



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

**Neuroinflamação induzida por infusão intracerebroventricular de
palmitato tratada com Liraglutida (análogo do hormônio peptídeo
similar ao glucagon 1): efeitos no hipotálamo e hipocampo**

Rio de Janeiro

2017

André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

Neuroinflamação induzida por infusão intracerebroventricular de palmitato tratada com Liraglutida (análogo do hormônio peptídeo similar ao glucagon 1): efeitos no hipotálamo e hipocampo

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Aberto Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

B273 Barreto-Vianna, André Rodrigues da Cunha.

Neuroinflamação induzida por infusão intracerebroventricular de palmitato, tratada com Liraglutida (análogo do hormônio peptídeo similar ao glucagon 1): efeitos no hipotálamo e hipocampo / André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna. – 2017.
100 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda.

Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Doenças neurodegenerativas – Teses. 2. Hipotálamo. 3. Hipocampo. 4. Palmitatos. I. Mandarim de Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.8-003.99

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

**Neuroinflamação induzida por infusão intracerebroventricular de palmitato
tratada com Liraglutida (análogo do hormônio peptídeo similar ao glucagon 1):
efeitos no hipotálamo e hipocampo**

Tese apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Humana e Experimental, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de julho de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Leila Maria Cardão Chimelli
Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer

Prof.^a Dra. Thereza Cristina Lonzetti Bargut
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha irmã e aos meus familiares mais próximos, por todo apoio e por estarem sempre presentes, mesmo que geograficamente distantes.

À minha namorada Paulinha e seus parentes, que estão sempre presentes. E aos novos membros da família, Huguinho e Analú.

A todos do laboratório (TODOS mesmo), que de alguma forma colaboraram, não só com este trabalho, mas também por terem me propiciado excelentes momentos.

Aos amigos e agregados do LTM, que estão presentes nos melhores momentos fora da UERJ.

Ao mestre e grande amigo Eduardo Maurício Mendes de Lima, pela orientação, puxão de orelha e estímulo. Nenhuma palavra seria o suficiente para expressar meu agradecimento.

A CAPES, FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.

Martin Luther King

RESUMO

BARRETO-VIANNA, André Rodrigues da Cunha. *Neuroinflamação induzida por infusão intracerebroventricular de palmitato, tratada com Liraglutida (análogo do hormônio peptídeo similar ao glucagon 1): efeitos no hipotálamo e hipocampo*. 2017. 100 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A neuroinflamação descontrolada desempenha um mecanismo chave no surgimento e progressão das doenças neurodegenerativas, que muitas vezes estão relacionadas à resistência central à insulina. Os agonistas do hormônio peptídeo similar ao glucagon (GLP)-1, como a liraglutida, são mais conhecidos pelos seus efeitos sobre a homeostase da glicose e sensibilização da cascata da insulina e, como tal, foram desenvolvidos para uso no tratamento de diabetes mellitus tipo 2. Muitas evidências sugerem que os análogos do hormônio GLP-1 atravessam a barreira hematoencefálica e atuam como agentes neuroprotetores. A liraglutida, apesar de sua já conhecida ação neuroprotetora, ainda não foi testada em modelo de neuroinflamação induzida por palmitato. Camundongos receberam infusão intracerebroventricular (ICV) por 4 semanas de palmitato e foram tratados por 2 semanas com liraglutida. Fizemos análises relativas a massa corporal dos animais, ao metabolismo de carboidratos, como teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI) e aferição dos hormônios insulina e GLP-1 no plasma. No hipotálamo e tecidos adiposos, marrom (BAT) e branco, avaliamos por western blotting, RT-PCR e microscopia parâmetros relacionados à inflamação e metabolismo (balanço energético, termogênese, lipogênese e lipólise). No hipocampo (regiões CA1 e giro denteado) avaliamos marcadores relacionados à neuroinflamação e, através da microscopia confocal, realizamos a análise morfológica e molecular das micróglia e astrócitos. A infusão ICV de palmitato aumentou a massa corporal, diminuiu a tolerância à glicose e gerou resistência à insulina. No hipotálamo, o palmitato aumentou a expressão dos marcadores inflamatórios: interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral (TNF)- α , e comprometeu o balanço energético, onde observamos aumento dos níveis de neuropeptídeo Y (NPY) e diminuição dos níveis de pró-opiomelanocortina (POMC), além de resistência hipotalâmica à insulina. Observamos que o palmitato aumentou a área dos adipócitos brancos, aumentou a lipogênese e diminuiu a lipólise. No BAT, o palmitato aumentou as proteínas relativas ao acúmulo de gordura e diminuiu a termogênese. A liraglutida foi efetiva em atenuar ou reverter os efeitos hipotalâmicos associados à infusão de palmitato, restaurando o controle energético, atenuando a neuroinflamação e a resistência à insulina, além de estimular a lipólise e aumentar a termogênese no BAT. No hipocampo a infusão ICV de palmitato resultou em pronunciada inflamação, microgliose e astrogliose reativas. As micróglia estavam presentes em maior densidade, possuíam morfologia ameboide, hipertrofiadas e com diminuição no número de ramos e junções, além de expressarem em maior quantidade o complexo de histocompatibilidade (MHC)-II. Observamos no hipocampo dos grupos infundidos com palmitato, uma elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α e IL-6. A liraglutida induziu o fenótipo neuroprotetor da micróglia, caracterizado por um aumento da complexidade dessas células. Esta morfologia neuroprotetora foi acompanhada por uma redução significativa na expressão de TNF- α e IL-6. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a liraglutida possui potencial para atuar no combate a neuroinflamação induzida por palmitato, a qual é caracterizada por intensa expressão de citocinas pró-inflamatórias e alteração no balanço energético, além de microgliose e astrogliose reativas, descritos como uma das causas primárias de várias patologias do sistema nervoso central.

Palavras-chave: Hipotálamo. Hipocampo. Neuroinflamação. Palmitato. Ácido graxo saturado. Balanço energético.

ABSTRACT

BARRETO-VIANNA, André Rodrigues da Cunha. *Neuroinflammation induced by intracerebroventricular infusion of palmitate, treated with Liraglutide (analogous to glucagon-like peptide 1 hormone): effects on the hypothalamus and hippocampus*. 2017. 100f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

The uncontrolled neuroinflammation is a key mechanism in the onset and progression of neurodegenerative diseases, and are related to insulin resistance. The glucagon-like peptide (GLP) -1 agonists, such as liraglutide, are well-known for their effects on glucose homeostasis and insulin sensitization they have been developed for use in the treatment of type 2 diabetes. Many evidences suggest that the GLP-1 analogues cross the blood brain barrier and acts as a neuroprotective agent. The liraglutide, despite its already known neuroprotective effects, has not yet been tested in a model of palmitate-induced neuroinflammation. Mice received intracerebroventricular infusion (ICV) of palmitate for 4 weeks and were treated for 2 weeks with liraglutide. We performed analyzes on body mass, carbohydrate metabolism, such as oral glucose tolerance test (TOTG) and intraperitoneal insulin tolerance test (TITI) and measurement of the insulin and GLP-1 plasmatic hormones. In the hypothalamus and adipose tissues, brown (BAT) and white, we evaluated by western blotting, RT-PCR and microscopy relating to neuroinflammation and metabolism (energy balance, thermogenesis, lipogenesis and lipolysis). In the hippocampus (CA1 and dentate gyrus regions) we evaluated markers related to neuroinflammation and, through confocal microscopy, we performed the morphological and molecular analysis of microglia and astrocytes. The ICV infusion of palmitate increased the body mass, decreased the glucose tolerance, and increased the insulin resistance. In the hypothalamus, palmitate increased the expression of the inflammatory markers: interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and altered the energetic balance, where we observed increased levels of neuropeptide Y (NPY) and decreased levels of pro-opiomelanocortin (POMC), in addition to hypothalamic insulin resistance. It was observed that palmitate increased the lipogenesis and the sectional area of white adipocytes and decreased the lipolysis. In BAT, palmitate increased the proteins related to fat accumulation and decreased thermogenesis. Liraglutide was effective in attenuating or reversing the hypothalamic effects associated with palmitate infusion, restoring energy control, attenuating neuroinflammation and insulin resistance, stimulating lipolysis and increasing thermogenesis in BAT. In the hippocampus, the ICV infusion of palmitate resulted in pronounced neuroinflammation, microgliosis and reactive astrogliosis. The microglia were present in higher density, had ameboid and hypertrophied morphology, and reduced the number of branches and junctions, besides expressing in more histocompatibility complex (MHC) -II. We observed in the hippocampus of the palmitate-infused groups an elevation in the levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. The liraglutide induced the neuroprotective phenotype of the microglia, characterized by an increase in the complexity morphology of the microglia. This neuroprotective morphology was accompanied by a significant reduction in TNF- α and IL-6 expression. The study provides evidence that liraglutide may be a suitable treatment against the palmitate-induced neuroinflammation, which it is characterized by the impaired energy balance, intense expression of proinflammatory cytokines, reactive microgliosis and astrogliosis, which has been described as one of the primary causes of several pathologies of the central nervous system.

