funció cognitiva global, i de forma consistent s'ha obtingut un resultat positiu, independentment de la modalitat d'exercici estudiada (Gallardo-Gómez et al., 2022; Sanders et al., 2019; Wilke et al., 2019; Xiong et al., 2021). D'aquests estudis es pot concloure que l'exercici de resistència sembla tenir un efecte més marcat que les altres modalitats (Gallardo-Gómez et al., 2022; Wilke et al., 2019), i que aquest efecte no presenta una relació dosi-resposta marcada, de manera que la durada de les sessions d'exercici no afecta de forma important els resultats (Sanders et al., 2019).

Tot i que els efectes de l'exercici sobre la cognició s'han estudiat extensivament, la bibliografia en persones obesess amb una intervenció dietètica és limitada i només s'ha trobat un assaig clínic en el que es comparen els efectes d'una intervenció dietètica i els d'una intervenció d'exercici soles i combinades (Napoli et al., 2014). En aquest estudi es van reclutar 107 individus obesos (IMC major de 30) d'edat avançada (més de 65 anys) i amb un estil de vida sedentari. Aquestes persones es van distribuir en grups per tal de determinar els efectes de: 1) una restricció calòrica diària de 500-750 kcal, 2) una intervenció d'exercici físic aeròbic i de resistència, amb sessions supervisades de 90 minuts 3 dies a la setmana, i 3) una combinació d'ambdues intervencions. Aquestes intervencions es van mantenir durant 1 any. Els resultats indiquen que la intervenció d'exercici físic té efectes majors sobre la funció cognitiva global, mesurada a través del test *Modified Mini-Mental State Examination, 3MS*, que analitza components d'orientació, registre, atenció, llenguatge i memòria immediata i diferida, que la intervenció dietètica, i que la combinació de les dues intervencions no té efectes majors que la intervenció d'exercici per si sola.

En models animals d'OID els efectes d'una intervenció combinada amb un tractament dietètic i d'exercici físic sobre la funció cognitiva també estan poc estudiats. S'ha descrit que la combinació d'un tractament dietètic (canvi de dieta alta en grasses a dieta de manteniment) i d'exercici al tapís rodant (25m/min, durant 15 minuts, 5 dies a la setmana durant 6 setmanes) en rates obesas és més efectiva que les intervencions soles a l'hora de revertir els efectes de l'obesitat sobre la tasca de reconeixement d'objectes (Pratchayasakul et al., 2022). En canvi, en un altre estudi on també es van combinar una intervenció dietètica (canvi de dieta alta en grasses a dieta de manteniment) i una intervenció d'exercici físic al tapís rodant (14m/min, durant 1h, 5 dies a la setmana durant 8 setmanes) en rates obesas, la intervenció combinada no va resultar en una millora significativa en el laberint aquàtic de Morris comparada amb l'exercici sol, mentre que sí va generar efectes positius comparada amb la intervenció dietètica sola (Woo et al., 2013). Aquestes diferències poden ser degudes al test utilitzat, la funció cognitiva que es vol determinar i la tasca de memòria subjacent, ja que en el primer estudi citat es du a terme en un laberint aquàtic que mesura capacitat d'orientació espacial i en l'altre, un test de reconeixement d'objectes nous que mesura la identificació d'objectes nous respecte objectes coneguts en una exposició anterior. A més, les intervencions d'exercici d'ambdós estudis també difereixen, de manera que en el primer es va usar una intensitat de 25m/min, que es pot considerar una intervenció d'alta intensitat, (Pratchayasakul et al., 2022), mentre que en el segon se'n va usar una de 14m/min, considerada d'intensitat moderada (Woo et al., 2013)..

2. Hipòtesis i Objectius

La hipòtesis d'aquest treball és que una intervenció dietètica basada en una dieta de cafeteria restringida en calories administrada sola o combinada amb una intervenció d'exercici físic d'intensitat moderada al tapís rodant, reverteix, al menys parcialment, les alteracions a nivell biomètric, metabòlic i conductual de l'obesitat induïda amb una dieta de cafeteria en rates Long-Evans.

L'objectiu general que es planteja per tal de validar o descartar aquesta hipòtesi consisteix en avaluar en rates mascle i femella amb obesitat induïda per dieta de cafeteria, l'eficàcia d'un tractament dietètic i d'una intervenció d'exercici físic sobre marcadors de síndrome metabòlica, sobre la conducta ansiosa i funció de l'eix HPA, i sobre la conducta relacionada amb la ingesta de solucions de sucrosa.

Els objectius específics són:

1. Determinar els efectes del tractament dietètic i de la intervenció d'exercici físic sobre les mesures biomètriques, la composició corporal, la ingesta alimentària i els paràmetres metabòlics relacionats amb l'obesitat.
2. Avaluar els efectes del tractament dietètic i de la intervenció d'exercici físic sobre l'activitat locomotora basal, la conducta exploratòria, la conducta ansiosa i la funció de l'eix HPA.
3. Determinar els efectes del tractament dietètic i de la intervenció d'exercici físic sobre la conducta apetitiva i hedònica relacionada amb el gust dolç.
4. Avaluar els efectes del tractament dietètic i de la intervenció d'exercici físic sobre la conducta de reconeixement d'objectes nous i canvis de localització.

3. Resultats

3.1. Capítol 1: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates mascle sobre la conducta exploratòria, la conducta ansiosa, l'activitat locomotora basal i l'eix HPA.

Els continguts d'aquest capítol han sigut publicats amb data 15 de Novembre de 2022 a la revista Scientific Reports en l'article titulat "Restrictive cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats". La referència completa d'aquest article és: Alvarez-Monell A, Subias-Gusils A, Mariné-Casadó R, Belda X, Gagliano H, Pozo OJ, Boqué N, Caimari A, Armario A, Solanas M, Escorihuela RM. Restricted cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats. Sci Rep. 2022;12(1):19545. doi:10.1038/s41598-022-23464-7.

En aquest estudi es van dur a terme un test d'activitat basal o actimetria (*Home Cage Activity*, HCA), un test de la taula de forats (*Hole Board*, HB) i un test en el laberint en creu elevat (*Elevated Plus Maze*, EPM) amb l'objectiu d'analitzar l'activitat locomotora basal, l'activitat exploratòria i la conducta ansiosa respectivament. Així mateix va estudiar l'eix HPA mitjançant la determinació dels nivells de corticosterona i hormona adenocorticotropa (ACTH) basals i en resposta a una situació d'estrès moderat, com és l'exposició a un ambient nou (durant 15 minuts al HB), així com dels nivells de corticosterona en pèl amb l'objectiu d'estudiar aquest eix hormonal a llarg termini.



OPEN Restricted cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats

Adam Alvarez-Monell^{1,2}, Alex Subias-Gusils^{2,3}, Roger Mariné-Casadó⁴, Xavier Belda^{2,5}, Humberto Gagliano^{2,5}, Oscar J. Pozo⁶, Noemí Boqué⁴, Antoni Caimari⁴, Antonio Armario^{2,5}, Montserrat Solanas^{4,2✉} & Rosa M. Escorihuela^{2,5✉}

The aim of this study was to evaluate, in male Long-Evans rats, whether a restricted-cafeteria diet (CAFR), based on a 30% calorie restriction vs continuous ad libitum cafeteria (CAF) fed animals, administered alone or in combination with moderate treadmill exercise (12 m/min, 35 min, 5 days/week for 8 weeks), was able to ameliorate obesity and the associated risk factors induced by CAF feeding for 18 weeks and to examine the changes in circadian locomotor activity, hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis functionality, and stress response elicited by this dietary pattern. In addition to the expected increase in body weight and adiposity, and the development of metabolic dysregulations compatible with Metabolic Syndrome, CAF intake resulted in a sedentary profile assessed by the home-cage activity test, reduced baseline HPA axis activity through decreased corticosterone levels, and boosted exploratory behavior. Both CAFR alone and in combination with exercise reduced abdominal adiposity and hypercholesterolemia compared to CAF. Exercise increased baseline locomotor activity in the home-cage in all dietary groups, boosted exploratory behavior in STD and CAF, partially decreased anxiety-like behavior in CAF and CAFR, but did not affect HPA axis-related parameters.

The prevalence of obesity and overweight is increasing and poses a major health burden worldwide¹. Obesity has several associated metabolic and hormonal alterations, which lead to Metabolic Syndrome (MetS) and increase cardiovascular and cancer risks among others^{2,3}. Several behavioral alterations have also been described, including circadian dysregulation^{4,5}, altered cognitive function^{6,7} and anxiety^{8,9}, both in rodents and humans.

Several experimental models have been used to study obesity¹⁰. Cafeteria (CAF) diet, in which animals are fed several high-fat and high-sugar components of human diets, is one of the most robust models of diet-induced obesity (DIO)^{11,12}. It is a model with face validity for human obesity¹³, inducing hedonic eating due to the high palatability of its ingredients, and leading to altered eating behavior such as snacking and hyperphagia^{11,12,14,15}. Moreover, CAF diet generates more severe MetS symptoms than other experimental diets^{16,17}.

CAF diet simulates the intake of comfort food in humans, which has been shown to have an anxiolytic effect and to decrease the glucocorticoid response¹⁸. In rats, seven days of palatable food intake reduced plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone responses to restraint stress¹⁹. Studies have shown

¹Medical Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. ²Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. ³Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. ⁴Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Biotechnology Area and Technological Unit of Nutrition and Health, 43204 Reus, Spain. ⁵Animal Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. ⁶Gastroesophageal Carcinogenesis Group, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Carrer Doctor Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain. ✉email: Montserrat.Solanas@uab.cat; Rosamaria.Escorihuela@uab.cat

that, rather than the macronutrient composition, it is the choice, liking, and palatability of the food that induces these effects, both in rodents²⁰ and in humans²¹.

Clinically, obesity is treated through dietary and exercise interventions, aimed at reducing energy intake and increasing energy expenditure, anti-obesity medications, and bariatric surgery in severe cases²². The widely used dietary interventions consist of changing diet quantity and quality to decrease adiposity and MetS markers^{23,24}. However, these interventions tend to have low adherence²⁵ and can generate stress and anxiety due to lower diet satisfaction⁸.

We have characterized a calorie-restricted CAF (CAFR) diet based on the same palatable foods of CAF but with a 30% calorie restriction relative to the energy intake of CAF animals. A 30% was chosen because 15–30% restriction over the usual diet is the recommended for dieting in human obesity management²⁶. It has been proposed as a realistic and precise approach to evaluate the anti-obesity effect of a caloric restriction-based intervention combined with other therapeutic strategies. This diet decreases energy intake and ameliorates the biometric, metabolic, and hormonal imbalances associated with MetS²⁷. We have also shown that CAFR diet, especially when supplemented with the polyphenolic compound oleuropein, has additional beneficial effects on sweet taste function, which is altered in obesity²⁸. This diet models obese and overweight individuals with partial success and eating relatively often the not recommended cafeteria products while dieting. The little portions of those cafeteria items would increase and maintain adherence.

A corrective intervention such as physical exercise generates an overall healthier profile by improving cardiovascular function and decreasing the risk of developing type 2 diabetes among other benefits^{29–31}. Moderate combined aerobic and resistance exercise programs can modestly contribute to weight loss and metabolic health, which are mainly induced by low-calorie diets³², and have been shown to reduce depression and stress scores in humans³³. The Norwegian HUNT cohort study involved a healthy cohort of 33,908 adults which were followed up for 11 years and linked regular leisure-time physical activity (LTPA; walking, jogging, swimming) to a reduced incidence of depression³⁴.

In rats, the effects of treadmill exercise on body weight are inconsistent, with publications reporting a mild decrease³⁵ or no effects^{36,37}. However, regardless of body weight changes, an improvement in obesity-related metabolic dysfunctions (muscle triacylglycerides content or renal function) has been shown^{35,37}. More specifically and pertaining to the task at hand, treadmill exercise in rats reverted impairments in stress-coping induced by CAF feeding and decreased anxiety-like behaviour³⁶.

Here we aimed at characterizing the effects of CAF and CAFR feeding as well as an exercise intervention upon biometric and metabolic parameters, circadian locomotor activity, exploratory and anxiety-like behavior, and HPA axis function in obese male Long-Evans rats. We hypothesized that CAFR would partially revert the effects of *ad libitum* (*a.l.*) CAF induced behavioral and hormonal changes in the HPA axis, and that treadmill exercise should further palliate the obese phenotype in CAFR fed animals to a greater degree than in CAF fed animals. We used an experimental design in which CAF diet was administered for 10 weeks from weaning onwards to induce obesity compared to standard chow, and then dietary and exercise interventions were applied for 8 weeks, after which behavioral testing was performed.

Methods

Animals. We used 60 male Long-Evans rats (Janvier, France) 23–25 days-old upon arrival. Animals were housed in pairs in standard Plexiglas cages, maintained under a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 8 h) in standard conditions (temperature: 21 ± 1 °C; humidity 50 ± 10%) and allowed 1 week of habituation to the animal room. After the habituation, they were randomly assigned to two groups balancing mean body weight (BW): Standard (STD), n = 20, BW = 79.58 ± 2.03 g; and CAF, n = 40, BW = 79.60 ± 1.36 g. From week 10 onwards, animals were housed individually to measure diet consumption. The experimental protocol was approved by the Generalitat de Catalunya (DAAM 9978), following the ‘Principles of laboratory animal care’ and was performed in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EU). The present study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Experimental design. We used a 3 × 2 factorial design with Diet (STD, CAF, and CAFR) and Exercise (Control -C- and Exercise -E-) as factors (Fig. 1). Once obesity had been induced by the administration of CAF diet for 10 weeks, animals were randomly allocated to the following groups, balancing mean BW: STD-C, n = 10, BW = 373.2 ± 6.1 g; STD-E, n = 10, BW = 374.7 ± 5.2 g; CAF-C, n = 10, BW = 413.9 ± 10.0 g; CAF-E, n = 10, BW = 412.0 ± 8.2 g; CAFR-C, n = 10, BW = 413.4 ± 10.1 g; and CAFR-E, n = 10, BW = 411 ± 6.3 g. Interventions were maintained throughout the experiment. Animals were weighed weekly, and nose-to-anus length (NAL) and abdominal circumference (AC) were measured every two weeks. Lee Index [$((\text{BW}(\text{g})^{1/3}) / (\text{NAL}(\text{cm}) \cdot 10)) \cdot 10000$] was also calculated biweekly. Food intake was calculated every week as the difference between food provided and the remainder the day after. At weeks 9 and 17 we performed the home cage activity (HCA) test and at week 18 the hole board (HB) and the elevated plus maze (EPM) tests. At week 23 animals were sacrificed by decapitation after an 8-h fast. Fasting started in the morning at 7 h, leaving 20 min between animals, and sacrifices were carried out between 15 and 18 h. The following tissues were collected and weighed: adrenal glands, thymus, white adipose tissue -WAT- depots (inguinal, retroperitoneal, epididymal and mesenteric), and soleus and gastrocnemius muscles. Blood was collected and serum was obtained by centrifugation at 2000 g for 15 min and stored at –80 °C until further analysis. Between weeks 19 and 22 animals performed a set of behavioral tests unrelated to the present study being prepared for publication in an independent paper.

Diets. During the obesity-induction period of the experiment, the STD group was fed standard chow *a.l.* whereas the CAF group was fed CAF diet *a.l.*, and all animals had access to tap water *a.l.*. The amount of CAF

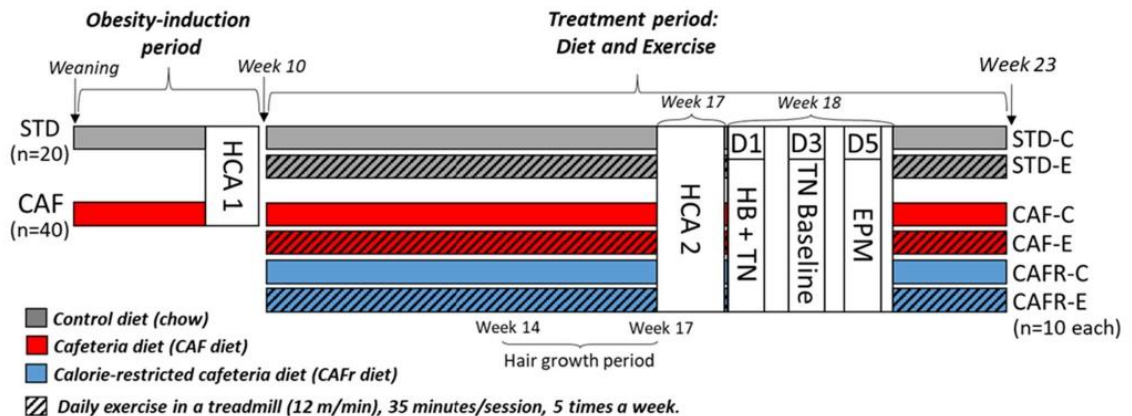


Figure 1. Experimental design showing groups, diets, and behavioral tests. Hair growth period refers to the period in which hair was allowed to regrow to be collected for the hair corticosterone study, see “[Hair corticosterone](#)” for details. HCA Home-Cage Activity; HB Hole Board; EPM Elevated Plus Maze; TN Tail nick.

items provided was progressively raised during the first 8 weeks to match the growth of the animals (Table S1). From week 10 onwards, the CAF diet consisted of (average quantities per rat/day): bacon (8 g), biscuits + pâté (5 g), biscuits + cheese (5 g), muffins (7 g), carrots (8 g), jellied sugared milk (a mixture of milk, sugar, and neutral gelatine with a solid consistency) (45 g), and standard chow (25 g). The amount of food and energy administered daily were 103 g and 246 kcal respectively, and the caloric distribution was: 10.5% protein, 39% fat and 50.5% carbohydrates. The caloric content of the standard chow (Teklad Global 14% protein rodent diet 2014, Envigo, US) was 290 kcal per 100 g, and its caloric distribution was: 20% protein, 13% fat and 67% carbohydrates.

The CAFR diet was based on the same items as the CAF diet, but the amount of each item was readjusted weekly to match a 30% calorie-restriction relative to the mean energy intake of the CAF group. The quantities of CAF items provided were (averaged quantity per rat/day): bacon (3.4 g), biscuits + pâté (3.3 g), muffins (1.8 g), carrots (7.6 g), jellied sugared milk (12 g) and standard chow (13 g). The average amounts of food and energy administered per day were 41 g and 97 kcal respectively, and the caloric distribution was: 12% protein, 38% fat and 50% carbohydrates. All food was renewed daily.

Treadmill training. Training was performed in a treadmill (Columbus instruments, Columbus, OH, USA) placed in a separate room with mild lighting. The apparatus consisted of 3 separated parallel runways (45 × 11 × 12 cm), topped by Plexiglas. Two identical apparatuses were used for the training with one animal from each diet group. Non-exercised animals were placed in the treadmills at an intensity of 0 m/min. This exercise paradigm was chosen over others in order to ensure all animals followed the same training procedure in terms of frequency, session duration and number, and intensity.

Training began at week 10, with daily training sessions 5 days/week (from Sunday to Friday). No training was performed during the behavioral testing days. The intensity was raised progressively from sessions 1 to 12 (Table S2). From session 13 onwards, all sessions started at an intensity of 6 m/min which was raised 1 m/min every minute until reaching an intensity of 12 m/min. From that point on, the intensity was maintained until minute 30, during which the animals ran approximately 341 m, then the intensity was lowered to 8 m/min. Sessions ended at minute 35, at an approximate total distance of 381 m. This intensity was chosen since animals can perform this exercise without needing aversive stimulation to run (i.e. electric shock)^{36,38}; and higher intensities can be considered an stressor on the animals³⁹. Eight weeks were chosen as the duration of the intervention since similar durations have provided positive results previously³⁶.

Serum analyses. Enzymatic colorimetric kits were used for the determination of serum total cholesterol, triglycerides, and glucose (QCA, Barcelona, Spain), HDL-cholesterol and LDL-cholesterol (Bioassay systems, CA, USA) and non-esterified free fatty acids (NEFAs) (WAKO, Neuss, Germany). Serum insulin and leptin levels were measured using a mouse/rat insulin ELISA kit (Millipore, Barcelona, Spain) and a rat leptin ELISA kit (Millipore). The homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) was calculated following the formula⁴⁰: $HOMA-IR = \text{Glucose(mM)} \times \text{Insulin(mU/L)} / 22.5$.

Behavioral testing. *Home cage activity (HCA).* Two identical sound-proof HCA apparatuses were used to determine basal circadian locomotor activity at weeks 9 and 17 (Fig. 1). Each apparatus contained two identical home-cages (40 × 23 × 18 cm) made from transparent Plexiglas (Med Associates Inc., USA). Animals were tested from 15 to 10 h of the following day, with normal light cycles. An infrared camera 43 cm above the top of the cages recorded the session and the computer recorded the distance travelled (cm) in 1 min bins that were collapsed to obtain the distance travelled each hour. Data were analysed into two periods, one for the lights on period (ON, from 16 to 19 h and from 8 to 10 h) and one for the lights OFF period (OFF, from 20 to 07 h). Data

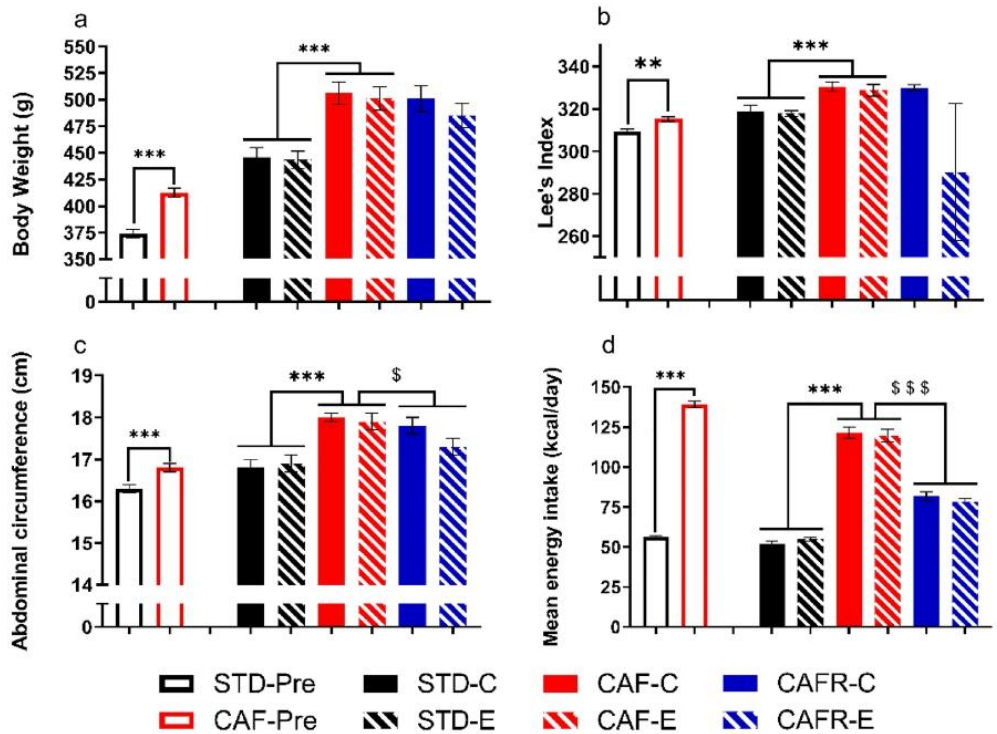


Figure 2. Effects of dietary interventions and exercise on biometric parameters and mean energy intake. (a) Body weight (g). (b) Lee Index. (c) Abdominal circumference (cm). (d) Mean energy intake (Kcal/day). Empty bars are data at the end of the obesity-induction period before the start of interventions (week 10); and solid and dashed bars are data from the time of behavioral testing (week 18). Values are mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus STD; \$ $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.001$ versus CAF.

Smirnov tests, respectively. Data at week 10 (BW, Lee Index, AC, mean energy intake and HCA data) were analysed with the Mann–Whitney U test due to different group sizes. Data collected at one time point (BW, Lee Index, AC, energy intake, adrenal gland and thymus weight, hormonal response to the HB, HB and EPM and hair corticosterone) were analysed with 2 two-way ANOVAs, the first one comparing the groups STD and CAF [diet (STD, CAF) \times exercise (C, E)], and the second one comparing the groups CAF and CAFR [diet (CAF, CAFR) \times exercise (C, E)]. This approach allowed better determination of the effects of CAF feeding and exercise compared with STD and control animals, and separation of the effects of CAFR feeding and exercise compared with the obese CAF fed animals. In case significant diet effects appeared on the 2nd two-way ANOVA revealing that CAFR feeding might have beneficial effects on obese cafeteria fed animals, an additional two-way ANOVA comparing STD and CAFR diets was performed. This final analysis allowed us to determine whether CAFR feeding had returned obese animals to the STD conditions or there were still differences between them. Finally, data comprising several time points (HCA, basal hormones) were also analysed with 2 two-way repeated measures ANOVAs, with time as the within-subject factor and diet and exercise as the between-subjects factors. Both within-subject and between-subject factor analyses allowed detection of differences over the time points and overall, respectively.

Results

CAFR Feeding and exercise palliated the effects of CAF feeding on biometric parameters. We first characterized the effects of CAF feeding upon several biometric and energy intake parameters at week 10, immediately before the interventions, and week 18, immediately before behavioural testing (Fig. 2).

At week 10, CAF fed animals showed higher BW, Lee Index and AC than STD fed animals [BW: $U = 91$; $p < 0.001$; Lee Index: $U = 203$, $p = 0.003$; AC: $U = 202$; $p = 0.003$]; and displayed a 2.46-fold increase in mean daily energy intake [$U = 55$; $p < 0.001$]. At week 18, CAF feeding increased BW, Lee Index, AC and the average energy intake compared to STD feeding [diet: BW: $F(1,39) = 36.981$, $p < 0.001$; Lee Index: $F(1,39) = 23.634$, $p < 0.001$; AC: $F(1,39) = 35.610$, $p < 0.001$; average energy intake: $F(1,39) = 599.540$, $p < 0.001$]. Neither exercise nor the diet \times exercise interaction exerted any effect upon these variables.

	STD-C	STD-E	CAF-C	CAF-E	CAFR-C	CAFR-E	1st ANOVA (STD vs. CAF)	2nd ANOVA (CAF vs. CAFR)
WAT absolute weight (g)								
Inguinal	21.78 ± 1.46	19.68 ± 1.72	36.26 ± 1.84	38.33 ± 3.01	35.60 ± 1.56	29.64 ± 1.91	D***	D*
Retroperitoneal	10.90 ± 0.57	8.92 ± 0.65	20.37 ± 1.12	19.23 ± 0.93	17.32 ± 0.70	16.46 ± 0.99	D***	D**
Mesenteric	8.18 ± 0.47	7.33 ± 0.67	12.32 ± 0.53	11.47 ± 0.60	10.56 ± 0.39	10.58 ± 0.48	D***	D*
Epididymal	7.42 ± 0.24	6.68 ± 0.33	12.14 ± 0.65	12.41 ± 0.50	11.32 ± 0.35	11.00 ± 0.36	D***	D*
Abdominal	26.50 ± 1.16	22.93 ± 1.56	44.84 ± 1.96	43.12 ± 1.87	39.21 ± 1.27	38.05 ± 1.67	D***	D**
Total	48.28 ± 2.54	42.61 ± 3.12	81.11 ± 3.50	81.45 ± 4.83	74.81 ± 2.57	67.70 ± 2.86	D***	D**
Muscle absolute weight (g)								
Soleus	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	–	–
Gastrocnemius	2.30 ± 0.04	2.29 ± 0.02	2.36 ± 0.05	2.31 ± 0.07	2.23 ± 0.05	2.18 ± 0.05	–	D*
Adrenal gland absolute weight (mg)	39.50 ± 2.64	40.40 ± 2.15	39.89 ± 2.37	41.33 ± 3.23	40.44 ± 1.04	38.56 ± 2.09	–	–
Thymus absolute weight (mg)	135 ± 4	124 ± 9	151 ± 12	147 ± 12	150 ± 9	128 ± 7	–	–
WAT relative weight (g/100 g)								
Inguinal	4.57 ± 0.25	4.15 ± 0.29	6.51 ± 0.27	6.84 ± 0.40	6.63 ± 0.29	5.64 ± 0.32	D***	–
Retroperitoneal	2.29 ± 0.09	1.88 ± 0.11	3.66 ± 0.17	3.45 ± 0.11	3.23 ± 0.14	3.12 ± 0.15	D***, E*	D*
Mesenteric	1.72 ± 0.08	1.54 ± 0.11	2.21 ± 0.06	2.05 ± 0.07	1.96 ± 0.06	2.01 ± 0.05	D***	D*
Epididymal	1.56 ± 0.03	1.41 ± 0.06	2.18 ± 0.09	2.23 ± 0.05	2.11 ± 0.06	2.09 ± 0.06	D***	–
Abdominal	5.58 ± 0.11	4.85 ± 0.26	8.05 ± 0.25	7.73 ± 0.19	7.31 ± 0.24	7.23 ± 0.22	D***, E*	D*
Total	10.15 ± 0.41	9.01 ± 0.52	14.57 ± 0.45	14.58 ± 0.58	13.94 ± 0.48	12.87 ± 0.39	D***	D*
Muscle relative weight (g/100 g)								
Soleus	0.038 ± 0.002	0.037 ± 0.002	0.034 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.033 ± 0.001	D**	–
Gastrocnemius	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	D***	–
Adrenal gland relative weight (mg/100 g)	8.36 ± 0.57	8.65 ± 0.56	7.19 ± 0.433	7.45 ± 0.59	7.55 ± 0.28	7.39 ± 0.46	D*	–
Thymus relative weight (mg/100 mg)	28.57 ± 0.97	26.34 ± 1.81	27.16 ± 2.15	26.55 ± 2.37	28.20 ± 2.03	24.60 ± 1.66	–	–

Table 1. Effects of dietary interventions and exercise on the absolute (g) and relative weight (g/100 g) of white adipose depots, skeletal muscle, adrenal gland and thymus at the end of the experiment. The two last right columns indicate the significant ANOVA results for analyzed factors (D Diet; E Exercise; DxE Diet*Exercise interaction; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Data are mean ± SEM. Abdominal WAT was calculated as the sum of the retroperitoneal, epididymal and mesenteric depots. WAT: White Adipose Tissue.

On the other hand, CAFR significantly decreased AC and mean energy intake [diet: AC: $F(1,37) = 4.980$, $p = 0.033$; energy intake: $F(1,37) = 599.54$, $p < 0.001$] compared to CAF. No effect on BW or Lee Index was found. No exercise or diet*exercise effects were found.

CAFR feeding and exercise improved body composition and serum obesity-related biomarkers in obese animals. As shown in Table 1, CAF feeding increased all WAT depots (inguinal, retroperitoneal, mesenteric and epididymal), both in absolute (g) and relative weight (g/100 g of body weight) compared to STD. On the other hand, CAF feeding decreased relative weight of the soleus and gastrocnemius skeletal muscles but did not affect their absolute weights. CAF feeding also decreased the relative weight of the adrenal gland but did not affect the thymus weight. Regarding exercise in STD and CAF fed animals, it decreased relative retroperitoneal adiposity, and more notably the relative total abdominal WAT (sum of retroperitoneal, epididymal and mesenteric fat depots).

As for the CAFR feeding, it reverted the effects of CAF on adipose tissue depots, specifically by decreasing their absolute weight, while also decreasing the gastrocnemius absolute weight.

The analysis of obesity-associated serum parameters (Table 2) showed that CAF feeding increased glucose, triacylglycerides, insulin, HOMA-IR, leptin, adiponectin, and the leptin/adiponectin ratio compared to STD feeding. Total cholesterol and HDL-cholesterol were reduced, but LDL-cholesterol was increased in the CAF group. Exercise decreased total and HDL-cholesterol in STD and CAF fed animals, and increased leptin levels specifically in CAF animals. CAFR feeding decreased total cholesterol and leptin levels compared to CAF. The detailed results of the 1st and 2nd two-way ANOVA analyses of body composition and serum parameters are shown in supplementary Tables S3 and S4.

CAFR diet differed significantly from STD diet in all the variables showing CAF versus CAFR differences in the 2nd two-way ANOVA. This indicates that CAFR feeding did not recover the obesity alterations on those biometric, tissues weight and serum parameters to the level of STD feeding (see supplementary Table S6).

	STD-C	STD-E	CAF-C	CAF-E	CAFR-C	CAFR-E	1st ANOVA (STD vs. CAF)	2nd ANOVA (CAF vs. CAFR)
Glucose (mg/L)	1027 ± 21	1083 ± 38	1186 ± 37	1125 ± 44	1143 ± 42	1071 ± 29	D**	–
Triacylglycerides (mg/L)	1175 ± 127	1216 ± 201	1688 ± 183	1830 ± 208	1466 ± 198	1611 ± 208	D**	–
Cholesterol (mg/L)	872 ± 45	742 ± 45	746 ± 31	686 ± 39	661 ± 31	596 ± 39	D*, E*	D*
LDL-Cholesterol (mg/L)	193 ± 17	224 ± 28	246 ± 27	261 ± 19	244 ± 39	218 ± 28	D*	–
HDL-cholesterol (mg/L)	785 ± 41	672 ± 25	601 ± 31	522 ± 35	540 ± 22	492 ± 26	D***, E*	–
NEFAs (mM)	0.72 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.62 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.63 ± 0.04	–	–
Insulin (µg/L)	1.93 ± 0.20	1.56 ± 0.29	3.36 ± 0.35	3.76 ± 0.50	2.95 ± 0.46	2.89 ± 0.36	D***	–
HOMA-IR	12.27 ± 1.30	17.72 ± 7.74	24.54 ± 2.90	25.18 ± 2.80	21.05 ± 3.64	19.23 ± 2.65	D***	–
Leptin (ng/mL)	31.47 ± 2.84	30.01 ± 8	59.42 ± 5.33	78.38 ± 6.36	59.54 ± 4.14	54.91 ± 6.65	D***, DxE**	D*, DxE*
Adiponectin (µg/mL)	25.75 ± 1.37	23.29 ± 1.07	28.68 ± 1.32	30.83 ± 1.59	29.67 ± 1.13	28.22 ± 1.86	D**	–
Leptin/adiponectin ratio	1.25 ± 0.12	1.28 ± 0.34	2.07 ± 0.17	2.53 ± 0.15	2.04 ± 0.17	2.03 ± 0.32	D***, DxE**	–

Table 2. Effects of dietary interventions and exercise on serum parameters. The two rightmost columns indicate the significant ANOVA results for analyzed factors (D Diet; E Exercise; Dx E Diet*Exercise interaction; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Data are mean ± SEM. NEFAs Non-sterified fatty acids; HOMA-IR Homeostatic model assessment-estimated insulin resistance.

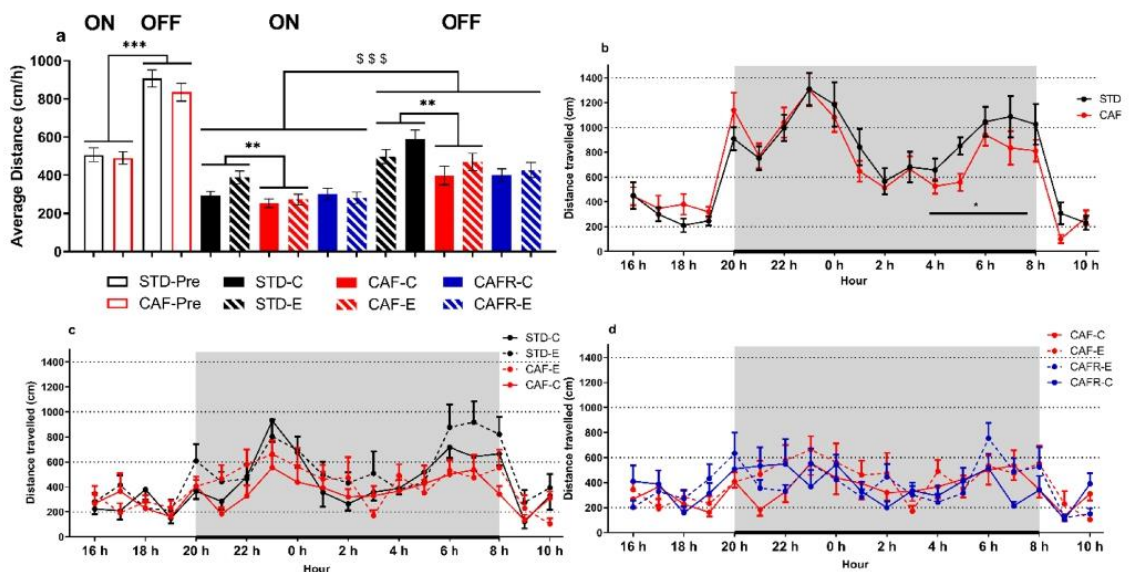


Figure 3. Effects of dietary interventions and exercise on circadian activity. Two Home-Cage Activity tests were performed at week 9 and week 17. (a) Average hourly distance traveled (cm) for the ON and OFF periods in both time points (week 9, -Pre, and week 17). (b) Hourly distance traveled (cm) for the ON and OFF (grey square area) periods at week 9. (c) Hourly distance traveled (cm) for the STD and CAF, control and exercised, groups at week 17. (d) Hourly distance traveled (cm) for the CAF and CAFR, control and exercised, groups at week 17. Values are mean ± SEM. \$\$\$ $p < 0.001$ versus ON period, * $p < 0.05$ versus STD. ** $p < 0.01$ versus STD.

CAF and CAFR feeding decreased, and exercise marginally increased circadian locomotor activity. To determine whether obesity affected circadian locomotor activity, we performed the HCA test at weeks 9–10. We first analysed the average distance travelled over the lights ON and lights OFF periods (Fig. 3A). As expected, average activity in the OFF period was higher than in the ON period [period: $F(1,54) = 187.851$, $p < 0.001$], with no interaction with the diet. We then analysed the hourly activity over the OFF and ON periods separately. The activity changed over the OFF period hours (Fig. 3B) [hour: $F(11,594) = 8.750$, $p < 0.001$], but no interaction with the diet was found. However, we noticed that the CAF fed animals appeared to decrease their activity during the last 4 h of the OFF period (from 04h until 08h). So, we analysed the total activity of this 4 h-period (Fig. 3B) and found that the CAF animals were less active compared to the STD animals [$U = 219$; $p = 0.016$]. Regarding the ON period (Fig. 3B) we found a tendency for activity to change over time [hour: $F(5270) = 2.335$, $p = 0.051$], with no effect of diet.