Keywords: Hypothalamus. Hippocampus. Neuroinflammation. Palmitate. Saturated fatty acid. Energetic balance.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Desenho experimental..... | 37 |
| Figura 2 – | O palmitato modula a via anorexigênica no hipotálamo..... | 51 |
| Figura 3 – | O palmitato modula a via orexigênica no hipotálamo..... | 52 |
| Figura 4 – | O palmitato estimula a via pró-inflamatória no hipotálamo..... | 54 |
| Figura 5 – | O palmitato causa resistência hipotalâmica à insulina..... | 55 |
| Figura 6 – | Metabolismo do tecido adiposo marrom e termogênese..... | 57 |
| Figura 7 – | O palmitato aumenta a deposição de gordura no tecido adiposo branco..... | 58 |
| Figura 8 – | Resposta inflamatória e resistência à insulina no tecido adiposo branco..... | 60 |
| Figura 9 – | Densidade e morfologia das micróglia..... | 67 |
| Figura 10 – | A liraglutida diminui a densidade e a ativação das micróglia no giro denteado..... | 68 |
| Figura 11 – | Imunorreatividade das micróglia e astrócitos..... | 69 |
| Figura 12 – | O palmitato aumenta a densidade de micróglia e a expressão de TNF-alfa na região CA1 do hipocampo..... | 70 |
| Figura 13 – | O palmitato aumenta a densidade de astrócitos e a expressão de TNF-alfa na região CA1 do hipocampo..... | 71 |
| Figura 14 – | Análise morfológica das micróglia..... | 73 |
| Figura 15 – | Análise das citocinas pró-inflamatórias..... | 76 |
| Figura 16 – | Resumo dos efeitos da infusão ICV de palmitato e tratamento com liraglutida no hipocampo..... | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Sequências dos <i>primers</i> utilizados..... | 45 |
| Tabela 2 – | Comportamento alimentar, massa corporal, análise hormonal e metabolismo de carboidratos..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|--|
| aCSF – | Líquido cefalorraquidiano artificial |
| AgRP – | Proteína relacionada ao Agouti |
| AIN-93 – | American Institute of Nutrition do ano de 1993 |
| ANOVA – | Análise de variância |
| ARC – | Núcleo arqueado do hipotálamo |
| ASC – | Área sob a curva |
| ATP– | Adenosina trifosfato |
| BAT – | Tecido adiposo marrom |
| BSA – | Albumina sérica bovina |
| C – | Controle |
| CA – | Corno de Amon |
| CART – | Transcrito regulado por cocaína e anfetamina |
| CD-36 – | Aglomerado de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>) -36 |
| cDNA – | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CEUA – | Comitê de ética no uso de animais |
| DAPI – | 4',6-Diamidina-2'-phenylindole dihydrochloride |
| DNA – | Ácido desoxirribonucleico |
| DP – | Desvio padrão |
| DPP – | Enzima dipeptidil peptidase |
| ERK – | Quinase reguladora de sinal extracelular |
| ERK (p) – | Quinase reguladora de sinal extracelular fosforilada |
| GD – | Giro denteado |
| GFAP – | Proteína ácida fibrilar da glia |
| GLP-1 – | Proteína similar ao glucagon |
| GLP-1R – | Receptor da proteína similar ao glucagon |
| HSL – | Hormônio lipase sensível |
| HSL (p) – | Hormônio lipase sensível fosforilada |
| I κ B α – | Fator nuclear amplificador do gene do polipeptídeo <i>kappa</i> no inibidor de células B – <i>alfa</i> |

| | |
|------------------|--|
| IBA-1 – | Molécula adaptadora da ligação do cálcio ionizado-1 |
| iBAT – | Tecido adiposo marrom interscapular |
| ICV – | Intracerebroventricular |
| IFN- γ – | Interferon gama |
| IL – | Interleucina |
| JNK – | Janus quinase |
| JNK (p) – | Janus quinase fosforilada |
| K – | Potássio |
| L – | Liraglutida |
| LPS – | Lipopolissacarídeo |
| LTP – | Potenciação de longa duração |
| M1 – | Ativação clássica das micróglia |
| M2 – | Ativação alternativa das micróglia |
| MHC-II – | Complexo de histocompatibilidade –II |
| mRNA – | Ácido ribonucleico mensageiro |
| MC4R – | Receptor da melanocortina subtipo 4 |
| Na – | Sódio |
| NF κ B – | Fator nuclear <i>kappa</i> B |
| NPY – | Neuropeptídeo Y |
| P – | Palmitato |
| PBS – | Tampão fosfato salina |
| PFA – | Paraformaldeído |
| PGC-1 α – | Co-ativador-1 <i>alfa</i> do receptor gama ativado por proliferador do peroxissomo |
| PLIN-2 – | Perilipina-2 |
| POMC – | Pró-opiomelanocortina |
| Q _A – | Densidade numérica por área |
| RNA – | Ácido ribonucleico |
| RPM – | Rotações por minuto |
| RT-PCR – | Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa |
| SC – | Via subcutânea |
| SOCS – | Proteína supressora de sinalização de citocina |
| STAT – | Sinal transdutor e ativador da transcrição |

| | |
|-----------------|--|
| TNF- α – | Fator de necrose tumoral <i>alfa</i> |
| TFAM – | Fator de transcrição mitocondrial |
| TITI – | Teste intraperitoneal de tolerância à insulina |
| TLR – | Receptor do tipo <i>Toll</i> |
| TOTG – | Teste oral de tolerância à glicose |
| u.a. – | Unidade arbitrária |
| UCP – | Proteína desacopladora mitocondrial |
| Vv – | Densidade de volume |
| β 3AR – | Receptor <i>beta</i> 3 adrenérgico |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 1.1 | Ácido graxo saturado e neuroinflamação | 17 |
| 1.2 | Neuroinflamação | 19 |
| 1.2.1 | <u>Neuroinflamação crônica</u> | 21 |
| 1.3 | Micróglia | 22 |
| 1.3.1 | <u>Estágio de repouso</u> | 23 |
| 1.3.2 | <u>Estágio de ativação clássica (M1)</u> | 23 |
| 1.3.3 | <u>Estágio de ativação alternativa (M2)</u> | 24 |
| 1.4 | Hipotálamo – balanço energético | 24 |
| 1.5 | Tecido adiposo marrom - termogênese | 26 |
| 1.6 | Hipocampo | 29 |
| 1.7 | Análogo do hormônio GLP-1 – Liraglutida | 31 |
| 2 | OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 | Objetivo geral | 35 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 35 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 | Desenho experimental | 36 |
| 3.2 | Infusão intracerebroventricular de palmitato | 38 |
| 3.3 | Infusão subcutânea de liraglutida | 39 |
| 3.4 | Massa corporal e consumo alimentar | 39 |
| 3.5 | Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI) | 39 |
| 3.6 | Coleta de sangue | 40 |
| 3.7 | Microscopia de luz e confocal | 41 |
| 3.8 | Densidade e análise morfológica das micróglia | 42 |
| 3.9 | Análise plasmática de GLP-1 e insulina | 43 |
| 3.10 | Real-time PCR | 43 |
| 3.11 | Western blotting | 46 |
| 3.12 | Análise estatística | 47 |
| 4 | RESULTADOS | 48 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1 | Massa corporal e consumo alimentar | 48 |
| 4.2 | Níveis plasmáticos de GLP-1 e insulina | 49 |
| 4.3 | Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI) | 49 |
| 4.4 | Hipotálamo | 49 |
| 4.4.1 | <u>Neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados à regulação do metabolismo.</u> | 50 |
| 4.4.2 | <u>Perfil inflamatório no hipotálamo</u> | 53 |
| 4.4.3 | <u>Resistência hipotalâmica à insulina</u> | 55 |
| 4.5 | Tecido adiposo marrom | 56 |
| 4.6 | Tecido adiposo branco | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO | 61 |
| 6 | CONCLUSÃO | 65 |
| 7 | RESULTADOS | 66 |
| 7.1 | Densidade de micróglia e imunorreatividade dos astrócitos | 66 |
| 7.2 | Morfologia das micróglia | 72 |
| 7.3 | Perfil inflamatório | 75 |
| 8 | DISCUSSÃO | 77 |
| 9 | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 84 |
| | APÊNDICE – Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa..... | 98 |
| | ANEXO A – Artigo publicado (<i>Metabolic Brain Diseases</i>) | 99 |
| | ANEXO B – Artigo submetido (<i>PLoS ONE</i>) | 100 |

INTRODUÇÃO

A neuroinflamação descontrolada desempenha um papel chave no surgimento e progressão das doenças neurodegenerativas (Baron *et al.*, 2014), que estão relacionadas a processos semelhantes aos da resistência periférica à insulina e associadas com a obesidade (Gupta *et al.*, 2012). Dessa forma, a demanda por drogas que minimizem os efeitos nocivos da obesidade no sistema nervoso central, assim como a restauração da sensibilidade central à insulina torna-se cada vez mais significativa (Athauda e Foltynie, 2016).

Indivíduos obesos possuem níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos saturados, principalmente palmitato (Sabin *et al.*, 2007). O aumento da concentração de palmitato é observado no encéfalo de camundongos que foram alimentados com dieta hiperlipídica (Rodriguez-Navas *et al.*, 2016). Apesar de os ácidos graxos serem essenciais na constituição das membranas celulares, e de serem usados como mensageiros celulares do SNC, alterações na sua concentração podem desencadear neuroinflamação (Gupta *et al.*, 2012; Stranahan, 2015). Além disso, a administração ICV crônica de palmitato, induz fenótipo inflamatório similar ao observado em animais obesos, com alteração na sensibilidade à insulina. Também tem sido sugerido que doses maiores de palmitato podem induzir resistência à leptina e ganho de peso a longo prazo, como visto em animais obesos induzidos por dieta (Kleinridders *et al.*, 2009).

Os agonistas do hormônio similar ao glucagon (GLP) -1, principalmente a liraglutida, possuem efeitos neuroprotetores. Apesar de o GLP-1 endógeno apresentar meia vida muito curta, a liraglutida (que possui sequência 97% homóloga à sequência do GLP-1 endógeno) é resistente à degradação pela enzima dipeptidil peptidase (DPP)-4, possuindo assim a meia vida mais longa. O órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos e medicamentos (US Food and Drug Administration), aprovou o uso da liraglutida como terapia contra diabetes do tipo 2 e obesidade, pois os análogos do hormônio GLP-1 são conhecidos pelos seus efeitos benéficos na regulação da homeostase da glicose e pelos seus efeitos anorexígenicos (Barreto-Vianna *et al.*, 2016; Christou *et al.*, 2016).

Uma série de estudos tem demonstrado os efeitos neuroprotetores da liraglutida em modelos de doenças neurodegenerativas (McClellan e Holscher, 2014; Sharma *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; McClellan *et al.*, 2015). Porém, a sua ação neuroprotetora em modelo de inflamação induzida por palmitato, mesmo que interessante e com potencial para novas perspectivas de tratamentos, ainda não foi avaliada. O presente estudo foi conduzido para analisar no hipotálamo e no hipocampo os possíveis efeitos neuroprotetores da administração subcutânea de liraglutida em modelo de infusão ICV de palmitato.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ácido graxo saturado e neuroinflamação

A obesidade é o principal fator da resistência à insulina (Antuna-Puente *et al.*, 2008; Fraulob *et al.*, 2010). Os mecanismos fisiológicos que relacionam a obesidade com a resistência à insulina têm sido amplamente estudados, e incluem a alteração na produção de diversos fatores como as adipocinas, adiponectina e resistina, aumento na secreção das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e aumento dos níveis de ácidos graxos saturados (Tanti *et al.*, 2012). Na última década, a obesidade tem sido cada vez mais caracterizada por ser uma doença de característica inflamatória, onde as vias pró-inflamatórias estimuladas estão diretamente relacionadas com a resistência à insulina (Shi *et al.*, 2006; Tanti *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos pelos quais a obesidade estimula a via inflamatória ainda são mal compreendidos. Os ácidos graxos saturados, cujos níveis se apresentam elevados no indivíduo obeso, aparecem nos últimos anos como o principal vilão, sendo ele, o responsável direto pela resistência à insulina (Shi *et al.*, 2006). De fato, a infusão vascular de ácidos graxos saturados prejudica tanto a capacidade da insulina em suprimir a produção hepática da glicose, como também prejudica a captação da glicose pelo musculatura esquelética (Lam *et al.*, 2003; Boden *et al.*, 2005).

Os indivíduos obesos têm níveis elevados de ácidos graxos saturados, principalmente palmitato (Sabin *et al.*, 2007). O aumento da concentração de palmitato é observado no cérebro de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (Rodriguez-Navas *et al.*, 2016). Embora os ácidos graxos sejam essenciais na constituição das membranas celulares e utilizados como mensageiros celulares em áreas do sistema nervoso, mudanças na sua concentração podem levar à neuroinflamação (Gupta *et al.*, 2012; Stranahan, 2015).

A exposição à dieta rica em ácidos graxos saturados ativa a família de receptores chamada de toll-like (TLR), o mesmo receptor que participa da identificação dos lipopolissacarídeos (LPS). Estudos mostram que o componente lipídico do LPS é suficiente para desencadear a ativação da sinalização do TLR (Shi

et al., 2006; Park e Lee, 2013). Os TLRs são membros da superfamília de receptores do tipo Interleucina (IL)-1, que desempenham um papel crucial no sistema imune inato, eles detectam a presença e a natureza da infecção e, portanto, fornecem a primeira linha de defesa do hospedeiro, ativando a cascata de sinalização pró-inflamatória (Shi *et al.*, 2006). Os TLRs são expressos em compartimentos celulares distintos e reconhecem vários padrões moleculares associados aos patógenos derivados de vírus, bactérias patogênicas, fungos patogênicos e protozoários parasitários. Existem diversos subtipos de TLRs, dentre eles, o TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 que são expressos na superfície da célula e o TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 que são expressos em compartimentos intracelulares, como no retículo endoplasmático (Konner e Bruning, 2011).

Os ácidos graxos saturados, como o palmitato, são ligantes do tipo TLR-4, sua ativação desencadeia a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, a IL-1beta e a IL-6, causando inflamação em diversas regiões, dentre elas, no hipotálamo. Essa inflamação hipotalâmica culmina com a perda do controle neural e subsequente falha no equilíbrio entre o consumo de alimentos e o gasto energético, o que, por sua vez, contribui para a resistência à insulina e à leptina (Milanski *et al.*, 2009; Barreto-Vianna *et al.*, 2016).