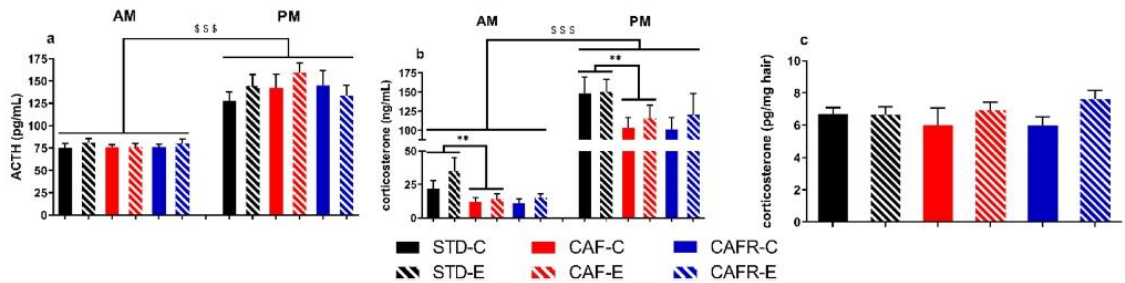


Figure 4. Effects of dietary interventions and exercise on circadian baseline levels of plasmatic corticosterone and ACTH, and hair corticosterone levels. (a) ACTH (pg/mL). (b) Corticosterone (ng/mL). (c) Hair corticosterone (pg/mg hair). Values are mean \pm SEM. \$\$\$ $p < 0.001$ versus AM levels; ** $p < 0.01$ versus STD.

To analyse whether the CAFR diet and/or treadmill exercise affected locomotor activity, we performed a second HCA test at week 17. We first compared the average distance travelled at weeks 9 and 17 and found an overall decrease at week 17 [$F(1,50) = 148.06$, $p < 0.001$]. Thus, as it can be seen in Fig. 3A, animals overall displayed an average distance reduction from 496 at week 9–10 to 300 cm/h at week 17 during the ON period, and from 860 at week 9–10 to 466 cm/h at week 17 during the OFF period.

Secondly, the average distance travelled during the ON and OFF periods were analysed (Fig. 3A). In the CAF and STD animals we found activity to increase in the OFF period compared to the ON period [period: $F(1,34) = 71.314$, $p < 0.001$], with no effect of diet or exercise. The between-subject factor revealed that CAF diet decreased the average distance travelled, and exercise increased it [Diet: $F(1,34) = 9.564$, $p = 0.004$; Exercise: $F(1,34) = 5.241$, $p = 0.028$; and Diet*Exercise: $F(1,34) = 0.634$, $p = 0.431$]. The same analysis comparing CAF and CAFR animals revealed an analogous increase in activity during the OFF period [$F(1,32) = 47.312$, $p < 0.001$] and no effect of diet or exercise was found.

Finally, the hourly activity over the OFF and ON periods were studied separately. The analysis in CAF and STD animals (Fig. 3C) revealed activity changes over the hours of the OFF period [hour: $F(11,374) = 6.287$, $p < 0.001$] but not over the ON period [hour: $F(5170) = 1.600$, $p = 0.165$], with no effect of diet or exercise in either period. However, the between-subject factors showed that CAF feeding had decreased the level of activity in the OFF period compared to the STD group, with exercise reaching no significant effect [Diet: $F(1,34) = 5.902$, $p = 0.021$; Exercise: $F(1,34) = 3.155$, $p = 0.085$; and Diet*Exercise: $F(1,34) = 0.046$, $p = 0.831$]. The analysis in CAFR and CAF animals (Fig. 3D) showed activity changes over both periods [OFF hours: $F(11,352) = 2.746$, $p = 0.002$; ON hours: $F(5160) = 2.833$, $p = 0.025$], with no effect of diet. Moreover, this activity change over the ON period was significantly affected by the exercise intervention [hour*exercise interaction $F(5160) = 2.917$, $p = 0.022$, Fig. 3D], with exercised animals being less active at 10AM compared to non-exercised animals [$t(34) = 3.830$, $p = 0.001$]. No such effect of exercise was detected in the OFF period.

CAF and CAFR feeding decreased basal corticosterone levels. We were also interested in studying whether CAF diet-induced obesity and the dietary and exercise interventions affected baseline HPA axis activity through plasmatic ACTH and corticosterone levels, both in the morning (AM) and evening (PM).

The repeated measures comparison of corticosterone and ACTH levels between the PM and AM samples in CAF and STD animals showed an increase for both hormones in the PM [corticosterone: $F(1,35) = 124.607$, $p < 0.001$; ACTH: $F(1,33) = 114.426$, $p < 0.001$] with no effect of diet or exercise, but the between-subject effect indicated CAF animals had lower corticosterone levels than STD [Diet: $F(1,35) = 9.247$, $p = 0.004$], with no effect of exercise. No such effect was observed for ACTH. When we analysed the effects of CAFR feeding compared to CAF, the results showed that the CAFR group maintained the decrease in corticosterone levels.

We also aimed to determine long-term effects of the interventions on HPA axis activity by means of hair corticosterone levels, which have been validated as a good biomarker for evaluating the chronic activity of the HPA axis⁴⁵. Results did not show any difference due to CAF feeding when compared to STD or any effects of exercise (Fig. 4C). On the other hand, the analysis of CAFR and CAF animals indicated no significant effects of the exercise factor [$F(1,35) = 3.141$, $p = 0.086$ (Fig. 4C)].

HPA-axis response to a novel environment was unaffected by diet or exercise. We also analysed the HPA axis reactivity to the exposure to a mild stressor, a novel environment. Immediately after the HB test, plasmatic ACTH and corticosterone levels increased 5, eightfold and 28, fourfold, respectively (Fig. 5A and B) compared with baseline AM hormone levels (shown in Fig. 4A and B). No significant effects appeared when analysing CAF and STD diets on ACTH [diet: $F(1,38) = 3.326$, $p = 0.077$] and corticosterone levels. Exercise had no significant effects on neither hormone.

CAFR feeding did not have any significant effect compared to CAF feeding.

Exploratory activity in a novel environment and anxiety-like behavior. The analysis of the HB was performed considering both the first 5 min and the whole 15 min of the test.

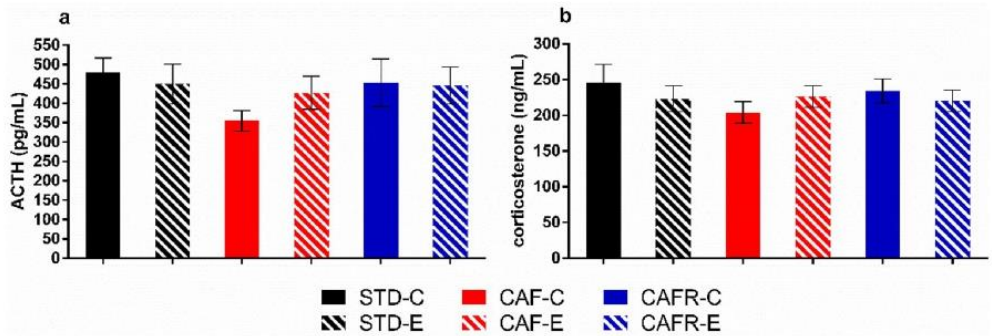


Figure 5. Effect of dietary interventions and exercise on HPA-axis hormone response to the Hole Board test. (a) Plasmatic ACTH levels (ng/mL) and (b) corticosterone levels (ng/mL) in response to exposure to a novel environment.

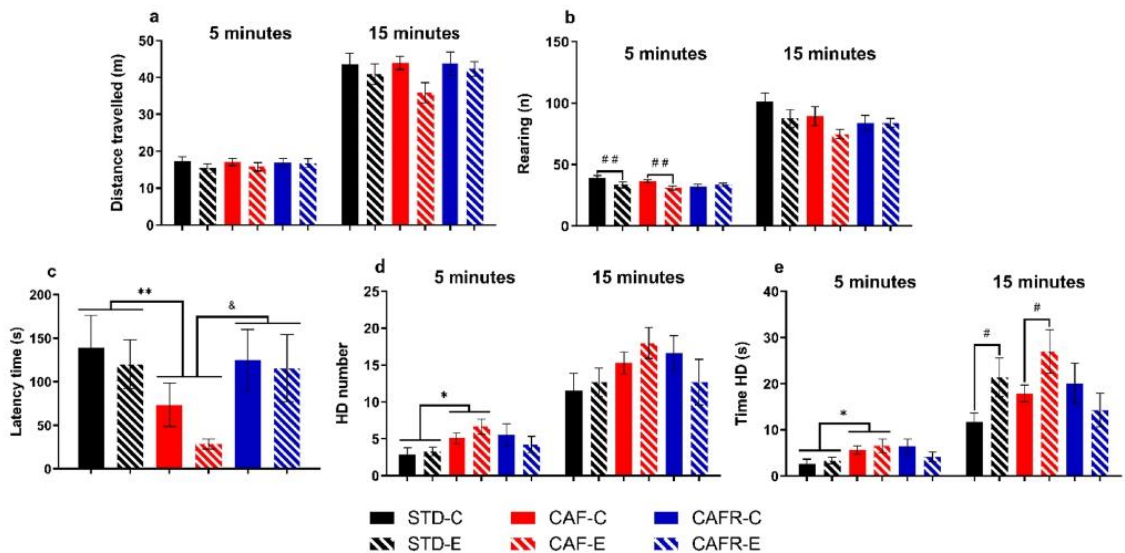


Figure 6. Effects of dietary treatments and exercise on ambulatory and exploratory behavior in the Hole Board test in the first 5 min and the whole 15 min test. (a) Distance travelled (m). (b) Number of rearings. (c) Latency time (seconds) of the first head dip. (d) Number of head dips. (e) Time spent head-dipping (seconds). Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus STD; & $p < 0.05$ versus CAF; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus the respective non-exercised controls.

The analysis of the first 5 min did not reveal any effect of CAF on the distance travelled (Fig. 6A) or the rearings (Fig. 6B) compared with STD. In contrast, exercise decreased rearings [$F(1,39) = 9.257, p = 0.004$] but not distance travelled. Regarding exploratory activity, CAF decreased the latency of the first HD (Fig. 6C), and increased the number (Fig. 6D) and the time spent HD (Fig. 6E) compared with STD [latency: $F(1,39) = 12.667, p = 0.001$; number HD: $F(1,39) = 11.678, p = 0.002$; time HD: $F(1,39) = 8.940, p = 0.005$]. No effects of exercise upon these variables were detected. When we analyzed the effects of CAF feeding compared to CAF, a significant ‘diet*exercise’ interaction on rearings was found [$F(1,37) = 4.693, p = 0.038$]. Decomposition of this interaction revealed that CAF animals performed less rearings when exercised [$t(17) = 2.559, p = 0.020$], whereas CAFR animals did not differ between exercise conditions. For exploratory activity, CAFR increased the latency of the first HD compared to CAF [$F(1,37) = 5.232, p = 0.029$] without additional significant effects/interactions in the first 5 min of the test.

For the 15-min exposure analysis, 8 animals (1 from the STD-C, CAF-C and CAFR-E groups, 2 from the CAF-E group, 3 from the STD-E group and none from the CAFR-C group) were eliminated due to them climbing the wall and escaping the apparatus. Results showed that CAF did not affect the distance travelled and the number of rearings. Exercise residually decreased the distance travelled (Fig. 6A) and the number of rearings (Fig. 6B) [distance: $F(1,32) = 3.831, p = 0.060$; rearings: $F(1,32) = 4.144, p = 0.051$]. CAF also increased the number of HD

(Fig. 6D) but not the time spent HD (Fig. 6E) [number HD: $F(1,32) = 4.979, p = 0.034$; time HD: $F(1,32) = 3.354, p = 0.078$]. Exercise increased the time spent HD [$F(1,32) = 8.719, p = 0.006$], but not the number of HD. We then calculated the mean duration of a HD (time HD/number HD), and found no effect of CAF while exercise increased mean HD duration [Exercise: $F(1,32) = 9.774, p = 0.004$, data not shown]. The analysis of CAF feeding compared to CAF revealed no diet effects on the distance travelled (Fig. 6A), the number of rearings (Fig. 6B), the number of HD (Fig. 6D) or the time spent HD (Fig. 6E). Exercise did not significantly affect the distance travelled [$F(1,33) = 3.422, p = 0.075$], nor the number of rearings [$F(1,33) = 1.518, p = 0.228$].

Finally, the EPM analysis (Fig S5) revealed no major effect of diet in anxiety-like behavior, and an effect where exercise decreased enclosed arm entries in CAF and CAFR fed animals [$F(1,36) = 4.551, p = 0.041$].

Discussion

In this work we have shown that CAF feeding successfully induced obesity, changed body composition by increasing adiposity, and impaired metabolic health by increasing MetS blood biomarkers and adipokine levels. This dietary pattern also resulted in a sedentary profile assessed by the HCA test, reduced baseline HPA axis activity through decreased corticosterone levels, and boosted exploratory behavior but did not affect anxiety-like behavior. The decreased energy intake of CAFR animals ameliorated some biometric and metabolic parameters, but it was not sufficient to revert neither the CAF-induced sedentary profile nor the boosted exploratory activity. Regarding exercise effects, results showed that it decreased adiposity and cholesterol levels, increased baseline locomotor activity in the HCA test, and further boosted exploratory behavior while partially decreasing anxiety-like behavior.

Additionally, CAF feeding altered circadian locomotor activity. The activity pattern of control STD animals during the night hours was characterized by an increase of baseline activity in the first and last night hours and an intervening period of decreased activity, as reported previously⁴⁶. After 10 weeks of CAF feeding, we observed a relatively mild decrease in activity during a subset of hours at the end of the night phase. However, after 17 weeks of CAF feeding the decrease of HCA was noticeable over the whole night phase. No changes in activity were observed during the light hours. In line with these results, high-fat (HF) feeding in rats has been reported to decrease activity during night hours and increase activity during day hours⁴⁷. Baseline locomotor activity is known to be directly under control of the master clock in the suprachiasmatic nucleus⁴⁸ and it has been reported that knock-out of the Clock gene in mice increased daytime feeding along with alterations in activity⁴⁹. Alterations in circadian rhythm have been shown to occur in HF diet mice, including attenuation of diurnal rhythms of feeding and locomotor activity, and attenuation of the expression of circadian clock genes and diurnal patterns of metabolic markers⁴. In our case, CAF feeding increased energy intake, but whether this altered eating pattern was associated with increased daytime feeding should be further explored in future studies.

Besides analysing the locomotor activity pattern, we also wanted to determine whether CAF feeding affected the circadian cycle of the HPA axis. Plasmatic ACTH and corticosterone levels showed a circadian cycle with higher hormone levels in the evening and lower levels in the morning, as expected⁵⁰. CAF feeding did not alter this pattern but decreased basal corticosterone levels both in the morning and evening. This result is consistent with another study in which decreased corticosterone and no effect on ACTH baseline levels were obtained after 5 weeks of CAF feeding in rats⁵¹. The fact that there were no differences in baseline circulating ACTH could indicate that the CAF-induced effects could be exerted at the level of the adrenal gland. In mice, increased corticosterone levels, cortical adrenal hyperplasia and increased Melanocortin-2 Receptor expression have been reported after long-term HF feeding⁵². Although we found a decrease in relative adrenal gland weight in CAF fed animals which might partially explain the decreased corticosterone basal levels, absolute weight was unaffected, and we cannot discard changes in ACTH signalling being the cause of the decrease in baseline corticosterone. In humans there is no consensus about baseline levels of cortisol in obesity⁵³, with reports showing increased⁵⁴ or decreased⁵⁵ levels, and similar results can be found for ACTH levels^{56,57}. Additionally, we determined corticosterone concentration in hair, which is used as a biomarker of long-term HPA axis activity and thought to reflect free corticosterone⁴⁵, which is considered as the bioavailable portion⁵⁸. The fact that we did not find differences in hair corticosterone between STD and CAF-fed animals suggests that CAF feeding might not alter bioavailable corticosterone levels. This might indicate that although total corticosterone levels would be decreased due to the CAF diet, compensatory mechanisms might be at play in generating adequate levels of free corticosterone and therefore a normal adrenal function in the obese state. It is important to note that RIA measures are an indication of total corticosterone levels thus reflecting axis activity rather than bioavailable free circulating corticosterone.

We also determined the effects of a mild stress challenge, novel environment exposure, on the HPA axis response. We detected a slight decrease in ACTH levels in CAF-fed animals. This is in accordance with other studies showing that palatable food intake, even in short-term exposures and without body weight gain, decreased ACTH response to restraint stress and anxiety-like behavior in the EPM¹⁸, which was attributed to a stress-buffering action of the hedonic properties of palatable foods mediated by reward-induced structural plasticity in the basolateral amygdala. The small effect of CAF feeding observed here might be related with the type of stimulus, since restraint stress or forced swim generate a much greater response than novel environment exposure⁵⁹. On the other hand, we have not found differences in corticosterone levels in response to a mild stressor suggesting that the HPA axis can respond normally to this kind of challenge by regulating small changes in hormone levels.

At the behavioral level, CAF feeding induced an increase in exploratory activity, in accordance with a previous study from our group⁹. Interestingly, other rodent models of DIO in which animals were fed a non-palatable HFD reported decreased exploratory activity^{60,61}, which suggests differential effects of obesity-induced diets depending on their palatability. Additionally, CAF feeding did not alter anxiety-like behavior in the EPM. In a previous study we have shown that 8 weeks of post-weaning CAF feeding had no effects on anxiety-like behavior⁹, and this result seems to be replicated after 18 weeks.

After characterizing the effects that CAF feeding had compared to STD, we also studied the effects that the restricted CAF diet had on obese animals. The decrease in energy intake observed in CAFR compared to CAF was reflected in the AC, which was diminished in CAFR animals. CAFR feeding also decreased the weight of subcutaneous and abdominal adipose tissue compared to CAF. This decreased adiposity, which was not accompanied by a reduced body weight, was reflected in lower leptin levels in serum. Moreover, CAFR feeding also changed body composition by slightly decreasing the gastrocnemius muscle absolute weight. Interestingly, CAFR feeding decreased mainly the abdominal tissue depots, but not the subcutaneous, which suggests an adipose tissue redistribution that has been associated with decreased cardiovascular risk in humans⁶². Other markers of MetS, such as serum total cholesterol levels, were also decreased in CAFR animals. Therefore, CAFR feeding intervention would be associated with better health outcomes. However, this diet did not significantly revert glucose dysregulation induced by the CAF diet, showing similar glucose and insulin levels. It could be hypothesized that a longer CAFR intervention would revert the effects of CAF feeding on glucose dysregulations. It is also important to note that in this study the interventions were of a corrective nature, which are considered less effective than preventive interventions⁶³. In fact, CAFR feeding administered post-weaning showed a greater amelioration of glucose and insulin levels, and of HOMA-IR compared to CAF²⁷ than in the present study.

Despite the amelioration of the biometric parameters and adiposity, CAFR diet did not change the HCA compared to CAF, indicating that the dysregulation of the circadian locomotor activity pattern induced by CAF feeding, consisting in a more sedentary pattern, is not corrected by the CAFR diet. As for the baseline corticosterone and ACTH levels, we did not find differences between CAF and CAFR feeding. Mouse studies in which a HFD was interrupted after 6 weeks reported increased baseline corticosterone levels, indicating a withdrawal response to the preferred diet⁶⁴. We did not observe such an effect, which suggests that the decrease of energy intake resulting from the CAF to CAFR feeding shift did not generate this withdrawal-like effect. We have previously shown that CAFR feeding induced changes in feeding behavior by increasing the proportion of regular chow that the animals consume, compared to the amount of chow consumed while CAF feeding, which indicates that those animals ate chow *a.l.* and were not starved^{27,28}. Hair corticosterone levels were also not different in CAFR fed animals when compared to CAF fed animals.

HPA response to a novel environment was also not affected by CAFR feeding, indicating that the effects of CAF feeding are also present in CAFR feeding. Behaviorally, CAFR fed animals also displayed similar levels of exploratory and anxiety-like behaviors to CAF fed animals. In another study, mice fed a palatable diet and switched to standard chow after 6 weeks decreased the time spent in the open arms of the EPM, thus reflecting increased anxiety-like behavior⁶⁴. Moreover, in rats switched to chow after 15 weeks of cafeteria diet, gene expression of CRH increased suggesting increased stress⁶⁵. We have shown the CAFR diet is capable of increasing chow intake when administered post-weaning^{27,28}. However, in our study we did not detect the increased stress and anxiety measures that are associated with diet withdrawal.

In this study we aimed to evaluate the effects of an exercise intervention. Regarding its effects in CAF-fed animals compared to STD animals, exercised animals presented decreased adiposity in the retroperitoneal fat depot and remarkably, decreased total abdominal adiposity, which points to a healthier body composition profile since, as mentioned above, abdominal adiposity rather than subcutaneous adiposity is associated with MetS⁶⁶. This result is interesting because the treadmill protocol used in the present study, consisting of 12 m/min, 35 min/session and 5 sessions/week, is considered of moderate intensity, equivalent to brisk walking or slow running in humans⁶⁷. However, this exercise did not affect the body weight, Lee Index or AC. Although similar treadmill interventions (12 m/min for 45 min) have resulted in ~25% decreased in CAF induced body weight gain⁶⁸, greater exercise intensities, such as 20 m/min for 1 h at 5% incline, or different paradigms, such as voluntary wheel running, seem to be necessary to consistently ameliorate biometric parameters^{69,70}. Regardless, exercise improved body composition and reduced abdominal adiposity, without affecting energy intake. This is consistent with other studies using a similar exercise protocol in CAF fed animals⁶⁸. Even when a higher exercise intensity (15 m/min for 1 h) was applied to chow-fed rats, no effect was reported on energy intake, although several changes of eating patterns such as decreased meal size and increased meal frequency during the light phase have been described⁷¹. Exercise was able to decrease cholesterolemia, indicating an amelioration of metabolic risk biomarkers. Exercise also diminished absolute weights (inguinal and total) and relative weights (inguinal, retroperitoneal and total) of adipose depots, and total serum cholesterol levels in animals fed with standard chow or the CAFR diet. This is in line with previous results in which treadmill exercise showed beneficial effects both in obese and non-obese animals^{36,38}. The new finding in the present report is that these effects are also present in animals fed a restricted-cafeteria diet.

As for the effects of treadmill exercise on HCA, we found an increase during the night hours both in the STD- and CAF-fed groups. This result is consistent with another study reporting that voluntary wheel running in rats resulted in weight loss, reduced daytime feeding, and reverted the effects of a HFD on circadian locomotor activity⁷⁰. However, it is unclear whether this improvement in circadian regulation was due to the exercise itself or to the weight loss. The fact that we observed a partial reversion of the sedentary profile induced by CAF feeding without reducing body weight suggests that exercise by itself would be capable of improving circadian function in DIO rats, although it did not fully restore the activity pattern seen in STD-fed animals. This might indicate that while treadmill exercise can partially increase activity, its effects are milder than voluntary wheel running⁷⁰. We have not found any reports of similar treadmill exercise protocols in which baseline circadian locomotor activity was measured.

Exercise did not affect the baseline HPA axis activity. In a previous study using long-term moderate treadmill exercise exposures (12 m/min for 30 min) we have also reported no effect on baseline corticosterone³⁸. On the other hand, treadmill exercise at a higher intensity than ours (15 m/min for 60 min) has shown increased corticosterone levels after 2 weeks of training³⁹. In other exercise paradigms such as wheel running, similar results have been found, with baseline corticosterone levels increasing after a short-term exposure to the exercise that

were normalized after 4 weeks⁷². Taken together this suggests that baseline activity of the HPA axis may increase because of exercise in the short term but reverts to control levels in the long term. This response might be similar to that found in paradigms of chronic predictable stress. Thus, daily immobilization stress for 7 days generated increased baseline corticosterone levels⁷³, while a similar but milder paradigm lasting 4 weeks did not⁷⁴.

Even though we detected no effects of exercise upon plasmatic levels of corticosterone, exercise tended to increase hair corticosterone in CAF and CAFR. This might indicate that for obese animals, treadmill exercise could be a more challenging stimulus requiring more effort compared to lean STD animals. Single stressful situations that might increase corticosterone acutely are masked in integrated measures such as hair corticosterone, but repeated stressful situations generate an increase in hair corticosterone⁴⁵. There are reports of DIO rats having lower exercise endurance and failing to adequately perform treadmill exercise earlier than control animals at high intensities (25 m/min)⁷⁵, which might indicate treadmill exercise represents a greater challenge to obese animals.

Regarding the effects of exercise on the HPA axis response to a mild novel environment stress challenge, in a previous study mentioned above we have shown that long-term treadmill exercise initiated post-weaning (12 m/min for 30 min/day for 33 weeks) can decrease the ACTH response to a novel environment exposure in Sprague Dawley rats³⁸. In the present study this effect was not replicated, which might be related with the duration of the treadmill intervention (33 weeks vs 8 weeks). It might also be related to the stage of development of the animals in which the exercise was performed, since the exercise in the present study started in a later stage when animals were already adults. Another possible factor lies in the rat strain used. Here we have used Long-Evans rats, which are known to present higher resting levels of ACTH and corticosterone, as well as a higher hormonal response to the HB⁷⁶ compared to Sprague–Dawley rats.

Treadmill exercise increased exploratory activity in STD-fed animals and further enhanced the already increased exploratory activity induced by CAF feeding. Additionally, exercise marginally decreased anxiety-like behavior, which is consistent with previous reports from our group⁹. There are reports of exercise increasing anxiety behavior in chow-fed rats in a different behavioural test⁷¹, or of no effect of treadmill exercise⁷⁷. Several variables such as the use of electric stimulus to motivate running as well as exercise intensity, duration, and paradigm (treadmill vs wheel running) might generate different behavioral profiles^{36,77}. In our exercise protocol control animals were placed in the treadmill daily as a control for handling and exposure to the apparatus, this implies that both exercised and control groups were handled daily which can induce an anxiolytic effect⁷⁸ and mask the effect of exercise, as we have also shown previously³⁸.

To conclude, restricted CAF feeding reverted, in part, the effects of CAF-induced obesity on biometric parameters, adiposity, and metabolic biomarkers, but it was not able to revert the sedentary profile and the decrease in baseline corticosterone levels. Exercise also decreased adiposity, partially corrected metabolic alterations and increased baseline locomotor activity and exploratory behavior in STD and CAF animals, but not in CAFR. Therefore, exercise appears to have beneficial effects in reverting the alterations of CAF, but it does not seem to show additional benefits when paired with CAFR.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 14 July 2022; Accepted: 31 October 2022

Published online: 15 November 2022

References

1. Ward, Z. J. *et al.* Projected U.S. state-level prevalence of adult obesity and severe obesity. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2440–2450 (2019).
2. Chan, A. M. L. *et al.* Recent developments in rodent models of high-fructose diet-induced metabolic syndrome: A systematic review. *Nutrients* **13**, 1–21 (2021).
3. Hamjane, N., Benyahya, F., Nourouti, N. G., Mechita, M. B. & Barakat, A. Cardiovascular diseases and metabolic abnormalities associated with obesity: What is the role of inflammatory responses? A systematic review. *Microvasc. Res.* **131**, 104023 (2020).
4. Kohsaka, A. *et al.* High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* **6**, 414–421 (2007).
5. Ramos-Lopez, O. *et al.* Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. *Chronobiol. Int.* **35**, 969–981 (2018).
6. Gardener, H. *et al.* Obesity measures in relation to cognition in the northern manhattan study. *J. Alzheimers Disease* **78**, 1653–1660 (2021).
7. Jurdak, N., Lichtenstein, A. H. & Kanarek, R. B. Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. *Nutr. Neurosci.* **11**, 48–54 (2008).
8. Moradi, F. *et al.* Association between dietary satisfaction and depression, anxiety and stress in obese and overweight patients during the coronavirus pandemic. *Clin. Nutr. ESPEN* **45**, 399–403 (2021).
9. Lalanza, J. F. *et al.* Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: Metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS ONE* **9**, e85049 (2014).
10. Small, L., Brandon, A. E., Turner, N. & Cooney, G. J. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: What have high-fat and high-calorie diets revealed?. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **314**, E251–E265 (2018).
11. Lalanza, J. F. & Snoeren, E. M. S. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **122**, 92–119 (2021).
12. Sclafani, A. & Springer, D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* **17**, 461–471 (1976).
13. Kleinert, M. *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 140–162 (2018).
14. Martire, S. I., Holmes, N., Westbrook, R. F. & Morris, M. J. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: Increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS ONE* **8**, e60407 (2013).
15. Geiger, B. M. *et al.* Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience* **159**, 1193–1199 (2009).
16. Sampey, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity* **19**, 1109–1117 (2011).

17. Gual-Grau, A., Guirro, M., Mayneris-Perxachs, J., Arola, L. & Boqué, N. Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: A metagenomics and metabolomics integrative approach. *J. Nutr. Biochem.* **71**, 122–131 (2019).
18. Ulrich-Lai, Y. M. *et al.* Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20529–20534 (2010).
19. Foster, M. T. *et al.* Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropic and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology* **150**, 2325–2333 (2009).
20. la Fleur, S. E., Houshyar, H., Roy, M. & Dallman, M. F. Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropic responses to restraint. *Endocrinology* **146**, 2193–2199 (2005).
21. McKay, N. *et al.* The effect of unhealthy food and liking on stress reactivity. *Physiol. Behav.* **229**, 113216 (2021).
22. Heffron, S. P., Parham, J. S., Pendse, J. & Alemán, J. O. Treatment of obesity in mitigating metabolic risk. *Circ. Res.* **126**, 1646–1665 (2021).
23. Trouwborst, I., Goossens, G. H., Astrup, A., Saris, W. H. M. & Blaak, E. E. Sexual dimorphism in body weight loss, improvements in cardiometabolic risk factors and maintenance of beneficial effects 6 months after a low-calorie diet: Results from the randomized controlled diogenes trial. *Nutrients* **13**, 1588 (2021).
24. Willmann, C. *et al.* Potential effects of reduced red meat compared with increased fiber intake on glucose metabolism and liver fat content: A randomized and controlled dietary intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 288–296 (2019).
25. Alhassan, S., Kim, S., Bersamin, A., King, A. C. & Gardner, C. D. Dietary adherence and weight loss success among overweight women: Results from the A to Z weight loss study. *Int. J. Obes.* **32**, 985–991 (2008).
26. Yumuk, V. *et al.* European guidelines for obesity management in adults. *Obes. Facts* **8**, 402–424 (2015).
27. Subias-Gusils, A. *et al.* A restricted cafeteria diet ameliorates biometric and metabolic profile in a rat diet-induced obesity model. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **72**, 767–780 (2021).
28. Subias-gusils, A. *et al.* Behavioral and metabolic effects of a calorie-restricted cafeteria diet and oleuropein supplementation in obese male rats. *Nutrients* **13**, 4474 (2021).
29. Sieverdes, J. C. *et al.* Physical activity, cardiorespiratory fitness and the incidence of type 2 diabetes in a prospective study of men. *Br. J. Sports Med.* **44**, 238–244 (2010).
30. Murtagh, E. M. *et al.* The effect of walking on risk factors for cardiovascular disease: An updated systematic review and meta-analysis of randomised control trials. *Prev. Med. (Baltim)* **72**, 34–43 (2015).
31. Erickson, K. I. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3017–3022 (2011).
32. Chin, S. H., Kahathuduwa, C. N. & Binks, M. Physical activity and obesity: What we know and what we need to know*. *Obes. Rev.* **17**, 1226–1244 (2016).
33. Atlantis, E., Chow, C. M., Kirby, A. & Fiatarone Singh, M. An effective exercise-based intervention for improving mental health and quality of life measures: A randomized controlled trial. *Prev. Med. Baltim* **39**, 424–434 (2004).
34. Harvey, S. B. *et al.* Exercise and the prevention of depression: Results of the HUNT cohort study. *Am. J. Psychiatry* **175**, 28–36 (2018).
35. Pinheiro-Mulder, A., Aguila, M. B., Bregman, R. & Alberto Mandarim-de-Lacerda, C. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. *Pathol. Res. Pract.* **206**, 168–173 (2010).
36. Cigarroa, I. *et al.* Treadmill intervention attenuates the cafeteria diet-induced impairment of stress-coping strategies in young adult female rats. *PLoS ONE* **11**, e0153687 (2016).
37. Novelli, M. *et al.* Effects of life-long exercise on circulating free fatty acids and muscle triglyceride content in ageing rats. *Exp. Gerontol.* **39**, 1333–1340 (2004).
38. Lalanza, J. F. *et al.* Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 1745–1754 (2012).
39. Ziarniak, K. *et al.* Two weeks of moderate intensity locomotor training increased corticosterone concentrations but did not alter the number of adropin-immunoreactive cells in the hippocampus of diabetic type 2 and control rats. *Acta Histochem.* **123**, 151751 (2021).
40. Matthews, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419 (1985).
41. Armario, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors?. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **5**, 485–501 (2006).
42. Zelena, D. *et al.* Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, 1110–1117 (2003).
43. Engeland, W. C., Miller, P. & Gann, D. S. Dissociation between changes in plasma bioactive and immunoreactive adrenocorticotropic after hemorrhage in awake dogs. *Endocrinology* **124**, 2978–2985 (1989).
44. Gomez-Gomez, A. & Pozo, O. J. Determination of steroid profile in hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1624**, 461179 (2020).
45. Scorrano, F. *et al.* Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB J.* **29**, 859–867 (2015).
46. Shimizu, N. & Hara, C. Effects of chronic glucocorticoid receptor stimulation on circadian locomotor activity and serotonergic neurotransmission in the basolateral amygdala of rats. *Biol. Pharm. Bull.* **43**, 1279–1282 (2020).
47. Bravo, R. *et al.* Body weight gain in rats by a high-fat diet produces chronodisruption in activity/inactivity circadian rhythm. *Chronobiol. Int.* **31**, 363–370 (2014).
48. Schibler, U. & Sassone-Corsi, P. A web of circadian pacemakers. *Cell* **111**, 919–922 (2002).
49. Turek, F. W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* (1979) **308**, 1043–1045 (2005).
50. Ixart, G., Szafarczyk, A., Belugou, J. L. & Assenmacher, I. Temporal relationships between the diurnal rhythm of hypothalamic corticotrophin releasing factor, pituitary corticotrophin and plasma corticosterone in the rat. *J. Endocrinol.* **72**, 113–120 (1977).
51. Zeeni, N. *et al.* Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. *Physiol. Behav.* **139**, 41–49 (2015).
52. Swierczyńska, M. M. *et al.* Changes in morphology and function of adrenal cortex in mice fed a high-fat diet. *Int. J. Obes.* **39**, 321–330 (2015).
53. Incollongo Rodriguez, A. C. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* **62**, 301–318 (2015).
54. Champaneri, S. *et al.* Diurnal salivary cortisol is associated with body mass index and waist circumference: The multiethnic study of atherosclerosis. *Obesity* **21**, E56–E63 (2013).
55. Therrien, F. *et al.* Awakening cortisol response in lean, obese, and reduced obese individuals: Effect of gender and fat distribution. *Obesity* **15**, 377–385 (2007).
56. Vgontzas, A. N. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obese men with and without sleep apnea: Effects of continuous positive airway pressure therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 4199–4207 (2007).
57. Lucassen, E. A. & Cizza, G. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Obesity, and Chronic Stress Exposure: Sleep and the HPA Axis in Obesity. *Curr. Obes. Rep.* **1**, 208–215 (2012).

58. Han, E.-S., Evans, T. R., Shu, J. H., Lee, S. & Nelson, J. F. Food restriction enhances endogenous and corticotropin-induced plasma elevations of free but not total corticosterone throughout life in rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56**, B391–B397 (2001).
59. Rotlland, D., Nadal, R. & Armario, A. Differential effects of stress and amphetamine administration on fos-like protein expression in corticotropin releasing factor-neurons of the rat brain. *Dev. Neurobiol.* **6**, 702–714 (2006).
60. Abd Al Haleem, E. N. & El-Bakly, W. M. The role of MAPK signaling pathway in selenium amelioration of high fat/high cholesterol diet-induced taupathy in rats. *Chem. Biol. Interact.* **302**, 108–116 (2019).
61. Kurhe, Y., Mahesh, R. & Devadoss, T. QCM-4, a 5-HT₃ receptor antagonist ameliorates plasma HPA axis hyperactivity, leptin resistance and brain oxidative stress in depression and anxiety-like behavior in obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 74–79 (2015).
62. Blüher, M. Metabolically healthy obesity. *Endocr. Rev.* **41**, 405–420 (2020).
63. Romanelli, R. *et al.* Pediatric obesity: Prevention is better than care. *Ital. J. Pediatr.* **46**, 103 (2020).
64. Sharma, S. & Fulton, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int. J. Obes.* **37**, 382–389 (2013).
65. Martire, S. I., Westbrook, R. F. & Morris, M. J. Effects of long-term cycling between palatable cafeteria diet and regular chow on intake, eating patterns, and response to saccharin and sucrose. *Physiol. Behav.* **139**, 80–88 (2015).
66. Karelis, A. D. *et al.* The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 4145–4150 (2005).
67. Lalanza, J. F. *et al.* Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in male and female rats. *Sci. Rep.* **5**, 16166 (2015).
68. Leigh, S. J., Kaakoush, N. O., Escorihuela, R. M., Westbrook, R. F. & Morris, M. J. Treadmill exercise has minimal impact on obeso-genic diet-related gut microbiome changes but alters adipose and hypothalamic gene expression in rats. *Nutr. Metab. (Lond.)* **17**, 1–13 (2020).
69. Mayengbam, S. *et al.* Distinct gut microbiota and serum metabolites in response to weight loss induced by either dairy or exercise in a rodent model of obesity. *J. Proteome Res.* **18**, 3867–3875 (2019).
70. Mifune, H. *et al.* Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides (N.Y.)* **71**, 49–55 (2015).
71. Foright, R. M. *et al.* Compensatory eating behaviors in male and female rats in response to exercise training. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **319**, R171–R183 (2020).
72. Feduc, S., Campbell, J. E. & Riddell, M. C. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1867–1875 (2006).
73. Daviu, N., Rabasa, C., Nadal, R. & Armario, A. Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* **17**, 176–185 (2014).
74. Kaptan, Z., Dar, K. A., Kapucu, A., Bulut, H. & Üzüüm, G. Effect of enriched environment and predictable chronic stress on spatial memory in adolescent rats: Predominant expression of BDNF, nNOS, and interestingly malondialdehyde in the right hippocampus. *Brain Res.* **1721**, 146326 (2019).
75. Cameron, I., Alam, M. A., Wang, J. & Brown, L. Endurance exercise in a rat model of metabolic syndrome. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **90**, 1490–1497 (2012).
76. Sanchis-Ollé, M. *et al.* Male long-evans rats: An outbred model of marked hypothalamic-pituitary-adrenal hyperactivity. *Neurobiol. Stress* **15**, 100355 (2021).
77. Burghardt, P. R., Fulk, L. J., Hand, G. A. & Wilson, M. A. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* **1019**, 84–96 (2004).
78. Song, M. K., Lee, J. H. & Kim, Y. J. Effect of chronic handling and social isolation on emotion and cognition in adolescent rats. *Physiol. Behav.* **237**, 113440 (2021).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of Núria Grau and Sandra Simón, of the laboratory technicians at the Eureka Technological Unit of Nutrition and Health, and of the staff at the Unitat d'Experimentació Animal of the Campus Mundet at the Universitat de Barcelona.

Author contributions

Conceptualization: N.B., A.C., M.S. and R.M.E.; methodology: N.B., A.C., A.A., M.S. and R.M.E.; formal analysis: A.A.-M., A.S.-G., M.S. and R.M.E.; investigation (behavioral experiments): A.A.-M., A.S.-G., X.B., H.G., M.S. and R.M.E.; investigation (radioimmunoanalyses): A.A.-M., X.B., H.G., A.A.; investigation (LC-MS/MS): O.J.P.; writing—original draft: A.A.-M., M.S. and R.M.E.; writing—review and editing: A.A.-M., N.B., A.C., R.M.-C., A.A., M.S. and R.M.E.; visualization: A.A.-M.; supervision: A.A., M.S. and R.M.E.; project administration: M.S. and R.M.E.; funding acquisition: M.S. and R.M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, grant number PSI2016-77234-R. A.A.-M. is granted by the Universitat Autònoma de Barcelona, grant PIF-UAB2018. A.S.-G. is granted by the Ministerio de Ciencia e Innovación, grant number BES-2017-081939. This work was also financially supported by the Catalan Government through the funding grant ACCIÓ-EURECAT. The funding sources had no involvement in study design, collection, analysis and interpretation of data, the writing of the report and the decision to submit the article for publication.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23464-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.S. or R.M.E.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

3.2. Capítol 2: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates mascle i femella sobre la conducta associada al gust dolç.

Els continguts d'aquest capítol han sigut publicats amb data 28 de Desembre de 2022 a la revista *Nutrients* en l'article titulat "Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats". La referència completa d'aquest article és: Alvarez-Monell A, Subias-Gusils A, Mariné-Casadó R, Boqué N, Caimari A, Solanas M, Escorihuela RM. Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats. *Nutrients*. 2022;15(1):144. doi:10.3390/nu15010144

En aquest estudi es van dur a terme un test de preferència de dues ampolles (*2-bottle preference test*), un test de reactivitat al tast (*taste reactivity test*) i un test d'accés breu a sucrosa (*brief-access sucrose test*) amb l'objectiu de determinar la ingesta de sucrosa, la reactivitat hedònica induïda per la ingesta de sucrosa, i la sensibilitat a la sucrosa, respectivament. La realització d'aquesta bateria de tests permet obtenir una visió completa i global de la conducta relacionada amb la ingesta de sucrosa així com caracteritzar des del punt de vista conductual, d'una banda, els efectes de l'obesitat, i d'altra banda, els de la intervenció dietètica i de l'exercici físic, per separat i en combinació.

Article

Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats

Adam Alvarez-Monell ^{1,2}, Alex Subias-Gusils ^{1,3} , Roger Mariné-Casadó ⁴ , Noemi Boqué ⁴ , Antoni Caimari ⁴ , Montserrat Solanas ^{1,2,*} and Rosa M. Escorihuela ^{1,3,*}

¹ Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08913 Bellaterra, Spain
³ Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
⁴ Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, Technological Unit of Nutrition and Health, 43204 Reus, Spain
* Correspondence: montserrat.solanas@uab.cat (M.S.); rosamaria.escorihuela@uab.cat (R.M.E.); Tel.: +34-93-5811373 (M.S.); +34-93-5813296 (R.M.E.)

Abstract: The goal of the present study was to evaluate the sweet taste function in obese rats fed with a 30% calorie-restricted cafeteria diet (CAFR) and/or subjected to moderate treadmill exercise (12–17 m/min, 35 min, 5 days per week) for 9 weeks. A two-bottle preference test, a taste reactivity test, and a brief-access licking test were carried out when animals were aged 21 weeks; biometric and metabolic parameters were also measured along the interventions. Two separate experiments for females and males were performed. Behaviorally, CAF diet decreased sucrose intake and preference, as well as perceived palatability, in both sexes and decreased hedonic responses in males. Compared to the CAF diet, CAFR exerted a corrective effect on sweet taste variables in females by increasing sucrose intake in the preference test and licking responses, while exercise decreased sucrose intake in both sexes and licking responses in females. As expected, CAF diet increased body weight and Lee index and worsened the metabolic profile in both sexes, whereas CAFR diet ameliorated these effects mainly in females. Exercise had no noticeable effects on these parameters. We conclude that CAF diet might diminish appetitive behavior toward sucrose in both sexes, and that this effect could be partially reverted by CAFR diet in females only, while exercise might exert protective effects against overconsumption of sucrose in both sexes.

Keywords: energy restriction; physical activity; metabolic syndrome; sex differences; sucrose; wanting; liking



Citation: Alvarez-Monell, A.; Subias-Gusils, A.; Mariné-Casadó, R.; Boqué, N.; Caimari, A.; Solanas, M.; Escorihuela, R.M. Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats. *Nutrients* **2023**, *15*, 144. <https://doi.org/10.3390/nu15010144>

Academic Editor: Megan A. McCrory

Received: 2 December 2022
Revised: 15 December 2022
Accepted: 21 December 2022
Published: 28 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Obesity and overweight are two of the biggest health concerns worldwide, with one-third of the population being overweight or obese [1]. The increase in available high-fat and high-sugar food choices has contributed to increased obesity rates [2]. The consumption of these foods and drinks has spiked in recent decades and has been associated with an increase in adiposity, biomarkers of metabolic syndrome (MetS), and associated pathologies [2,3].

Studies have tried to elucidate how an obese phenotype impacts sweet taste. It has been reported in humans that a high BMI is associated with lower perceived sweetness, and with increased liking for sweetness [4]. Preclinical studies have shown that the adipokine leptin has been linked to sweet taste function at several levels, from the taste receptors in the taste buds to the brain reward processing system [5]. It is known that leptin alters sweet taste transduction through the Ob-Rb leptin receptor located in the T1R3 cells of the taste bud that are activated by sweet stimuli [6]. In nonobese humans and rodents, the

behavioral responses to a sweet stimulus change with the circadian rhythms of circulating leptin, whilst, in obese individuals, these circadian changes in leptin are absent [7].

Clinically, obesity is treated by improving diet quality and reducing caloric intake, by increasing physical exercise, and by bariatric surgery in severe cases [8]. These interventions have been shown to affect the sweet taste function with contrasting outcomes. For example, weight loss induced through dieting [9] or cognitive therapy [10] has been reported to decrease liking for concentrated sucrose solutions in women, although no differences were observed in other studies [11]. Physical exercise appears to have differential effects on sweet taste depending on whether the training is acute or chronic. Acute bouts of intense aerobic exercise increased the intake of sweet solutions and the reported liking of sucrose in healthy subjects [12,13], suggesting a compensatory effect of the nutrient depletion due to the exercise bout [14], while an increase in self-reported physical activity over 6 months decreased the perceived intensity of sweet solutions [15]. However, it is unclear whether these changes in sweet taste function are a direct result of the exercise itself or of the weight loss associated with it [14]. Nutritional state appears not to be a strong determinant of sweet taste function [16], and studies comparing sweet taste detection thresholds between individuals consuming vegan, vegetarian, or omnivorous diets for decades [17] or low-sugar diets for months [18] did not show altered thresholds. However, it has also been reported that a low-vegetable meal increases sweetness desire 2 h after meal consumption [19], while another study reported no differences in sweet intensity and hedonics after a meal [20].

Several animal models have been developed to study obesity [21]. Among them, the cafeteria diet (CAF)-induced obesity (DIO) model, in which animals are fed several high-fat and high-sugar items of human consumption [22,23], is considered a robust model with high face validity for human obesity [24]. CAF diet induces obesity through hedonic eating and hyperphagia due to the high palatability of its ingredients; additionally, it generates more severe MetS symptoms than other high-fat and high-sugar diets [25,26].

In animal models of DIO, a decrease in motivational behavior toward sweet stimuli, as measured by increased latency to approach the sweet stimuli and/or decreased consumption, has been reported in males [27–29]. It has also been reported that diet-induced weight loss in male rats increases preference for low concentrations of sucrose [28]. Furthermore, a decrease in preference for highly concentrated sweet solutions in males has been reported in models of gastric bypass surgery [30,31]. The effects of exercise in animal models and how it affects sweet taste have not been extensively studied. We previously reported a decrease in sugared milk and carbohydrate intake in female Sprague-Dawley rats after 8 weeks of treadmill exercise [32]. Other authors have shown that female mice selectively bred for a high runner phenotype showed decreased consumption of artificial sweeteners when exercised [33]. Sex differences exist in human taste perception, with women being generally more sensitive than men [34–36]. This sexual dimorphism is also present in rats, in which females show higher intakes of sucrose solutions than males [37,38].

The responses to sweet stimuli in animals can be interpreted in terms of wanting and liking, which are considered two separate processes [39]. Wanting is considered to be related to how much of a reward is consumed, while liking is related to hedonic impact and to which reward is consumed [40]. Wanting is thought to be a process mediated by the dopaminergic system that encompasses several brain structures processing reward value, such as the mesocorticolimbic dopaminergic system. On the other hand, liking is thought to be mediated by small and localized areas, termed hedonic hotspots, mainly modulated by the opioidergic system and overlapping with areas controlling wanting [39]. These two processes are relatively independent, since it has been shown that mesolimbic dopamine depletion impairs the ability to exert motivational effort while not affecting hedonic reactivity [41], and that elevated dopamine levels increase motivational effort while not affecting hedonic reactivity [42]. However, while wanting can be affected without altering liking, modifications that alter liking almost always alter wanting [40,43].

In this study, we aimed to (i) characterize the effects of CAF DIO upon the sweet taste in terms of wanting and liking, (ii) determine the putative changes in wanting and liking of sucrose solutions due to dietary and exercise interventions based on a calorie-restricted CAF diet (CAFR) and treadmill training in DIO animals, and (iii) analyze the changes in food intake, as well as biometric and metabolic parameters, induced by these interventions. We aimed to determine these parameters in Long-Evans rats, both in females (Experiment 1) and in males (Experiment 2).

2. Materials and Methods

2.1. Experiment 1

2.1.1. Animals

Sixty female Long-Evans rats (Janvier, France), 23–25 days-old at the time of delivery, were used. Animals were housed in pairs in standard Plexiglas cages, maintained under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 8 a.m.) in standard conditions (temperature: 21 ± 1 °C; humidity 50 ± 10%). After 1 week of habituation to the animal room, they were randomly assigned to two groups balancing mean body weight (BW): STD (n = 20, BW = 89.11 ± 1.94 g) and CAF (n = 40, BW = 88.58 ± 1.25 g). The experimental protocol was approved by the Generalitat de Catalunya (DAAM 9978), following the ‘Principles of laboratory animal care’ and was performed in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EU).

2.1.2. Experimental Design

We used a 3 × 2 factorial design with diet (STD, CAF, and CAFR) and exercise (control C and exercise E) as factors and six experimental groups. After inducing obesity by the administration of the CAF diet for 8 weeks, animals were randomly allocated in pairs to the following groups, balancing mean body weight: STD-C (n = 10, BW = 217.7 ± 4.11 g), STD-E (n = 10, BW = 216.9 ± 4.40 g), CAF-C (n = 10, BW = 264.7 ± 9.67 g), CAF-E (n = 10, BW = 261.2 ± 7.89 g), CAFr-C (n = 10, BW = 259.5 ± 7.51 g), and CAFr-E (n = 10, BW = 263.3 ± 5.98 g). Interventions were maintained throughout the experiment unless otherwise noted. Every week, the animals were weighed, and food intake was determined as the difference between foods provided on Monday and unconsumed the day after. Nasoanal length (NAL) and Lee index ($\frac{\sqrt[3]{BW}}{LNA} \times 1000$) were recorded every 2 weeks. Behavioral testing started when the animals were 22 weeks old and consisted of the sucrose preference test (week 18), the taste reactivity test (week 19), and the brief-access licking test (weeks 20 and 21). During the 10–12 days after finishing the behavioral testing, the dietary treatment and treadmill sessions occurred as usual. Animals were sacrificed by decapitation at week 23 after 8 h of fasting. Blood was collected, and serum was obtained by centrifugation at 2000 × g for 15 min at 4 °C and stored at –80 °C until further analysis. The white adipose tissue (WAT) depots (retroperitoneal, RWAT; mesenteric, MWAT; epididymal, EWAT; and inguinal, IWAT) were also removed and weighed. Figure 1 shows a schematic design of experiments 1 and 2.

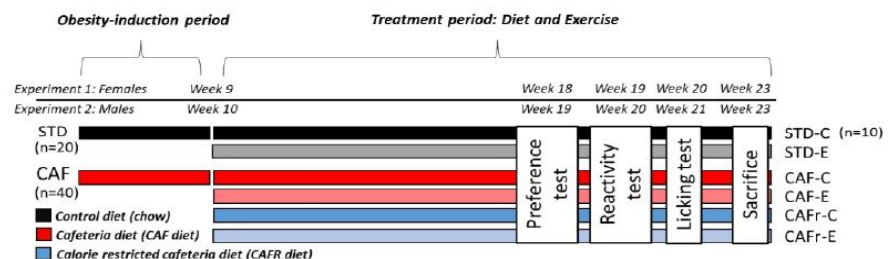


Figure 1. Schematic representation of the experimental layout for experiments 1 and 2 showing groups and the time of behavioral testing.

2.1.3. Diets

During the obesity-induction period, the STD and CAF groups were fed standard chow and CAF diet ad libitum (Supplementary Table S1). From week 9 onward, the CAF diet consisted of (averaged quantities per rat per day) bacon (7 g), biscuits with pâté (5 g), biscuits with cheese (5 g), muffins (7 g), carrots (7 g), jellied sugared milk (40 g), and standard chow (25 g). Food items were administered in a clay pot inside the cage and prepared fresh each day. The average amounts of food and energy administered per rat per day were 96 g and 233 kcal, respectively, and the caloric distribution of the CAF diet was 10.6% protein, 38.3% fat, and 51.1% carbohydrates. We previously used a similar CAF diet in females and showed that it has obesogenic effects [43]. The caloric content of the standard chow (2014 Teklad Global Rodent Diet, Envigo) was 290 kcal per 100 g, and its caloric distribution was 20% protein, 13% fat, and 67% carbohydrates.

As for the CAFR diet, the amount of each item provided was (averaged quantities per rat per day) bacon (2.4 g), biscuits with pâté (2.5 g), muffins (1.8 g), carrots (6.3 g), jellied sugared milk (4.6 g), and standard chow (7.5 g). The average amounts of food and energy administered per rat per day were 25.1 g and 61.5 kcal, respectively, and the caloric distribution of the CAFR diet was as follows: 11.4% protein, 42% fat, and 46.6% carbohydrates. Food items were also administered in a clay pot inside the cage and renewed daily.

2.1.4. Treadmill Training

Training was performed in a treadmill (Columbus instruments, Columbus, OH, USA) as reported in [44] with some modifications.

This began on week 9 along with dietary intervention, with daily training sessions from Monday to Friday (5 days/week), and with the intensity raising progressively from 7 m/min in session 1 to 17 m/min in session 9 (Supplementary Table S2). From session 9 onward, all sessions started at an intensity of 7 m/min, increasing progressively until 17 m/min at min 6, which was maintained until minute 30 and then lowered to 8 m/min for the last 5 min. Sessions ended at minute 35, at an approximate total distance run of 591 m.

2.1.5. Behavioral Testing

- Two-bottle sucrose preference test

To determine the preference for sucrose solutions, a two-bottle preference test was performed. Animals were housed individually the day before starting the test to allow for individualized testing. The exercise intervention was maintained throughout the behavioral test, but all animals were fed only chow to control for interferences between experimental diets and the test results. The test consisted of placing two bottles, one containing a sucrose solution and the other one containing tap water. On the first day, the animals were presented with tap water in the two bottles (250 mL each) placed at opposite sides of the food container cover of the animals' cage to habituate them to the procedure and to measure water intake for 24 h. The day after and over seven consecutive days, seven concentrations of sucrose solutions were presented in ascending order and tested for 24 h (0.01 M, 0.03 M, 0.06 M, 0.1 M, 0.3 M, 0.6 M, and 1 M). Sucrose solutions were prepared daily using tap water. Water and sucrose intakes were recorded daily, and bottles' positions were randomly switched between concentrations to avoid lateral preference. *Sucrose preference ratio* was calculated according to the following formula:

$$\text{Sucrose preference} = \frac{\text{sucrose solution intake (g)}}{\text{water intake (g)} + \text{sucrose solution intake (g)}} \times 100$$

- Taste reactivity test

After the two-bottle preference test, the animals were returned to the home cages in pairs. To evaluate hedonic responses to different sucrose solutions, we performed the

taste reactivity test according to Shin et al. 2011 [28]. Over four consecutive days, the orofacial responses elicited by four sucrose solutions (0.03 M, 0.1 M, 0.3 M, and 0.6 M) prepared daily using tap water and administered (one each day) in ascending order were recorded. Animals were placed in a cylindrical (29 cm height; 25 cm diameter) Plexiglass cage, and, after 2.5 min, 1 mL of sucrose solution was deposited with a micropipette on the edge of the circular transparent floor. The orofacial expressions were recorded from below using a video camera (JVC, HD Everio GZ-HD10) for 2.5 min from the time the mouth of the animal had the first contact with the solution. Positive hedonic responses (tongue protrusion TP, rhythmic protrusions of the tongue on the midline, and discrete nonrhythmic lateral protrusions of the tongue [45]) were measured as the number of episodes (n) and total duration (s). Behavior was scored by examination of slow-motion videos by a trained experimenter [45].

- Brief-access licking test

To determine the sensitivity and reward value of sucrose, animals were tested on a lickometer (Med Associates Inc., St. Albans, VT, USA). Both the dietary and the exercise interventions were suspended for the duration of the test. The testing procedure encompassed a 4 day habituation period to the apparatus (days 1–4), a habituation session to the test conditions on day 5, and the final test on day 7. The day before starting the habituation period (day 0) the animals were deprived of water. During the habituation period, the animals were placed in the testing chamber and presented with a spout connected to a plastic bottle containing water positioned behind an open slot in the wall of the cage. On days 1 and 2, animals were placed in the chamber and allowed 30 min of uninterrupted water presentation to train them to lick the spout. On days 3 and 4, they were allowed 20 s to lick the spout, and, once licking started, they had 10 s before a shutter blocked access to the spout and a motorized wheel positioned the next spout. Eight bottles containing water were placed in the motorized wheel, and each bottle was presented eight times for a total of 64 trials each session. On day 5, animals were tested with one bottle containing water and the other seven bottles containing sucrose solutions (0.01 M, 0.03 M, 0.06 M, 0.1 M, 0.3 M, 0.6 M, and 1 M). The presentation order was randomized in eight blocks without repetition. When the session ended, the animals were returned to their home cage and allowed access to water. No session was administered on day 6, and the animals were allowed to rest in their home cage. The final test was carried out on day 7 under no water restriction and using the same procedure as day 5. Animals were weighed daily during the test to ensure no animals lost more than 15% of their baseline body weight due to the water restriction. From this test, the number of trials that initiated licking responses, the total number of licks performed in a session, the number of licks performed at each trial, the mean duration of a licking bout (defined as consecutive licks separated by ILIs between 50 and 250 ms), and the interlick interval (ILI) between consecutive licks with a time resolution of 10 ms, which was used to determine the mean ILI distribution for each experimental group, were recorded.

2.1.6. Serum Analyses

Analysis of serum samples was performed as in [44]. Briefly, enzymatic colorimetric kits were used for the determination of serum total cholesterol, triglycerides, and glucose (QCA, Barcelona, Spain). Serum insulin and leptin levels were measured using a mouse/rat insulin ELISA kit (Mercodia, Barcelona, Spain) and a rat leptin ELISA kit (Millipore, Barcelona, Spain). The homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula [46]: $HOMA-IR = \text{glucose} \times \text{insulin} / 22.5$.

2.2. Experiment 2

2.2.1. Animals, Timeline, and Experimental Design

Experiment 2 followed a similar design to experiment 1. For detail on the animals used and the experimental design, see [44]. Of note, the exercise and CAFR interventions started at week 10, the preference test was performed at week 19, the taste reactivity test

was performed at week 20, and the brief-access licking test was performed at weeks 21–22. Figure 1 shows the schematic design of experiment 2.

2.2.2. Dietary and Exercise Interventions

A similar CAF diet, CAFR diet, and treadmill exercise to experiment 1 were used in experiment 2. For details on the amounts of food and energy administered per day and treadmill training, see [44]. Of note, the exercise intensity in experiment 2 was set at 12 m/min instead of 17 m/min. This decrease in intensity is because female rats tolerate higher treadmill intensities and are better runners than males [32,47,48].

2.2.3. Behavioral Testing

- Two-bottle sucrose preference test

The test was performed at week 19 using a similar methodology as experiment 1. The corresponding dietary and exercise interventions were maintained during testing.

- Taste reactivity test

The test was performed at week 20 using the same methodology as experiment 1

- Brief-access licking test

The test was performed at week 21 using the same methodology as experiment 1. The exercise intervention was interrupted during the habituation and testing, and the dietary intervention was maintained.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the “Statistical package for Social Sciences” (SPSS, version 22, IBM). Biometric and intake data for the first period of obesity induction were analyzed separately with Student’s t-test. Data for the second period were analyzed separately using two two-way ANOVA analyses to determine the effects of the factors diet and exercise: a first two-way ANOVA comparing CAF and STD groups [diet (STD, CAF) × exercise (C, E)] and a second two-way ANOVA comparing CAFR and CAF groups [diet (CAF, CAFR) × exercise (C, E)]. Data comprising several timepoints (BW progression, sucrose intake in the two-bottle preference test, lick score, mean burst size, and mean ILI distribution in the brief-access licking test) were also analyzed with two two-way repeated-measures ANOVAs with time or sucrose concentration as within factors, and diet and exercise as between factors. Sucrose preference and the taste reactivity test data were analyzed with Kruskal–Wallis followed by the Mann–Whitney U test for pairwise comparisons due to unequal variances assessed with Levene’s test. The number of animals that contacted the sucrose solution in the taste reactivity test was analyzed using the chi-squared test.

Mean lick scores data for each group were curve fitted using the following logistic function [49,50]:

$$F(x) = \frac{a + b}{[1 + 10^{(x-c)d}]},$$

where a is the asymptotic lick response, b is the lower lick response, x is the \log_{10} stimulus concentration, c is the \log_{10} concentration at the inflection point, and d is the slope of the curve.

Mean ILI distribution data were curve-fitted to the Gaussian function according to Lin et al. (2013) [51] using the following function:

$$F(x) = \text{Amp} \cdot \exp^{-0.5 \cdot \left(\frac{x - \text{Mean}}{\text{SD}} \right)^2},$$

where amplitude (Amp) is the height at the center of the distribution, mean is the X value at the center of the distribution, and SD is the standard deviation of the distribution.

All the results are expressed as the mean ± SEM. The level of statistical significance was set at bilateral 5%.

3. Results

3.1. CAFR Diet Exerted Corrective Effects on CAF-Induced Alterations on Biometric Data in Females

We first analyzed body weight gain (BWG) (Figure 2A,C) and the Lee index (Figure 2B,D), in the first period. We found higher BWG and Lee index in CAF animals than in STD animals in both sexes ($p < 0.01$). Over the second period, this increase in BWG and Lee index in CAF compared to STD was maintained ($p < 0.001$). Moreover, CAFR diet significantly decreased BWG and Lee index compared to CAF in females (second analysis: $p < 0.01$), while, in males, the Lee index tended to decrease ($p = 0.062$) with no significant effect on BWG. No effects of the exercise or the interaction diet * exercise were detected in any parameter in either sex. For details on the progression of BW through the experiment, see Supplementary Figure S1.

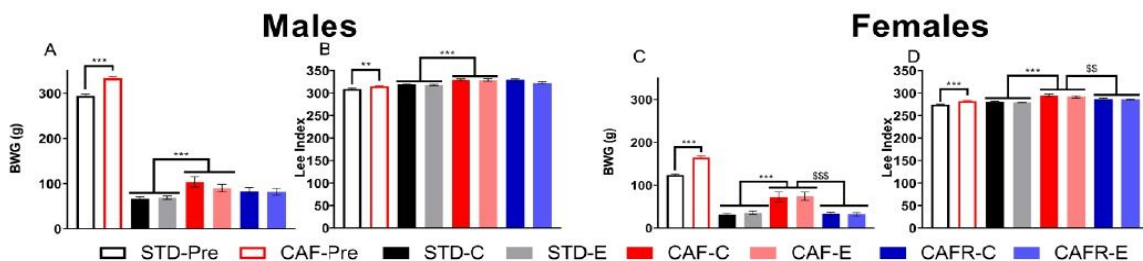


Figure 2. Effects of dietary and exercise interventions on body weight gain (BWG) and Lee index at the end of the obesity induction period (empty bars at the left side of each graphic) and before starting behavioral testing (filled bars). (A) BWG in females (week 8, empty bars; week 17, filled bars). (B) Lee index in females (week 8, empty bars; week 17, filled bars). (C) BWG in males (week 10, empty bars; week 18, filled bars). (D) Lee index in males (week 10, empty bars; week 18, filled bars). ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ STD versus CAF; \$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$ CAF versus CAFR.

3.2. CAFR Diet Partially Corrected the Increase in Food and Energy Intake Induced by CAF Diet in Both Sexes

Regarding the dietary intake parameters (Table 1), CAF diet greatly increased the daily total food intake in the first period ($p < 0.001$). This effect was maintained in the second period of the experiments ($p < 0.001$). No effects of exercise or the diet × exercise interaction were detected. In the CAF groups, the energy consumed came mainly from the CAF diet rather than chow (514 kcal versus 86 kcal in males and 518 kcal versus 44 kcal in females). Additionally, throughout the experiments, CAF fed animals decreased chow intake compared to STD fed animals ($p < 0.001$), the diet × exercise interaction in the males' experiment did not reach significance ($p = 0.056$).

When comparing CAF and CAFR diets, we found that CAFR lowered the total food intake in both sexes ($p < 0.001$). No effects of exercise or the diet × exercise interaction were observed. When analyzing the chow intake, we found that CAFR increased the energy consumed from chow and decreased the energy consumed from cafeteria diet ($p < 0.001$).

Table 1. Intake parameters in males and females during the obesity-induction period (STD-Pre and CAF-Pre columns) and for the six experimental groups during the interventions period of the two experiments.

		STD-Pre	CAF-Pre	STD-C	STD-E	CAF-C	CAF-E	CAFR-C	CAFR-E
Total Food intake (g/Kg)	Males	90.7 ± 2.48	265.3 ± 24.33 ***	42.95 ± 2.87	46.18 ± 2.63	111.93 ± 13.74 ***	109.26 ± 17.15 ***	78.74 ± 7.73 \$\$\$	76.71 ± 6.61 \$\$\$
	Females	88.9 ± 3.05	229.8 ± 30.76 ***	56.23 ± 4.09	56.23 ± 2.38	130.9 ± 13.31 ***	123.3 ± 16.9 ***	62.03 ± 6.69 \$\$\$	46.5 ± 7.11 \$\$\$
Chow energy intake (Kcal/Kg)	Males	263.0 ± 7.2	86.3 ± 14.4 ***	124.5 ± 8.33	133.9 ± 7.61	24.5 ± 8.21 ***	22.8 ± 10.73 ***	47.4 ± 7.77 \$\$\$	47.3 ± 9.53 \$\$\$
	Females	257.9 ± 8.86	44.8 ± 13.54 ***	163.08 ± 11.87	163.07 ± 6.92	18.61 ± 5.20 ***	22.28 ± 9.31 ***	41.29 ± 6.5 \$\$\$	45.04 ± 10.24 \$\$\$
Non-chow energy intake (Kcal/Kg)	Males	-	514.7 ± 9.96	-	-	233.1 ± 6.20	231.1 ± 6.86	129.2 ± 5.07 \$\$\$	126.4 ± 4.02 \$\$\$
	Females	-	518.7 ± 7.97	-	-	283.4 ± 11.89	275.9 ± 11.52	139.1 ± 4.17 \$\$\$	140.6 ± 3.25 \$\$\$
Chow intake (% of total energy intake)	Males	100	14.38 ± 0.47 ***	100	100	9.61 ± 1.07 ***	8.99 ± 1.31 ***	26.94 ± 1.36 \$\$\$	27.22 ± 1.67 \$\$\$
	Females	100	7.96 ± 0.55 ***	100	100	5.32 ± 0.97 ***	7.30 ± 1.26 ***	22.92 ± 1.71 \$\$\$	24.16 ± 2.10 \$\$\$
Non-chow intake (% of total energy intake)	Males	-	85.62 ± 0.47	-	-	90.39 ± 1.07	91.01 ± 1.31	73.06 ± 1.36 \$\$\$	72.78 ± 1.67 \$\$\$
	Females	-	92.04 ± 0.55	-	-	94.68 ± 0.97	92.70 ± 1.26	77.08 ± 1.71 \$\$\$	75.84 ± 2.10 \$\$\$
Simple sugars (Kcal/Kg)	Males	-	167.6 ± 4.25	-	-	72.8 ± 5.18	69.87 ± 6.03	36.91 ± 2.04 \$\$\$	34.75 ± 1.83 \$\$\$
	Females	-	157.3 ± 6.03	-	-	84.85 ± 4.67	81.43 ± 5.57	31.76 ± 2.28 \$\$\$	33.69 ± 2.30 \$\$\$

Averaged daily total food, chow, non-chow cafeteria diet, and simple sugar intake relativized to BW (kg) or as a percentage of total energy intakes from chow and non-chow. *** $p < 0.001$ STD versus CAF; \$\$\$ $p < 0.001$ CAF versus CAFR.

3.3. CAFR Partially Corrected the Increase in Serum MetS Biomarkers and Adiposity Induced by CAF Diet in Females

When comparing STD and CAF diets, we found that CAF females increased the circulating levels of glucose (Figure 3A), triacylglycerides (Figure 3B), insulin (Figure 3C), the insulin resistance index HOMA-IR (Figure 3D), and leptin (Figure 3E), but not total cholesterol (Figure 3F) (glucose, triacylglycerides, insulin, and leptin: $p < 0.001$; HOMA-IR: $p < 0.01$; cholesterol: $p = 0.073$). Exercise tended to decrease cholesterol levels ($p = 0.090$).

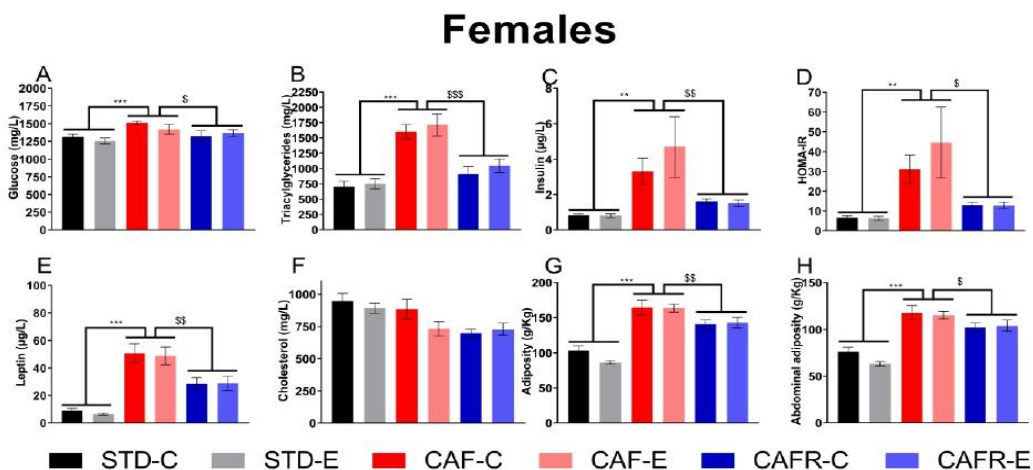


Figure 3. Effects of dietary and exercise interventions on metabolic parameters and adiposity in females. (A) Circulating glucose levels. (B) Circulating triacylglycerides levels. (C) Circulating insulin levels. (D) HOMA-IR index. (E) Circulating leptin levels. (F) Circulating cholesterol levels. (G) Total relative (g/kg) adiposity. (H) Abdominal (sum of epididymal, retroperitoneal and mesenteric fat depots) relative (g/kg) adiposity. ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus STD; \$ $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.01$, and \$\$\$\$ $p < 0.001$ versus CAF.

On the other hand, CAFR diet decreased glucose, triacylglycerides, insulin, leptin, the HOMA-IR and tended to decrease cholesterol levels compared to CAF (glucose: $p < 0.05$; triacylglycerides: $p < 0.001$; insulin, leptin, and HOMA-IR: $p < 0.01$; cholesterol: $p = 0.088$). No significant diet × exercise interactions and no effects of exercise were detected.

Regarding adipose tissue depots, CAF females showed increased relative total and abdominal adiposity compared to STD females ($p < 0.001$) (Figure 3G,H). CAFR diet

decreased total ($p < 0.01$) and abdominal ($p < 0.05$) adiposity compared to CAF diet. No effects of exercise or the diet \times exercise interaction were detected in any comparison.

The corresponding data for the males' experiment were published in a previous article [44].

3.4. CAF Decreased Sucrose Consumption While CAFR Reverted this Effect in Females, and Exercise Decreased Sucrose Intake in the Sucrose Preference Test

Regarding the effects of CAF diet on sucrose preference and intake compared with STD diet, the results showed an inverted-U pattern of sucrose intake in both sexes, increasing between the 0.01 M and the 0.1 M–0.3 M solutions, and then decreasing from that point onward (Figure 4A,C). There was a significant main effect of sucrose concentration ($p < 0.001$), as well as a significant diet \times concentration interaction ($p < 0.001$), indicating that the intakes changed with the sucrose concentration in both sexes, and those changes differed between diets. Pairwise comparisons showed that, in both sexes, CAF diet diminished intakes at all sucrose concentrations compared to STD ($p < 0.001$). Exercise in females decreased sucrose concentration intake ($p < 0.01$). Specifically, it decreased the sucrose intake of the 0.06 M solution and tended to decrease the intake of 0.03 M solution [0.06 M, $p < 0.05$; 0.3 M, $p = 0.079$]. The triple interaction of diet \times exercise \times concentration was not significant in either sex.

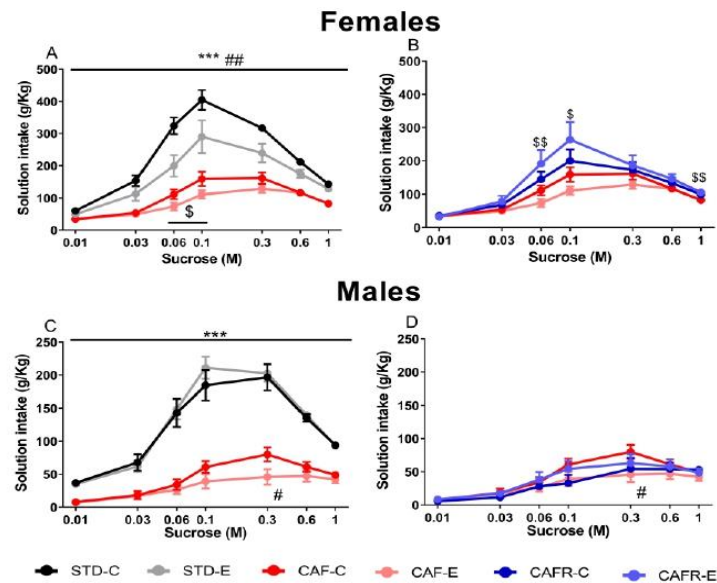


Figure 4. Sucrose intake (g/kg) in the two-bottle sucrose preference test in females and males. (A) Sucrose intake for STD and CAF groups in females. (B) Sucrose intake for CAF and CAFR groups in females. (C) Sucrose intake for STD and CAF groups in males. (D) Sucrose intake for CAF and CAFR groups in males. *** $p < 0.001$ STD versus CAF; \$ $p < 0.05$ and \$\$ $p < 0.01$ CAF versus CAFR; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus non-exercised condition.

When analyzing the CAFR diet compared to the CAF diet, we found differential sex effects, with increased sucrose intake in CAFR females ($p < 0.01$) (Figure 4B) and no effect on males (Figure 4D). This effect in females was significant for the 0.06 M ($p < 0.01$), 0.1 M ($p < 0.05$), and 1 M ($p < 0.01$) solutions and tended toward significance for the 0.03 M ($p = 0.052$) and 0.6 M ($p = 0.059$) solutions. No effect of the concentration \times exercise interaction was observed in either sex. The analysis of the diet \times exercise \times concentration interaction showed a tendency toward significance in males ($p = 0.092$) but not in females

($p = 0.108$). Decomposition of this interaction revealed that CAF-E males had lower intakes than CAF-C males at the 0.3 M concentration ($p < 0.05$), while CAFR-C and CAFR-E males showed similar intakes.

We also analyzed the sucrose preference at each sucrose concentration (Figure 5). Results showed differences in sucrose preference when comparing STD and CAF control and exercised groups. In CAF females, sucrose preference decreased at 0.03 M ($p < 0.01$), 0.06 M ($p < 0.05$), and 0.1 M ($p < 0.01$) compared to STD. In CAF males, sucrose preference also decreased significantly at the 0.06 M ($p < 0.01$) and 0.1 M ($p < 0.05$) concentrations, and tendencies were found at 0.03 M ($p = 0.072$) and 0.3 M ($p = 0.061$) concentrations compared to the STD diet. No significant effect was found between CAF and CAFR in either sex.

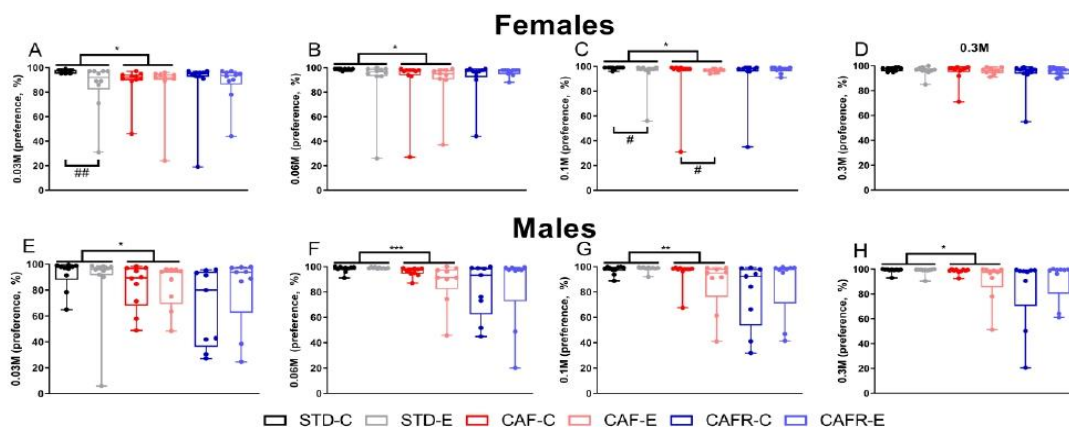


Figure 5. Sucrose preference for different sucrose solution concentrations by group in both sexes. Only solutions in which a significant result was found are shown. (A) Preference at 0.03 M in females. (B) Preference at 0.06 M in females. (C) Preference at 0.1 M in females. (D) Preference at 0.3 M in females. (E) Preference at 0.03 M in males. (F) Preference at 0.06 M in males. (G) Preference at 0.1 M in males. (H) Preference at 0.3 M in males. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ STD versus CAF; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus non-exercised corresponding diet group.