Diferentes ácidos graxos produzem diferentes respostas no sistema nervoso central. Para avaliar as diferentes respostas, Milanski *et al.* (2009) administrou por via ICV, diferentes misturas de ácidos graxos. Eles avaliaram em camundongos e ratos, a resposta à expressão das citocinas relacionadas à inflamação. Nesse estudo, eles observaram que o ácido oleico aumentou apenas a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-6. Por outro lado, tanto as misturas com ácidos graxos de origem vegetal, como as misturas de ácidos graxos saturados, modularam positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, no entanto, a mistura composta por ácidos graxos saturados apresentou efeitos mais exacerbados. Quando Milanski *et al.* (2009) testaram os ácidos graxos saturados e insaturados isolados, houve uma clara diferença com o maior efeito pró-inflamatório estimulado pelos ácidos graxos saturados de cadeia longa.

Alterações nos níveis de lipídios no sistema nervoso central estão associadas a doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Iuliano *et al.*, 2013), além disso, a obesidade potencialmente aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica ao ácido graxo saturado. É possível mimetizar a obesidade induzida pela dieta no

sistema nervoso central através da infusão ICV de palmitato, que regula a via pró-inflamatória, levando a resistência hipotalâmica à leptina e insulina (Kleinridders *et al.*, 2009; Posey *et al.*, 2009).

A infusão ICV de palmitato é um bom modelo para mimetizar a obesidade a nível central, pois além de os ácidos graxos serem permeáveis à barreira hematoencefálica (Smith e Nagura, 2001), estudos mostram que dietas com alto teor de gordura podem aumentar a absorção de ácidos graxos no cérebro a partir do plasma (Wang *et al.*, 1994; Karmi *et al.*, 2010). O acúmulo de ácidos graxos saturados modulam o processo de deposição de placas amilóides em neurônios e astrócitos (Patil e Chan, 2005; Patil *et al.*, 2006). Pela localização e função dos astrócitos na barreira hematoencefálica, essas células são um alvo provável e fisiologicamente significativo para as ações dos ácidos graxos. Quando administrado periféricamente, os ácidos graxos se acumulam em grande quantidade nos astrócitos (Bernoud *et al.*, 1998).

1.2 Neuroinflamação

A inflamação é uma resposta biológica das células ou tecidos aos danos causados por agressões físicas, como radiações e ondas de ultrassom, agressões químicas, como ácidos, e agressões biológicas, como toxinas, bactérias, protozoários, fungos e vírus. A inflamação pode se apresentar de diversas formas, variando de acordo com a natureza, o tempo e a intensidade do estímulo inflamatório, assim como, também varia de acordo com o tecido que está sendo afetado, esses fatores determinam se o processo inflamatório é agudo ou crônico. Quando a inflamação ocorre em tecidos pertencentes ao sistema nervoso, ela é chamada de neuroinflamação (Headland e Norling, 2015).

A neuroinflamação crônica é observada em estádios relativamente iniciais das doenças neurodegenerativas. No sistema nervoso central os processos neurodegenerativos são caracterizados por mudanças morfológicas, anatômicas e funcionais que levam a perda neuronal precoce, de forma crônica e progressiva. Esses processos influenciam a função das células da glia causando ativação das microglias e astrócitos, essa ativação provoca a produção e liberação de grandes

quantidades de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Waisman et al., 2015; DiSabato et al., 2016).

A ativação crônica das micróglia está ligada à degradação proteica, à disfunção mitocondrial e aos defeitos no transporte axonal, que têm um efeito prejudicial na função dos neurônios e levam à morte celular. Além disso, a neuroinflamação resulta na subsequente infiltração de células imunes da periferia ao sistema nervoso central através da barreira hematoencefálica, o que acelera e agrava o processo de neuroinflamação e a neurodegeneração (Waisman et al., 2015; DiSabato et al., 2016; Kempuraj et al., 2016).

O sistema nervoso central já foi considerado imunologicamente privilegiado devido à proteção da barreira hematoencefálica e devido à falta de resposta imune humoral envolvendo leucócitos e anticorpos, como a observada na periferia. As principais características da inflamação, também chamadas de pilares da inflamação, como edema, rubor, dor e calor, não são observadas no cérebro. O conceito de privilégio imune do cérebro foi revisado na década de 1990, e agora é geralmente reconhecido que algumas áreas cerebrais, como as meninges, os ventrículos cerebrais e os órgãos periventriculares (órgãos que estão ao redor dos ventrículos cerebrais) não são imunologicamente privilegiados e que o parênquima cerebral é capaz de uma resposta imune inata, embora diferente da característica resposta imune inata periférica (Matyszak, 1998). O sistema nervoso central tem uma resposta imunológica ativa e dinâmica, onde os macrófagos residentes no sistema nervoso central, chamados de micróglia realizam a vigilância do tecido contra patógenos, além de mobilizar, fagocitar, apresentar antígenos e produzir e secretar uma gama de citocinas envolvidas na inflamação (Jin e Yamashita, 2016).

No sistema nervoso central, as microglia sempre examinam o microambiente produzindo fatores que influenciam astrócitos e neurônios adjacentes, particularmente em resposta a infecção ou lesão celular neuronal. Isso culmina com a ativação de uma resposta inflamatória que envolve ainda uma resposta transitória e auto-limitante através do sistema imunológico, para que se inicie o reparo tecidual. Em condições patológicas, quando os mecanismos de resolução normais falham, há uma ativação anormal e produção exacerbada de fatores inflamatórios, levando ao estado neuroinflamatório crônico e à progressão de alterações neurodegenerativas (Chen e Trapp, 2016; Jin e Yamashita, 2016; Liddel et al., 2017).

1.2.1 Neuroinflamação crônica

A neuroinflamação possui potencial para proteger e prejudicar. A resposta imune protege o sistema nervoso central contra agentes patogênicos, promove a cicatrização após lesões, ela conserva energia acelerando a morte de células (quando o dano é irreversível), e promove o reparo celular (Haus-Wegrzyniak *et al.*, 2002; Luo e Chen, 2012). No entanto, os mecanismos pelos quais a micróglia pode proteger o sistema nervoso também podem causar danos ao tecido. Independente da fisiopatologia da agressão que iniciou o processo inflamatório, a neuroinflamação crônica pode ter como consequência a neurodegeneração (Allan e Rothwell, 2003; Lehnardt *et al.*, 2003; Ransohoff, 2016).

A micróglia com ativação clássica (M1, que será explicada no próximo tópico) produz e secreta fatores pró-inflamatórios para atrair e estimular a ativação de mais micróglia, criando um ciclo de ativação. Em circunstâncias normais, esta resposta é transitória e não causa danos ao tecido. A micróglia, então, passa de ativação clássica (M1) para alternativamente ativada (M2), seguida por estágio de repouso. No entanto, se a fase pró-inflamatória for mantida, o processo inflamatório passa de protetor para predominantemente patológico (Luo e Chen, 2012; Ransohoff, 2016; Sochocka *et al.*, 2016).

Quando o sistema nervoso apresenta uma patologia, é observada a presença de micróglia em vários estágios de ativação. Nas doenças neurodegenerativas, as lesões e exacerbada morte de células fazem com que a neuroinflamação seja sustentada ao longo do tempo (em algumas doenças, essa ativação pode ser mantida por anos), onde é possível encontrar micróglia ativadas e desativadas, com predominância das micróglia ativadas (Lull e Block, 2010; Kempuraj *et al.*, 2016; Sochocka *et al.*, 2016).

Além da exposição contínua à agressão que ativou o sistema imune, uma resposta neuroinflamatória crônica também é autosustentável, pois as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas micróglia ativadas induzem a ativação de mais micróglia, como um ciclo vicioso (Haus-Wegrzyniak *et al.*, 1998; Haus-Wegrzyniak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a complexa cascata de eventos iniciada pela ativação crônica das micróglia inclui aumento da expressão de MHC-II. O MHC-II na

membrana das micróglias estimula as células T, que em seguida estimula a micróglia a secretar mais fatores pró-inflamatórios (Lynch, 2009).