Pairwise comparisons showed that CAF females decreased their preference for the 0.03 M (Figure 5A) ($p < 0.05$), 0.06 M (Figure 5B) ($p < 0.05$), and 0.1 M (Figure 5C) ($p < 0.05$) solutions, while CAF males decreased their preference for the 0.03 M (Figure 5E) ($p < 0.05$), 0.06 M (Figure 5F) ($p < 0.001$), 0.1 M (Figure 5G) ($p < 0.01$), and 0.3 M (Figure 5H) ($p < 0.010$) solutions compared to STD. Within diet conditions, exercise decreased sucrose preference in STD and CAF females. Specifically, exercise decreased sucrose preference in STD at the 0.03 M ($p < 0.01$) and 0.1 M ($p < 0.05$) concentrations, and in CAF at 0.1 M ($p < 0.05$).

3.5. CAF Decreased Hedonic Reactions to Concentrated Sucrose Solutions in Males but Not in Females

To determine the hedonic reactions as measured by the tongue protrusions (TP) elicited in response to tasting the different sucrose concentrations (0.03 M, 0.1 M, 0.3 M, and 0.6 M), a taste reactivity test was performed. Results showed that, in males, CAF diet decreased the total number of TPs compared to STD (Figure 6D) ($p < 0.05$). CAF diet also tended to decrease the total time spent performing TPs (Figure 6E) ($p = 0.094$). No significant effects were found in females (Figure 6A–C) when comparing STD and CAF, and no significant differences were found between CAF and CAFR in either sex. The detailed behavior elicited by each sucrose concentration is shown in Supplementary Figure S2.

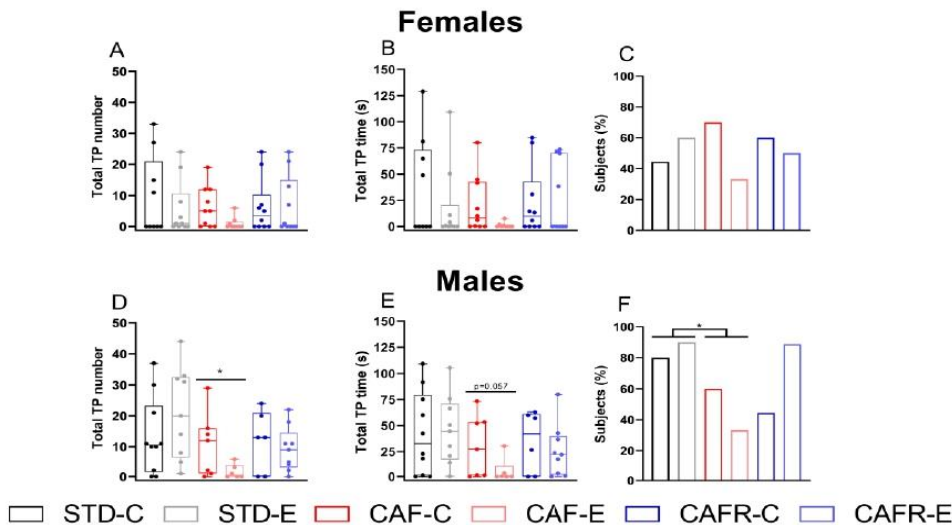


Figure 6. Hedonic responses (tongue protrusions, TP) in the taste reactivity test in both sexes. (A) Total number of TPs in females for all sucrose solutions tested. (B) Total time spent doing TPs in females. (C) Percentage of females that contacted the sucrose solution during the test days and performed at least one TP. (D) Total number of TPs in males for all sucrose solutions tested. (E) Total time spent doing TPs in males. (F) Percentage of males that contacted the sucrose solution during the test days and performed at least one TP. * $p < 0.05$ STD versus CAF.

3.6. Licking Test

To determine the reward value and the sensitivity to sucrose concentrations, a brief-access licking test was performed. For details on the training sessions, see Supplementary Figure S3.

CAF Decreased the Lick Response in Females and Exercise Decreased It in Both Sexes

The analyses in females showed that CAF diet tended to decrease the number of trials initiated (Figure 7A) ($p = 0.068$) and significantly decreased the total licks (Figure 7B) ($p < 0.05$) compared to the STD diet, with no effect of exercise or the interaction. A main effect of concentration on the number of licks (Figure 7C) was found ($p < 0.001$), but it was unaffected by the interventions. However, the between-subject effects indicated that CAF diet decreased the overall lick score ($p < 0.05$). When analyzing the burst size comparing STD and CAF (Figure 7E), we found a significant main effect of concentration ($p < 0.001$), and no interaction with factors. However, the between-subject effects showed a significance for the factor diet ($p < 0.01$), with exercised animals presenting higher burst size than non-exercised animals.

When comparing CAF and CAFR females, we found an increase in the number of trials initiated ($p < 0.05$) and the total licks ($p < 0.05$) in the CAFR female groups, with no effect of exercise or the interaction. Regarding the lick score (Figure 7D), the analysis revealed that the concentration \times diet interaction was significant ($p < 0.01$), indicating an increase of the lick score in CAFR animals at 0.3 M ($p < 0.05$) compared to CAF, with 1 M being close to significance ($p = 0.055$). There were no significant concentration \times exercise or concentration \times diet \times exercise interactions. The test of between-subject effects was significant for the diet \times exercise interaction in females ($p < 0.05$), indicating that CAF-E animals performed fewer licks overall than CAF-C ($p < 0.05$), while CAFR-C and CAFR-E animals did not differ. When comparing the burst size (Figure 7F) between CAF and CAFR females, we detected significance for the factor diet ($p < 0.01$), but not for exercise or the interaction,

suggesting an increased orosensory stimulation in CAFR females compared to CAF at the 0.3 M ($p < 0.05$) and 1 M ($p < 0.01$) concentrations. Additionally, the between-subject effects revealed a significant effect of diet ($p < 0.05$), indicating overall longer bursts in the CAFR than in the CAF female groups.

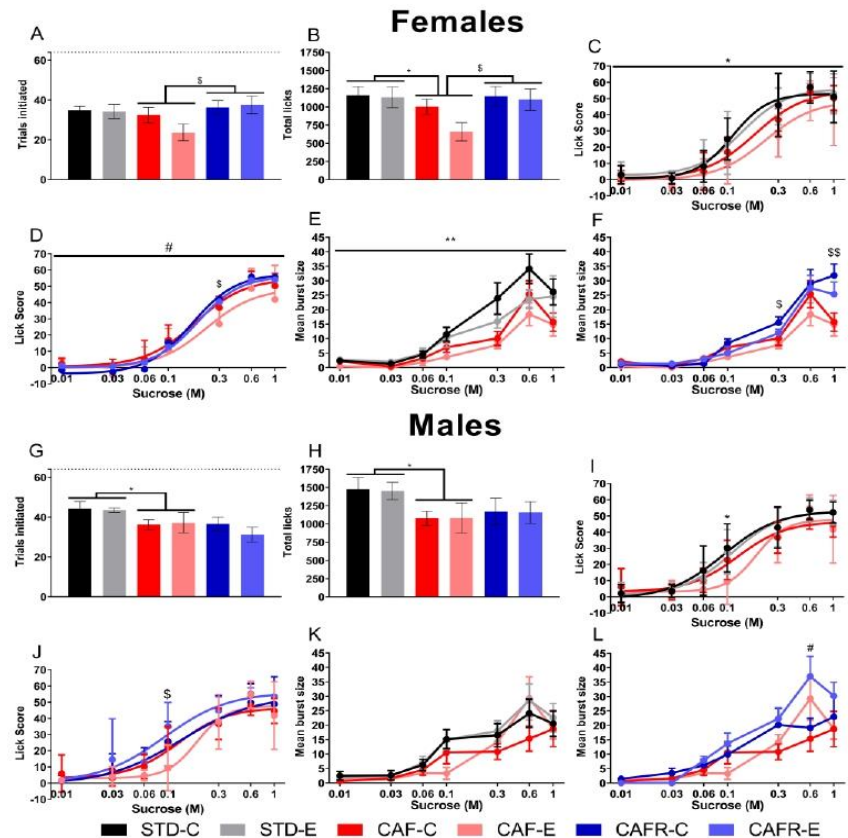


Figure 7. Licking test for both sexes. (A) Number of trials initiated in females. (B) Total licks performed in females. (C) Lick curve in STD and CAF females. (D) Lick curve in CAF and CAFR females. (E) Mean burst size in STD and CAF females. (F) Mean burst size in CAF and CAFR females. (G) Number of trials initiated in males. (H) Total licks performed in males. (I) Lick curve in STD and CAF males. (J) Lick curve in CAF and CAFR males. (K) Mean burst size in STD and CAF males. (L) Mean burst size in CAF and CAFR males. Dashed lines in A and G indicate the total number of trials in a session (64 trials). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ STD versus CAF; \$ $p < 0.05$ and \$\$ $p < 0.01$ CAF versus CAFR; # $p < 0.05$ versus non-exercised condition.

The analysis in males of the number of trials initiated and the total number of licks performed in the test session revealed that CAF animals initiated fewer trials (Figure 7G) ($p < 0.05$) and performed fewer licks (Figure 7H) ($p < 0.05$) than STD animals, with no effect of exercise or the diet \times exercise interaction on these two variables. When analyzing the lick score at each concentration (Figure 7I), a main effect of concentration was found in males ($p < 0.001$), which was affected by diet and exercise ($p < 0.05$). This translated into a lower response to the 0.1 M solution in CAF-fed animals ($p < 0.05$) and a similar tendency at 1 M ($p = 0.061$) compared to STD. The effect of exercise per se was not noticeable at any concentration. We then analyzed the burst size (Figure 7J), defined as the mean number

of consecutive licks with an interlick interval between 50 and 250 ms. Results showed a significant main effect of concentration ($p < 0.001$), indicating progressively longer bursts as concentration increased, but no significant interactions with diet or exercise. This measure is thought to reflect the potency of orosensory stimulation and the perceived palatability of the tastant [52].

When comparing CAF and CAFR males, no differences in the number of trials initiated or the total number of licks appeared. We found a tendency toward diet affecting the lick score (Figure 7J) ($p = 0.066$), which translated into an increased lick response by CAFR animals at 0.1 M ($p < 0.05$). No effects on lick response were detected for exercise or the concentration \times diet \times exercise interaction. The analysis of burst size (Figure 7L) showed an effect of exercise ($p < 0.010$), but no effect of diet or the interaction. Pairwise comparisons between exercise conditions revealed that exercised animals performed longer bursts at the 0.6 M concentration ($p < 0.05$) than non-exercised animals. Additionally, the between-subject factors revealed a significant effect of diet ($p < 0.05$), with CAFR males performing in general longer bursts than CAF males.

Data for the lick score were fitted to a logistic function; the curve fit was good for both experiments with an R^2 value of 0.763 ± 0.051 for males and 0.819 ± 0.083 for females.

Data for the ILI distribution by experimental group are reported in Supplementary Figure S4.

4. Discussion

In this study, we showed that CAF diet successfully induced obesity both in females and in males, and that CAFR intervention successfully ameliorated this effect. The outcomes of this dietary intervention were greater in females than in males. The CAFR diet in females decreased BW, Lee index, and adiposity and improved metabolic risk factors (decreased serum glucose, insulin, triacylglycerides, and insulin resistance), while CAFR in males decreased only adiposity and leptin levels [44]. CAFR in both sexes decreased the proportion of non-chow foods consumed and increased the proportion of chow consumed, suggesting a healthier food intake pattern. Exercise decreased cholesterol levels in males indicating an amelioration of the MetS risk, but it did not exert noticeable effects upon the biometric variables in either sex.

Regarding the biometric parameters, the obesity induced by CAF diet in this study was similar to that induced in previous studies by our group and others [22,29,53]. Both sexes exhibited similar changes over the obesity induction period, with differences in BW between groups appearing earlier in females than in males. This might be explained by the fact that females presented a higher CAF intake and a lower chow intake than males, which has also been reported in a model of high-fat diet (HFD) [54]. Previous studies reported that rodent males under HFD gained body weight more rapidly than females, which presented a delayed response [54,55]. These results partially contrast with ours; however, the fact that these studies used a HFD while ours used the CAF diet might partially explain the different results we obtained here. Eating patterns differ between DIO diets, with CAF inducing higher intakes than HFD [23,26] and reducing the amount of chow consumed due to the higher preference for palatable foods. Interestingly, females showed a higher preference for cafeteria diet overall than males, in accordance with other studies [54].

Another interesting finding of the present study was the differential effect of CAFR diet on decreasing BWG in females but not in males, despite CAFR females maintaining a higher proportion of non-chow food intake than CAFR males. It has been previously reported in mice that, when switching from HFD to chow, females lose body weight faster than males [55], which is in accordance with our results, since our animals were switched from CAF to CAFR diet, which increased chow intake. The CAFR diet shifted the intake of the animals toward a healthier profile that included increased chow intake, which is considered a healthier food choice than CAF, and decreased cafeteria diet intake in both sexes, which is consistent with previous observations in animals fed this diet [29,56]. This might partially mimic the human behavior of eating small portions of palatable energy-dense food while following dietary treatments aimed at increasing the amount of healthy

food consumed (here represented by chow). This shift in intake only ameliorated biometric parameters in females, but not in males, despite the adiposity being decreased in both sexes. Metabolically, our CAF intervention resulted in a profile that can be considered characteristic of obesity (hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and increased insulin resistance, and hyperleptinemia). These consequences of CAF diet have already been widely reported by us and others [25,26,29] and are indicative of the development of MetS in these animals.

Regarding the metabolic and hormonal parameters, the effects of CAFR diet seemed to differ between sexes, with females showing an attenuation in the levels of circulating glucose, TAGs, leptin, and insulin, as well as the HOMA-IR, while, in males, only the cholesterol levels decreased as a result of CAFR diet [44]. This might be explained by the greater responsiveness that females present to CAFR dieting.

Exercise did not modulate the intake, and no differences were observed between exercised and control animals in food intake, this is also consistent with other reports in which exercise of a similar intensity was unable to modify energy or food intake [47,57]. In line with this, we also detected that exercise had no noticeable effect on either the biometric parameters or the metabolic and hormonal profile in either sex. While similar interventions to the one used here have shown a 25% reduction in body weight gain in adult Sprague-Dawley rats [57], it seems that greater intensities or voluntary exercise rather than moderate treadmill training are more effective at inducing weight loss [58,59]. Another factor that might influence this parameter is the choice of rat strain; in the present study, Long-Evans animals were used, while, in Leigh et al. (2020) [57], Sprague-Dawley animals were used. The Long-Evans rat strain is known to be more active than Sprague-Dawley [60]; this might imply that higher exercise intensities were necessary in Long-Evans than in Sprague-Dawley in order to generate significant changes. Even in the absence of effects on those variables, exercise produced new and noticeable behavioral outcomes, decreasing sucrose consumption in both sexes and decreasing the palatability of sucrose in males.

In this study, we performed three tests which act concurrently to provide information about several aspects of ingestive and motivational behavior: the two-bottle sucrose preference test, the taste reactivity test, and the brief-access licking test. In the preference test, a reduction in sucrose intake can be interpreted as anhedonia and decreased appetitive behavior [61]. Similarly, in the taste reactivity test and the brief-access test, the number of animals initiating the behavior and the number of trials initiated, respectively, can also be interpreted as a measure of appetitive behavior [49]. In the taste reactivity test, the hedonic reactions elicited by the tasting of sucrose are considered a measure of how much the animals liked the stimulus [40,46], and a similar interpretation can be made from the preference index in the preference test [40]. Lastly, in the brief-access test, the lick responses at each sucrose concentration can be interpreted as a measure of the ingestive or consummatory behavior elicited by the tastant [47–49]. The length of the licking episodes performed at each sucrose concentration is a measure of the orosensory feedback power and the perceived palatability of that sucrose concentration [52,62].

The behavioral results indicated that “wanting” (i.e., how much of a reward is consumed) was affected by CAF diet. This was observed as a decrease in sucrose intake in the sucrose preference test in both sexes, a decrease in trials initiated in the brief-access test, and fewer CAF-fed animals tasting the stimulus in the taste reactivity test, compared to the STD-fed animals. These three results revealed a decrease in approaching behavior to the rewarding stimulus [49], which is consistent with previous reports in animals fed a CAF diet [27]. This decrease in approaching behavior in the brief-access and taste reactivity tests could result in fewer approaches in the preference test, which could explain the lower sucrose consumption. Altogether, this could be interpreted as diminished appetitive behavior, in part dependent on the dopaminergic system [63]. Concurrent with our results, HFD induced obesity in Long-Evans rats, impaired mesolimbic dopamine function, and decreased the number of operant conditioned responses to sucrose [63]. Moreover, chronic HFD in rats was related to a downregulation of dopamine and opioid receptors in the mesolimbic

system [64,65]. Additionally, downregulation of D1 and D2 receptors was observed after chronic CAF diet, and this effect was greater in females than in males [66]. Dopamine release in the nucleus accumbens (NAcc) was shown to be increased after sucrose consumption in sucrose-naïve rats [67]. HFD diet decreased tyrosine hydroxylase-positive neurons in the dopaminergic nigrostriatal pathway [68], and a decrease in dopamine release in the NAcc has been described after intake of milk enriched with 5% fat [69]. The decreased expression of dopamine receptors coupled with the decrease in dopamine synthesis and release in obese animals might imply a devaluation of the reward value of sucrose [70].

Another mechanism that might reduce sucrose intake in the preference test is the development of a depressive state that induces anhedonia in obese animals [71,72]. In fact, in a modified version of the sucrose preference test, in which animals are administered 1% sucrose (0.03 M) for 16 h, a diminution in sucrose intake is used to measure anhedonia [61]. In obese rats, the decrease in sucrose intake in a sucrose preference test was interpreted as anhedonia and related to increased adiposity and leptin levels [73]. In humans, obesity and depression are highly comorbid [74], and weight loss due to calorie-restricted diets has been reported to improve depression scores [75]. Several mechanisms have been proposed to link obesity and depression, including a mild level of chronic inflammation characteristic of obesity, chronically increased proinflammatory interleukin (IL-2) levels, and leptin signaling [76,77].

The results regarding appetitive behavior in CAFR-fed animals showed increased sucrose consumption in the preference test and more trials initiated in the brief access licking test compared to CAF diet only in females. This might imply a functional improvement in the dopaminergic system and a partial reversal of wanting compared to CAF diet. In males, there were no effects of CAFR diet on appetitive behavior, with the values of these parameters being similar to those of CAF-fed animals. Therefore, females seemed to be more responsive to the dietary treatments than males regarding appetitive behavior.

This recovery of appetitive behavior in CAFR-fed females might be related to the amelioration of the obese phenotype. Of note, people in the process of weight loss through calorie-restricted diets showed an amelioration of depression scores [75]; in another study, an improvement of depression scores was positively correlated with a decrease in body weight [78].

With regard to the exercise intervention, a new finding to our knowledge is that treadmill exercise decreased sucrose intake (i.e., appetitive behavior) in the preference test. This result is in line with several studies indicating that exercise might produce functional changes in the dopaminergic mesocorticolimbic pathways that make the animals less susceptible to the rewarding effects of drugs of abuse [79,80]. For example, voluntary exercise on a running wheel decreased self-administration of cocaine in rats [79], and the treadmill exercise in mice decreased MDMA conditioned place preference [81]. In the same way, exercise might have similar effects on sucrose intake, being protective against overconsumption of sweet drinks since the intake of both sucrose and drugs of abuse activates similar pathways in the brain [82]. Exercise has also been reported to increase D2R expression and protein levels in the NAcc [83,84], although conflicting reports have been published [85]. In older humans undergoing regular aerobic exercise at 40–80% of maximal heart rate (walking, jogging, or cycling) for 6 months, D2R availability, measured by PET scanning, was positively correlated with VO_2 max [86], indicating that physical fitness improves dopaminergic function. Additionally, treadmill exercise at a similar intensity (15 m/min, 40 min) to the one used here induced an increase in dopamine release in the NAcc after voluntary intake of milk enriched with 5% fat in HFD rats [69].

Regarding liking (i.e., hedonic impact or which reward is consumed), we detected a decrease in sucrose liking in CAF-fed animals, as evidenced by decreased sucrose preference in the two-bottle preference test and decreased hedonic reactivity in the taste reactivity test. This effect was greater in males than in females since males presented decreased preference in more concentrations than females, and CAF females did not present a significant reduction in positive hedonic reactions. As stated above, liking is thought to be mediated

mainly by the opioid system [87] and to be controlled by small regions in the brain [39] termed hedonic hotspots. It has been shown that chronic CAF diet induces a decrease in opioid receptors in the NAcc in males but not in females [66]. In Fam et al. (2022) [27], a similar CAF diet intervention resulted in no changes to liking of sucrose. However, the intervention in Fam et al. (2022) [27] started in adult rats, while ours started post weaning, which might indicate that changes in liking are only present when CAF diet is started early in life.

Regarding the CAFR diet, results showed no effects of this intervention on liking since both preference and hedonic reactions were not different between CAFR and CAF animals.

Exercise did not affect the hedonic reactivity in the taste reactivity test. The apparent reduction seen in CAF exercised animals compared to CAF controls can be explained by the lower number of CAF exercised animals that initiated behavior, skewing the result toward lower hedonic reactivity. This lack of effectiveness of exercise upon hedonic reactivity is consistent with previous reports of treadmill exercise having a minimal impact on opioidergic signaling [88], considered crucial in the processing of liking [39].

Molecular determinations of the dopaminergic and opioidergic systems are beyond the scope of this work; however, future research should emphasize this aspect, especially in animals fed the CAFR diet.

Consummatory behavior can be evaluated in the brief-access test through the lick score (difference between licks at each concentration and licks to water). Results showed that the CAF diet in males decreased the lick score at intermediate concentrations (0.1 M), with no changes at higher concentrations. This might imply that obese animals present lower consummatory behavior at these concentrations than nonobese animals, putting obese animals at risk of overconsuming at higher concentrations. CAFR diet reverted this by increasing the lick score at the 0.1 M compared to CAF-fed animals, aligning their phenotype more closely with the STD-fed condition.

We detected that exercise decreased the lick score; this effect might act in conjunction with the decreased appetitive behavior in exercised animals explained above to provide additional protection against overeating in exercised subjects.

Perceived palatability of sucrose in the brief-access test is evaluated through the burst size. This parameter is considered to indicate the potency of the orosensory positive feedback and to reflect perceived palatability [52,62]. We found a decrease in burst size in CAF-fed animals and more specifically in the CAF females, indicating a decreased perceived palatability in obese animals. One possible mechanism that might explain this decrease in palatability is a dysregulation of leptin signaling. The leptin receptor is present in the neural pathway relaying taste information from the tongue to the SNC. It has been shown that leptin administration induces hyperpolarization of taste receptor cells [89] and suppresses the response of the peripheral taste nerves to sucrose [90]. Our results showed that serum leptin levels increased in CAF groups, to a greater degree in females than in males (653% increase in females and 224% increase in males compared to the corresponding STD group). This difference in leptin levels between sexes suggests that the suppression of the signal transduction for sweet taste could be greater in females than in males. This would be consistent with the greater decrease in perceived palatability we detected in the brief-access licking test in females than in males.

Regarding the effects of the CAFR diet, our results show that this intervention corrected the effects of CAF diet on the perceived palatability in females, with the burst size increased in CAFR females compared to CAF females, but not in males. This result is also consistent with the different serum leptin levels in both sexes since the decrease in them was greater in CAFR-fed females than in males (57% versus 83% reduction compared to the corresponding CAF group), suggesting an attenuated suppression of the signal transduction for sweet taste in females [89,90].

Studies in humans have reported that, in women, weight loss induced through either low-fat or low-carbohydrate diets shifted liking for sweet food toward lower concentrations compared to baseline [9]. In another study, obese women instructed to reduce their total

caloric intake and to increase their physical activity decreased BW and BMI and shifted their perceived palatability of sucrose toward lower concentrations [10]. Considering these results in humans, although the CAF intervention was interrupted in the females' experiment, our animals cannot be considered in a fasted state during the behavioral testing since all animals had access to food. Furthermore, although the CAF and CAFR diets varied in the amount of food provided, they had the same food items and a very similar macronutrient composition, indicating that the diet composition per se should not be a determinant of sweet preference or liking. The results from human studies might suggest that weight loss rather than changes in feeding habits are necessary to revert the effects of the obese phenotype on perceived sweetness.

Furthermore, exercise also affected the perceived palatability of sucrose, increasing it. Although this effect was present in both sexes, it was only significant in males, in which exercised animals presented the highest burst size for the 0.6 M solution, while, in controls, the highest burst size was for the 1 M solution. As stated above, leptin is a suppressor of sweet taste [89,90], and the fact that exercise in CAF males increased serum leptin levels might explain the increased detection threshold. This result indicates that exercise may change palatability and switch it toward lower sucrose concentrations, which would be in line with the reduced sucrose intake observed in the preference test, suggesting a protective mechanism of exercise against overeating.

One of the limitations of this study was the lack of a mechanistic characterization of the processes mediating the reported effects. Future studies should aim at characterizing the effects of CAFR and the combined CAFR and exercise intervention on the dopaminergic and opioidergic systems, both at rest conditions and as a response to sucrose intake, as well as leptin receptor expression and dysregulation of leptin signaling in the neural pathway relaying sweet taste from the tongue to the SNC.

5. Conclusions and Final Remarks

In this study, we showed that the administration of a calorie-restricted cafeteria diet promotes healthy eating habits, which attenuated the adverse effects of ad libitum CAF diet to a greater degree in females than in males. This study provides the first characterization on the effects of CAFR diet on obese females. To our knowledge, the behavioral characterization of sweet taste behavior presented here in male and female rats is one of the most complete to date. Furthermore, this allows us to conclude that exercise might decrease the perceived sweetness, appetitive behavior, and sucrose consumption in both sexes, whereas CAFR in females increased appetitive behavior which might be indicative of an amelioration of the depressive state associated with obesity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu15010144/s1>: Figure S1: Body weight progression from the start of the experiment to the behavioral testing for experiments 1 and 2; Figure S2: Detail of the TP number and time at each concentration tested; Figure S3: Licking variables during training (sessions 1–5) in the brief-access licking test; Figure S4: ILI distribution in the test session of the brief-access licking test. Table S1: CAF diet composition for the first period of experiment 1; Table S2: Detailed treadmill training protocol from session 1 to 9 for experiment 1.

Author Contributions: Conceptualization, N.B., A.C., M.S. and R.M.E.; methodology, A.A.-M., N.B., A.C., M.S. and R.M.E.; formal analysis, A.A.-M., A.S.-G., M.S. and R.M.E.; investigation, A.A.-M., A.S.-G., R.M.-C., N.B., A.C., M.S. and R.M.E.; writing—original draft preparation, A.A.-M., M.S. and R.M.E.; writing—review and editing, A.A.-M., R.M.-C., N.B., A.C., M.S. and R.M.E.; visualization, A.A.-M.; supervision, M.S. and R.M.E.; funding acquisition, N.B., A.C., M.S. and R.M.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, grant numbers PSI2016-77234-R and PID 2020-119391GB-I00/AEI/10.13039/501100011033. A.A.-M. is granted by the Universitat Autònoma de Barcelona, grant PIF-UAB2018. A.S.-G. is granted

by the Ministerio de Ciencia e Innovación, grant number BES-2017-081939. This work was also financially supported by the Catalan Government through the funding grant ACCIÓ-EURECAT.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Generalitat de Catalunya (DAAM 9978, 20-09-2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the help of Núria Grau, Sandra Simon, Cristina Ordeix, and Francesca Munar; of laboratory technicians at the Eurecat Technological Unit of Nutrition and Health; of Laia Oliva and the technical staff of the Unitat d'Experimentació Animal in the Campus Mundet of Universitat de Barcelona (UB); and of Antonio Florido from the Universitat Autònoma de Barcelona for advice in performing and scoring the taste reactivity test.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Chooi, Y.C.; Ding, C.; Magkos, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* **2019**, *92*, 6–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Morris, M.J.; Beilharz, J.E.; Maniam, J.; Reichelt, A.C.; Westbrook, R.F. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2015**, *58*, 36–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Maersk, M.; Belza, A.; Stødkilde-Jørgensen, H.; Ringgaard, S.; Chabanova, E.; Thomsen, H.; Pedersen, S.B.; Astrup, A.; Richelsen, B. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: A 6-mo randomized intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 283–289. [[CrossRef](#)]
4. Bartoshuk, L.M.; Duffy, V.B.; Hayes, J.E.; Moskowitz, H.R.; Snyder, D.J. Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: Problems, solutions and new perspectives. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2006**, *361*, 1137–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Gutierrez, R.; Fonseca, E.; Simon, S.A. The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 3469–3502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yoshida, R.; Niki, M.; Jyotaki, M.; Sanematsu, K.; Shigemura, N.; Ninomiya, Y. Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2013**, *24*, 226–231. [[CrossRef](#)]
7. Horio, N.; Jyotaki, M.; Yoshida, R.; Sanematsu, K.; Shigemura, N.; Ninomiya, Y. New Frontiers in Gut Nutrient Sensor Research: Nutrient Sensors in the Gastrointestinal Tract: Modulation of Sweet Taste Sensitivity by Leptin. *J. Pharmacol. Sci.* **2010**, *112*, 8–12. [[CrossRef](#)]
8. Heffron, S.P.; Parham, J.S.; Pendse, J.; Alemán, J.O. Treatment of obesity in mitigating metabolic risk. *Circ. Res.* **2021**, *126*, 1646–1665. [[CrossRef](#)]
9. Burgess, B.; Rao, S.P.; Tepper, B.J. Changes in liking for sweet and fatty foods following weight loss in women are related to prop phenotype but not to diet. *Obesity* **2016**, *24*, 1867–1873. [[CrossRef](#)]
10. Nishihara, T.; Nozaki, T.; Sawamoto, R.; Komaki, G.; Miyata, N.; Hosoi, M.; Sudo, N. Effects of Weight Loss on Sweet Taste Preference and Palatability following Cognitive Behavioral Therapy for Women with Obesity. *Obes. Facts* **2019**, *12*, 529–542. [[CrossRef](#)]
11. Asao, K.; Rothberg, A.E.; Arcori, L.; Kaur, M.; Fowler, C.E.; Herman, W.H. Sweet taste preferences before and after an intensive medical weight loss intervention. *Obes. Sci. Pract.* **2016**, *2*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Horio, T.; Kawamura, Y. Influence of Physical Exercise on Human Preferences for Various Taste Solutions. *Chem. Senses* **1998**, *23*, 417–421. [[CrossRef](#)]
13. Passe, D.H.; Horn, M.; Stofan, J.; Murray, R. Palatability and Voluntary intake of Sports Beverages, Di-luted Orange Juice, and Water During exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **2004**, *14*, 272–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gauthier, A.-C.; Guimarães, R.d.F.; Namiranian, K.; Drapeau, V.; Mathieu, M.-E. Effect of Physical Exercise on Taste Perceptions: A Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 2741. [[CrossRef](#)]
15. Feeney, E.L.; Leacy, L.; O'Kelly, M.; Leacy, N.; Phelan, A.; Crowley, L.; Stynes, E.; de Casanove, A.; Horner, K. Sweet and Umami Taste Perception Differs with Habitual Exercise in Males. *Nutrients* **2019**, *11*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Venditti, C.; Musa-Veloso, K.; Lee, H.Y.; Poon, T.; Mak, A.; Darch, M.; Juana, J.; Fronda, D.; Noori, D.; Pateman, E.; et al. Determinants of Sweetness Preference: A Scoping Review of Human Studies. *Nutrients* **2020**, *12*, 718. [[CrossRef](#)]
17. Mozhdzhehi, F.J.; Abeywickrema, S.; Bremer, P.J.; Peng, M. Following Vegan, Vegetarian, or Omnivore Diets. *Foods* **2021**, *10*, 2704. [[CrossRef](#)]

18. Wise, P.M.; Nattress, L.; Flammer, L.J.; Beauchamp, G.K. Reduced dietary intake of simple sugars alters perceived sweet taste intensity but not perceived pleasantness. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 50–60. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhou, B.; Yamanaka-Okumura, H.; Adachi, C.; Kawakami, Y.; Katayama, T.; Takeda, E. High-fat diet-related stimulation of sweetness desire is greater in women than in men despite high vegetable intake. *Public Health Nutr.* **2014**, *18*, 1272–1281. [\[CrossRef\]](#)
20. Moskowitz, H.R.; Kumraiah, V.; Sharma, K.N.; Jacobs, H.L.; Sharma, S. Effects of hunger, satiety and glucose load upon taste intensity and taste hedonics. *Physiol. Behav.* **1976**, *16*, 471–475. [\[CrossRef\]](#)
21. Small, L.; Brandon, A.E.; Turner, N.; Cooney, G.J. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: What have high-fat and high-calorie diets revealed? *Am. J. Physiol. Metab.* **2018**, *314*, E251–E265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sclafani, A.; Springer, D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* **1976**, *17*, 461–471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lalanza, J.F.; Snoeren, E.M. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2020**, *122*, 92–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Kleiwert, M.; Clemmensen, C.; Hofmann, S.; Moore, M.C.; Renner, S.; Woods, S.C.; Huypens, P.; Beckers, J.; de Angelis, M.H.; Schürmann, A.; et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*, 140–162. [\[CrossRef\]](#)
25. Sampey, B.; Vanhoose, A.M.; Winfield, H.M.; Freerman, A.J.; Muehlbauer, M.J.; Fueger, P.T.; Newgard, C.B.; Makowski, L. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity* **2011**, *19*, 1109–1117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Gual-Grau, A.; Guirro, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Arola, L.; Boqué, N. Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: A metagenomics and metabolomics integrative approach. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *71*, 122–131. [\[CrossRef\]](#)
27. Fam, J.; Clemens, K.J.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J.; Kendig, M.D. Chronic exposure to cafeteria-style diet in rats alters sweet taste preference and reduces motivation for, but not 'liking' of sucrose. *Appetite* **2021**, *168*, 105742. [\[CrossRef\]](#)
28. Shin, A.C.; Townsend, R.L.; Patterson, L.M.; Berthoud, H.-R. "Liking" and "wanting" of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2011**, *301*, R1267–R1280. [\[CrossRef\]](#)
29. Subias-Gusils, A.; Álvarez-Monell, A.; Boqué, N.; Caimari, A.; Del Bas, J.M.; Mariné-Casadó, R.; Solanas, M.; Escorihuela, R.M. Behavioral and Metabolic Effects of a Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Oleuropein Supplementation in Obese Male Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 4474. [\[CrossRef\]](#)
30. Hajnal, A.; Kovacs, P.; Ahmed, T.; Meirelles, K.; Lynch, C.J.; Cooney, R.N. Gastric bypass surgery alters behavioral and neural taste functions for sweet taste in obese rats. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2010**, *299*, G967–G979. [\[CrossRef\]](#)
31. Tichansky, D.S.; Glatt, A.R.; Madan, A.K.; Harper, J.; Tokita, K.; Boughter, J.D. Decrease in sweet taste in rats after gastric bypass surgery. *Surg. Endosc.* **2010**, *25*, 1176–1181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Cigarroa, I.; Lalanza, J.F.; Caimari, A.; del Bas, J.M.; Capdevila, L.; Arola, L.; Escorihuela, R.M. Treadmill Intervention Attenuates the Cafeteria Diet-Induced Impairment of Stress-Coping Strategies in Young Adult Female Rats. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Thompson, Z.; Kolb, E.M.; Garland, T. High-runner mice have reduced incentive salience for a sweet-taste reward when housed with wheel access. *Behav. Process.* **2018**, *146*, 46–53. [\[CrossRef\]](#)
34. Barragán, R.; Coltell, O.; Portolés, O.; Asensio, E.M.; Sorlí, J.V.; Ortega-Azorín, C.; González, J.I.; Sáiz, C.; Fernández-Carrión, R.; Ordovas, J.M.; et al. Bitter, Sweet, Salty, Sour and Umami Taste Perception Decreases with Age: Sex-Specific Analysis, Modulation by Genetic Variants and Taste-Preference Associations in 18 to 80 Year-Old Subjects. *Nutrients* **2018**, *10*, 1539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Fischer, M.E.; Cruickshanks, K.J.; Ms, C.R.S.; Pinto, A.; Klein, B.E.K.; Klein, R.; Nieto, F.J.; Pankow, J.S.; Huang, G.-H.; Snyder, D.J. Taste intensity in the Beaver Dam Offspring Study. *Laryngoscope* **2013**, *123*, 1399–1404. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Yoshinaka, M.; Ikebe, K.; Uota, M.; Ogawa, T.; Okada, T.; Inomata, C.; Takeshita, H.; Mihara, Y.; Gondo, Y.; Masui, Y.; et al. Age and sex differences in the taste sensitivity of young adult, young-old and old-old Japanese. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2016**, *16*, 1281–1288. [\[CrossRef\]](#)
37. Valenstein, E.S.; Kakolewski, J.W.; Cox, V.C. Sex Differences in Taste Preference for Glucose and Saccharin Solutions. *Science* **1979**, *156*, 942–943. [\[CrossRef\]](#)
38. Martin, L.J.; Sollars, S.I. Contributory role of sex differences in the variations of gustatory function. *J. Neurosci. Res.* **2017**, *95*, 594–603. [\[CrossRef\]](#)
39. Berridge, K.C. Wanting and Liking: Observations from the Neuroscience and Psychology Laboratory. *Inquiry* **2009**, *52*, 378–398. [\[CrossRef\]](#)
40. Meyerollbersleben, L.; Winter, C.; Bernhardt, N. Dissociation of wanting and liking in the sucrose preference test in dopamine transporter overexpressing rats. *Behav. Brain Res.* **2020**, *378*, 112244. [\[CrossRef\]](#)
41. Robinson, S.; Sandstrom, S.M.; Denenberg, V.H.; Palmiter, R.D. Distinguishing Whether Dopamine Regulates Liking, Wanting, and/or Learning About Rewards. *Behav. Neurosci.* **2005**, *119*, 5–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Smith, K.S.; Berridge, K.C.; Aldridge, J.W. Disentangling pleasure from incentive salience and learning signals in brain reward circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E255–E264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lalanza, J.F.; Caimari, A.; Del Bas, J.M.; Torregrosa, D.; Cigarroa, I.; Pallàs, M.; Capdevila, L.; Arola, L.; Escorihuela, R.M. Effects Of A Post-Weaning Cafeteria Diet In Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity And Low Anxiety-Like Behaviour. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e85049. [\[CrossRef\]](#)

44. Alvarez-Monell, A.; Subias-Gusils, A.; Mariné-Casadó, R.; Belda, X.; Gagliano, H.; Pozo, O.J.; Boqué, N.; Caimari, A.; Armario, A.; Solanas, M.; et al. Restricted cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 19545. [[CrossRef](#)]
45. Berridge, K. Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2000**, *24*, 173–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Foright, R.; Johnson, G.C.; Kahn, D.; Charleston, C.A.; Presby, D.M.; Bouchet, C.; Wellberg, E.A.; Sherk, V.D.; Jackman, M.R.; Greenwood, B.N.; et al. Compensatory eating behaviors in male and female rats in response to exercise training. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2020**, *319*, R171–R183. [[CrossRef](#)]
48. Lalanza, J.F.; Sanchez-Roige, S.; Gagliano, H.; Fuentes, S.; Bayod, S.; Camins, A.; Pallàs, M.; Armario, A.; Escorihuela, R.M. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 1745–1754. [[CrossRef](#)]
49. Treasukosol, Y.; Boersma, G.J.; Oros, H.; Choi, P.; Tamashiro, K.L.; Moran, T.H. Similarities and differences between “proactive” and “passive” stress-coping rats in responses to sucrose, NaCl, citric acid, and quinine. *Chem. Senses* **2014**, *39*, 333–342. [[CrossRef](#)]
50. Boersma, G.J.; Treasukosol, Y.; Cordner, Z.A.; Kastelein, A.; Choi, P.; Moran, T.H.; Tamashiro, K.L. Exposure to activity-based anorexia impairs contextual learning in weight-restored rats without affecting spatial learning, taste, anxiety, or dietary-fat preference. *Int. J. Eat. Disord.* **2016**, *49*, 167–179. [[CrossRef](#)]
51. Bin Lin, X.; Pierce, D.R.; Light, K.E.; Hayar, A. The fine temporal structure of the rat licking pattern: What causes the variability in the interlick intervals and how is it affected by the drinking solution? *Chem. Senses* **2013**, *38*, 685–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Johnson, A.W. Characterizing ingestive behavior through licking microstructure: Underlying neurobiology and its use in the study of obesity in animal models. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2018**, *64*, 38–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Martire, S.I.; Holmes, N.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J. Altered Feeding Patterns in Rats Exposed to a Palatable Cafeteria Diet: Increased Snacking and Its Implications for Development of Obesity. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Maric, I.; Krieger, J.-P.; van der Velden, P.; Borchers, S.; Asker, M.; Vujicic, M.; Asterholm, I.W.; Skibicka, K.P. Sex and Species Differences in the Development of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disturbances in Rodents. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Guerra-Cantera, S.; Frago, L.M.; Collado-Pérez, R.; Canelles, S.; Ros, P.; Freire-Regatillo, A.; Jiménez-Hernaiz, M.; Barrios, V.; Argente, J.; Chowen, J.A. Sex Differences in Metabolic Recuperation After Weight Loss in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 796661. [[CrossRef](#)]
56. Subias-Gusils, A.; Boqué, N.; Caimari, A.; Del Bas, J.M.; Mariné-Casadó, R.; Solanas, M.; Escorihuela, R.M. A restricted cafeteria diet ameliorates biometric and metabolic profile in a rat diet-induced obesity model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2021**, *72*, 767–780. [[CrossRef](#)]
57. Leigh, S.-J.; Kaakoush, N.O.; Escorihuela, R.M.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J. Treadmill exercise has minimal impact on obesogenic diet-related gut microbiome changes but alters adipose and hypothalamic gene expression in rats. *Nutr. Metab.* **2020**, *17*, 1–13. [[CrossRef](#)]
58. Mayengbam, S.; Mickiewicz, B.; Trotter, S.K.; Mu, C.; Wright, D.C.; Reimer, R.A.; Vogel, H.J.; Shearer, J. Distinct Gut Microbiota and Serum Metabolites in Response to Weight Loss Induced by Either Dairy or Exercise in a Rodent Model of Obesity. *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 3867–3875. [[CrossRef](#)]
59. Mifune, H.; Tajiri, Y.; Nishi, Y.; Hara, K.; Iwata, S.; Tokubuchi, I.; Mitsuzono, R.; Yamada, K.; Kojima, M. Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides* **2015**, *71*, 49–55. [[CrossRef](#)]
60. Sanchis-Ollé, M.; Sánchez-Benito, L.; Fuentes, S.; Gagliano, H.; Belda, X.; Molina, P.; Carrasco, J.; Nadal, R.; Armario, A. Male long-Evans rats: An outbred model of marked hypothalamic-pituitary-adrenal hyperactivity. *Neurobiol. Stress* **2021**, *15*, 100355. [[CrossRef](#)]
61. Liu, M.-Y.; Yin, C.-Y.; Zhu, L.-J.; Zhu, X.-H.; Xu, C.; Luo, C.-X.; Chen, H.; Zhu, D.-Y.; Zhou, Q.-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 1686–1698. [[CrossRef](#)]
62. Smith, G. John Davis and the meanings of licking. *Appetite* **2001**, *36*, 84–92. [[CrossRef](#)]
63. Davis, J.F.; Tracy, A.L.; Schurdak, J.D.; Tschöp, M.H.; Lipton, J.W.; Clegg, D.J.; Benoit, S.C. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. *Behav. Neurosci.* **2008**, *122*, 1257–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Vucetic, Z.; Kimmel, J.; Reyes, T.M. Chronic High-Fat Diet Drives Postnatal Epigenetic Regulation of μ -Opioid Receptor in the Brain. *Neuropsychopharmacology* **2011**, *36*, 1199–1206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Johnson, P.M.; Kenny, P.J. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 635–641. [[CrossRef](#)]
66. Ong, Z.Y.; Wanamura, A.F.; Lin, M.Z.; Hiscock, J.; Muhlhauser, B.S. Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite* **2013**, *65*, 189–199. [[CrossRef](#)]
67. Hajnal, A.; Norgren, R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res.* **2001**, *904*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Jang, Y.; Lee, M.J.; Han, J.; Kim, S.J.; Ryu, I.; Ju, X.; Ryu, M.J.; Chung, W.; Oh, E.; Kweon, G.R.; et al. A High-fat Diet Induces a Loss of Midbrain Dopaminergic Neuronal Function That Underlies Motor Abnormalities. *Exp. Neurobiol.* **2017**, *26*, 104–112. [[CrossRef](#)]
69. Chen, W.; Li, J.; Liu, J.; Wang, D.; Hou, L. Aerobic Exercise Improves Food Reward Systems in Obese Rats via Insulin Signaling Regulation of Dopamine Levels in the Nucleus Accumbens. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 2801–2808. [[CrossRef](#)]
70. Volkow, N.D.; Wang, G.-J.; Tomasi, D.; Baler, R.D. Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. *Obes. Rev.* **2012**, *14*, 2–18. [[CrossRef](#)]
71. Abildgaard, A.; Solskov, L.; Volke, V.; Harvey, B.H.; Lund, S.; Wegener, G. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* **2011**, *36*, 623–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Macht, V.; Vazquez, M.; Petyak, C.; Grillo, C.; Kaigler, K.; Enos, R.; McClellan, J.; Cranford, T.; Murphy, E.; Nyland, J.; et al. Leptin resistance elicits depressive-like behaviors in rats. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *60*, 151–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Grillo, C.A.; Piroli, G.G.; Kaigler, K.F.; Wilson, S.P.; Wilson, M.A.; Reagan, L.P. Downregulation of hypothalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats. *Behav. Brain Res.* **2011**, *222*, 230–235. [[CrossRef](#)]
74. Carey, M.; Small, H.; Yoong, S.L.; Boyes, A.; Bisquera, A.; Sanson-Fisher, R. Prevalence of comorbid depression and obesity in general practice: A cross-sectional survey. *Br. J. Gen. Pract.* **2014**, *64*, e122–e127. [[CrossRef](#)]
75. Patsalos, O.; Keeler, J.; Schmidt, U.; Penninx, B.; Young, A.; Himmerich, H. Diet, Obesity, and Depression: A Systematic Review. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Milaneschi, Y.; Simmons, W.K.; Van Rossum, E.F.C.; Penninx, B.W. Depression and obesity: Evidence of shared biological mechanisms. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 18–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ambrósio, G.; Kaufmann, F.N.; Manosso, L.; Platt, N.; Ghisleni, G.; Rodrigues, A.L.S.; Rieger, D.K.; Kaster, M.P. Depression and peripheral inflammatory profile of patients with obesity. *Psychoneuroendocrinology* **2018**, *91*, 132–141. [[CrossRef](#)]
78. Fuller, N.R.; Burns, J.; Sainsbury, A.; Horsfield, S.; da Luz, F.; Zhang, S.; Denyer, G.; Markovic, T.P.; Caterson, I.D. Examining the association between depression and obesity during a weight management programme. *Clin. Obes.* **2017**, *7*, 354–359. [[CrossRef](#)]
79. Smith, M.A.; Schmidt, K.T.; Iordanou, J.C.; Mustroph, M.L. Aerobic exercise decreases the positive-reinforcing effects of cocaine. *Drug Alcohol Depend.* **2008**, *98*, 129–135. [[CrossRef](#)]
80. Smith, M.A.; Lynch, W.J. Exercise as a Potential Treatment for Drug Abuse: Evidence from Preclinical Studies. *Front. Psychiatry* **2012**, *2*, 82. [[CrossRef](#)]
81. Chen, H.I.; Kuo, Y.M.; Liao, C.-H.; Jen, C.J.; Huang, A.M.; Cherng, C.G.; Su, S.-W.; Yu, L. Long-term compulsive exercise reduces the rewarding efficacy of 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Behav. Brain Res.* **2008**, *187*, 185–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2008**, *32*, 20–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sadat-Shirazi, M.; Zadeh-Tehrani, S.N.; Akbarabadi, A.; Mokri, A.; Kasgari, B.T.Z.; Zarrindast, M. Exercise can restore behavioural and molecular changes of intergenerational morphine effects. *Addict. Biol.* **2021**, *27*, e13122. [[CrossRef](#)]
84. Rosa, H.; Segat, H.; Barcelos, R.; Roversi, K.; Rossato, D.; de Brum, G.; Burger, M. Involvement of the endogenous opioid system in the beneficial influence of physical exercise on amphetamine-induced addiction parameters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2020**, *197*, 173000. [[CrossRef](#)]
85. Robison, L.S.; Swenson, S.; Hamilton, J.; Thanos, P.K. Exercise Reduces Dopamine D1R and Increases D2R in Rats: Implications for Addiction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, *50*, 1596–1602. [[CrossRef](#)]
86. Jonasson, L.S.; Nyberg, L.; Axelsson, J.; Kramer, A.F.; Riklund, K.; Boraxbekk, C.-J. Higher striatal D2-receptor availability in aerobically fit older adults but non-selective intervention effects after aerobic versus resistance training. *NeuroImage* **2019**, *202*, 116044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Castro, D.C.; Berridge, K. Opioid Hedonic Hotspot in Nucleus Accumbens Shell: Mu, Delta, and Kappa Maps for Enhancement of Sweetness “Liking” and “Wanting”. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 4239–4250. [[CrossRef](#)]
88. Rahman, N.; Mihalkovic, A.; Geary, O.; Haffey, R.; Hamilton, J.; Thanos, P.K. Chronic aerobic exercise: Autoradiographic assessment of GABA(a) and mu-opioid receptor binding in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2020**, *196*, 172980. [[CrossRef](#)]
89. Yoshida, R.; Noguchi, K.; Shigemura, N.; Jyotaki, M.; Takahashi, I.; Margolskee, R.F.; Ninomiya, Y. Leptin Suppresses Mouse Taste Cell Responses to Sweet Compounds. *Diabetes* **2015**, *64*, 3751–3762. [[CrossRef](#)]
90. Kawai, K.; Sugimoto, K.; Nakashima, K.; Miura, H.; Ninomiya, Y.; Meyer, A.L.; Trollmo, C.; Crawford, F.; Marrack, P.; Steere, A.C.; et al. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11044–11049. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.3. Capítol 3: Efectes de la dieta de cafeteria restrictiva i l'exercici físic en rates femella sobre la conducta de reconeixement d'objectes nous i de localització.

Els continguts d'aquest capítol es troben en fase de preparació per a la seva publicació a la revista *Physiology & Behaviour* en format de *Short Communication*. Per tant, aquest capítol es presenta d'acord amb les instruccions d'aquesta revista, sense subapartats en el cos principal del text.

En aquest estudi es van dur a terme un test de reconeixement (*object recognition test*) i un de localització (*place recognition test*) d'objectes amb l'objectiu d'analitzar les possibles afectacions de l'obesitat, i de les intervencions dietètica i d'exercici físic sobre els processos de memòria en rates femella.

Treadmill exercise improved object recognition memory in cafeteria diet-induced obese female rats.

Adam Alvarez-Monell^{1,2}, Francesca Munar^{1,3}, Alex Subias-Gusils^{1,3}, Montserrat Solanas^{1,2*} and Rosa M Escorihuela^{1,3*}

¹Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08913 Bellaterra, Spain.

³Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

*Correspondence: Montserrat.Solanas@uab.cat (M.S.); RosaMaria.Escorihuela@uab.cat (R.M.E.)

Abstract

We evaluated recognition memory in cafeteria (CAF) diet-induced obese female rats and the effects of a 30% calorie-restricted cafeteria (CAFR) diet and moderate treadmill exercise. After inducing obesity through post-weaning CAF diet feeding for 8 weeks, animals were either maintained under CAF or switched to CAFR and/or exercise for 8 weeks more. Results from novel object and novel place recognition tests showed that CAF diet-induced obesity did not affect either object exploration or object recognition compared to the control and CAFR groups. However, exercise improved object, but not place, recognition in CAF and CAFR animals, indicating a possible improvement in memory.

Keywords: Diet-induced obesity, energy restriction, physical activity, object recognition memory, place recognition memory

Obesity is one of the biggest health concerns worldwide. Epidemiological studies indicate that a third of the population worldwide is obese or overweight (Chooi et al., 2019) and obesity rates are projected to increase in the future (Ward et al., 2019). Obesity is associated with cognitive dysfunction in a bidirectional manner (E. Smith et al., 2011). A higher BMI has been correlated to poorer global cognitive function, memory and language in 1703 adults from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (Gunstad et al., 2010). Additionally, in a cohort of 480 children, a

higher general cognitive function was associated with decreased odds of being overweight 2 years later (Guxens et al., 2009).

In animal models, similar results have been found. Ad libitum access to a high-fat/high-sugar diet in male rats generated impairments in hippocampal-dependent memory processes assessed in a radial maze (Kanoski & Davidson, 2010). Similar effects in a novel place recognition task are detected in male rats fed a cafeteria diet for short periods and before an increase in body weight is detected (Beilharz et al., 2014). Several mechanisms have been proposed to link obesity with cognitive impairments and specially with hippocampal function (E. Smith et al., 2011). Such mechanisms are related to the low grade chronic systemic inflammation (Khanna et al., 2022), and brain insulin resistance (Lee et al., 2016) characteristic of obesity.

Conversely, physical exercise is considered a booster of cognitive function as well as a protective agent against age-related cognitive decline (Talar et al., 2022). In rodents, voluntary exercise has been reported to facilitate acquisition in a radial maze in females (Anderson et al., 2000). Additionally, treadmill exercise in male rats at 15 m/min for 7 days resulted in improved object recognition memory, which was related to increased neurogenesis in exercised animals (Bechara & Kelly, 2013). Moreover, treadmill exercise at 15 m/min for 8 weeks was able to slow the cognitive deficits in the Morris water maze test in a rat model of aging (F. Yu et al., 2013).

On the basis of this background, in the present study, we used the cafeteria (CAF) diet as a model of diet-induced obesity (DIO). CAF diet induces obesity through the administration of highly palatable items of human consumption (Lanza & Snoeren, 2021; Scalfani & Springer, 1976), and is considered a robust model with high face validity for human obesity (Kleinert et al., 2018). We tested in the CAF diet-induced obese rats the effects of a dietary intervention based on a 30% calorie-restricted CAF diet (CAFR) (Subias-Gusils et al., 2021 a,b), alone or in combination with moderate treadmill exercise (Alvarez-Monell et al., 2022 a,b). The present study aimed to determine whether CAF feeding administered post-weaning affected cognitive performance in an object and place recognition tasks, and whether the CAFR diet and/or exercise interventions impacted these effects.

We performed the study using 60 female Long-Evans rats of 23-25 days of age. Firstly, obesity was induced through CAF diet (CAF group), and another weight-

matched group of animals (STD group) were maintained with standard chow (2014 Teklad Global Rodent Diet, Envigo). After 8 weeks of obesity induction, animals in the CAF group were separated in a CAF and CAFR group. This resulted in a factorial design with 3 diet conditions (STD, CAF, and CAFR) and 2 exercise conditions (control, C; and exercise, E), giving a total of 6 experimental groups (n=10 each). The CAF diet administered consisted of bacon, biscuits with pâté, biscuits with cheese, muffins, carrots, jellied sugared milk and standard chow. The amount of food and energy administered per day were 103g and 246Kcal for the CAF diet; 41g and 97Kcal for the CAFR diet; and 290kcal per 100g for the standard chow. Exercise was performed on a treadmill (Columbus instruments, Columbus, OH, USA) at an intensity of 17m/min for 35 minutes 5 days/week. The exercise intervention started at the same time as the CAFR diet intervention. For a detail of the experimental methodology see the diets administered and the exercise protocol (Alvarez-Monell et al., 2022 a).

After 8 weeks of interventions, we assessed recognition memory through the novel object and the novel place recognition tests. Both tests were carried out in 2 identical open field apparatus (66cm width x 66cm length x 47cm height). The apparatuses were placed in a room separated from the housing room, tests were carried out in the morning (between 9h and 14h) and recorded with a camera placed above de apparatus. For both tests, an habituation period lasting 2 days was performed before the testing. In this period animals were placed in the apparatus once each day for 10 minutes to habituate them to the apparatus. The two animals housed together were tested at the same time, one in each apparatus. During all sessions animals were placed in the open field in the same order. Testing was carried out during the next 2 days. On the first day one animal performed the novel object recognition task and the other animal the novel place recognition task, and on the second day the tasks were switched. All animals performed all habituation and test sessions in the same apparatus.

In the novel object recognition test two objects were used (Object 1, a cylindrical tomato can with a red ball attached at the top; and Object 2, a rectangular pack of detergent). The test consisted of three phases. Firstly, animals were exposed for 5 minutes to either two of Object 1 or of Object 2 (familiarization phase), placing the objects in the middle of the open field and leaving sufficient space in between for

the animal to roam. Then, the animals were removed from the open field and returned to their home-cage for 5 minutes (retention phase). During this time the apparatus and the objects were cleaned with 70% ethanol. Finally, animals were exposed for 3 minutes to two objects, one maintained from the first phase and the other new (test phase). Half the animals in each experimental group were exposed to Object 1 in the familiarization phase of testing, and the other half to Object 2. The object to which they were exposed in the first phase is referred to Object Sample (S) and the new object in the test phase Object New (N), regardless of whether it was object 1 or 2. Figure 1 details the distribution of the objects in each phase.

In the novel place recognition test, two different objects were used (Object 3, a cylindrical crystal jar of legumes; and Object 4, a cylindrical plastic jar of cocoa cream). The test consisted of three phases. Firstly, animals were exposed for 5 minutes to either two of Object 1 or Object 2 (familiarization phase), placing the objects in the open field close to a wall and leaving sufficient space in between the objects and the wall and the objects for the animal to roam. Then, the animals were removed from the open field and returned to their home-cage for 5 minutes (retention phase). During this time the apparatus and the objects were cleaned with 70% ethanol. Finally, animals were exposed for 3 minutes to two objects (test phase), one maintained from the familiarization phase and the other moved close to the opposite wall of the open field. Half the animals in each experimental group were exposed to Object 3 in the familiarization phase, and the other half to Object 4. The object to which they were exposed in the familiarization phase is referred to Object Sample (S), and the new object in the test phase Object Sample' (S'), regardless of whether it was Object 3 or 4. Figure 1 details the distribution of the objects in each phase.

In both tests the time spent exploring each object was always recorded by the same trained experimenter. The time exploring each object in the familiarization phase was added to obtain the total exploration time. In the test phase, exploration times were used to calculate the Novelty Index as:

$$\frac{\text{Time exploring the novel object (N or S')}}{\text{Time exploring object N or S' + Time exploring object S}}$$

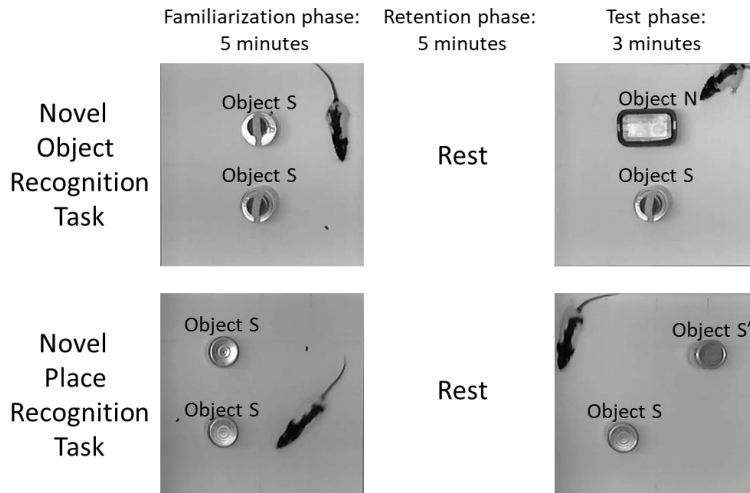


Figure 1. Phases of the novel object and place recognition task showing the positioning of the objects in the familiarization and test phases.

Data for the novel object and place task was analysed with two 2-way ANOVAs. A first 2-way ANOVA with the factors diet (STD and CAF) and exercise (C and E) was used to compare STD and CAF groups. A second 2-way ANOVA with factors diet (CAF and CAFR) and exercise (C and E) was used to compare CAF and CAFR groups.

For the novel object recognition test, the results in the first analysis showed that neither the diet nor the exercise affected exploration time on the familiarization phase (Fig. 2. A) nor the Novelty Index (Fig 2. B).

In the second analysis comparing CAF and CAFR groups, we found an effect of exercise in the exploration time in the familiarization phase [$F(1,38)=5.877$, $p=0.021$], with exercised animals exploring the objects less time than controls. Regarding the Novelty Index, we also detected an effect of the factor exercise [$F(1,38)=4.659$, $p=0.038$], with exercised animals showing a higher value than control animals.

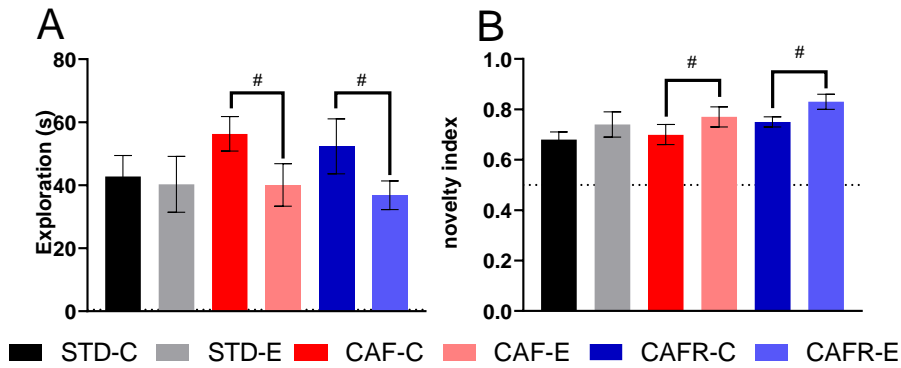


Figure 2. Novel object recognition task. A. Exploration time of the two objects in the familiarization phase of the test. B. Novelty index. # $p < 0.05$ vs non-exercised condition of the corresponding dietary group. Mean \pm SEM.

Regarding the novel place recognition test, the first analysis revealed that the exercise decreased exploration time [$F(1,35)=4.675$, $p=0.038$] in the familiarization phase of the test (Fig 3. A), and pair-wise comparisons showed that exercise decreased exploration time in CAF animals [$t(15)=2.213$, $p=0.043$], but not in STD. We also detected that the factor diet tended towards significance [$F(1,35)=3.755$, $p=0.062$], with CAF animals showing marginally increased exploration. No significant differences were found when analysing the Novelty Index (fig 3. B). In the second analysis comparing CAF and CAFR groups, no effect was found for diet or exercise on exploration or the Novelty Index.

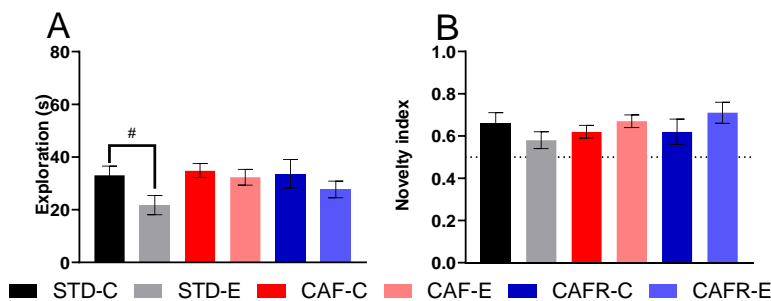


Figure 3. Novel place recognition task. A. Exploration time of the two objects in the familiarization phase of the test. B. Novelty index. # $p < 0.05$ vs non-exercised condition of the corresponding dietary group. Mean +/- SEM.

The results obtained showed that exercise improved cognitive function, mainly in the object recognition task in CAF and CAFR fed animals. Exercised animals in these groups improved the Novelty Index, indicating better recognition of the novel and known objects, despite showing decreased exploration in the familiarization phase. Conversely, CAF feeding did not have a noticeable impact on recognition memory.

The fact that DIO had minimal effects on recognition memory is apparently contrasting with existing reports since, as stated previously, it is generally accepted that obesity impairs cognitive function. Few studies have been performed comparing cognitive impairments in DIO male and female rats (Espinosa-García et al., 2020; Mezo-González et al., 2022). In males, cognitive dysfunction was shown both in a water maze (Espinosa-García et al., 2020) and in an object recognition task (Mezo-González et al., 2022), while in females no dysfunction was detected in the water maze (Espinosa-García et al., 2020) and in the novel object recognition task (Mezo-González et al., 2022). These results seem to support our findings of minimal impact of DIO on recognition memory in females.

Aside from the sex of the animals used, the timing of the dietary intervention also appears to have an impact on the degree of cognitive affectation. Similar CAF diet interventions than the one used in the present study but started in adult male rats showed impaired recognition memory (Beilharz et al., 2014; Kendig et al., 2019; Lewis et al., 2019), while CAF interventions started post-weaning showed no alterations (Ferreira et al., 2018). All this taken together might imply that a CAF diet intervention started post-weaning have milder or no effects on recognition memory. This might be due to adaptive processes that might take place when the dietary intervention is started at an early age, but not in adulthood.

The CAFR diet also showed no noticeable effects upon recognition memory. Few reports have been published tackling the effects of a restrictive dietary intervention aimed at ameliorating obesity, and of those, none has used recognition

tests, but the water maze instead. These reports showed that restrictive feeding improves cognitive function by increasing time spent in the target quadrant of the maze (Kaptan et al., 2015), and by decreasing the latency time to reach the platform (Nasirinezhad et al., 2022). The lack of effects that the CAFR diet had upon recognition memory in the present study might be due to the fact that CAF had no detrimental effects by itself as stated before, therefore making it difficult for a restrictive diet based on the CAF diet to revert the effects. Taking this into account the study of the beneficial effects of calorie-restricted diets on cognitive function seems to be better studied in males than in females, since males show greater detrimental effects of diet-induced obesity than females.

On the other hand, exercise affected recognition memory mainly in the novel object task. Exercised CAF and CAFR animals showed decreased exploration in the familiarization phase, and a higher Novelty Index than control animals in the test phase, indicating that exercised animals generated a better memory of the objects with less exploration time. Memory for object recognition is considered to be strongly mediated by the perirhinal cortex (Aggleton & Brown, 2005; Warburton & Brown, 2015a). Voluntary physical activity in rats has been reported to improve object recognition memory, which has been related to increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the perirhinal cortex (Hopkins & Bucci, 2010), and to a protective effect of exercise against neuronal loss (Jacotte-Simancas et al., 2015).

These results taken together might imply that CAF feeding in females, when started post-weaning and administered chronically, generates minimal impact on recognition memory, which might be the result of an adaptive processes that compensate for the detrimental effects of obesity. However, CAF feeding could have generated a detrimental effect not observed in the present study, but that can be at least partially reversed by treadmill exercise. It is also worth remarking that very few reports have been published tackling the effects on recognition memory of restrictive diets or exercise on female animals.

References

Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (2005). Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B: Comparative and Physiological Psychology*, 58(3–4), 218–233.

Alvarez-Monell, A., Subias-Gusils, A., Mariné-Casadó, R., Boqué, N., Caimari, A., Solanas, M., & Escorihuela, R. M. (2022). Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats. *Nutrients*, 15(1), 144.

Alvarez-Monell A, Subias-Gusils A, Mariné-Casadó R, Belda X, Gagliano H, Pozo OJ, Boqué N, Caimari A, Armario A, Solanas M, Escorihuela RM. Restricted cafeteria feeding and treadmill exercise improved body composition, metabolic profile and exploratory behavior in obese male rats. *Sci Rep*. 2022;12(1):19545. doi:10.1038/s41598-022-23464-7

Anderson, B. J., Rapp, D. N., Baek, D. H., McCloskey, D. P., Coburn-Litvak, P. S., & Robinson, J. K. (2000). Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behaviour*, 70(5), 425–429

Bechara, R. G., & Kelly, Á. M. (2013). Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural Brain Research*, 245, 96–100.

Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 134–141.

Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 6–10.

Espinosa-García, C., Fuentes-Venado, C. E., Guerra-Araiza, C., Segura-Uribe, J., Chávez-Gutiérrez, E., Farfán-García, E. D., Estrada Cruz, N. A., & Pinto-Almazán, R. (2020). Sex differences in the performance of cognitive tasks in a murine model of metabolic syndrome. *European Journal of Neuroscience*, 52(1), 2724–2736.

Ferreira, A., Castro, J. P., Andrade, J. P., Dulce Madeira, M., & Cardoso, A. (2018). Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 197–207.

Gunstad, J., Lhotsky, A., Wendell, C. R., Ferrucci, L., & Zonderman, A. B. (2010). Longitudinal examination of obesity and cognitive function: Results from the baltimore longitudinal study of aging. *Neuroepidemiology*, 34(4), 222–229.

Guxens, M., Mendez, M. A., Julvez, J., Plana, E., Forns, J., Basagaña, X., Torrent, M., & Sunyer, J. (2009). Cognitive function and overweight in preschool children. *American Journal of Epidemiology*, 170(4), 438–446.

Hopkins, M. E., & Bucci, D. J. (2010). BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 278–284.

Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Torras-Garcia, M., Borlongan, C. v., & Portell-Cortés, I. (2015). Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 32(10), 739–751.

Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2010). Different Patterns of Memory Impairments Accompany Short- and Longer-Term Maintenance on a High-Energy Diet. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 36(2), 313–319.

Kaptan, Z., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Dedeakayoullari, H., Batu, Ş., & Üzümlü, G. (2015). Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; Hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain Research*, 1618, 194–204.

Kendig, M. D., Westbrook, R. F., & Morris, M. J. (2019). Pattern of access to cafeteria-style diet determines fat mass and degree of spatial memory impairments in rats. *Scientific Reports*, 9(1), 13516.

Khanna, D., Khanna, S., Khanna, P., Kahar, P., & Patel, B. M. (2022). Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus*, 14(2), e22711

Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162.

Lalanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 122, 92–119.

Lee, S. H., Zabolotny, J. M., Huang, H., Lee, H., & Kim, Y. B. (2016). Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Molecular Metabolism*, 5(8), 589–601.

Lewis, A. R., Singh, S., & Youssef, F. F. (2019). Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. *Heliyon*, 5(3), E01412.

Mezo-González, C. E., Daher Abdi, A., Reyes-Castro, L. A., Olvera Hernández, S., Almeida, C., Croyal, M., Aguesse, A., Gavioli, E. C., Zambrano, E., & Bolaños-Jiménez, F. (2022). Learning Deficits Induced by High-Calorie Feeding in the Rat are Associated With Impaired Brain Kynurenine Pathway Metabolism. *International Journal of Tryptophan Research*, 15, 1-13.

Moreton, E., Baron, P., Tiplady, S., McCall, S., Clifford, B., Langley-Evans, S. C., Fone, K. C. F., & Voigt, J. P. (2019). Impact of early exposure to a cafeteria diet on prefrontal cortex monoamines and novel object recognition in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, 363, 191–198.

Nasirinezhad, N. A., Zamaninur, N., Nik Azm, S. A., Hosseini, A., Naisirinezhad, F., & Reza Vera, M. (2022). The effect of Calorie Restriction and Intermittent Fasting on Impaired Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obesity Started Post-Weaning in Male Wistar Rat. *Medicine Journal Islam Republic Iran*, 36, 12.

Sclafani, A., & Springer, D. (1976). Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology and Behavior*, 17(3), 461–471.

Smith, E., Hay, P., Campbell, L., & Trollor, J. N. (2011). A review of the association between obesity and cognitive function across the lifespan: Implications for novel approaches to prevention and treatment. *Obesity Reviews*, 12(9), 740–755.

Subias-gusils, A., Alvarez-Monell, A., Caimari, A., del Bas, J. M., Marin, R., Sokanas, M., & Escorihuela, R. M. (2021). Behavioral and Metabolic Effects of a Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Oleuropein Supplementation in Obese Male Rats. *Nutrients*, 13, 4474.

Subias-Gusils, A., Boqué, N., Caimari, A., del Bas, J. M., Mariné-Casadó, R., Solanas, M., & Escorihuela, R. M. (2021). A restricted cafeteria diet ameliorates biometric and metabolic profile in a rat diet-induced obesity model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6), 767–780.

Talar, K., Vetrovsky, T., van Haren, M., Négyesi, J., Granacher, U., Vácz, M., Martín-Arévalo, E., del Olmo, M. F., Kałamacka, E., & Hortobágyi, T. (2022). The effects of aerobic exercise and transcranial direct current stimulation on cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 81, 101738.

Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 131–139.

Ward, Z. J., Bleich, S. N., Cradock, A. L., Barrett, J. L., Giles, C. M., Flax, C., Long, M. W., & Gortmaker, S. L. (2019). Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2440–2450.

Yu, F., Xu, B., Song, C., Ji, L., & Zhang, X. (2013). Treadmill exercise slows cognitive deficits in aging rats by antioxidation and inhibition of amyloid production. *NeuroReport*, 24(6), 342–347.

4. Discussió General

En aquesta tesi s'han exposat 3 treballs amb l'objectiu d'estudiar en un model d'obesitat induïda per la dieta CAF en rates mascle i femella els efectes de les intervencions de CAF restrictiva i d'exercici, soles o combinades. Prèviament, a la secció d' Hipòtesis i Objectius de la tesi, s'ha exposat la hipòtesi que es va plantejar a l'inici del projecte, la qual estableix que la dieta CAF resultaria en un model d'obesitat adequat per a l'estudi de les intervencions, i formula que tant la intervenció de CAF restrictiva com d'exercici millorarien el fenotip dels animals obesos. Si volem donar una resposta ràpida a aquestes hipòtesis podríem dir que globalment s'han complert; de manera que la dieta CAF ha induït l'obesitat i les alteracions metabòliques esperades, i que això ens ha permès estudiar els efectes de les intervencions. A més a més, les intervencions han tingut efectes que es poden considerar de millora respecte el fenotip obès. Tot i aquesta resposta ràpida, és necessari matissar altres aspectes com ara les variables dependents afectades en cada cas, els efectes diferencials de sexe que hem obtingut i la magnitud de la millora de les intervencions respecte el fenotip obès. Aquesta discussió té com a objectiu proporcionar aquesta explicació detallada. I per tal d'orientar i simplificar aquesta explicació detallada, incloc les taules següents que mostren un resum dels resultats obtinguts i que faré servir al llarg de la discussió a mode de referència.

4.1. L'obesitat induïda per dieta CAF en rates mascle i femella

La dieta CAF va generar un augment important del pes corporal en ambdós sexes. Aquesta variable per sí sola no és indicativa d'un deteriorament de l'estat de salut dels animals (Blüher, 2020), essent una mesura més adequada la determinació del risc de SM que presenten els animals. En rates, a diferència que en humans, no existeixen uns valors estandarditzats a partir dels quals es considera que un animal té hiperglucèmia, dislipidèmia o un perímetre abdominal major que un individu no obès (Rodríguez-Correa et al., 2020). Això fa que aquests paràmetres s'hagin de determinar a partir de comparacions estadístiques amb el grup control. En els nostres estudis hem determinat que, tant en mascles com en femelles, el grup CAF presenta un perímetre abdominal, una glucèmia i una triglicèridèmia major que el grup STD i, a més, en mascles, uns nivells de colesterol HDL menors. En humans, aquests paràmetres, juntament amb la pressió arterial, s'usen en la pràctica clínica per a determinar el risc de SM (Alberti et al., 2009). Si apliquem un raonament semblant als nostres estudis podem afirmar que els animals CAF, d'ambdós sexes,

presenten almenys 3 dels paràmetres usats en humans alterats respecte al grup STD. D'aquesta manera a part de l'augment de pes generat per la dieta CAF, aquesta també genera un augment del risc de SM. Aquest empitjorament de la salut metabòlica dels animals confirma que la dieta CAF és un bon model d'obesitat, i que pot ser adequat per a determinar els efectes d'intervencions correctives sobre la salut metabòlica.

Taula 2. Resum dels resultats dels dos experiments duts a terme en aquesta tesi.

Sexe	Bloc de resultats	Paràmetre	CAF vs STD	CAFR vs CAF	Exercici en STD	Exercici en CAF	Exercici en CAFR
Mascles	Ingesta i obesitat	Parametres biomètrics	↑↑↑	↓	=	↓	↓
		Ingesta de pinso	↓↓↓	↑↑	=	=	=
		Ingesta de dieta CAF	↑↑↑	↓↓↓	=	=	=
		Marcadors SM	↑↑	↓	=	=	=
		Adipositat	↑↑	↓	↓	=	↓
	Gust dolç	Conducta apetitiva	↓↓↓	=	=	=	=
		Conducta hedònica	↓	=	=	=	=
		Palatabilitat percebuda	=	↑	=	=	↑
	Activitat locomotora, exploratoria i eix HPA	Home Cage Activity	↓	=	↑	↑	↑
		Corticosterona Basal	↓↓	=	=	=	=
ACTH basal		=	=	=	=	=	
Corticosterona en pèl		=	=	=	↑	↑	
Activitat exploratòria		↑↑	=	↑	↑	=	
Femelle ^s	Ingesta i obesitat	Parametres biomètrics	↑↑↑	↓↓	=	=	=
		Ingesta de pinso	↑↑↑	↓↓↓	=	=	=
		Ingesta de dieta CAF	↓↓↓	↑↑	=	=	=
		Marcadors SM	↑↑↑	↓↓	=	=	=
		Adipositat	↑↑↑	↓↓	↓	=	=
	Gust dolç	Test de preferència	↓↓	↑	↓↓	↓	=
		Respostes hedòniques	=	=	=	=	=
		Palatabilitat percebuda	↓	↑	=	=	=
	Funció cognitiva	Novelty index, NPR	=	=	=	=	=
		Exploracio Pretest, NPR	=	=	↓	=	=
Novelty index, NOR		=	=	=	↑	↑	
		Exploracio Pretest, NOR	=	=	=	↓	↓

En la taula es mostren els resultats obtinguts en els dos experiments (Mascles i Femelles) per variis paràmetres dins de cada bloc de resultats. Les fletxes indiquen la direcció de l'efecte i el nombre de fletxes (d'1 a 3) indica la magnitud de l'efecte (de 1 a 3), el símbol "=" indica una manca d'efecte.