1.3 Micróglias

As micróglias são as principais células imunes do sistema nervoso central, elas são análogas aos macrófagos encontrados na periferia e compreendem cerca de 5 a 20% de todas as células que compõe a glia. As micróglias foram citadas pela primeira vez por volta de 1900 por William Ford Robinson, o qual as chamou de células de mesoglia, em sua descrição ele sugeriu que as mesoglias possuem ação fagocitária em certas condições patológicas, porém, na ocasião ele não entrou em maiores detalhes. Duas décadas depois, em 1921, Pio del Rio-Hortega alterou o nome de mesoglias para micróglias e descreveu as alterações morfológicas na transição entre os estágios de repouso e fagocítica, onde ele demonstrou no estágio fagocítico a morfologia amebóide com o encurtamento das ramificações (Kettenmann et al., 2011). Quase 100 anos depois, as propriedades macrofágicas das microglias são bem estudadas e a linhagem compartilhada entre micróglias e macrófagos foi detalhada. Através da técnica de mapeamento de genes, Ginhoux et al. (2010) descreveram os macrófagos em embriões de camundongos e revelaram que quase toda a população de micróglias dos adultos surgiu de uma única população de macrófagos, confirmando as origens compartilhadas entre as micróglias e os macrófagos. Similar aos macrófagos, as micróglias podem apresentar três estágios principais, o estágio de repouso, o estágio de ativação clássica (M1) e o estágio ativação alternativa (M2) (Kettenmann et al., 2011; Moehle e West, 2015).

As micróglias ativadas são polarizada em células de fenótipo M1 e M2. A micróglias M1 produzem fatores pro-inflamatórios destrutivos. Em contrapartida, as micróglias M2 produzem fatores protetores e tróficos, além de possuírem maior capacidade fagocítica para remoção dos debris celulares (Jin e Yamashita, 2016).

1.3.1 Estágio de repouso

As micróglia em repouso nunca estão realmente em repouso, as micróglia possuem processos longos e finos que se movem continuamente, tendo a capacidade de "escanear" todo o parênquima em algumas horas. Sua morfologia é caracterizada por longos e delgados processos, com um pequeno corpo celular. O fenótipo imunológico deste estado é caracterizado pela baixa expressão de proteínas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC)-2 e outros receptores da superfície envolvidos na apresentação de antígenos (Lull e Block, 2010).

1.3.2 Estágio de ativação clássica (M1)

A ativação clássica (M1) é a expressão de uma resposta imune inata pró-inflamatória, em resposta à lesão ou invasão por patógenos (Lull e Block, 2010).

Nimmerjahn *et al.* (2005) demonstram através de vídeo de lapso de tempo que as micróglia em estado de repouso apresentam uma vigilância ativa do microambiente e quando elas recebem estímulo através do contato com LPS, as micróglia ficam ativadas e seus processos se dirigem rapidamente em direção à ponta da pipeta que está liberando o LPS.

A micróglia em estágio M1 se encontra com ativação dos fatores transcrição, como o transdutor de sinal e os ativadores da transcrição 1 e 4 (STAT1, STAT4) e NFkB indicando a ativação de genes para uma resposta pró-inflamatória (Colton e Wilcock, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias são fatores secretados pelas micróglia em estágio M1 envolvidos na comunicação celular para propagar a resposta imune entre as células. Em particular, a micróglia M1 expressa as citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN γ . Algumas dessas citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β , também são suficientes para caracteriar o estado M1 (Chen *et al.*, 2008).

A micróglia M1 retrai seus processos em uma morfologia para se apresentar com uma forma ameboide, permitindo sua mobilização para as áreas de interesse. A

microglia ativada em estágio M1 aumenta a expressão de proteínas de superfície, como TLRs, para reconhecer patógenos. Ela também aumenta a expressão do complexo de histocompatibilidade II (MHCII), principal complexo utilizado para apresentar antígeno aos linfócitos T e iniciar uma resposta imune humoral (Tooyama *et al.*, 1990).

1.3.3 Estágio de ativação alternativa (M2)

O estágio de ativação alternativa (M2) é caracterizado pela liberação de citocinas anti-inflamatórias (Szczepanik *et al.*, 2001). Embora M2a seja um estado anti-inflamatório, a microglia permanece fagocítica e, em alguns casos, são mais fagocíticas do que a microglia em estágio M1 (Durafour *et al.*, 2012).

Ao contrário da liberação tóxica de TNF- α e de espécies reativas de oxigênio, como visto pela microglia M1, o estágio M2 apresenta a fagocitose ativada. A fagocitose é um processo interno e controlado que auxilia na homeostase do microambiente através da remoção de agentes patogênicos e detritos celulares.

Além da produção reduzida de mediadores pró-inflamatórios e do aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, o estresse oxidativo diminui. A principal função da microglia M2 é a supressão da inflamação (Colton e Wilcock, 2010; Fernandes *et al.*, 2014).

1.4 Hipotálamo – balanço energético

O controle fisiológico da adiposidade é realizado pelo sistema nervoso central. Entre as diferentes áreas cerebrais envolvidas, uma das mais estudadas é o hipotálamo, que está localizado no diencefalo. O hipotálamo atua como sensor homeostático, recebendo múltiplas tarefas que estão relacionadas à experiência sensorial de comer, ao processo de ingestão e digestão e à manutenção dos níveis de armazenamento de energia (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017). Uma vez que esta informação está integrada, o hipotálamo tem a capacidade de responder com

resultados apropriados, alterando o metabolismo basal, a atividade física, a termogênese e o uso dos nutrientes (Bruce *et al.*, 2017; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017).

Em situações de abundância de alimentos, o hipotálamo promove sinais para que o indivíduo cesse o consumo alimentar e aumente o gasto energético. Em contrapartida, situações em que ocorre deficiência, ou eminência de deficiência nutricional, o hipotálamo estimula o aumento do consumo alimentar e a diminuição do gasto energético (Seeley e Woods, 2003).

A principal área do hipotálamo responsável pelo controle do balanço energético é o núcleo arqueado, situado em sua base. O núcleo arqueado pode ser considerado como o "repcionista" do hipotálamo. Isto é devido à sua posição anatômica, pois na base do hipotálamo existe uma região chamada de eminência média, que é um porção periventricular onde o endotélio da barreira hematoencefálica é fenestrado, permitindo que os neurônios do núcleo arqueado tenham acesso a sinais humorais, metabólicos e nutricionais circulantes (Myers *et al.*, 2009; Schaeffer *et al.*, 2014).

O núcleo arqueado contém duas populações de neurônios, que são altamente especializadas em controlar o consumo alimentar e o gasto energético, sendo eles: os neurônios produtores dos peptídeos POMC/CART (neurônios POMCérgicos, ou neurônios POMC) e os neurônios produtores dos peptídeos NPY/AgRP (neurônios NPY/AgRPérgicos ou neurônios NPY) (Konner *et al.*, 2009; Arruda *et al.*, 2011). Enquanto o POMC e o CART atuam como neuropeptídeos anorexigênicos, ou seja, reduzem o consumo alimentar e aumentam o gasto energético, o NPY e o AgRP atuam como neuropeptídeos orexigênicos, ou seja, estimulam o consumo alimentar e diminuem o gasto energético. Dentre esses neuropeptídeos, o NPY e o POMC se destacam por terem maior relevância no controle do balanço energético (Konner *et al.*, 2009; Sanchez-Lasheras *et al.*, 2010). O NPY é expresso predominantemente no núcleo arqueado, porém os neurônios desse núcleo se projetam em direção aos neurônios chamados de "segunda ordem", localizados principalmente nos núcleos paraventricular e lateral do hipotálamo (Mashiko *et al.*, 2009; Sanchez-Lasheras *et al.*, 2010).

As duas populações de neurônios supracitadas expressam receptores de leptina e insulina que, quando estão ativados, acionam as vias de sinalização que

controlam a transcrição de neurotransmissores e modulam a atividade dos neurônios NPYérgicos e POMCérgicos (Benoit *et al.*, 2002; Kitamura *et al.*, 2006).

Uma vez que exista o perfeito equilíbrio, tanto na atuação dos neuropeptídeos hipotalâmicos, como da leptina e da insulina, o corpo é capaz de manter o índice de adiposidade a nível fisiológico.