Aquests resultats en els paràmetres metabòlics són semblants als obtinguts en estudis previs duts a terme pel nostre grup de recerca. De manera que una dieta CAF genera consistentment un augment de l'adipositat, un deteriorament de la regulació de la glicèmia i una dislipidèmia en mascles (Lalanza et al., 2014; Subias-Gusils et al., 2021 a,b). En femelles s'han dut a terme menys estudis, però tot i això, s'ha determinat un efecte semblant en estudis previs, amb un augment de

l'adipositat, un deteriorament de la regulació de la glicèmia i una dislipidèmia (Cigarroa et al., 2016; Lanza et al., 2014).

Altres autors també han obtingut resultats semblants en referència al desenvolupament de SM en rates alimentades crònicament amb dieta CAF. En varis estudis en que es va fer una intervenció crònica de dieta CAF (entre 10 i 30 setmanes) s'han detectat alteracions en els marcadors clínics de SM, i en altres estudis s'ha descrit hipertensió (Doghri et al., 2019; Lozano-Cuenca et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019; Pons et al., 2016, 2017). A més, aquesta hipertensió sembla ser més marcada quan la intervenció amb dieta CAF és més prolongada. Així, una intervenció de 16 setmanes va resultar en una diferència de pressió arterial entre el grup control i el grup CAF major que l'observada en estudis amb intervencions de menor durada (Lozano-Cuenca et al., 2020).

De forma similar als resultats d'aquesta tesi, altres estudis també han detectat un augment de l'adipositat com a conseqüència de l'alimentació CAF crònica (Caimari et al., 2017; Carvalho et al., 2016; Gomez-Smith et al., 2016; Kendig et al., 2022; Leigh et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019; Pons et al., 2017). Vàries mesures es poden utilitzar per a determinar l'adipositat dels animals i diferents estudis utilitzen una o vàries d'aquestes mesures. Aquestes mesures són: (i) l'ús de paràmetres biomètrics específics (perímetre abdominal o Índex de Lee), (ii) l'ús de tècniques d'imatge, i (iii) la col·lecció i pesatge de teixit adipós al finalitzar l'estudi. En alimentació CAF crònica es detecta un augment de l'adipositat independentment de la tècnica utilitzada, de manera que tant l'ús de paràmetres biomètrics (Carvalho et al., 2016; Kendig et al., 2022; Leigh et al., 2020; Pons et al., 2017), de tècniques d'imatge (Caimari et al., 2017; Gomez-Smith et al., 2016), com el pes del teixit adipós al final de l'experiment (Caimari et al., 2017; Kendig et al., 2022; Leigh et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019) indiquen un increment de l'adipositat com a conseqüència de l'alimentació crònica amb dieta CAF.

Addicionalment, en el desenvolupament de SM també es troben alteracions en el metabolisme de la glucosa i en el perfil lipídic (Alberti et al., 2009). El paràmetre utilitzat en la pràctica clínica per determinar el risc de SM és la glucèmia basal. En la bibliografia hi ha resultats oposats per aquest paràmetre, amb varis estudis amb dieta CAF crònica mostrant un augment (Caimari et al., 2017; Carvalho et al., 2016; Derkach et al., 2017; Doghri et al., 2019; la Russa et al., 2019; Lozano-Cuenca et al., 2020), i d'altres mostrant una glucèmia semblant als controls (Gomez-Smith et al.,

2016; Kendig et al., 2022; Leigh et al., 2020; Livingston et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019; Pons et al., 2016). Un altre test que es pot realitzar per estudiar la regulació de la glucèmia en rates i la funció insulinèrgica és un test de tolerància a la glucosa. Aquest test consisteix en administrar (oral o intraperitoneal) una concentració fisiològica de glucosa, i posteriorment determinar la glucèmia al llarg de 2h en resposta a la càrrega de glucosa administrada (Bowe et al., 2014). En estudis amb administració de CAF crònica en que s'ha realitzat aquest test es detecta consistentment un deteriorament en el metabolisme de la glucosa, de manera que la glucèmia es manté elevada en resposta a la càrrega de glucosa en animals obesos durant més temps que en animals control, tant en estudis en que es detecta un augment de la glucèmia basal (Caimari et al., 2017; Derkach et al., 2017; Doghri et al., 2019), com en estudis en que no (Gomez-Smith et al., 2016). Aquest resultat indica que tot i que la dieta CAF no genera un augment consistent de la glucèmia basal, sí que genera consistentment un deteriorament en el metabolisme de la glucosa.

En referència al perfil lipídic, la SM es diagnostica amb un augment de la trigliceridèmia i una disminució del colesterol HDL (Alberti et al., 2009). D'aquests dos paràmetres, l'efecte de la dieta CAF crònica que es detecta de forma més consistent és la trigliceridèmia elevada (Caimari et al., 2017; Carvalho et al., 2016; Derkach et al., 2017; Gomez-Smith et al., 2016; la Russa et al., 2019; Leigh et al., 2020; Livingston et al., 2020; Lozano-Cuenca et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019; Pons et al., 2016, 2017), encara que tot i ser el resultat més consistent obtingut, també hi ha discrepàncies i algun estudi no detecta hipertrigliceridèmia (Doghri et al., 2019). És important remarcar que de tots aquests estudis, aquest últim de Doghri et al., 2019 és precisament el que administra la dieta CAF amb el contingut més baix en grasses (18%). Aquest fet podria explicar la baixa afectació que detecten en el perfil lipídic dels animals CAF respecte els altres estudis que administren una dieta amb un contingut en grasses més elevat (entre 25% i 35%).

L'altre marcador lipídic utilitzat és la disminució de colesterol HDL, el qual també es troba afectat en alimentació CAF crònica (Caimari et al., 2017; Derkach et al., 2017; Livingston et al., 2020; Mayneris-Perxachs et al., 2019), tot i que en alguns estudis no s'hi troba cap efecte (Carvalho et al., 2016; la Russa et al., 2019).

Considerant tots aquests resultats es pot concloure que la dieta CAF genera efectes robusts i negatius sobre la salut metabòlica dels animals, que genera un

fenotip que es pot relacionar fàcilment amb el desenvolupament de la SM, i que aquests efectes són suficientment marcats com per poder ser considerada una eina adequada per l'estudi de tractaments correctius de l'obesitat

Tot i el gran volum de bibliografia que hi ha centrada en l'estudi dels efectes de la OID, les diferències entre sexes en els efectes metabòlics estan poc estudiades i hi ha poques publicacions que comparin directament els efectes d'una dieta obesogènica en ambdós sexes. Els pocs estudis duts a terme amb una dieta CAF a llarg termini (26 setmanes) comparant directament mascles i femelles indiquen que les femelles presenten un guany de pes major que els mascles (Nadal-Casellas et al., 2012, 2013), de manera que els mascles CAF presenten un pes corporal un 120% major que els controls, mentre que les femelles CAF presenten un pes corporal un 150% major que els seus controls. En termes d'adipositat, això és traduït en un índex d'adipositat major en les femelles respecte els controls que en els mascles. A nivell metabòlic també es detecten diferències entre mascles i femelles alimentats amb dieta CAF, de manera que, tot i que els mascles presenten uns nivells d'insulina majors que les femelles, l'efecte de la dieta CAF és major en femelles generant un augment respecte els animals control major, i un índex de resistència a la insulina amb una afectació major en femelles (Nadal-Casellas et al., 2012, 2013). En referència al perfil lipídic, un resultat semblant al descrit pels nivells d'insulina es detecta pels triacilglicèrids (Nadal-Casellas et al., 2012). En l'estudi del nostre grup de recerca de Lanza et al., 2014 també es van comparar els efectes de la dieta CAF en mascles i femelles en una intervenció de 8 setmanes. En aquest estudi, però, no es van trobar tantes diferències entre sexes, de manera que només es va trobar un augment de l'adipositat major en femelles que en mascles. Aquestes discrepàncies es podrien atribuir a la diferència notable en la durada de les intervencions (26 setmanes contra 8 setmanes), i és possible que una durada major generi de forma progressiva un deteriorament en femelles major que en mascles.

En aquesta tesi, hem fet una intervenció de 23 setmanes tant en mascles com en femelles, tot i que no de forma conjunta. Els resultats obtinguts són més afins als obtinguts en els estudis de Nadal-Casellas et al., 2012, 2013 que als de Lanza et al., 2014. Així, es detecta un augment de pes major en femelles CAF (136%) que en mascles CAF (115%), en comparació al grup STD corresponent al mateix sexe, i un resultat semblant en els nivells d'insulina (406% en femelles CAF contra 174% en mascles CAF en relació amb el corresponent grup STD) i de triacilglicèrids (222%

en femelles CAF contra 143% en mascles CAF en relació amb el corresponent grup STD), amb un deteriorament en el grup CAF en comparació amb el grup STD major en femelles. Tot i això, no es detecta una diferència notable en l'adipositat entre sexes.

Aquests resultats en animals alimentats amb dieta CAF durant períodes de temps diferents sembla indicar que els efectes de la CAF en femelles són de caràcter més sever a mesura que la intervenció es prolonga en el temps, mentre que en els mascles, aquests efectes es mantenen més estables al llarg del temps.

En relació als resultats conductuals obtinguts en animals CAF mascles, el primer grup de resultats indica que l'alimentació amb dieta CAF indueix una disminució de l'activitat locomotora basal i un augment de l'activitat exploratòria respecte el grup STD.

Amb la informació de la que es disposa, el nostre estudi és possiblement el primer en determinar l'activitat locomotora basal al llarg de 24h en animals alimentats amb dieta CAF a llarg termini, demostrant una disminució d'aquesta activitat respecte al grup STD. En experiments fets en rates amb dietes obesogèniques altes en grasses es descriuen resultats semblants al que hem obtingut amb dieta CAF (Levin, 1991; Mifune et al., 2015), indicant que la modalitat de dieta obesogènica juga un paper poc rellevant en la reducció de l'activitat locomotora basal induïda per l'obesitat. El consens en la majoria de publicacions en que s'ha determinat l'activitat locomotora basal al llarg de 24 h en animals amb OID és que el cicle circadiari es deteriora, de manera que l'obesitat indueix una reducció en l'activitat durant les hores de foscor, i un augment de l'activitat en les hores de llum (Kohsaka et al., 2007; Mifune et al., 2015). Els nostres resultats també mostren una reducció de l'activitat en les hores de foscor, però no mostren un augment de l'activitat en les hores de llum. Aquesta discrepància és probablement deguda a la metodologia emprada. En el nostre experiment el test es va iniciar a les 15 h, de manera que el període de llum queda partit, mentre que en els experiments de Kohsaka et al., 2007 i Mifune et al., 2015 la determinació es va dur a terme durant varis dies, i es van obtenir dades ininterrompudes de l'activitat locomotora en el període de llum.

Altres estudis que han investigat els efectes de l'alimentació CAF en la locomoció al camp obert (García-Díaz et al., 2007; Sack et al., 2017) durant un

període de temps curt (10-30 minuts) conclouen que també hi ha una disminució de la locomoció en els animals alimentats amb dieta CAF. Aquesta metodologia pot generar un error en el resultat obtingut com a conseqüència de la novetat que genera l'exposició al camp obert. En el nostre estudi es va mesurar dues vegades l'activitat locomotora basal. Una just després d'haver induït l'obesitat i abans d'iniciar les intervencions de dieta CAFR i d'exercici, i l'altra 8 setmanes després per veure els efectes de les intervencions. Això fa que la novetat en el segon test és reduïda degut a l'exposició prèvia, i que en el segon test els animals són 8 setmanes més grans, la qual cosa també pot afectar la seva activitat motora basal. Addicionalment, les dades obtingudes durant la primera hora es van eliminar ja que les mesures van resultar anormalment altes (1000 cm a les 15h contra 287 cm a les 16h), molt probablement degut a la novetat de l'aparell.

Els resultats obtinguts al HB indiquen un augment en la conducta exploratòria dels animals CAF respecte els STD. L'OID s'ha documentat varies vegades com a una intervenció que genera una disminució de l'activitat exploratòria dels animals (Abd Al Haleem & El-Bakly, 2019; Arika et al., 2019; Kurhe et al., 2015). Tot i això, el resultat que hem obtingut en el nostre estudi es consistent amb resultats anteriors del grup (Lalanza et al., 2014) i d'altres (Ulrich-Lai et al., 2010)

Aquesta discrepància entre els resultats obtinguts en experiments amb dieta CAF i experiments amb altres dietes obesogèniques indica que la palatabilitat de la dieta és un factor important a l'hora de determinar els efectes de l'obesitat sobre la conducta exploratòria. El fet d'ingerir una dieta saborosa es pot relacionar directament amb el concepte de *comfort food*, i d'aquesta manera la dieta CAF podria induir una reducció de l'ansietat associada a l'exposició a un ambient nou i en conseqüència promoure l'exploració d'aquest ambient (Ulrich-Lai et al., 2010, 2015).

Aquest efecte de l'alimentació saborosa sobre l'ansietat també es pot detectar en la disminució basal dels nivells de corticosterona observada en els animals CAF. Addicionalment, en la resposta de l'eix HPA a l'exposició a un ambient nou vam detectar una lleugera disminució dels nivells d'ACTH en els animals CAF respecte els STD. Aquests efectes també son consistents amb altres estudis, indicant que la ingesta d'aliments saborosos es capaç de reduir la resposta de l'eix HPA a una situació estressant (Ulrich-Lai et al., 2010, 2015).

En relació als efectes de la dieta CAF sobre la funció gustativa, els resultats obtinguts indiquen que la ingesta d'aquesta dieta induïx una disminució de la conducta apetitiva en ambdós sexes. Aquest efecte es veu en la disminució de la ingesta en el test de preferència i en la disminució dels assajos iniciats en el test d'accés curt. Aquest resultat es consistent amb altres estudis on la dieta CAF també genera una disminució de la conducta apetitiva (Fam et al., 2022). Aquesta disminució es pot relacionar amb el desenvolupament del perfil depressiu que s'ha descrit tant en models animals d'OID (Abildgaard et al., 2011; Macht et al., 2017) com en humans obesos (Carey et al., 2014). Alternativament, una disminució en la senyalització dopaminèrgica induïda per la dieta CAF també pot explicar en part aquest resultat. D'aquesta manera, una disminució en l'expressió dels receptors dopaminèrgics D1 i D2 (Ong et al., 2013), conjuntament amb una disminució de l'alliberació de dopamina (W. Chen et al., 2019), induïdes per la OID, podrien generar una devaluació del valor reforçant de la sucrosa (Volkow et al., 2013).

Tot i que aquesta disminució de la conducta apetitiva es veu en ambdós sexes, aquest efecte presenta una magnitud major en mascles que en femelles. Aquest fenomen es podria explicar pel fet que s'ha descrit que les femelles són més susceptibles als efectes de recompensa dels aliments gustosos i demostren una preferència de lloc condicionada major que els mascles als aliments gustosos, així com una major expressió de c-fos al Nucli Accumbens (NA) en resposta a la ingesta d'aliments gustosos (Sinclair et al., 2017). Això podria contrarestar els efectes de l'OID i protegir a les femelles contra la reducció del poder reforçant de la sucrosa induïda per la dieta CAF. D'altra banda, les diferències en la conducta apetitiva entre ambdós sexes també podrien estar relacionades amb diferències metodològiques entre els experiments. Així, en el experiment realitzat en femelles es va retirar la dieta durant els tests conductuals, mentre que en l'experiment realitzat en mascles aquesta es va mantenir. La major disminució en la conducta apetitiva detectada en mascles es podria explicar pel fet de tenir disponible la dieta de cafeteria just abans del test.

D'altra banda, la dieta CAF també genera una reducció en l'avaluació hedònica de la sucrosa. Aquest paràmetre està principalment regulat pel sistema opioidèrgic (Berridge, 2009) en regions petites on micro-infusions d'agonistes opioides poden modificar l'avaluació hedònica de la sucrosa (Castro & Berridge, 2014). En línia amb aquest resultat, en animals alimentats amb dieta CAF s'ha documentat una

disminució de l'expressió del receptor μ -opioide al NA en mascles, però no en femelles (Ong et al., 2013), de manera que aquesta diferència entre sexes podria explicar perquè en els nostres resultats trobem la conducta hedònica alterada en mascles en major grau que en femelles.

Finalment, la dieta CAF també indueix una disminució de la palatabilitat percebuda a la sucrosa en femelles, però no en mascles. La palatabilitat percebuda es pot relacionar amb la capacitat de la via de transducció de senyals des de les papil·les gustatives que expressen l'heterodímer T1R2/3 i que tenen la funció de receptors pel gust dolç. La leptina té un efecte supressor sobre la transducció d'aquests senyals (Kawai et al., 2000; Yoshida et al., 2013). Tal com s'ha comentat anteriorment, l'administració de dieta CAF a llarg termini té un major impacte en femelles que en mascles, i en aquest sentit els nivells de leptina estan més augmentats en femelles CAF respecte el corresponent grup STD que en mascles (augment del 653% en femelles contra 224% en mascles). Aquest efecte diferencial entre ambdós sexes podria explicar que la disminució de la palatabilitat percebuda per efecte de la dieta CAF només s'hagi observat en les femelles.

El darrer conjunt de resultats obtinguts ens indica que l'alimentació CAF en femelles no genera un deteriorament de la conducta de reconeixement d'objectes. En altres estudis en que s'ha dut a terme una intervenció amb dieta CAF s'han detectat afectacions de la capacitat de reconeixement d'objectes (Beilharz et al., 2014; Espinosa-García et al., 2020; Kendig et al., 2019; Lewis et al., 2019; Mezo-González et al., 2022). Tot i això, en els pocs estudis en que aquesta conducta s'ha estudiat en els dos sexes, aquestes afectacions estan absents en femelles (Espinosa-García et al., 2020; Mezo-González et al., 2022). Aquest efecte diferencial entre sexes també s'ha documentat en estudis que utilitzen una dieta obesogènica diferent a la CAF (Hwang et al., 2010; Lord et al., 2021). El fet que aquestes diferències entre sexes es detectin consistentment en animals sotmesos a OID suggeriria que les femelles presenten una resistència major que els mascles a l'efecte deteriorant de l'obesitat sobre la funció cognitiva.

4.2. Els efectes de la dieta de cafeteria restrictiva en les rates obeses

Un cop discutits els efectes de la dieta CAF, el següent pas es discutir quins han sigut els efectes de la dieta CAFR, determinar si aquesta dieta ha tingut efectes que

es puguin considerar correctius respecte la dieta CAF i com han sigut aquests efectes.

En relació als paràmetres associats a la SM, els resultats indiquen que en mascles, la dieta CAFR disminueix significativament el perímetre abdominal i l'adipositat.. En canvi, altres paràmetres como el colesterol HDL, la triglicèridèmia i la glucèmia no es veuen afectats de forma significativa, tot i que es la triglicèridèmia es redueix (1688 mg/L en CAF i 1466 mg/L en CAFR), i l'índex de resistència a la insulina també (24.5 en CAF i 21 en CAFR). En conjunt, aquests resultats indiquen que els efectes de la dieta CAFR a l'hora de revertir els efectes de l'obesitat induïda per la dieta CAF sobre la salut metabòlica són petits en els mascles .

En femelles aquest resultat es diferent. Primerament, a diferència dels mascles, les femelles CAFR tenen una disminució del pes corporal i de l'índex de Lee en comparació amb les CAF. Addicionalment, també mostren una disminució en l'adipositat, la glucèmia i la triglicèridèmia. Aquesta disminució respecte el grup CAF situa aquests animals en un punt intermig entre els animals CAF i els STD, indicant una millora important en la salut metabòlica dels animals, però no una reversió completa.

En un estudi dut a terme amb una dieta alta en grasses en ratolins en que es va interrompre la intervenció obesogènica a les 8 setmanes i es va retornar els animals a una dieta de pinso de manteniment, les femelles van arribar a un pes comparable al dels animals control més ràpid que els mascles (Guerra-Cantera et al., 2021), indicant que en rosegadors una intervenció correctiva de l'obesitat pot ser més efectiva en femelles que en mascles.

En humans hi ha pocs assajos clínics sobre els efectes d'una intervenció dietètica sobre el risc de SM que reportin els resultats pels dos sexes. En els meta-anàlisis que reporten el percentatge d'homes i dones inclosos en els assajos clínics analitzats es pot observar com la majoria inclouen homes i dones (T. Hu et al., 2012), però no reporten les dades per cada sexe. Tot i això, els pocs que reporten un resultat per sexe conclouen que no hi ha diferències notables entre homes i dones (Brinkworth et al., 2009).

Des d'un punt de vista metodològic, la dieta CAFR és una dieta que restringeix la quantitat de cada ingredient CAF administrat en un 30% respecte la ingesta calòrica dels animals CAF. Aquesta dieta s'adequa a les directrius actuals que recomanen als pacients obesos una reducció calòrica d'un 30% sobre la ingesta

habitual (Jensen et al., 2014). Cal tenir en compte però, que aquesta dieta administrada en animals no obesos després del deslletament indueix un augment en l'adipositat dels animals intermedi entre els grups CAF i STD (Subias-Gusils et al., 2021), de manera que es pot considerar una dieta amb un cert efecte obesogènic. En part, aquesta dieta modelaria als individus amb obesitat o sobrepès que inicien una dieta amb l'objectiu de perdre pes, però segueixen menjant en menor quantitat aliments alts en grasses i sucres. Aquesta estratègia no és la més adequada, ja que manté ingredients alts en grasses i/o sucres, i en altres estudis en que es realitza un canvi de la dieta obesogènica a una dieta estàndard és troben efectes correctius més marcats sobre el perfil obès (Guerra-Cantera et al., 2021). Tot i això, la dieta CAFR utilitzada en els nostres estudis també aconseguix generar un efecte correctiu, tot i que aquest sigui de menor magnitud.

S'ha descrit que una interrupció de la dieta CAF després de 6 setmanes d'administració continuada altera l'expressió gènica en àrees del SNC relacionades amb l'estrès i augmenta els nivells plasmàtics de corticosterona (Martire et al., 2014). La retirada de la dieta de cafeteria a les rates després de 8 setmanes també genera afectacions al sistema dopaminèrgic comparables a les generades per la retirada de sucrosa, alcohol o cocaïna, indicant un efecte comparable a la síndrome d'abstinència que apareix a l'interrompre l'ús de drogues d'abús (Ong et al., 2013). Addicionalment, en un model de alimentació alta en grasses i sucres, la retirada de la dieta després de 8 setmanes genera un augment en la conducta ansiosa dels animals (Pickering et al., 2009). Aquests resultats suggereixen que en humans un canvi bruscat de la dieta podria generar una ansietat i un desig per ingerir aliments saborosos que indueixi al fracàs a l'hora de seguir un regim dietètic estricte. De fet, estudis en humans demostren que la satisfacció amb la dieta durant el procés de pèrdua de pes esta inversament relacionada amb marcadors de depressió, estres i ansietat (Moradi et al., 2021), i que la simptomatologia depressiva està directament relacionada amb l'adherència a una dieta (Khalil et al., 2011). Això pot indicar que un efecte semblant a l'observat en models animals també es dona en persones quan es retira una dieta preferida.

La dieta CAFR, a part de generar una ingesta calòrica menor respecte la CAF degut a la quantitat menor de calories administrades, també genera una millora en el perfil d'ingesta dels animals tot promovent la ingesta de pinso. D'aquesta manera en els animals CAFR un 25% de les calories ingerides provenen del pinso, mentre

que en els animals CAF aquest percentatge és inferior al 10%. A priori, aquest efecte pot semblar generat pel fet que la quantitat de dieta CAF disponible és menor en els animals CAFR. Els animals CAFR tenien disponibles diàriament de mitjana aproximadament 60 kcal, tant en mascles com en femelles, mentre que la ingesta mitjana dels animals STD es de 55 kcal diàries en mascles i de 38 kcal diàries en femelles. Per tant, aquestes dades indiquen que l'augment en l'ingesta de pinso no hauria de ser un mecanisme compensatori degut a un dèficit energètic generat per la dieta CAFR.

Un dels objectius d'aquest treball era avaluar els efectes de la dieta CAFR sobre les conductes ansioses i sobre l'eix HPA per determinar si aquesta dieta genera o no els efectes associats a la retirada de la dieta. En aquest aspecte la dieta CAFR no augmenta l'activitat basal de l'eix HPA, sent els valors d'ACTH i de corticosterona semblants als dels animals CAF, i la conducta ansiosa mesurada amb el laberint en creu elevat tampoc està afectada. Aquests resultats semblen indicar que la dieta CAFR no provoca efectes comparables als de la retirada completa de la dieta, de manera que, possiblement una intervenció semblant a la dieta CAFR en humans sigui sostenible a llarg termini i podria prevenir una disminució en la satisfacció de la dieta i un augment en l'estrès generat pel tractament dietètic.

Un altre efecte observat de la dieta CAFR és l'augment en la conducta apetitiva en femelles però no en mascles. Un possible mecanisme que podria explicar aquest efecte és una reversió dels efectes de l'OID sobre el sistema dopaminèrgic. En un estudi fet en ratolins amb una dieta alta en grasses es va determinar que després de 12 setmanes d'accés *ad libitum*, la retirada durant 4 setmanes de la dieta induïa una reversió en l'expressió gènica dels receptors dopaminèrgics D1 i D2 en femelles però no en mascles (Carlin et al., 2013). Un efecte semblant sobre el sistema dopaminèrgic en el nostre experiment podria proporcionar una explicació a la reversió en conducta apetitiva detectada en les femelles. En un experiment dut a terme a l'Octubre de 2020 al nostre laboratori en col·laboració amb el grup "*Behavioral and translational neuroscience*" dirigit per la Dr. Eelke Snoeren de la Universitat Àrtica de Noruega amb l'objectiu de determinar l'activació neuronal en resposta a la ingesta de dieta CAF en femelles a través del marcador *c-fos*, es va determinar que una intervenció de 6 setmanes amb dieta CAF genera una activació neuronal en el NA menor que la dieta STD, mentre que la dieta CAFR provoca una activació major però no de forma significativa (dades no

publicades). Aquests resultats s'alineen amb la bibliografia disponible i amb els nostres resultats conductuals.

D'altra banda, la recuperació en la conducta apetitiva observada en les femelles CAFR també podria estar relacionada amb la reversió del perfil depressiu associat a l'obesitat. Una de les teories utilitzades en l'estudi del desenvolupament de la depressió és la teoria inflamatòria de la depressió (Wachowska & Gałeczki, 2021). Aquesta teoria assumeix la interacció entre els sistemes nerviós, immunitari i neuroendocrí, i estableix les citocines com a element connector que permet la interacció entre aquests sistemes. D'aquesta manera, s'ha determinat específicament un augment en les citocines pro-inflamatòries IL-1 i IL-6 en pacients depressius i un augment en la simptomatologia depressiva (disfòria, anhedònia, ansietat i fatiga) en pacients sotmesos a un tractament amb citocines (Schiepers et al., 2005). Una de les característiques del fenotip obès és la presència d'un estat inflamatori crònic lleu (Bastard et al., 2006; Gregor & Hotamisligil, 2011). En models animals també es detecta un augment en el grau d'inflamació, tant en intervencions de dieta a llarg (Morrison et al., 2010; Pistell et al., 2010) com a curt termini (Beilharz et al., 2014; Giovana Maciel Reis et al., 2023). En experiments anteriors amb el model de dieta CAF també hem detectat un augment en el marcador inflamatori MCP-1 després de 8 setmanes de dieta CAF (Subias-Gusils et al., 2021a), indicant un augment en el grau d'inflamació sistèmica. Aquesta inflamació crònica sistèmica també s'ha documentat que disminueix en animals en que s'ha induït una disminució en el pes corporal a través d'un canvi en la dieta (Rodrigues et al., 2020). En els nostres experiments també hem detectat una lleugera disminució dels nivells sèrics de MCP1 en el grup CAFR respecte el grup CAF en mascles ($p=0.077$), i una disminució significativa en femelles ($p=0.010$), de manera que la dieta CAFR també es capaç de generar una disminució del grau d'inflamació sistèmica sent aquesta disminució major en femelles que en mascles (dades no mostrades).

Tenint en compte aquests resultats en referència a la inflamació sistèmica es podria concloure que la millora en el dèficit de conducta apetitiva en animals femella CAFR respecte CAF estaria associada a una millora en el grau d'inflamació sistèmica. Addicionalment, el fet que en femelles es trobi una disminució major de MCP-1 que en mascles és consistent amb el fet que la millora en la conducta apetitiva també es major en femelles que en mascles.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de la palatabilitat percebuda de la sucrosa també indiquen una diferència entre sexes, tot i que de magnitud menor.. En aquest paràmetre, les femelles CAFR presenten una reversió respecte els efectes de la dieta CAF major que els mascles. Com ja s'ha comentat, la leptina té un efecte supressor sobre la transducció de senyals des del receptor gustatiu fins al SNC (Kawai et al., 2000; Yoshida et al., 2013). Els nostres resultats indiquen que els efectes de la CAFR sobre els nivells de leptina són majors en femelles que en mascles. Els nivells de leptina en mascles CAFR són un 82% comparat amb els CAF, mentre que aquest percentatge és d'un 57% en femelles CAFR comparat amb les CAF. Aquesta reducció major dels nivells de leptina en femelles podria indicar una supressió menor de la transducció de senyals i, en conseqüència, una palatabilitat percebuda major.

4.3. Els efectes de l'exercici moderat al tapís rodant en les rates obeses

A més de la intervenció dietètica amb la dieta CAFR, en aquest treball també s'ha fet una intervenció d'exercici físic al tapís rodant.

Primerament, cal indicar que els protocols utilitzats en mascles i femelles per aquesta intervenció d'exercici físic van ser lleugerament diferents. En termes de la intensitat, en mascles vam usar una intensitat de 12m/min, mentre que en femelles van usar 17m/min. Aquesta diferència respon al fet que les femelles tendeixen a ser més tolerants a l'exercici que els mascles, de manera que intensitats majors són necessàries per generar efectes semblants. Aquest fenomen ja va ser observat en experiments anteriors del nostre grup, on les mateixes intensitats de 12 i 17 m/min van ser usades (Cigarroa et al., 2016; Lanza et al., 2012), i també ha estat observat per altres grups (Foright et al., 2020). Així, en un experiment amb una intervenció al tapís rodant de 4 setmanes a una intensitat de 15m/min es va determinar el grau d'acompliment de l'exercici en una escala de l'1 al 10. En aquesta escala es puntuava cada animal en cada sessió al tapís rodant d'acord amb si l'animal realitza l'exercici de forma correcta (corre a l'inici de la cinta de forma continuada durant tota la sessió) o de forma incorrecte (quedar-se al final de la cinta durant tota la sessió sense fer exercici). Aquesta escala va donar diferències entre sexes de manera que les femelles van obtenir en conjunt una puntuació propera a 8 i els mascles una puntuació propera a 6. Aquesta diferència entre sexes també es pot detectar en un test de camp obert, on les femelles presenten una activitat locomotora més elevada

que els mascles (Knight et al., 2021). D'aquests resultats es pot concloure de forma robusta que les femelles són més actives que els mascles.

Respecte al desenvolupament de la SM, l'exercici és una intervenció que genera uns efectes menors que la intervenció amb la dieta CAFR. manera Així, l'únic efecte destacable de l'exercici és una disminució de l'adipositat en mascles, indicant un efecte modest. Aquest resultat ha estat reproduït de forma consistent (Bulmus et al., 2022; Cigarroa et al., 2016; Leigh et al., 2020; Suárez-García et al., 2017), de manera que l'exercici d'intensitat moderada al tapis rodant no aconsegueix revertir els paràmetres de risc per síndrome metabòlica en animals obesos.

En aquest estudi la intervenció d'exercici físic que s'ha usat és de caràcter correctiu, de manera que aquesta intervenció està encaminada a generar una reversió de les alteracions associades al desenvolupament de l'obesitat. Una altre manera en la que es pot implementar l'exercici és com a teràpia preventiva, de manera que la intervenció d'exercici s'aplica de forma conjunta amb una intervenció dietètica obesogènica per tal de determinar si és capaç de prevenir el desenvolupament de l'obesitat. Les intervencions preventives es consideren més efectives a l'hora de pal·liar l'obesitat en humans (Romanelli et al., 2020). En models animals, aquest efecte també es pot detectar, de manera que quan l'exercici s'aplica de forma preventiva, els animals sotmesos a una dieta obesogènica presenten una adipositat i triglicèridèmia menors, i una regulació de la glucèmia millor que els animals sedentaris (Gopalan et al., 2021; Suk & Shin, 2015; Yang et al., 2022).

Un resultat inesperat d'aquest treball és l'augment dels nivells de leptina en els mascles del grup CAF-E respecte els CAF-C. Aquest resultat és contradictori amb el fet que la leptina es secreta de forma proporcional a la quantitat de teixit adipós de l'individu (Maffei et al., 1995). Tot i això, hi ha altres estudis que han reportat un augment en l'expressió gènica de la leptina com a conseqüència de l'exercici crònic en rates alimentades amb una dieta alta en grasses (de Queiroz et al., 2014). A nivell agut, l'exercici físic intens en humans es capaç de generar una reducció transitòria en els nivells de leptina (Bouassida et al., 2010), de tal manera que aquest efecte només es detecta després d'un episodi d'exercici de durada superior a 60 minuts, o que suposi una despesa energètica superior a 800 kcal (Bouassida et al., 2006; Kraemer et al., 2002). Un exercici d'aquesta intensitat no es comparable amb l'exercici que han dut a terme els nostres animals, que es considera d'intensitat moderada.

Aquest augment en la leptinèmia en mascles CAF-E podria ser un possible mediador a través del qual es produeix la reducció en l'adipositat a través de lipòlisi induïda per la leptina. S'ha documentat que la leptina administrada de forma crònica es capaç de reduir els dipòsits adiposos (G. Chen et al., 1996). Addicionalment, és possible que aquest efecte sigui major en el dipòsit retroperitoneal, ja que tant en l'estudi de de Queiroz et al., 2014, com en el nostre aquest és el dipòsit adipós més afectat. D'altra banda, cal destacar que l'efecte detectat de l'exercici sobre els nivells de leptina en animals CAF també presenta una marcada diferència entre sexes, de manera que en femelles el grup CAF-E i el grup CAF-C presenten nivells de leptina comparables. En humans aquest fenomen també es detecta, havent-se descrit que en individus entrenats, els homes presenten un augment de leptina major que les dones (Noland et al., 2001). Aquesta diferència entre sexes podria respondre en dones a la necessitat de mantenir un índex d'adipositat adequat que impedeixi l'aparició de disfuncions en la regulació menstrual (Royo et al., 2003).

En relació als efectes de l'exercici sobre els paràmetres conductuals, hem detectat un augment de l'activitat locomotora basal en animals STD i CAF sotmesos al tapís rodant. Aquest efecte reverteix parcialment la disminució en aquesta activitat observada en els animals CAF. En la bibliografia no s'ha trobat cap estudi que hagi analitzat l'activitat locomotora basal durant 24h en animals sotmesos a una intervenció al tapís rodant. En estudis en que s'ha realitzat una intervenció d'exercici voluntari en rates amb rodes d'activitat s'ha detectat una reversió dels efectes de la alimentació alta en grasses (Mifune et al., 2015). Cal destacar que en aquest estudi la intervenció realitzada era d'una intensitat molt menor a la del nostre estudi, ja que els animals només tenien accés a les rodes d'activitat 3 dies cada 2 setmanes. Tot i això, l'efecte que es va detectar amb l'exercici voluntari és major al que hem detectat amb al tapís rodant, de manera que, tot i que l'efecte sigui comparable qualitativament, quantitativament l'exercici voluntari genera un efecte molt major.

Els animals amb exercici també presenten una major exploració en el test de la taula de forats. Addicionalment, en el laberint en creu elevat els animals CAF i CAFR mostren una disminució en el nombre d'entrades i de temps passat als braços tancats. Aquests dos resultats es poden interpretar com a un lleuger efecte ansiolític de l'exercici, independentment del grup de dieta. Els efectes ansiolítics de l'exercici

estan ben documentats en la bibliografia. S'ha detectat que una intervenció al tapís rodant a una intensitat de 12m/min i de 32 setmanes de durada genera un augment en les conductes d'evitació en un test d'evitació activa en dos sentits (Lalanza et al., 2015). A més, una intervenció a una intensitat de 10m/min i de 17 mesos de durada també genera un efecte ansiolític augmentant el nombre d'entrades a la zona il·luminada en el test de la caixa de llum-foscor (Taguchi et al., 2022) D'altra banda, una intervenció a una intensitat de 15m/min de 4 setmanes de durada també augmenta el nombre d'entrades als braços oberts del laberint en creu elevat (Seo, 2018). Aquests resultats indiquen que l'exercici al tapís rodant és capaç d'induir un efecte ansiolític en diferents intensitats i diferents durades de les intervencions.

L'efecte ansiolític detectat al nostre estudi va ser de magnitud menor que en d'altres. Per controlar els efectes de la manipulació diària a la que es van sotmetre els animals dels grups d'exercici, els animals control també es van col·locar al tapís rodant, però a una intensitat de 0m/min. D'aquesta manera la manipulació va resultar igual en tots els grups. En els estudis de Seo, 2018 i Taguchi et al., 2022 no s'especifica si els grups control van ser exposats al tapís rodant i manipulats de forma semblant als grups d'exercici. La manipulació dels animals també està ben documentada com una intervenció que genera un efecte ansiolític (Costa et al., 2012; Ferre et al., 1995; Shafaghi et al., 2022), de manera que és possible que la diferència entre la magnitud de l'efecte ansiolític de l'exercici entre diferents estudis sigui conseqüència de la metodologia emprada i de si els animals control es manipulen de forma semblant als animals amb exercici. En un estudi anterior del nostre grup d'investigació (Lalanza et al., 2012) es va dur a terme una comparació entre un grup d'animals exercitats al tapís rodant, un grup control exposat al tapís rodant a una intensitat de 0m/min, i un grup sedentari no exposat al tapís rodant. Amb aquest disseny és possible separar els efectes de l'exposició al tapís rodant dels efectes propis de l'exercici i d'aquesta manera es va poder concloure que en el test del laberint en creu elevat l'efecte ansiolític prové principalment de l'exposició al tapís rodant.

Un altre resultat important obtingut amb els animals sotmesos al tapís rodant és una disminució de la conducta apetitiva. Aquest resultat pot estar relacionat amb els efectes que presenta l'exercici sobre el sistema de recompensa corticomesolímbic. Varis estudis recents han detectat un augment en l'expressió de receptors dopaminèrgics en el NA en resposta a l'exercici. En un estudi una

intervenció al tapís rodant de baixa intensitat (10m/min durant 20 minuts, 3 dies a la setmana durant 3 setmanes) va generar un augment del receptor D2 al NA (Sadat-Shirazi et al., 2022), mentre que en un altre estudi en que es va dur a terme una intervenció d'intensitat major d'exercici físic (natació forçada durant 1h diària, 5 dies a la setmana durant 5 setmanes), es va descriure un augment tant del receptor D1 com de D2 (Rosa et al., 2020).

En altres estudis també s'ha detectat un efecte protector de l'exercici físic sobre el poder reforçant de les drogues d'abús. Per exemple, una intervenció de 8 setmanes amb exercici voluntari en rodes d'activitat genera una disminució en el poder reforçant de la cocaïna, de manera que els animals sedentaris realitzen esforços majors per obtenir la droga que els animals exercitats (M. A. Smith et al., 2008). En un altre estudi amb ratolins sotmesos al tapís rodant (10m/min, 1h diària, 5 dies a la setmana), els animals exercitats van presentar una disminució en la preferència condicionada per lloc induïda per un derivat de l'amfetamina, el MDMA exercici-dependent, de manera que com més setmanes va durar la intervenció, menys preferència van demostrar els animals (H. I. Chen et al., 2008). El consum de sucrosa en rates induïx una activació al sistema de recompensa corticomesolímbic semblant a l'activació induïda per les drogues d'abús (Avena et al., 2008). Per exemple, s'ha descrit que la ingesta de sucrosa induïx un marcat augment en l'alliberació de dopamina al NA de les rates (Hajnal & Norgren, 2001). Així, l'exercici podria actuar sobre la ingesta de sucrosa de forma semblant a com ho fa sobre l'efecte reforçant de les drogues d'abús, de manera que generaria una disminució en el consum.

Cal destacar que aquest efecte de l'exercici es va detectar de forma més marcada en femelles que en mascles. Aquesta diferència entre sexes es podria atribuir parcialment al fet que les femelles realitzen l'exercici millor que els mascles i s'han entrenat a intensitats més altes (Foright et al., 2020). Al ser millors corredores les femelles que els mascles és possible que els efectes de l'exercici també es vegin de forma més robusta. Una altra possible explicació és que les femelles són més susceptibles a l'efecte reforçant de la ingesta d'aliments saborosos (Sinclair et al., 2017) i presenten ingestes majors en el test de preferència que els mascles.

4.4. L'estudi cognitiu de les intervencions sobre reconeixement d'objectes

Un altre efecte remarcable de l'exercici és la millora de la capacitat de reconeixement d'objectes en les femelles CAF i CAFR, però no en les STD. En femelles CAF i CAFR exercitades vam detectar un índex de novetat major que en els animals control amb un temps d'exploració dels objectes menor en la fase de familiarització. És a dir, les femelles CAF i CAFR amb exercici van necessitar menys temps d'exploració dels objectes mostra per identificar correctament l'objecte nou del test. En altres treballs en que s'ha analitzat l'efecte de l'exercici sobre la memòria de reconeixement d'objectes com a teràpia per revertir un dèficit cognitiu induït, un resultat comú a varis estudis és un efecte de l'exercici visible només en el grup experimental. Per exemple, un exercici intens al tapís rodant (20m/min durant 60 minuts, 5 dies a la setmana durant 8 setmanes) reverteix els efectes negatius sobre el reconeixement d'objectes provocats per la neuroinflamació induïda a través de l'administració repetida de lipopolisacàrid bacterià, sense generar efectes notables en els animals control (Sohroforouzani et al., 2022). De forma semblant, un exercici de natació forçada (30 minuts diaris, 5 dies a la setmana durant 4 setmanes) reverteix els efectes sobre la memòria de reconeixement d'objectes en un model animal d'Alzheimer induït a través d'una administració intrecerebroventricular de estreptozotomicina, també sense generar efectes notables en els animals control (Bashiri et al., 2020). Tenint en compte aquests resultats i els obtinguts en el nostre estudi, sembla que l'exercici no genera un efecte en la memòria de reconeixement en animals sans.

Una cerca bibliogràfica sobre els efectes de la dieta de cafeteria en la memòria de reconeixement d'objectes indica que aquesta conducta s'ha avaluat majoritàriament en mascles (Feijó et al., 2019; Ferreira et al., 2018; Kendig et al., 2019; Lewis et al., 2019), fins al punt que el nostre és possiblement el primer estudi en determinar la memòria de reconeixement en femelles CAF. En estudis en que s'indueix l'obesitat a través d'altres dietes sí que s'han fet comparacions directes entre mascles i femelles. Per exemple en Mezo-González et al., (2022) s'indica que hi ha diferències notables entre sexes en els efectes de l'OID sobre la memòria de reconeixement d'objectes, de manera que les femelles no presenten una afectació notable sobre aquesta conducta, però en els mascles està profundament afectada i no retenen la memòria de l'objecte conegut. Una revisió recent va concloure que les femelles presenten una capacitat marginalment major en la tasca de reconeixement

d'objectes que els mascles (Becegado & Sila, 2022). És factible que aquesta capacitat major protegeixi a les femelles dels efectes negatius de l'OID.

Una de les estructures clau del SNC encarregada del reconeixement d'objectes és el còrtex perirrinal (Warburton & Brown, 2015b). Lesions en aquesta estructura provoquen impediments severos en aquest test (Mumby et al., 2007; Mumby & Pinel, 1994) i aquests dèficits són detectables a partir d'un període de retenció de 5 minuts (Norman & Eacott, 2004), que és el que hem utilitzat en el nostre estudi. El BDNF es un factor implicat en el desenvolupament neuronal i la plasticitat sinàptica (Driscoll et al., 2012) i s'ha establert una relació positiva entre l'expressió de BDNF al còrtex perirrinal i la capacitat de reconeixement d'objectes (Callaghan & Kelly, 2012). En un experiment dut a terme amb rates de la soca Long-Evans mascles i femelles en que es va administrar una dieta alta en grasses durant 4 setmanes es va analitzar l'expressió gènica de BDNF a l'hipotàlem ventromedial i aquesta intervenció va generar una disminució de l'expressió gènica de BDNF en mascles però no en femelles (X. Liu et al., 2014). Així, si un efecte semblant de disminució d'expressió de BDNF es dona al còrtex perirrinal, podria explicar en part la resistència de les femelles als efectes negatius sobre el reconeixement d'objectes de l'OID. Varis estudis indiquen que l'exercici incrementa els nivells de BDNF en femelles. Una intervenció al tapis rodant (12m/min, 30 minuts, 5 dies per setmana durant 12 setmanes) va augmentar els nivells de BDNF a l'hipocamp en femelles però no en mascles (Naghbi et al., 2021). D'altra banda, l'exercici voluntari en rodes d'activitat genera en mascles un augment del BDNF al còrtex perirrhinal acompanyat d'una millora en la tasca de reconeixement d'objectes (Hopkins & Bucci, 2010). Si aquest augment en BDNF es dona també en femelles podria proporcionar una explicació a la millora observada en el nostre estudi.

5. Conclusions

1. La dieta CAF ha generat en rates Long Evans mascle i femella un fenotip obès amb alteracions pròpies de la síndrome metabòlica (major pes corporal, major circumferència abdominal, major adipositat, hiperglucèmia, hipertrigliceridèmia i major resistència a la insulina); aquestes alteracions són més importants en femelles que en mascles.

2. L'obesitat induïda per dieta CAF ha disminuït en mascles l'activitat locomotora al test d'actimetria, el consum de solució de sucrosa en el test de preferència, i la conducta hedònica en el test de reactivitat al gust dolç. En femelles l'obesitat induïda per la dieta ha disminuït el consum de solució de sucrosa en el test de preferència.

3. La intervenció amb la dieta CAFR en els mascles reverteix parcialment els efectes de la dieta CAF en disminuir el perímetre abdominal i l'adipositat abdominal i total.

4. La intervenció amb la dieta CAFR en els femelles reverteix parcialment els efectes de la dieta CAF en disminuir el guany de pes corporal i l'índex adipositat, i millorant els índex de glucèmia, trigliceridèmia, insulinèmia, resistència a la insulina i leptinèmia en femelles.

5. Les intervencions tant amb la dieta CAF com CAFR en mascles disminueixen els nivells basals de corticosterona al llarg de tot el cicle circadiari, mentre no tenen cap efecte sobre la resposta de l'eix HPA a l'exposició a la novetat, ni sobre els nivells de corticosterona en pèl.

6. A la taula de forats, la dieta CAFR ha revertit parcialment els efectes de la dieta CAF en activitat exploratòria en mascles, generant una disminució en conducta exploratòria.

7. La intervenció amb la dieta CAFR en femelles reverteix parcialment els efectes de la dieta CAF augmentant el consum de solució de sucrosa en el test de preferència, la conducta consumatòria i la palatabilitat percebuda en el test d'accès curt.

8. L'exercici al tapís rodant en els mascles CAF genera un augment en leptinèmia i augmenta la conducta exploratòria a la taula de forats.

9. L'exercici al tapís rodant en femelles CAF genera una disminució en el consum de solució de sucrosa en el test de preferència.

10. Globalment, la intervenció dietètica amb la dieta CAFR ha sigut més efectiva a l'hora de revertir les alteracions associades a l'obesitat induïda amb dieta CAF en femelles que en mascles. L'exercici ha tingut de forma generalitzada un efecte modest en ambdós sexes.

6. Referències

- Abd Al Haleem, E. N., & El-Bakly, W. M. (2019). The role of MAPK signaling pathway in selenium amelioration of high fat/high cholesterol diet-induced tauopathy in rats. *Chemico-Biological Interactions*, *302*(1), 108–116.
- Abdalla, M. M. I., Azzani, M., Atroosh, W., Anbazhagan, D., & Kumarasamy, V. (2022). The association between mental health and obesity in postmenopausal women: A systematic review. *Endocrine Regulations*, *56*(4), 295–310.
- Abell, J. G., Stalder, T., Ferrie, J. E., Shipley, M. J., Kirschbaum, C., Kivimäki, M., & Kumari, M. (2016). Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*, *73*, 148–156.
- Abildgaard, A., Solskov, L., Volke, V., Harvey, B. H., Lund, S., & Wegener, G. (2011). A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology*, *36*(5), 623–633.
- Abiri, B., Hosseinpanah, F., Banihashem, S., Madinehzad, S. A., & Valizadeh, M. (2022). Mental health and quality of life in different obesity phenotypes: a systematic review. In *Health and Quality of Life Outcomes* 20(63)
- Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (2005). Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B: Comparative and Physiological Psychology*, *58*(3–4), 218–233.
- Albert, D. J., Storlien, L. H., Albert, J. G., Mah, C. J., & Obesity, C. J. M. (1971). Obesity Following Disturbance of the Ventromedial Hypothalamus: A Comparison of Lesions, Lateral Cuts, and Anterior Cuts. *Physiology and Behavior*, *7*, 135-141.
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P. T., Loria, C. M., & Smith, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. In *Circulation* 20(16), 1640–1645.

- Alhassan, S., Kim, S., Bersamin, A., King, A. C., & Gardner, C. D. (2008). Dietary adherence and weight loss success among overweight women: Results from the A to Z weight loss study. *International Journal of Obesity*, 32(6), 985–991.
- Alvarez-Monell, A., Subias-Gusils, A., Mariné-Casadó, R., Boqué, N., Caimari, A., Solanas, M., & Escorihuela, R. M. (2022). Impact of Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Treadmill Exercise on Sweet Taste in Diet-Induced Obese Female and Male Rats. *Nutrients*, 15(1), 144.
- Alves, J. G., Gale, C. R., Mutrie, N., Correia, J. B., & Batty, G. D. (2009). A 6-month exercise intervention among inactive and overweight Favela-residing women in Brazil: The caranguejo exercise trial. *American Journal of Public Health*, 99(1), 76–80.
- Anderson, B. J., Rapp, D. N., Baek, D. H., McCloskey, D. P., Coburn-Litvak, P. S., & Robinson, J. K. (2000). Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behavior*, 70, 425-429.
- Ara Royo Vicente Rodríguez J Pérez Gómez C Dorado García JAL Calbet, I. G. (2003). Leptina y ejercicio físico. *Archivos de Medicina del Deporte*, 20(94) 135-142.
- Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N., & Lázaro-Masedo, S. (2016). Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25-64 años) 2014-2015: estudio ENPE. *Revista Espanola de Cardiologia*, 69(6), 579–587.
- Arika, W. M., Kibiti, C. M., Njagi, J. M., & Ngugi, M. P. (2019). Effects of DCM Leaf Extract of *Gnidia glauca* (Fresen) on Locomotor Activity, Anxiety, and Exploration-Like Behaviors in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Behavioural Neurology*, 2019(1)
- Armario, A. (2006). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: What can it Tell us About Stressors? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 5(5), 485–501.
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. In *Neurosci Biobehav Rev*, 32(1) 20-39.
- Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Hayes, J. E., Moskowitz, H. R., & Snyder, D. J. (2006). Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: Problems,

- solutions and new perspectives. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361(1471) 1137-1148. Royal Society.
- Bashiri, H., Enayati, M., Bashiri, A., & Salari, A. A. (2020). Swimming exercise improves cognitive and behavioral disorders in male NMRI mice with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology and Behavior*, 223, 113003.
- Bastard, J.-P., Ji Kim, M., Vidal, H., & Capeau, J. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance *European Cytokine Network*, 17(1), 4-12.
- Bechara, R. G., & Kelly, á M. (2013). Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural Brain Research*, 245, 96–100.
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 134–141.
- ben Ounis, O., Elloumi, M., ben Chiekh, I., Zbidi, A., Amri, M., Lac, G., & Tabka, Z. (2008). Effects of two-month physical-endurance and diet-restriction programmes on lipid profiles and insulin resistance in obese adolescent boys. *Diabetes and Metabolism*, 34(6), 595–600.
- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(2), 173–198.
- Berridge, K. C. (2009). Wanting and liking: Observations from the neuroscience and psychology laboratory. *Inquiry*, 52(4), 378–398.
- Bertino, M., Beauchamp, G. K., & Engeiman, K. (1982). Long term reduction in dietary sodium alters the taste of salt 3. In *The American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 36).
- Blüher, M. (2020). Metabolically healthy obesity. In *Endocrine Reviews* (Vol. 41, Issue 3, pp. 405–420). Endocrine Society.
- Bouassida, A., Chamari, K., Zaouali, M., Feki, Y., Zbidi, A., & Tabka, Z. (2010). Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. In *British Journal of Sports Medicine*, 44(9), 620-630.

- Bouassida, A., Zalleg, D., Bouassida, S., Zaouali, M., Feki, Y., Zbidi, A., & Tabka, Z. (2006). Leptin, its implications in physical exercise and training: a short review, *Journal of Sports Science and Medicine*, 5, 172-181
- Bowe, J. E., Franklin, Z. J., Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Persaud, S. J., & Jones, P. M. (2014). Assessing glucose homeostasis in rodent models. *Journal of Endocrinology*, 222(3), 13–25.
- Bray, G. A., Ryan, D. H., Johnson, W., Champagne, C. M., Johnson, C. M., Rood, J., Williamson, D. A., & Sacks, F. M. (2017). Markers of dietary protein intake are associated with successful weight loss in the POUNDS Lost trial. *Clinical Obesity*, 7(3), 166–175.
- Brinkworth, G. D., Buckley, J. D., Noakes, M., Clifton, P. M., & Wilson, C. J. (2009). Long-term Effects of a Very Low-Carbohydrate Diet and a Low-Fat Diet on Mood and Cognitive Function. *Archives of Internal Medicine*, 169(20), 1873-1880.
- Brinkworth, G. D., Luscombe-Marsh, N. D., Thompson, C. H., Noakes, M., Buckley, J. D., Wittert, G., & Wilson, C. J. (2016). Long-term effects of very low-carbohydrate and high-carbohydrate weight-loss diets on psychological health in obese adults with type 2 diabetes: randomized controlled trial. *Journal of Internal Medicine*, 280(4), 388–397.
- Brinkworth, G. D., Noakes, M., Buckley, J. D., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2009). Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 23–32.
- Bueno, N. B., de Melo, I. S. V., de Oliveira, S. L., & da Rocha Ataíde, T. (2013). Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: A meta-analysis of Randomised controlled trials. In *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1178-1187.
- Bulmus, O., Ercan, Z., Kacar, E., Serhatlioglu, I., Yasar, A., & Kelestimur, H. (2022). Treadmill exercise training improves the high-fat diet-induced behavioral changes in the male rats. *Biologia Futura*, 73(4), 483–493.
- Caimari, A., del Bas, J. M., Boqué, N., Crescenti, A., Puiggròs, F., Chenoll, E., Martorell, P., Ramón, D., Genovés, S., & Arola, L. (2017). Heat-killed *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CECT 8145 increases lean mass and ameliorates metabolic syndrome in cafeteria-fed obese rats. *Journal of Functional Foods*, 38, 251–263.

- Callaghan, C. K., & Kelly, Á. M. (2012). Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus*, *22*(11), 2127–2135.
- Campos-Nonato, I., Hernandez, L., & Barquera, S. (2017). Effect of a High-Protein Diet versus Standard-Protein Diet on Weight Loss and Biomarkers of Metabolic Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *Obesity Facts*, *10*(3), 238–251.
- Carey, M., Small, H., Yoong, S. L., Boyes, A., Bisquera, A., & Sanson-Fisher, R. (2014). Prevalence of comorbid depression and obesity in general practice: A cross-sectional survey. *British Journal of General Practice*, *64*(620).
- Carlin, J., Hill-Smith, T. E., Lucki, I., & Reyes, T. M. (2013). Reversal of dopamine system dysfunction in response to high-fat diet. *Obesity*, *21*(12), 2513–2521.
- Carvalho, F. M. C., Lima, V. C. O., Costa, I. S., Medeiros, A. F., Serquiz, A. C., Lima, M. C. J. S., Serquiz, R. P., Maciel, B. L. L., Uchôa, A. F., Santos, E. A., & Morais, A. H. A. (2016). A trypsin inhibitor from tamarind reduces food intake and improves inflammatory status in rats with metabolic syndrome regardless of weight loss. *Nutrients*, *8*(10).
- Castro, D. C., & Berridge, K. C. (2014). Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: Mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness “liking” and “wanting.” *Journal of Neuroscience*, *34*(12), 4239–4250.
- Champaneri, S., Xu, X., Carnethon, M. R., Bertoni, A. G., Seeman, T., DeSantis, A. S., Roux, A. D., Shrager, S., & Golden, S. H. (2013). Diurnal salivary cortisol is associated with body mass index and waist circumference: The multiethnic study of atherosclerosis. *Obesity*, *21*(1), E56–E63.
- Cheke, L. G., Simons, J. S., & Clayton, N. S. (2016). Higher body mass index is associated with episodic memory deficits in young adults. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, *69*(11), 2305–2316.
- Chen, G., Koyama, K., Yuan, X., Lee, Y., Zhou, Y., Newgard, C. B., & Unger, R. H. (1996). Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. In *Medical Sciences*, *93*, 14795-14799.

- Chen, H. I., Kuo, Y. M., Liao, C. H., Jen, C. J., Huang, A. M., Cherng, C. G., Su, S. W., & Yu, L. (2008). Long-term compulsive exercise reduces the rewarding efficacy of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Behavioural Brain Research, 187*(1), 185–189.
- Chen, W., Li, J., Liu, J., Wang, D., & Hou, L. (2019). Aerobic Exercise Improves Food Reward Systems in Obese Rats via Insulin Signaling Regulation of Dopamine Levels in the Nucleus Accumbens. *ACS Chemical Neuroscience, 10*(6), 2801–2808.
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental, 92*, 6–10.
- Cigarroa, I., Lanza, J. F., Caimari, A., del Bas, J. M., Capdevila, L., Arola, L., & Escorihuela, R. M. (2016). Treadmill intervention attenuates the cafeteria diet-induced impairment of stress-coping strategies in young adult female rats. *PLoS ONE, 11*(4).
- Clark, L., & Zack, M. (2023). Engineered highs: Reward variability and frequency as potential prerequisites of behavioural addiction. *Addictive Behaviors, 140*, 107626.
- Clegg, D. J., Benoit, S. C., Reed, J. A., Woods, S. C., Dunn-Meynell, A., & Levin, B. E. (2005). Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 288*, 981–986.
- Cornsweet, T. N. (1962). The Staircase-Method in Psychophysics. In *Source: The American Journal of Psychology, 75*(3), 485-491.
- Costa, R., Tamascia, M. L., Nogueira, M. D., Casarini, D. E., & Marcondes, F. K. (2012). Handling of Adolescent Rats Improves Learning and Memory and Decreases Anxiety. In *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 51*(5), 548-553.
- Cournot, M., Marquié, J. C., Ansiau, D., Martinaud, C., Fonds, H., Ferrières, J., & Ruidavets, J. B. (2006). Relation between body mass index and cognitive function in healthy middle-aged men and women. *Neurology, 67*(7), 1208–1214.
- da Costa Estrela, D., da Silva, W. A. M., Guimarães, A. T. B., de Oliveira Mendes, B., da Silva Castro, A. L., da Silva Torres, I. L., & Malafaia, G. (2015). Predictive behaviors for anxiety and depression in female

- Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiology and Behavior*, 151, 252–263.
- Dalle Grave, R., Calugi, S., Gavasso, I., el Ghoch, M., & Marchesini, G. (2013). A randomized trial of energy-restricted high-protein versus high-carbohydrate, low-fat diet in morbid obesity. *Obesity*, 21(9), 1774–1781.
- Dallman, M. F. (2010). Stress-induced obesity and the emotional nervous system. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(3), 159–165.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., & La Fleur, S. E. (2005). Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. In *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(4), 275–280. Academic Press Inc.
- de Queiroz, K. B., Guimarães, J. B., Coimbra, C. C., Rodovalho, G. V., Carneiro, C. M., Evangelista, E. A., & Guerra-Sá, R. (2014). Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids*, 49(1), 85–96.
- de Vrind, V. A. J., van 't Sant, L. J., Rozeboom, A., Luijendijk-Berg, M. C. M., Omrani, A., & Adan, R. A. H. (2021). Leptin Receptor Expressing Neurons in the Substantia Nigra Regulate Locomotion, and in The Ventral Tegmental Area Motivation and Feeding. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 680494.
- Del Corral, P., Chandler-Laney, P. C., Casazza, K., Gower, B. A., & Hunter, G. R. (2009). Effect of dietary adherence with or without exercise on weight loss: A mechanistic approach to a global problem. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1602–1607.
- Derkach, K. v., Ivantsov, A. O., Chistyakova, O. v., Sukhov, I. B., Buzanakov, D. M., Kulikova, A. A., & Shpakov, A. O. (2017). Intranasal Insulin Restores Metabolic Parameters and Insulin Sensitivity in Rats with Metabolic Syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(2), 184–189.
- Dockray, G. J. (2009). Cholecystokinin and gut-brain signalling. In *Regulatory Peptides*, 155(1-3), 6-10.
- Doghri, Y., Chetaneau, F., Rhimi, M., Kriaa, A., Lalanne, V., Thorin, C., Maguin, E., Yassine Mallem, M., & Desfontis, J. C. (2019). Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome. *PLoS ONE*, 14(11). ç

- Donnelly, J. E., Blair, S. N., Jakicic, J. M., Manore, M. M., Rankin, J. W., & Smith, B. K. (2009). Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. In *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(2), 459-471.
- Driscoll, I., Martin, B., An, Y., Maudsley, S., Ferrucci, L., Mattson, M. P., & Resnick, S. M. (2012). Plasma BDNF is associated with age-related white matter atrophy but not with cognitive function in older, non-demented adults. *PLoS ONE*, 7(4).
- Eckel, L. A., & Moore, S. R. (2004). Diet-induced hyperphagia in the rat is influenced by sex and exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, 1080–1085.
- Ein, N., Armstrong, B., & Vickers, K. (2019). The effect of a very low calorie diet on subjective depressive symptoms and anxiety: meta-analysis and systematic review. In *International Journal of Obesity* (Vol. 43, Issue 7, pp. 1444–1455). Nature Publishing Group.
- Espeland, M. A., Carmichael, O., Hayden, K., Neiberg, R. H., Newman, A. B., Keller, J. N., Wadden, T. A., Rapp, S. R., Hill, J. O., Horton, E. S., Johnson, K. C., Wagenknecht, L., & Wing, R. R. (2018). Long-term Impact of Weight Loss Intervention on Changes in Cognitive Function: Exploratory Analyses from the Action for Health in Diabetes Randomized Controlled Clinical Trial. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(4), 484–491.
- Espinosa-García, C., Fuentes-Venado, C. E., Guerra-Araiza, C., Segura-Uribe, J., Chávez-Gutiérrez, E., Farfán-García, E. D., Estrada Cruz, N. A., & Pinto-Almazán, R. (2020). Sex differences in the performance of cognitive tasks in a murine model of metabolic syndrome. *European Journal of Neuroscience*, 52(1), 2724–2736.
- Fam, J., Clemens, K. J., Westbrook, R. F., Morris, M. J., & Kendig, M. D. (2022). Chronic exposure to cafeteria-style diet in rats alters sweet taste preference and reduces motivation for, but not 'liking' of sucrose. *Appetite*, 168(June 2021), 105742.
- Feijó, G. dos S., de Oliveira, S., Thoen, R., Schaab, E. E., de Moura, A. C., Franco, F., Giovenardi, M., Porowski, M., & Guedes, R. P. (2019). Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity. *Neurochemical Research*, 44(8), 1869–1877.

- Feng, R., Wang, L., Li, Z., Yang, R., Liang, Y., Sun, Y., Yu, Q., Gharthey-Kwansah, G., Sun, Y., Wu, Y., Zhang, W., Zhou, X., Xu, M., Bryant, J., Yan, G., Isaacs, W., Ma, J., & Xu, X. (2019). A systematic comparison of exercise training protocols on animal models of cardiovascular capacity. In *Life Sciences*, 217, 128–140. Elsevier Inc.
- Ferguson, R. D., Gallagher, E. J., Scheinman, E. J., Damouni, R., & LeRoith, D. (2013). The epidemiology and molecular mechanisms linking obesity, diabetes, and cancer. In *Vitamins and Hormones*, 93, 51–98. Academic Press Inc.
- Fernández-Gayol, O., Sanchis, P., Aguilar, K., Navarro-Sempere, A., Comes, G., Molinero, A., Giralt, M., & Hidalgo, J. (2019). Different responses to a high-fat diet in IL-6 conditional knock-out mice driven by 1 constitutive GFAP-Cre and Synapsin 1-Cre expression. *Neuroendocrinology*
- Ferre, P., Francisco, J., Ferrfi, P., Nunez, J. F., Garcfa, E., Tobena, A., Escorihuela, R. M., & Fernandez-Teruel, A. (1995). Postnatal Handling Reduces Anxiety as Measured by Emotionality Rating and Hyponeophagia Tests in Female Rats. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51(2-3), 199-203.
- Ferreira, A., Castro, J. P., Andrade, J. P., Dulce Madeira, M., & Cardoso, A. (2018). Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 197–207.
- Firth, J., Marx, W., Dash, S., Carney, R., Teasdale, S. B., Solmi, M., Stubbs, B., Schuch, F. B., Carvalho, A. F., Jacka, F., & Sarris, J. (2019). The Effects of Dietary Improvement on Symptoms of Depression and Anxiety: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Psychosomatic Medicine*, 81(3), 265–280.
- Foright, R. M., Johnson, G. C., Kahn, D., Charleston, C. A., Presby, D. M., Bouchet, C. A., Wellberg, E. A., Sherk, V. D., Jackman, M. R., Greenwood, B. N., & MacLean, P. S. (2020). Compensatory eating behaviors in male and female rats in response to exercise training. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 319(2), R171–R183.
- Fulton, S., Décarie-Spain, L., Fioramonti, X., Guiard, B., & Nakajima, S. (2022). The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 33(1), 18-35. Elsevier Inc.

- Gallardo-Gómez, D., del Pozo-Cruz, J., Noetel, M., Álvarez-Barbosa, F., Alfonso-Rosa, R. M., & del Pozo Cruz, B. (2022). Optimal dose and type of exercise to improve cognitive function in older adults: A systematic review and bayesian model-based network meta-analysis of RCTs. In *Ageing Research Reviews*, 76, 101591. Elsevier Ireland Ltd.
- García-Díaz, D. F., Champion, J., Milagro, F. I., Lomba, A., Marzo, F., & Martínez, J. A. (2007). Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. In *J. Physiol. Biochem*, 63(4) 337-346
- Giovana Maciel Reis, C., Rocha-Gomes, A., Escobar Teixeira, A., Gomes de Oliveira, D., Mainy Oliveira Santiago, C., Alves da Silva, A., Regina Riul, T., & de Jesus Oliveira, E. (2023). Short-term Cafeteria Diet Is Associated with Fat Mass Accumulation, Systemic and Amygdala Inflammation, and Anxiety-like Behavior in Adult Male Wistar Rats. *Neuroscience*.
- Gomez-Smith, M., Karthikeyan, S., Jeffers, M. S., Janik, R., Thomason, L. A., Stefanovic, B., & Corbett, D. (2016). A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology and Behavior*, 167, 382–391.
- Gopalan, V., Yaligar, J., Michael, N., Kaur, K., Anantharaj, R., Verma, S. K., Sadananthan, S. A., Le, G. T. T., Goh, J., & Velan, S. S. (2021). A 12-week aerobic exercise intervention results in improved metabolic function and lower adipose tissue and ectopic fat in high-fat diet fed rats. *Bioscience Reports*, 41(1).
- Grayson, B. E., Fitzgerald, M. F., Hakala-Finch, A. P., Ferris, V. M., Begg, D. P., Tong, J., Woods, S. C., Seeley, R. J., Davidson, T. L., & Benoit, S. C. (2014). Improvements in hippocampal-dependent memory and microglial infiltration with calorie restriction and gastric bypass surgery, but not with vertical sleeve gastrectomy. *International Journal of Obesity*, 38(3), 349–356.
- Green, B. G., Dalton, P., Cowart, B., Shaffer, G., Rankin, K., & Higgins, J. (1996). Evaluating the “Labeled Magnitude Scale” for Measuring Sensations of Taste and Smell. In *Chem. Senses* (Vol. 21).
- Greenwood, B. N., Spence, K. G., Crevling, D. M., Clark, P. J., Craig, W. C., & Fleshner, M. (2013). Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 37(3), 469–478.

- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*, 29, 415–445.
- Groesz, L. M., McCoy, S., Carl, J., Saslow, L., Stewart, J., Adler, N., Laraia, B., & Epel, E. (2012). What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite*, 58(2), 717–721.
- Gual-Grau, A., Guirro, M., Mayneris-Perxachs, J., Arola, L., & Boqué, N. (2019). Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 71, 122–131.
- Guerra-Cantera, S., Frago, L. M., Collado-Pérez, R., Canelles, S., Ros, P., Freire-Regatillo, A., Jiménez-Hernaiz, M., Barrios, V., Argente, J., & Chowen, J. A. (2021). Sex Differences in Metabolic Recuperation After Weight Loss in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *Frontiers in Endocrinology*, 12(December), 1–16.
- Gunstad, J., Lhotsky, A., Wendell, C. R., Ferrucci, L., & Zonderman, A. B. (2010). Longitudinal examination of obesity and cognitive function: Results from the baltimore longitudinal study of aging. *Neuroepidemiology*, 34(4), 222–229.
- Gutierrez, R., Fonseca, E., & Simon, S. A. (2020). The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 18). Springer International Publishing.
- Guxens, M., Mendez, M. A., Julvez, J., Plana, E., Forns, J., Basagaña, X., Torrent, M., & Sunyer, J. (2009). Cognitive function and overweight in preschool children. *American Journal of Epidemiology*, 170(4), 438–446.
- Hajnal, A., & Norgren, R. (2001). Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. In *Brain Research* (Vol. 904).
- Hall, K. D., Guo, J., Dore, M., & Chow, C. C. (2009). The progressive increase of food waste in America and its environmental impact. *PLoS ONE*, 4(11).
- Halyburton, A. K., Brinkworth, G. D., Wilson, C. J., Noakes, M., Buckley, J. D., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2007). Low-and high-carbohydrate weight-loss diets have similar effects on mood but not cognitive performance. In *Am J Clin Nutr* (Vol. 86).

- Han, T. S., & Lean, M. E. J. (2015). Metabolic syndrome. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 43, Issue 2, pp. 80–87). Elsevier Ltd.
- Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. (2017). *New England Journal of Medicine*, 377(1), 13–27.
- Heffron, S. P., Parham, J. S., Pendse, J., & Alemán, J. O. (2021). Treatment of obesity in mitigating metabolic risk. *Circulation Research*, 126(11), 1646–1665.
- Heinze, J. M., Costanzo, A., Baselier, I., Fritsche, A., Frank-Podlech, S., & Keast, R. (2018). Detection thresholds for four different fatty stimuli are associated with increased dietary intake of processed high-caloric food. *Appetite*, 123, 7–13.
- HHS. (2018). *Physical Activity Guidelines for Americans. 2 nd edition.*
- Ho, M., Garnett, S. P., Baur, L. A., Burrows, T., Stewart, L., Neve, M., & Collins, C. (2013). Impact of dietary and exercise interventions on weight change and metabolic outcomes in obese children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. In *JAMA Pediatrics*, 167(8) 759-768.
- Hoebel, B. G. (1965). Hypothalamic Lesions by Electrocauterization: Disinhibition of Feeding and Self-Stimulation. *Science*, 149, 452–453.
- Hopkins, M. E., & Bucci, D. J. (2010). BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 278–284.
- Horie, N. C., Serrao, V. T., Simon, S. S., Gascon, M. R. P., Dos Santos, A. X., Zambone, M. A., Del Bigio De Freitas, M. M., Cunha-Neto, E., Marques, E. L., Halpern, A., De Melo, M. E., Mancini, M. C., & Cercato, C. (2016). Cognitive effects of intentional weight loss in elderly obese individuals with mild cognitive impairment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(3), 1104–1112.
- Hu, M., Shi, Q., Sun, S., Hong, H. I., Zhang, H., Qi, F., Zou, L., & Nie, J. (2022). Effect of a Low-Carbohydrate Diet With or Without Exercise on Anxiety and Eating Behavior and Associated Changes in Cardiometabolic Health in Overweight Young Women. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- Hu, T., Mills, K. T., Yao, L., Demanelis, K., Eloustaz, M., Yancy, W. S., Kelly, T. N., He, J., & Bazzano, L. A. (2012). Effects of low-carbohydrate diets versus low-fat diets on metabolic risk factors: A meta-analysis of

- randomized controlled clinical trials. In *American Journal of Epidemiology* (Vol. 176, Issue SUPPL. 7).
- Hu, T., Yao, L., Reynolds, K., Niu, T., Li, S., Whelton, P. K., He, J., Steffen, L. M., & Bazzano, L. A. (2016). Adherence to low-carbohydrate and low-fat diets in relation to weight loss and cardiovascular risk factors. *Obesity Science and Practice*, 2(1), 24–31.
- Hwang, L. L., Wang, C. H., Li, T. L., Chang, S. D., Lin, L. C., Chen, C. P., Chen, C. T., Liang, K. C., Ho, I. K., Yang, W. S., & Chiou, L. C. (2010). Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity*, 18(3), 463–469.
- Incollingo Rodriguez, A. C., Epel, E. S., White, M. L., Standen, E. C., Seckl, J. R., & Tomiyama, A. J. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 301–318.
- Jacotte-Simancas, A., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Torras-Garcia, M., Borlongan, C. v., & Portell-Cortés, I. (2015). Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 32(10), 739–751.
- Jensen, M. D., Ryan, D. H., Apovian, C. M., Ard, J. D., Comuzzie, A. G., Donato, K. A., Hu, F. B., Hubbard, V. S., Jakicic, J. M., Kushner, R. F., Loria, C. M., Millen, B. E., Nonas, C. A., Pi-Sunyer, F. X., Stevens, J., Stevens, V. J., Wadden, T. A., Wolfe, B. M., & Yanovski, S. Z. (2014). 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the obesity society. In *Circulation* (Vol. 129, Issue 25 SUPPL. 1). Lippincott Williams and Wilkins.
- Jesudason, D., Nordin, B. E. C., Keogh, J., & Clifton, P. (2013). Comparison of 2 weight-loss diets of different protein content on bone health: A randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(5), 1343–1352.
- Jiang, Z., Rajamanickam, S., & Justice, N. J. (2019). CRF signaling between neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN)

- coordinates stress responses. In *Neurobiology of Stress* (Vol. 11). Elsevier Inc.
- Johnson, A. W. (2018). Characterizing ingestive behavior through licking microstructure: Underlying neurobiology and its use in the study of obesity in animal models. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 64, pp. 38–47). Elsevier Ltd.
- Jokela, M., Hamer, M., Singh-Manoux, A., Batty, G. D., & Kivimäki, M. (2014). Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: Pooled analysis of eight studies. *Molecular Psychiatry*, *19*(8), 910–914.
- Jones, R. A., Lawlor, E. R., Birch, J. M., Patel, M. I., Werneck, A. O., Hoare, E., Griffin, S. J., van Sluijs, E. M. F., Sharp, S. J., & Ahern, A. L. (2021). The impact of adult behavioural weight management interventions on mental health: A systematic review and meta-analysis. In *Obesity Reviews* (Vol. 22, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd.
- Judge, M. K., Zhang, J., Tü Mer, N., Carter, C., Daniels, M. J., & Scarpace, P. J. (2008). Prolonged hyperphagia with high-fat feeding contributes to exacerbated weight gain in rats with adult-onset obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *295*, 773–780.
- Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2010). Different Patterns of Memory Impairments Accompany Short- and Longer-Term Maintenance on a High-Energy Diet. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *36*(2), 313–319.
- Kaptan, Z., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Dedeakayoğullari, H., Batu, Ş., & Üzüm, G. (2015). Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; Hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain Research*, *1618*, 194–204.
- Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., & Ninomiya, Y. (2000). Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(20), 11044–11049.
- Kendig, M. D., Cheung, A. M. K., Raymond, J. S., & Corbit, L. H. (2016). Contexts paired with junk food impair goal-directed behavior in rats: Implications for decision making in obesogenic environments. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*(Nov).