Recentes estudos, mostram que a exposição de animais a dietas ricas em ácidos graxos saturados desencadeia, principalmente através da ativação TLR4, o aumento da transcrição de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , levando à inflamação do hipotálamo com perda do controle neural e subsequente falha no equilíbrio entre consumo alimentar e gasto energético, culminando com a resistência central à leptina e insulina (Velloso *et al.*, 2008; Milanski *et al.*, 2009). Caso a exposição com dietas ricas em ácidos graxos se prolongue por mais tempo, a inflamação pode ativar a cascata de apoptose, levando à morte dos neurônios hipotalâmicos (Moraes *et al.*, 2009).

1.5 Tecido adiposo marrom - termogênese

A produção de calor (termogênese) pode ser classificada de duas formas: termogênese obrigatória “intrínseca” ou termogênese facultativa “adaptativa”. A primeira delas se refere à produção de calor devido às reações exotérmicas (como as que envolvem canais de Na⁺ e K⁺ dependentes de ATP), que ocorrem em todos os órgãos do corpo. A segunda delas se refere ao sistema de proteção que produz calor em resposta à alterações no clima (proteção contra o frio – termogênese induzida pelo frio) ou alterações na dieta (regulação do balanço energético – termogênese induzida pela dieta), e o principal órgão responsável pela termogênese adaptativa é o BAT (Lowell e Spiegelman, 2000).

O BAT teve sua primeira descrição em 1551, pelo suíço Konrad Gessner, médico e naturalista, ao estudar a anatomia da Marmota Alpina (*Marmota marmota*). O BAT foi encontrado na região interescapular e descrito como “nem gordura e nem carne” (*nec pinguitudo nec caro*) (Tews e Wabitsch, 2011; Whittle *et al.*, 2013). Atualmente, o BAT é descrito como sendo um órgão produtor de calor devido à transformação de energia, através de processos que não envolvem contração de

tecido muscular, ou seja, processos que não envolvem tremor ou calafrio (Cannon e Nedergaard, 2004).

No decorrer do século 20 o BAT foi foco de diversos estudos, porém acreditava-se não ter muita relevância para humanos adultos, em parte, pelas limitações em avaliar a sua presença e sua ativação (Whittle *et al.*, 2013). Em 2007, Nedergaard *et al.* publicou um trabalho mostrando, através de PET-CT, a existência de BAT ativo em humanos e, a partir desse estudo, inúmeros trabalhos têm sido realizados visando principalmente o tratamento da obesidade através da ativação do BAT.

Em camundongos, é possível encontrar BAT em diversas regiões do corpo, entretanto, aquele encontrado na região interescapular (iBAT) parece ser o mais metabolicamente ativo e, por se apresentar melhor delimitado e em maior volume neste sítio, é o mais estudado (Cannon e Nedergaard, 2004).

A termogênese adaptativa é controlada pelo sistema nervoso central, através da mediação de centros autonômicos localizados no hipotálamo, como os núcleos arqueado, paraventricular e dorsomedial do hipotálamo (Richard, 2007; Berthoud e Morrison, 2008; Whittle *et al.*, 2012), mais especificamente pelo sistema melanocortina (Cone, 2006; Richard *et al.*, 2010), pelo qual aumenta a atividade do SNS. O BAT é ricamente inervado e a ativação da termogênese se inicia através de estímulo direto do sistema nervoso simpático, ativando com catecolaminas (noraepinefrina e epinefrina) várias isoformas de receptores beta-adrenérgicos, principalmente a isoforma tipo 3 (β 3AR) (Cannon e Nedergaard, 2004; Richard *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

A ativação dos receptores beta-adrenérgicos localizados na membrana celular dos adipócitos marrons desencadeia uma série de reações, culminando com a estimulação da UCP1, assim como com aumento de sua produção. A UCP1 é uma proteína do BAT, encontrada na membrana interna das suas mitocôndrias. Ela é responsável por gerar calor através do desacoplamento dos prótons que seriam usados para formação de ATP. A atividade da UCP1 aumenta em poucos segundos após a estimulação adrenérgica e se a estimulação for crônica (horas ou dias) culmina com o aumento da transcrição desta proteína (Lowell e Spiegelman, 2000; Richard *et al.*, 2010).

No que diz respeito à relação entre a resistência central à leptina e à termogênese, uma vez que a resistência central à leptina esteja instalada, causando

uma perturbação no controle central do balanço energético, seria natural o pensamento de que o controle central da termogênese também estivesse alterado devido ao estado de resistência. Contudo, estudos atuais têm mostrado que, apesar de os núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle central da termogênese serem os mesmos envolvidos no balanço energético, principalmente no que diz respeito ao controle do apetite (Berthoud e Morrison, 2008; Whittle *et al.*, 2012; Whittle *et al.*, 2013), o controle central da termogênese não entra em estado de resistência, surgindo o termo “resistência seletiva à leptina” (Morgan *et al.*, 2008; Enriori *et al.*, 2011; Konner e Bruning, 2012).

Recentemente, avaliou-se a termogênese pelo BAT em camundongos obesos induzidos por dieta e verificaram que, apesar da resistência central à leptina, a termogênese nesses animais estava aumentada comparada a animais não obesos e, ao analisarem a termogênese em animais *ob/ob* (não produtores de leptina), essa se apresentou diminuída em relação ao controle, confirmando que o estímulo simpático para o BAT é dependente de leptina e não é alterado em situações de resistência a este hormônio (Enriori *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, têm sido muito estudados os efeitos da ativação dos receptores GLP-1 no estímulo da termogênese. Embora o GLP-1R não seja essencial para o controle homeotérmico em resposta ao frio, ele utiliza os mecanismos eferentes comuns, componentes do sistema nervoso simpático, para aumentar a termogênese do iBAT. A conexão entre o BAT e o GLP-1 se dá pela ativação do sistema nervoso simpático, uma vez que a infusão ICV de GLP-1 aumenta a atividade eletrofisiológica das fibras simpáticas que inervam o iBAT (Lockie *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2017). Lockie *et al.* (2012) mostraram que a termogênese do iBAT seja um dos múltiplos mecanismos pelos quais, juntamente com o controle da alimentação e do metabolismo do tecido adiposo branco, os agonistas do hormônio GLP-1 contribuem para a manutenção do balanço energético.

A infusão ICV de GLP-1 reduz o peso corporal e aumenta a termogênese pela ativação do iBAT, esse efeito é independente de mudanças na alimentação e independente da capacidade de resposta da insulina. A expressão de genes envolvidos na ativação da termogênese, como os que codificam o co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α) e a proteína de desacoplamento-1 (UCP1) foram reguladas no BAT de camundongos tratados com

agonistas do GLP-1. Em contraste, camundongos geneticamente manipulados para não expressar o receptor de GLP-1 não apresentam nenhuma alteração na temperatura do BAT ou na expressão dos genes relacionados com a termogênese (Lockie *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2017).

Como visto anteriormente, além do controle do comportamento alimentar, o núcleo arqueado do hipotálamo também regula o gasto energético. Dessa forma, a ação da leptina no núcleo arqueado é necessária para a indução do potencial de ação e ativação dos nervos simpáticos que alcançam o BAT (Rahmouni e Morgan, 2007; Harlan *et al.*, 2011). Curiosamente, a ativação de neurônios do núcleo arqueado que expressam NPY diminuiu a termogênese do BAT (Bewick *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2013). Por outro lado, os neurônios POMC têm sido relacionados ao aumento da termogênese através da ativação da via adrenérgica para o BAT (Butler e Cone, 2002; Yasuda *et al.*, 2004). Como consequência, camundongos que não possuem genes que ativam os neurônios POMC, como o gene MC4R, suprimiram o aumento da termogênese dependente de leptina no BAT (Zhang *et al.*, 2005).

1.6 Hipocampo

O hipocampo é uma das estruturas mais pesquisadas do sistema nervoso central, suas funções mais estudadas se relacionam com o aprendizado e a memória. Sua localização se dá caudalmente entre o neocórtex e o diencéfalo antes de se curvar ventralmente em direção ao lobo temporal, o hipocampo recebe informação sensorial através de suas comunicações com o córtex entorrina e se apresenta repleto de conectividade aferente e eferente com estruturas corticais e subcorticais (Martin e Clark, 2007). O hipocampo consiste de duas finas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra. Uma camada é chamada de giro denteado (GD), enquanto a outra camada é denominada Corno de Amon (CA). O CA, por sua vez, pode ser dividido em regiões CA1, CA2 e CA3 (Bear *et al.*, 2007).

Nos últimos anos houve o aumento nos estudos correlacionando a obesidade com distúrbios da função cognitiva (funções relacionadas com a memória, raciocínio, tomada de decisões, atenção, entre outros). Em estudo de meta-análise com mais de 25 mil participantes, os autores encontraram uma forte associação entre

obesidade e distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer e outras demências, segundo este estudo, o sobrepeso e a obesidade na vida adulta aumentam o risco de demência. E quando os resultados foram estratificados, separando indivíduos por sexos, as mulheres apresentaram efeitos mais exacerbados da obesidade relacionada a demências. Por exemplo, mulheres adultas com sobrepeso apresentaram 3,1 vezes maior para a doença de Alzheimer, enquanto os homens apresentaram 2,4 vezes maior (Anstey *et al.*, 2011).

Além disso, os dados de um estudo pós-mortem mostraram que os pacientes idosos com obesidade mórbida apresentaram maiores concentrações (em comparação com indivíduos não obesos) de proteína β -amiloide e tau no hipocampo, que são marcadores de doença de Alzheimer, do que aqueles que não eram obesos (Mrak, 2008).

As mudanças estruturais e diminuição da integridade do hipocampo podem ter como consequência os sintomas de insuficiência cognitiva leve ou até mesmo doença de Alzheimer. Pacientes com doença de Alzheimer apresentam atrofia no lobo temporal enquanto os pacientes com comprometimento cognitivo leve mostram um padrão similar, mas em menor grau do que aqueles com doença de Alzheimer. Da mesma forma, essa atrofia do hipocampo também é observada em indivíduos obesos (De Santi *et al.*, 2001; Gustafson *et al.*, 2004). O hipocampo e o córtex pré-frontal, regiões particularmente vulneráveis às mudanças relacionadas à obesidade, são essenciais para o aprendizado e a memória, sua redução de volume correlaciona-se com o declínio no desempenho da memória (Henneman *et al.*, 2009).

Corroborando os dados clínicos, inúmeros estudos experimentais usando modelos de animais obesos induzidos por dieta rica em gordura, revelaram modificações na estrutura e função do hipocampo, esses animais também apresentam deficiência no aprendizado e memória. A potenciação de longa duração (*Long Term Potentiation* ou LTP, em inglês) no hipocampo, considerada um mecanismo importante na aprendizagem e na memória, é prejudicada em modelos de roedores alimentados com dieta hiperlipídica (Stranahan *et al.*, 2008; Karimi *et al.*, 2013).

Experimentos *in vivo* mostram que a administração de dietas ricas em ácidos graxos saturados aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica. A lesão hipocampal em indivíduos obesos é causada pela microgliose reativa e aumento da

circulação de citocinas pró-inflamatórias, que ocorrem devido ao aumento da concentração de ácidos graxos e triglicerídeos livres (Callaghan *et al.*, 2012; Callaghan *et al.*, 2016). A diminuição da função cognitiva também está relacionada a resistência à insulina nos neurônios (Grillo *et al.*, 2015).

O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e dos marcadores pró-inflamatórios no hipocampo, incluindo a ativação microglial, são detectados em animais obesos que ingeriram dieta hiperlipídica por longos períodos (Jeon *et al.*, 2012). Ao longo do tempo, o aumento da permeabilidade permite a entrada em maior quantidade de citocinas, ácidos graxos livres e triglicerídeos que potencializam ainda mais a lesão do hipocampo culminando com posterior atrofia dessa região. Estes resultados fornecem uma ligação mecanicista entre a ruptura da barreira hematoencefálica e a diminuição da cognição vista em indivíduos obesos (Farr *et al.*, 2008).

1.7 Análogo do hormônio GLP-1 – Liraglutida

O GLP-1 é um hormônio secretado principalmente pelas células L do intestino delgado distal e do cólon em resposta à ingestão de alimentos. Pela sua atividade fisiológica, este hormônio é classificado como incretina (*intestinal secretion of insulin*) (Holst *et al.*, 2009). Esta classificação se baseia em um estudo realizado nos anos 60 (Elrick *et al.*, 1964), onde foi observado que a glicose administrada por via oral resulta em aumento muito maior da insulina plasmática do que a glicose administrada por via intravenosa. Este efeito ficou conhecido como “efeito incretina”.

A atividade do hormônio GLP-1 é mediada por um receptor próprio, o GLP1R, que é encontrado em diversos órgãos, como pâncreas, rins, coração, estômago, pulmões, intestinos, SNC e periférico. O principal uso terapêutico de agonistas do hormônio GLP-1 é em indivíduos diabéticos, pois a ativação do GLP1R no pâncreas causa aumento da secreção de insulina e supressão da secreção de glucagon, além de suprimir também a apoptose das células beta e estimular sua proliferação (Baggio e Drucker, 2007).

Após a secreção, o GLP-1 endógeno é rapidamente degradado (cerca de 1-2 minutos em humanos) pela DPP-4, e conseqüentemente esse peptídeo possui

potencial limitado para ser utilizado de forma terapêutica. A descoberta de que o GLP-1 poderia ser uma opção no tratamento de diabéticos estimulou a indústria farmacêutica a criar peptídeos sintéticos com ação similar ao hormônio GLP-1, porém com meia-vida prolongada (Unger e Parkin, 2011). Atualmente existem vários agonistas do GLP1R aprovados para tratamento de diabetes tipo 2 (DM2), os mais conhecidos são a exenatida (Byetta®; Eli Lilly & Co, Indianapolis, IN, EUA) administrada uma ou duas vezes ao dia em humanos, e a liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) administrada uma vez ao dia em humanos.

A liraglutida é um análogo do GLP-1 indicada para o tratamento de diabetes tipo 2 e obesidade, como adjuvante na dieta e exercício físico. A administração de liraglutida pode ser feita a qualquer hora do dia, independente dos horários de alimentação, por via subcutânea através de uma caneta multidoses. Seu uso foi aprovado na Europa em 2009 e, nos EUA e no Brasil em 2010, então muitas pesquisas ainda estão sendo realizadas e muitos efeitos pleiotrópicos ainda estão sendo descobertos.

A liraglutida possui, no que diz respeito à sequência de aminoácidos, 97% de identidade com o GLP-1 endógeno. Pequenas modificações na cadeia de aminoácidos permitiram uma maior afinidade de ligação à proteína albumina e diminuição da suscetibilidade à DPP-4, resultando em uma meia-vida plasmática de aproximadamente 13 horas em humanos (Bode, 2012; Hurren e Pinelli, 2012).

Juhl *et al.* (2002) verificaram que em humanos diabéticos uma única dose de liraglutida diminui a glicemia plasmática, aumenta a secreção de insulina e melhora os indicadores de disfunção das células beta em jejum. Bock *et al.* (2003) e Ellenbroek *et al.* (2013) verificaram que em ratos e camundongos a administração de liraglutida leva ao aumento da sensibilidade à insulina, tanto em animais do grupo controle alimentados com dieta padrão, como em animais obesos induzidos por dieta. Ellenbroek *et al.* (2013) verificaram ainda que em ambos os grupos, houve aumento da secreção de insulina durante o teste oral de tolerância à glicose e diminuição da glicemia apenas no grupo de animais obesos.

Através de cultura de ilhota pancreática, esses pesquisadores mostraram que os animais do grupo controle tratados com liraglutida apresentaram secreção basal de insulina aumentada quando comparada aos animais não tratados. Ellenbroek *et al.* (2013) sugeriram que em camundongos normoglicêmicos, a administração por seis semanas de liraglutida aumenta a secreção de insulina, melhorando a função

secretora das células beta já existentes, diminuindo assim, a proliferação de novas células.