- Kendig, M. D., Hasebe, K., McCague, R., Lee, F., Leigh, S. J., Arnold, R., & Morris, M. J. (2022). Adolescent exposure to a solid high-fat, high-sugar 'cafeteria' diet leads to more pronounced changes in metabolic measures and gut microbiome composition than liquid sugar in female rats. *Appetite*, 172.
- Kendig, M. D., Westbrook, R. F., & Morris, M. J. (2019). Pattern of access to cafeteria-style diet determines fat mass and degree of spatial memory impairments in rats. *Scientific Reports*, 9(1).
- Kessler, R. M., Hutson, P. H., Herman, B. K., & Potenza, M. N. (2016). The neurobiological basis of binge-eating disorder. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 63, pp. 223–238). Elsevier Ltd.
- Khalil, A. A., Frazier, S. K., Lennie, T. A., & Sawaya, B. P. (2011). Depressive symptoms and dietary adherence in patients with end-stage renal disease. *Journal of Renal Care*, 37(1), 30–39.
- Khanna, D., Khanna, S., Khanna, P., Kahar, P., & Patel, B. M. (2022). Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. *Cureus*.
- Khataei, T., Romig-Martin, S. A., Harding, A. M. S., Radley, J. J., & Benson, C. J. (2021). Comparison of murine behavioural and physiological responses after forced exercise by electrical shock versus manual prodding. *Experimental Physiology*, 106(4), 812–819.
- Khazen, T., Hatoum, O. A., Ferreira, G., & Maroun, M. (2019). Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. *Scientific Reports*, 9(1), 12270.
- King, B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. In *Physiology and Behavior* (Vol. 87, Issue 2, pp. 221–244). Elsevier Inc.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162.
- Knight, P., Chellian, R., Wilson, R., Behnood-Rod, A., Panunzio, S., & Bruijnzeel, A. W. (2021). Sex differences in the elevated plus-maze test

- and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 204.
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W., & Bass, J. (2007). High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism*, 6(5), 414–421.
- Kovács, K. J. (2013). CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 54, 25–33.
- Kraemer, R. R., Chu, H., & Daniel Castracane, V. (2002). Leptin and exercise. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 227, Issue 9, pp. 701–708). Society for Experimental Biology and Medicine.
- Kurhe, Y., Mahesh, R., & Devadoss, T. (2015). QCM-4, a 5-HT₃ receptor antagonist ameliorates plasma HPA axis hyperactivity, leptin resistance and brain oxidative stress in depression and anxiety-like behavior in obese mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 74–79.
- la Fleur, S. E., Houshyar, H., Roy, M., & Dallman, M. F. (2005). Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. *Endocrinology*, 146(5), 2193–2199.
- la Russa, D., Giordano, F., Marrone, A., Parafati, M., Janda, E., & Pellegrino, D. (2019). Oxidative imbalance and kidney damage in cafeteria diet-induced rat model of metabolic syndrome: Effect of bergamot polyphenolic fraction. *Antioxidants*, 8(3).
- Lanza, J. F., Caimari, A., Del Bas, J. M., Torregrosa, D., Cigarroa, I., Pallàs, M., Capdevila, L., Arola, L., & Escorihuela, R. M. (2014). Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: Metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS ONE*, 9(1).
- Lanza, J. F., Sanchez-Roige, S., Cigarroa, I., Gagliano, H., Fuentes, S., Armario, A., Capdevila, L., & Escorihuela, R. M. (2015). Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in Male and feMale rats. *Scientific Reports*, 5.
- Lanza, J. F., Sanchez-Roige, S., Gagliano, H., Fuentes, S., Bayod, S., Camins, A., Pallàs, M., Armario, A., & Escorihuela, R. M. (2012). Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology*, 37(11), 1745–1754.

- Lalanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 122(December 2020), 92–119.
- Lawless, H. T. (2010). A simple alternative analysis for threshold data determined by ascending forced-choice methods of limits. *Journal of Sensory Studies*, 25(3), 332–346.
- Leasure, J. L., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 156(3), 456–465.
- Lee, S. H., Zabolotny, J. M., Huang, H., Lee, H., & Kim, Y. B. (2016). Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. In *Molecular Metabolism* (Vol. 5, Issue 8, pp. 589–601). Elsevier GmbH.
- Leigh, S. J., Kaakoush, N. O., Escorihuela, R. M., Westbrook, R. F., & Morris, M. J. (2020). Treadmill exercise has minimal impact on obesogenic diet-related gut microbiome changes but alters adipose and hypothalamic gene expression in rats. *Nutrition and Metabolism*, 17(1).
- Levin, B. E. (1991). Spontaneous Motor Activity During the Development and Maintenance of Diet-Induced Obesity in the Rat. In *Physiology & Behavior* (Vol. 50). Pergamon Press plc.
- Levin, B. E., & Dunn-Meynell, A. A. (2002). Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283, 941–948.
- Levin, B. E., Triscari, J., Hogan, S., & Sullivan, A. C. (1987). Resistance to diet-induced obesity: food intake, pancreatic sympathetic tone, and insulin. *American Journal of Physiology*, 252(21), R471-R478.
- Lewis, A. R., Singh, S., & Youssef, F. F. (2019). Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. *Heliyon*, e01412.
- Lim, J., Wood, A., & Green, B. G. (2009). Derivation and evaluation of a labeled hedonic scale. *Chemical Senses*, 34(9), 739–751.
- Liu, D., Huang, Y., Huang, C., Yang, S., Wei, X., Zhang, P., Guo, D., Lin, J., Xu, B., Li, C., He, H., He, J., Liu, S., Shi, L., Xue, Y., & Zhang, H. (2022). Calorie Restriction with or without Time-Restricted Eating in Weight Loss. *New England Journal of Medicine*, 386(16), 1495–1504.

- Liu, M. Y., Yin, C. Y., Zhu, L. J., Zhu, X. H., Xu, C., Luo, C. X., Chen, H., Zhu, D. Y., & Zhou, Q. G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, *13*(7), 1686–1698.
- Liu, X., Zhu, Z., Kalyani, M., Janik, J. M., & Shi, H. (2014). Effects of energy status and diet on Bdnf expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. *Physiology and Behavior*, *130*, 99–107.
- Livingston, J. M., McDonald, M. W., Gagnon, T., Jeffers, M. S., Gomez-Smith, M., Antonescu, S., Cron, G. O., Boisvert, C., Lacoste, B., & Corbett, D. (2020). Influence of metabolic syndrome on cerebral perfusion and cognition. *Neurobiology of Disease*, *137*.
- Loprinzi, P. D., & Frith, E. (2018). Obesity and episodic memory function. In *Journal of Physiological Sciences* (Vol. 68, Issue 4, pp. 321–331). Springer Tokyo.
- Lord, M. N., Heo, J. W., Schifino, A. G., Hoffman, J. R., Donohue, K. N., Call, J. A., & Noble, E. E. (2021). Sexually dimorphic effects of a western diet on brain mitochondrial bioenergetics and neurocognitive function. *Nutrients*, *13*(12).
- Lozano-Cuenca, J., Valencia-Hernández, I., López-Canales, O. A., Flores-Herrera, H., López-Mayorga, R. M., Castillo-Henkel, E. F., & López-Canales, J. S. (2020). Possible mechanisms involved in the effect of the subchronic administration of rosuvastatin on endothelial function in rats with metabolic syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *53*(2).
- Lustig, R. H., Collier, D., Kassotis, C., Roepke, T. A., Kim, M. J., Blanc, E., Barouki, R., Bansal, A., Cave, M. C., Chatterjee, S., Choudhury, M., Gilbertson, M., Lagadic-Gossmann, D., Howard, S., Lind, L., Tomlinson, C. R., Vondracek, J., & Heindel, J. J. (2022). Obesity I: Overwiev and molecular and biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, *199*.
- Macera, C., Jones, D., Yore, M., Ham, S., Kohl, H., Kimsey, C., & Buchner, D. (2003). Prevalence of Physical Activity, Including Lifestyle Activities Among Adults-United States, 2000-2001. *MMWR : Morbidity and Mortality Weekly Report*, *52*(32), 764.
- Macht, V. A., Vazquez, M., Petyak, C. E., Grillo, C. A., Kaigler, K., Enos, R. T., McClellan, J. L., Cranford, T. L., Murphy, E. A., Nyland, J. F., Solomon, G., Gertler, A., Wilson, M. A., & Reagan, L. P. (2017). Leptin resistance

- elicits depressive-like behaviors in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *60*, 151–160.
- Maes, H. H. M., Neale, M. C., & Eaves¹, L. J. (1997). Genetic and Environmental Factors in Relative Body Weight and Human Adiposity. In *Behavior Genetics* (Vol. 27, Issue 4).
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R., Lee, G., ZHANG, Y., Lalwne, R., & Friedman, J. (1995). *Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.*
- Mansoor, N., Vinknes, K. J., Veierod, M. B., & Retterstol, K. (2016). Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and cardiovascular risk factors a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, *115*(3), 466–479.
- Maric, I., Krieger, J. P., van der Velden, P., Borchers, S., Asker, M., Vujicic, M., Wernstedt Asterholm, I., & Skibicka, K. P. (2022). Sex and Species Differences in the Development of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disturbances in Rodents. *Frontiers in Nutrition*, *9*(February), 1–14.
- Markus, R., Panhuysen, G., Tuiten, A., & Koppeschaar, H. (2000). Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. In *Physiology & Behavior* (Vol. 70).
- Martire, S. I., Maniam, J., South, T., Holmes, N., Westbrook, R. F., & Morris, M. J. (2014). Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behavioural Brain Research*, *265*, 132–141.
- Matafome, P., & Seiça, R. (2017). The role of brain in energy balance. In *Advances in Neurobiology* (Vol. 19, pp. 33–48). Springer New York LLC.
- May, C. E., & Dus, M. (2020). Confection Confusion: Interplay Between Diet, Taste, and Nutrition. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *32*(2), 95–105.
- Mayneris-Perxachs, J., Alcaide-Hidalgo, J. M., de la Hera, E., del Bas, J. M., Arola, L., & Caimari, A. (2019). Supplementation with biscuits enriched with hesperidin and naringenin is associated with an improvement of the Metabolic Syndrome induced by a cafeteria diet in rats. *Journal of Functional Foods*, *61*.

- Mccrickerd, K., & Forde, C. G. (2016). Sensory influences on food intake control: Moving beyond palatability. *Obesity Reviews*, 17(1), 18–29.
- McEvoy, C. T., Leng, Y., Peeters, G. M., Kaup, A. R., Allen, I. E., & Yaffe, K. (2019). Interventions involving a major dietary component improve cognitive function in cognitively healthy adults: a systematic review and meta-analysis. In *Nutrition Research* (Vol. 66, pp. 1–12). Elsevier Inc.
- McKay, N., Przybysz, J., Cavanaugh, A., Horvatits, E., Giorgianni, N., & Czajka, K. (2021). The effect of unhealthy food and liking on stress reactivity. *Physiology and Behavior*, 229(October 2020), 113216.
- Mezo-González, C. E., Daher Abdi, A., Reyes-Castro, L. A., Olvera Hernández, S., Almeida, C., Croyal, M., Aguesse, A., Gavioli, E. C., Zambrano, E., & Bolaños-Jiménez, F. (2022). Learning Deficits Induced by High-Calorie Feeding in the Rat are Associated With Impaired Brain Kynurenine Pathway Metabolism. *International Journal of Tryptophan Research*, 15.
- Mifune, H., Tajiri, Y., Nishi, Y., Hara, K., Iwata, S., Tokubuchi, I., Mitsuzono, R., Yamada, K., & Kojima, M. (2015). Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides*, 71, 49–55.
- Moradi, F., Heshmati, J., Daneshzad, E., Ahmadi, A., Jafari, T., Persad, E., & Fazelian, S. (2021). Association between dietary satisfaction and depression, anxiety and stress in obese and overweight patients during the coronavirus pandemic. *Clinical Nutrition ESPEN*, 45, 399–403.
- Moreno, B., Bellido, D., Sajoux, I., Goday, A., Saavedra, D., Crujeiras, A. B., & Casanueva, F. F. (2014). Comparison of a very low-calorie-ketogenic diet with a standard low-calorie diet in the treatment of obesity. *Endocrine*, 47(3), 793–805.
- Morris, D. L., & Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297, 1247–1259.
- Morris, M. J., Beilharz, J. E., Maniam, J., Reichelt, A. C., & Westbrook, R. F. (2015). Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 58, pp. 36–45). Elsevier Ltd.

- Morrison, C. D., Pistell, P. J., Ingram, D. K., Johnson, W. D., Liu, Y., Fernandez-Kim, S. O., White, C. L., Purpera, M. N., Uranga, R. M., Bruce-Keller, A. J., & Keller, J. N. (2010). High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: Implications for decreased Nrf2 signaling. *Journal of Neurochemistry*, *114*(6), 1581–1589.
- Mumby, D. G., & Pinel, J. P. J. (1994). Rhinal Cortex Lesions and Object Recognition in Rats. In *Behavioral Neuroscience* (Vol. 108, Issue 1).
- Mumby, D. G., Piterkin, P., Lecluse, V., & Lehmann, H. (2007). Perirhinal cortex damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Behavioural Brain Research*, *185*(2), 82–87.
- Münzberg, H., & Myers, M. G. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. In *Nature Neuroscience* (Vol. 8, Issue 5, pp. 566–570).
- Murtagh, E. M., Nichols, L., Mohammed, M. A., Holder, R., Nevill, A. M., & Murphy, M. H. (2015). The effect of walking on risk factors for cardiovascular disease: An updated systematic review and meta-analysis of randomised control trials. *Preventive Medicine*, *72*, 34–43.
- Muscogiuri, G., Barrea, L., Laudisio, D., Pugliese, G., Salzano, C., Savastano, S., & Colao, A. (2019). The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: A practical guide. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd.
- Myers, M. G., Leibel, R. L., Seeley, R. J., & Schwartz, M. W. (2010). Obesity and leptin resistance: Distinguishing cause from effect. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 21, Issue 11, pp. 643–651).
- Nadal-Casellas, A., Bauzá-Thorbrügge, M., Proenza, A. M., Gianotti, M., & Lladó, I. (2013). Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *373*(1–2), 125–135.
- Nadal-Casellas, A., Proenza, A. M., Lladó, I., & Gianotti, M. (2012). Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. *Biochemistry and Cell Biology*, *90*(2), 164–172.

- Naghibi, S., Shariatzadeh Joneydi, M., Barzegari, A., Davoodabadi, A., Ebrahimi, A., Eghdami, E., Fahimpour, N., Ghorbani, M., Mohammadikia, E., Rostami, M., & Salari, A. A. (2021). Treadmill exercise sex-dependently alters susceptibility to depression-like behaviour, cytokines and BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology and Behavior*, *241*.
- Nakamura, Y., Sanematsu, K., Ohta, R., Shirosaki, S., Koyano, K., Nonaka, K., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2008). Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes*, *57*(10), 2661–2665.
- Napoli, N., Shah, K., Waters, D. L., Sinacore, D. R., Qualls, C., & Villareal, D. T. (2014). Effect of weight loss, exercise, or both on cognition and quality of life in obese older adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, *100*(1), 189–198.
- Nasirinezhad, N. A., Zamaninur, N., Nik Azm, S. A., Hosseini, A., Naisirinezhad, F., & Reza Vera, M. (2022). The effect of Calorie Restriction and Intermittent Fasting on Impaired Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obesity Started Post-Weaning in Male Wistar Rat. *Medicine Journal Islam Republic Iran*, *36*(12).
- Ng, S. W., & Popkin, B. M. (2012). Time use and physical activity: A shift away from movement across the globe. *Obesity Reviews*, *13*(8), 659–680.
- Nilsson, C., Raun, K., Yan, F. F., Larsen, M. O., & Tang-Christensen, M. (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 33, Issue 2, pp. 173–181).
- Noland, R. C., Baker, J. T., Boudreau, S. R., Kobe, R. W., Tanner, C. J., Hickner, R. C., Mccammon, M. R., Houmard, J. A., Baker, J. T., Boudreau, S. R., Kobe, R. W., Tanner, C. J., Hickner, R. C., Mccammon, M. R., & Houmard, J. A. (2001). Effect of intense training on plasma leptin in male and female swimmers. In *Med. Sci. Sports Exerc* (Vol. 33, Issue 2).
- Ong, Z. Y., Wanasuria, A. F., Lin, M. Z. P., Hiscock, J., & Muhlhausler, B. S. (2013). Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite*, *65*, 189–199. h
- Palframan, K. M., & Myers, K. P. (2016). Modern “junk food” and minimally-processed “natural food” cafeteria diets alter the response to sweet

- taste but do not impair flavor-nutrient learning in rats. *Physiology and Behavior*, *157*, 146–157.
- Patterson, R. E., Laughlin, G. A., LaCroix, A. Z., Hartman, S. J., Natarajan, L., Senger, C. M., Martínez, M. E., Villaseñor, A., Sears, D. D., Marinac, C. R., & Gallo, L. C. (2015). Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *115*(8), 1203–1212.
- Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2016). Stress and Pediatric Obesity: Neurobiology and Behavior. *Family Relations*, *65*(1), 85–93.
- Peryam, D. R. (2017). The 9-point hedonic scale. *Documentation et Bibliothèques*, *63*(1), 21–31.
- Peven, J. C., Jakicic, J. M., Rogers, R. J., Lesnovskaya, A., Erickson, K. I., Kang, C., Zhou, X., Porter, A., Donofry, S. D., Watt, J. C., & Stillman, C. M. (2020). The effects of a 12-month weight loss intervention on cognitive outcomes in adults with overweight and obesity. *Nutrients*, *12*(10), 1–15.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. T., & Hess, J. F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics*, *13*, 18–19.
- Piché, M. E., Poirier, P., Lemieux, I., & Després, J. P. (2018). Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. In *Progress in Cardiovascular Diseases* (Vol. 61, Issue 2, pp. 103–113). W.B. Saunders.
- Pickering, C., Alsiö, J., Hulting, A. L., & Schiöth, H. B. (2009). Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar diet induces craving only in obesity-prone animals. *Psychopharmacology*, *204*(3), 431–443.
- Pistell, P. J., Morrison, C. D., Gupta, S., Knight, A. G., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Bruce-Keller, A. J. (2010). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, *219*(1–2), 25–32.
- Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F. I., Arola-Arnal, A., & Mugerza, B. (2016). Acute administration of single oral dose of grape seed polyphenols restores blood pressure in a rat model of metabolic syndrome: role of nitric oxide and prostacyclin. *European Journal of Nutrition*, *55*(2), 749–758.

- Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F. I., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2017). Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats. *British Journal of Nutrition*, *117*(2), 200–208.
- Pratchayasakul, W., Arunsak, B., Suparan, K., Sriwichaiin, S., Chunchai, T., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2022). Combined caloric restriction and exercise provides greater metabolic and neurocognitive benefits than either as a monotherapy in obesity with or without estrogen deprivation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *110*.
- Purnell, J. Q., Brandon, D. D., Isabelle, L. M., Loriaux, D. L., & Samuels, M. H. (2004). Association of 24-Hour Cortisol Production Rates, Cortisol-Binding Globulin, and Plasma-Free Cortisol Levels with Body Composition, Leptin Levels, and Aging in Adult Men and Women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(1), 281–287.
- Rajaie, S. H., Soltani, S., Yazdanpanah, Z., Zohrabi, T., Beigrezaei, S., Mohseni-Takaloo, S., Kaviani, M., Forbes, S. C., Baker, J. S., & Salehi-Abargouei, A. (2022). Effect of exercise as adjuvant to energy-restricted diets on quality of life and depression outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. In *Quality of Life Research* (Vol. 31, Issue 11, pp. 3123–3137). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Randeva, H. S., Karteris, E., Lewandowski, K. C., Sailesh, S., O’Hare, P., & Hillhouse, E. W. (2003). Circadian rhythmicity of salivary leptin in healthy subjects. *Molecular Genetics and Metabolism*, *78*(3), 229–235.
- Ranjit, N., Young, E. A., Raghunathan, T. E., & Kaplan, G. A. (2005). Modeling cortisol rhythms in a population-based study. *Psychoneuroendocrinology*, *30*(7), 615–624.
- Rask, E., Walker, B. R., So“derberg, S., So“derberg, S., Livingstone, D. E. W., Andrew, R., & Olsson, T. (2002). *Tissue-Specific Changes in Peripheral Cortisol Metabolism in Obese Women: Increased Adipose 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity*.
- Ribeiro, G., & Oliveira-Maia, A. J. (2021). Sweet taste and obesity. In *European Journal of Internal Medicine* (Vol. 92, pp. 3–10). Elsevier B.V.
- Rodin, J., Moskowitz, H. R., & Bray, G. A. (1976). Relationship Between Obesity, Weight Loss, and Taste Responsiveness’. In *Physiology & Behavior* (Vol. 17). Pergamon Press and Brain Research Publ.

- Rodrigues, M. O. M., Evangelista Silva, P. H., Neves, N. N., Moreno, L. G., Santos, C. S., Rocha, K. L. S., Ottone, V. O., Batista-da-Silva, B., Dias-Peixoto, M. F., Magalhães, F. C., & Esteves, E. A. (2020). Caloric restriction-induced weight loss with a high-fat diet does not fully recover visceral adipose tissue inflammation in previously obese C57BL/6 mice. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, *45*(12), 1353–1359.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? In *Nutrition and Diabetes* (Vol. 10, Issue 1). Springer Nature.
- Rojic-Becker, D., Portero-Tresserra, M., Martí-Nicolovius, M., Vale-Martínez, A., & Guillazo-Blanch, G. (2019). Caloric restriction modulates the monoaminergic and glutamatergic systems in the hippocampus, and attenuates age-dependent spatial memory decline. *Neurobiology of Learning and Memory*, *166*.
- Rojic-Becker, D., Portero-Tresserra, M., Martí-Nicolovius, M., Vale-Martínez, A., & Guillazo-Blanch, G. (2021). Effects of caloric restriction on monoaminergic neurotransmission, peripheral hormones, and olfactory memory in aged rats. *Behavioural Brain Research*, *409*.
- Romanelli, R., Cecchi, N., Carbone, M. G., Dinardo, M., Gaudino, G., Miraglia Del Giudice, E., & Umamo, G. R. (2020). Pediatric obesity: Prevention is better than care. In *Italian Journal of Pediatrics* (Vol. 46, Issue 1). BioMed Central.
- Rosa, H. Z., Segat, H. J., Barcelos, R. C. S., Roversi, K., Rossato, D. R., de Brum, G. F., & Burger, M. E. (2020). Involvement of the endogenous opioid system in the beneficial influence of physical exercise on amphetamine-induced addiction parameters. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *197*.
- Rosmond, R., Dallman, M. F., & Björntorp, B. (1998). Stress-Related Cortisol Secretion in Men: Relationships with Abdominal Obesity and Endocrine, Metabolic and Hemodynamic Abnormalities*. In *J Clin Endocrinol Metab* (Vol. 83).
- Sabag, A., Way, K. L., Keating, S. E., Sultana, R. N., O'Connor, H. T., Baker, M. K., Chuter, V. H., George, J., & Johnson, N. A. (2017). Exercise and ectopic fat in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. In

Diabetes and Metabolism (Vol. 43, Issue 3, pp. 195–210). Elsevier Masson SAS.

- Sack, M., Lenz, J. N., Jakovcevski, M., Biedermann, S. v., Falfán-Melgoza, C., Deussing, J., Bielohuby, M., Bidlingmaier, M., Pfister, F., Stalla, G. K., Sartorius, A., Gass, P., Weber-Fahr, W., Fuss, J., & Auer, M. K. (2017). Early effects of a high-caloric diet and physical exercise on brain volumetry and behavior: a combined MRI and histology study in mice. *Brain Imaging and Behavior*, *11*(5), 1385–1396.
- Sadat-Shirazi, M. S., Nouri Zadeh-Tehrani, S., Akbarabadi, A., Mokri, A., Taleb Zadeh Kasgari, B., & Zarrindast, M. R. (2022). Exercise can restore behavioural and molecular changes of intergenerational morphine effects. *Addiction Biology*, *27*(2).
- Sadeghian, M., Hosseini, S. A., Javid, A. Z., Kambiz, & Angali, A., & Mashkournia, A. (2021). *Effect of Fasting-Mimicking Diet or Continuous Energy Restriction on Weight Loss, Body Composition, and Appetite-Regulating Hormones Among Metabolically Healthy Women with Obesity: a Randomized Controlled, Parallel Trial*.
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. In *Current Hypertension Reports* (Vol. 20, Issue 2). Current Medicine Group LLC 1.
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*, *19*(6), 1109–1117.
- Sanders, L. M. J., Hortobágyi, T., Gemert, S. la B. van, Van Der Zee, E. A., & Van Heuvelen, M. J. G. (2019). Dose-response relationship between exercise and cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. In *PLoS ONE* (Vol. 14, Issue 1). Public Library of Science.
- Sanematsu, K., Nakamura, Y., Nomura, M., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2018). Diurnal variation of sweet taste recognition thresholds is absent in overweight and obese humans. *Nutrients*, *10*(3).
- Schemmel, R., Mickelsen, O., & Gill, A. L. (1970). Dietary Obesity in Rats: Body Weight and Body Fat Accretion in Seven Strains of Rats '. *The Journal of Nutrition*, *100*(9), 1041–1048.

- Schiepers, O. J. G., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 29, Issue 2, pp. 201–217). Elsevier Inc.
- Schoenfeld, B. J. (2010). THE MECHANISMS OF MUSCLE HYPERTROPHY AND THEIR APPLICATION TO RESISTANCE TRAINING. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(10), 2857–2872.
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1996). Hypothalamic Targets for Leptin Action Rapid Publication Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus. In *J. Clin. Invest* (Vol. 98, Issue 5).
- Sclafani, A., & Springer, D. (1976). Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology and Behavior*, 17(3), 461–471.
- Seidemann, S. B., Claggett, B., Cheng, S., Henglin, M., Shah, A., Steffen, L. M., Folsom, A. R., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Solomon, S. D. (2018). Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *The Lancet Public Health*, 3(9), e419–e428.
- Seimon, R. v., Wild-Taylor, A. L., McClintock, S., Harper, C., Gibson, A. A., Johnson, N. A., Fernando, H. A., Markovic, T. P., Center, J. R., Franklin, J., Liu, P. Y., Grieve, S. M., Lagopoulos, J., Caterson, I. D., Byrne, N. M., & Sainsbury, A. (2020). 3-Year effect of weight loss via severe versus moderate energy restriction on body composition among postmenopausal women with obesity - the TEMPO Diet Trial. *Heliyon*, 6(6).
- Seo, J. H. (2018). Treadmill exercise alleviates stress-induced anxiety-like behaviors in rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 14(5), 724–730.
- Shafaghi, A., Vakili Shahrabaki, S. S., Aminzadeh, A., Heidari, M. R., Shamsi Meymandi, M., & Bashiri, H. (2022). The effect of early handling on anxiety-like behaviors of rats exposed to valproic acid pre-and post-natally. *Neurotoxicology and Teratology*, 89.
- Sharma, S., & Fulton, S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International Journal of Obesity*, 37(3), 382–389.
- Shin, A. C., Townsend, R. L., Patterson, L. M., & Berthoud, H. R. (2011). “Liking” and “wanting” of sweet and oily food stimuli as affected by

high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 301(5).

- Shinoda, S., Nakamura, N., Roach, B., Bernlohr, D. A., Ikramuddin, S., & Yamamoto, M. (2022). Obesity and Pancreatic Cancer: Recent Progress in Epidemiology, Mechanisms and Bariatric Surgery. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 6). MDPI.
- Sieverdes, J. C., Sui, X., Lee, D. C., Church, T. S., McClain, A., Hand, G. A., & Blair, S. N. (2010). Physical activity, cardiorespiratory fitness and the incidence of type 2 diabetes in a prospective study of men. *British Journal of Sports Medicine*, 44(4), 238–244.
- Sinclair, E. B., Hildebrandt, B. A., Culbert, K. M., Klump, K. L., & Sisk, C. L. (2017). Preliminary evidence of sex differences in behavioral and neural responses to palatable food reward in rats. *Physiology and Behavior*, 176, 165–173.
- Small, L., Brandon, A. E., Turner, N., & Cooney, G. J. (2018). Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: What have high-fat and high-calorie diets revealed? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 314(3), E251–E265.
- Smith, E., Hay, P., Campbell, L., & Trollor, J. N. (2011). A review of the association between obesity and cognitive function across the lifespan: Implications for novel approaches to prevention and treatment. *Obesity Reviews*, 12(9), 740–755.
- Smith, G. P. (2001). John Davis and the meanings of licking. *Appetite*, 36(1), 84–92.
- Smith, M. A., Schmidt, K. T., Iordanou, J. C., & Mustroph, M. L. (2008). Aerobic exercise decreases the positive-reinforcing effects of cocaine. *Drug and Alcohol Dependence*, 98(1–2), 129–135.
- Sohroforouzani, A. M., Shakerian, S., Ghanbarzadeh, M., & Alaei, H. (2022). Effect of forced treadmill exercise on stimulation of BDNF expression, depression symptoms, tactile memory and working memory in LPS-treated rats. *Behavioural Brain Research*, 418.
- Soldevila-Domenech, N., Forcano, L., Vintró-Alcaraz, C., Cuenca-Royo, A., Pintó, X., Jiménez-Murcia, S., García-Gavilán, J. F., Nishi, S. K., Babio, N., Gomis-González, M., Corella, D., Sorlí, J. V., Fernandez-Carrión, R.,

- Martínez-González, M. Á., Marti, A., Salas-Salvadó, J., Castañer, O., Fernández-Aranda, F., & Torre, R. de la. (2021). Interplay between cognition and weight reduction in individuals following a Mediterranean Diet: Three-year follow-up of the PREDIMED-Plus trial. *Clinical Nutrition*, 40(9), 5221–5237.
- Special Eurobarometer 472 Sport and physical activity Report Fieldwork*. (2017).
- Stalder, T., Steudte-Schmiedgen, S., Alexander, N., Klucken, T., Vater, A., Wichmann, S., Kirschbaum, C., & Miller, R. (2017). Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. In *Psychoneuroendocrinology* (Vol. 77, pp. 261–274). Elsevier Ltd.
- Stevens, S. S. (1956). The Direct Estimation of Sensory Magnitudes: Loudness. In *Source: The American Journal of Psychology* (Vol. 69, Issue 1).
- Stoner, L., Rowlands, D., Morrison, A., Credeur, D., Hamlin, M., Gaffney, K., Lambrick, D., & Matheson, A. (2016). Efficacy of Exercise Intervention for Weight Loss in Overweight and Obese Adolescents: Meta-Analysis and Implications. In *Sports Medicine* (Vol. 46, Issue 11, pp. 1737–1751). Springer International Publishing.
- Suárez-García, S., del Bas, J. M., Caimari, A., Escorihuela, R. M., Arola, L., & Suárez, M. (2017). Impact of a cafeteria diet & daily physical training on the rat serum metabolome. *PLoS ONE*, 12(2).
- Subias-gusils, A., Alvarez-Monell, A., Caimari, A., del Bas, J. M., Marin, R., Sokanas, M., & Escorihuela, R. M. (2021). Behavioral and Metabolic Effects of a Calorie-Restricted Cafeteria Diet and Oleuropein Supplementation in Obese Male Rats. *Nutrients* 13, 4474.
- Subias-Gusils, A., Boqué, N., Caimari, A., del Bas, J. M., Mariné-Casadó, R., Solanas, M., & Escorihuela, R. M. (2021). A restricted cafeteria diet ameliorates biometric and metabolic profile in a rat diet-induced obesity model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6), 767–780.
- Suk, M., & Shin, Y. (2015). Effect of high-intensity exercise and high-fat diet on lipid metabolism in the liver of rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 19(4), 289–295.

- Sutton, A. K., Myers, M. G., & Olson, D. P. (2016). The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 78, pp. 207–221). Annual Reviews Inc.
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). Series Obesity 1 The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. In *Lancet* (Vol. 378).
- Taguchi, S., Choudhury, M. E., Mikami, K., Utsunomiya, R., Yano, H., & Tanaka, J. (2022). Treadmill Exercise as a Preventive Measure Against Age-Related Anxiety and Social Behavioral Disorders in Rats: When Is It Worth Starting? *Annals of Rehabilitation Medicine*, 46(6), 320–328.
- Talar, K., Vetrovsky, T., van Haren, M., Négyesi, J., Granacher, U., Váczi, M., Martín-Arévalo, E., del Olmo, M. F., Kalamacka, E., & Hortobágyi, T. (2022). The effects of aerobic exercise and transcranial direct current stimulation on cognitive function in older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 81, 101738.
- Teeple, K., Rajput, P., Gonzalez, M., Han-Hallett, Y., Fernández-Juricic, E., & Casey, T. (2023). High fat diet induces obesity, alters eating pattern and disrupts corticosterone circadian rhythms in female ICR mice. *PLoS ONE*, 18(1 January).
- Therrien, F., Drapeau, V., Lalonde, J., Lupien, S. J., Beaulieu, S., Tremblay, A., & Richard, D. (2007). Awakening cortisol response in lean, obese, and reduced obese individuals: Effect of gender and fat distribution. *Obesity*, 15(2), 377–385.
- Tobias, D. K., Chen, M., Manson, J. A. E., Ludwig, D. S., Willett, W., & Hu, F. B. (2015). Effect of low-fat diet interventions versus other diet interventions on long-term weight change in adults: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 3(12), 968–979.
- Travison, T. G., O'Donnell, A. B., Araujo, A. B., Matsumoto, A. M., & McKinlay, J. B. (2007). Cortisol levels and measures of body composition in middle-aged and older men. *Clinical Endocrinology*, 67(1), 71–77.
- Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., & Saha, S. (2017). Economic burden of obesity: A systematic literature review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 14, Issue 4).

- Tryon, M. S., Carter, C. S., DeCant, R., & Laugero, K. D. (2013). Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. *Physiology and Behavior*, *120*, 233–242.
- Ulrich-Lai, Y. M., Christiansen, A. M., Ostrander, M. M., Jones, A. A., Jones, K. R., Choi, D. C., Krause, E. G., Evanson, N. K., Furay, A. R., Davis, J. F., Solomon, M. B., de Kloet, A. D., Tamashiro, K. L., Sakai, R. R., Seeley, R. J., Woods, S. C., & Herman, J. P. (2010). Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20529–20534.
- Ulrich-Lai, Y. M., Fulton, S., Wilson, M., Petrovich, G., & Rinaman, L. (2015). Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*, *18*(4), 381–399.
- Ursache, A., Wedin, W., Tirsi, A., & Convit, A. (2012). Preliminary evidence for obesity and elevations in fasting insulin mediating associations between cortisol awakening response and hippocampal volumes and frontal atrophy. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(8), 1270–1276.
- Uysal, N., Kiray, M., Sisman, A. R., Camsari, U. M., Gencoglu, C., Baykara, B., Cetinkaya, C., & Aksu, I. (2015). Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats. *Biotechnic and Histochemistry*, *90*(1), 55–68.
- van der Valk, E. S., van der Voorn, B., Iyer, A. M., Mohseni, M., Leenen, P. J. M., Dik, W. A., van den Berg, S. A. A., de Rijke, Y. B., van den Akker, E. L. T., Penninx, B. W. J. H., & van Rossum, E. F. C. (2021). Hair cortisol, obesity and the immune system: Results from a 3 year longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology*, *134*.
- Vicennati, V., & Pasquali, R. (2000). *Abnormalities of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Nondepressed Women with Abdominal Obesity and Relations with Insulin Resistance: Evidence for a Central and a Peripheral Alteration*.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Tomasi, D., & Baler, R. D. (2013). Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. In *Obesity Reviews* (Vol. 14, Issue 1, pp. 2–18).
- Wachowska, K., & Gałeccki, P. (2021). Inflammation and cognition in depression: A narrative review. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 24).

- Wallerius, S., Rosmond, R., Ljung, T., Holm, G., & Björntorp, P. (2003). Rise in morning saliva cortisol is associated with abdominal obesity in men: A preliminary report. *Journal of Endocrinological Investigation*, *26*, 616–619.
- Wang, X., Li, Q., Liu, Y., Jiang, H., & Chen, W. (2021). Intermittent fasting versus continuous energy-restricted diet for patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome for glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 179). Elsevier Ireland Ltd.
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015a). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *285*, 131–139.
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015b). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *285*, 131–139.
- Ward, Z. J., Bleich, S. N., Craddock, A. L., Barrett, J. L., Giles, C. M., Flax, C., Long, M. W., & Gortmaker, S. L. (2019). Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. *New England Journal of Medicine*, *381*(25), 2440–2450.
- Watson, A. B. (1983). QUEST: A Bayesian adaptive psychometric method. In *Perception & Psychophysics* (Vol. 33, Issue 2).
- Watson, N. A., Dyer, K. A., Buckley, J. D., Brinkworth, G. D., Coates, A. M., Parfitt, G., Howe, P. R. C., Noakes, M., & Murphy, K. J. (2018). Comparison of two low-fat diets, differing in protein and carbohydrate, on psychological wellbeing in adults with obesity and type 2 diabetes: A randomised clinical trial. *Nutrition Journal*, *17*(1).
- Wewege, M. A., Desai, I., Honey, C., Coorie, B., Jones, M. D., Clifford, B. K., Leake, H. B., & Hagstrom, A. D. (2022). The Effect of Resistance Training in Healthy Adults on Body Fat Percentage, Fat Mass and Visceral Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Sports Medicine* (Vol. 52, Issue 2, pp. 287–300). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Wilke, J., Giesche, F., Klier, K., Vogt, L., Herrmann, E., & Banzer, W. (2019). Acute Effects of Resistance Exercise on Cognitive Function in Healthy Adults: A Systematic Review with Multilevel Meta-Analysis. In *Sports Medicine* (Vol. 49, Issue 6, pp. 905–916). Springer International Publishing.

- Wilson, J. L., & Enriori, P. J. (2015). A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *418*, 108–119.
- Wise, P. M., Nattress, L., Flammer, L. J., & Beauchamp, G. K. (2016). Reduced dietary intake of simple sugars alters perceived sweet taste intensity but not perceived pleasantness. *American Journal of Clinical Nutrition*, *103*(1), 50–60.
- Woo, J., Shin, K. O., Park, S. Y., Jang, K. S., & Kang, S. (2013). Effects of exercise and diet change on cognition function and synaptic plasticity in high fat diet induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1).
- Xiong, J., Ye, M., Wang, L., & Zheng, G. (2021). Effects of physical exercise on executive function in cognitively healthy older adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials: Physical exercise for executive function. *International Journal of Nursing Studies*, *114*.
- Yang, Y., Li, X., Liu, Z., Ruan, X., Wang, H., Zhang, Q., Cao, L., Song, L., Chen, Y., & Sun, Y. (2022). Moderate Treadmill Exercise Alleviates NAFLD by Regulating the Biogenesis and Autophagy of Lipid Droplet. *Nutrients*, *14*(22).
- Yannakoulia, M., Poulimeneas, D., Mamalaki, E., & Anastasiou, C. A. (2019). Dietary modifications for weight loss and weight loss maintenance. In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 92, pp. 153–162). W.B. Saunders.
- Ye, P., Xi, Y., Huang, Z., & Xu, P. (2020). Linking obesity with colorectal cancer: Epidemiology and mechanistic insights. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 6). MDPI AG.
- Yoshida, R., Niki, M., Jyotaki, M., Sanematsu, K., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2013). Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *24*(3), 226–231.
- Yoshida, R., Noguchi, K., Shigemura, N., Jyotaki, M., Takahashi, I., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2015). Leptin suppresses mouse taste cell responses to sweet compounds. *Diabetes*, *64*(11), 3751–3762.
- Yu, F., Xu, B., Song, C., Ji, L., & Zhang, X. (2013). Treadmill exercise slows cognitive deficits in aging rats by antioxidation and inhibition of amyloid production. *NeuroReport*, *24*(6), 342–347.

- Yu, Q., Wong, K. K., Lei, O. K., Nie, J., Shi, Q., Zou, L., & Kong, Z. (2022). Comparative Effectiveness of Multiple Exercise Interventions in the Treatment of Mental Health Disorders: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. In *Sports Medicine - Open* (Vol. 8, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Yu, Y. H., Vasselli, J. R., Zhang, Y., Mechanick, J. I., Korner, J., & Peterli, R. (2015). Metabolic vs. hedonic obesity: A conceptual distinction and its clinical implications. In *Obesity Reviews* (Vol. 16, Issue 3, pp. 234–247). Blackwell Publishing Ltd.
- Zhao, G., Ford, E. S., Dhingra, S., Li, C., Strine, T. W., & Mokdad, A. H. (2009). Depression and anxiety among US adults: Associations with body mass index. *International Journal of Obesity*, 33(2), 257–266.
- Zhao, H., Jin, H., Xian, J., Zhang, Z., Shi, J., & Bai, X. (2022). Effect of Ketogenic Diets on Body Composition and Metabolic Parameters of Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(19).