A administração de liraglutida acarreta em alterações no controle central do balanço energético, de responsabilidade do hipotálamo, de modo que a administração de liraglutida é capaz de alterar o consumo alimentar e o gasto energético, causando perda de peso (Jelsing *et al.*, 2012; Flint *et al.*, 2013; Rotondo *et al.*, 2013; Barreto-Vianna *et al.*, 2016).

Em estudo com humanos obesos não diabéticos, foi mostrada perda de 4,8 a 7,2 kg de massa corporal, variando de acordo com a dose do medicamento. O mesmo estudo observou ainda diminuição na pressão arterial e diminuição dos marcadores de pré-diabetes, acompanhado com efeitos gastrointestinais indesejáveis, porém transitórios, como náuseas (Astrup *et al.*, 2009). A ocorrência de eventos gastrointestinais indesejáveis com o uso de liraglutida não é responsável pela perda de peso, uma vez que tal perda está presente mesmo em indivíduos que não apresentaram efeitos adversos (Niswender *et al.*, 2013). Em curto período de tratamento com liraglutida, quatro semanas, Horowitz *et al.* (2012) mostraram que houve diminuição da fome em jejum e da duração das refeições, com elevação não significativa do gasto energético, levando os autores a concluírem que a redução na massa corporal, cerca de 2 kg, foi resultado do efeito combinado sobre a ingestão de energia e o gasto energético.

Em ratos obesos e normais foi verificado que a administração de liraglutida nas doses 100 µg/kg e 200 µg/kg, duas vezes ao dia, induziu diminuição do apetite, acompanhada por diminuição da massa corporal (Larsen *et al.*, 2001). Kanoski *et al.* (2011) verificaram que a diminuição de apetite em ratos é um efeito tanto mediado pela via vagal aferente, quanto diretamente no sistema nervoso central, uma vez que animais vagotomizados também teriam o efeito anoréxico da administração de liraglutida, porém, demoraria um pouco mais para esse efeito acontecer (Kanoski *et al.*, 2011), ou seja, no primeiro instante a liraglutida ativaria a via vagal aferente e num segundo instante, o medicamento passaria pela barreira hematoencefálica (Hunter e Holscher, 2012) alcançando o hipotálamo.

Em trabalho anterior do nosso grupo, mostramos que a administração de liraglutida ativa as vias anorexigênicas centrais, principalmente através da modulação dos neurônios tipo POMC, diminuindo assim a ingestão de energia e aumentando o gasto energético. Vimos ainda que a liraglutida apresenta um

importante efeito neuroprotetor em camundongos obesos, onde houve a diminuição da microgliose e inibição da via apoptótica, esses benefícios da liraglutida ocorreram independentemente da perda de massa corporal, que foi observada a partir da segunda semana de tratamento (Barreto-Vianna *et al.*, 2016).

Pesquisas recentes mostraram que os agonistas do hormônio GLP-1 possuem a capacidade promissora de gerar neuroproteção contra distúrbios neurológicos, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e acidente vascular encefálico isquêmico (Porter *et al.*, 2010; Hyun Lee *et al.*, 2011; Parthasarathy e Holscher, 2013a; Porter *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Holscher, 2014; Zhu *et al.*, 2016)

No cérebro, os receptores GLP-1 são expressos pelos neurônios, em particular nos neurônios piramidais no hipocampo e neocórtex, nas células de Purkinje no cerebelo e no hipotálamo (During *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2007; Hamilton e Holscher, 2009). No hipocampo, estudos têm mostrado que agonistas GLP-1, como Val8GLP-1, liraglutide e exendin-4 possuem efeitos benéficos na formação da memória e na plasticidade sináptica, além de proteger o hipocampo dos efeitos prejudiciais que as placas de β -amilóide têm na plasticidade sináptica no hipocampo (McClellan *et al.*, 2010; Long-Smith *et al.*, 2013; Parthasarathy e Holscher, 2013a). Além disso, os miméticos GLP-1 podem proteger sinapses dos efeitos prejudiciais que o β -amilóide tem na plasticidade sináptica (McClellan *et al.*, 2010; Gault *et al.*, 2011). A maioria dos agonistas do GLP-1 pode atravessar a barreira hematoencefálica (Kastin e Akerstrom, 2003; McClellan *et al.*, 2011; Barreto-Vianna *et al.*, 2016), uma propriedade de vital importância para tratar distúrbios neurodegenerativos do sistema nervoso central.

Estudos *in vitro* mostram que os agonistas GLP-1 podem diminuir a secreção e a acumulação de depósitos de β -amilóide, reduzir a morte celular induzida pelos depósitos, além de diminuir a toxicidade e os níveis de proteína precursora de amilóide (Perry *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2008). Da mesma forma, o tratamento *in vivo* com os análogos de GLP-1 exenatide, liraglutide e lixisenatide demonstrou reduzir a hiperfosforilação de tau (Chen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015), a quantidade de placas β -amilóide e os níveis solúveis de β -amilóide em uma variedade de modelos de doença de Alzheimer, contrariando seus efeitos tóxicos e levando a melhorias na aprendizagem e na memória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar no hipotálamo e hipocampo de camundongos C57BL/6, os efeitos da infusão intracerebroventricular de ácido graxo saturado (palmitato) e tratamento com o agonista do hormônio GLP-1 (liraglutida).

2.2 Objetivos específicos

- a. Induzir neuroinflamação através da infusão intracerebroventricular de palmitato em camundongos da linhagem C57BL/6;
- b. Avaliar os efeitos do tratamento com liraglutida infundida pela via subcutânea;
- c. Acompanhar a evolução da massa corporal e da ingestão alimentar nos animais durante todo período experimental;
- d. Avaliar a resistência à insulina e tolerância à glicose através do teste intraperitoneal de tolerância à insulina e do teste oral de tolerância à glicose;
- e. Analisar a expressão protéica e/ou gênica, verificando possíveis alterações entre importantes alvos da via que regula o consumo alimentar e o balanço energético no hipotálamo, além da análise das vias controladas pelo hipotálamo relativo à termogênese pelo tecido adiposo marrom e lipogênese/lipólise do tecido adiposo branco;
- f. Avaliar a inflamação no hipocampo, através da expressão protéica e/ou gênica de marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios e através da análise morfológica das micróglia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Todos os procedimentos realizados neste trabalho seguiram as diretrizes atuais para a experimentação animal (Publicação NIH No. 85-23, revisada em 2011) e os protocolos de experimentais com animais foram aprovados pelo comitê de ética animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo 030/2014).

Camundongos machos C57BL/6 foram mantidos em condições controladas no sistema NexGen (Allentown Inc., PA, EUA, 12 h / 12 h, ciclo escuro/claro). Aos três meses de idade, os animais foram alojados individualmente, com livre acesso a alimentos e água. A dieta padrão seguiu o preconizado pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (Reeves et al., 1993).

Inicialmente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 40 em cada grupo) e receberam infusão ICV de líquido artificial (aCSF) ou palmitato (#5710-3, Cayman Chemical Company, MI, EUA):

- a) Grupo Controle (C): infusão ICV de aCSF;
- b) Grupo Palmitato (P): infusão ICV de palmitato.

Duas semanas após a cirurgia para implantação da cânula acoplada à bomba de infusão ICV, os animais foram redistribuídos em quatro grupos (n = 20 por grupo). Cada grupo inicial (C e P) foi dividido em dois novos grupos, onde os animais foram tratados com infusão subcutânea (SC) de solução salina ou liraglutida (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) através de bomba osmótica (conforme descrito a seguir) e mantiveram-se por mais duas semanas até a eutanásia. O nome dos grupos recebeu letras, onde a primeira delas faz referência ao grupo que foi formado inicialmente (C ou P) e, em seguida, denominamos o tratamento (C ou L), da seguinte forma (Figura 1):

- c) Grupo C/C: infusão ICV de aCSF / infusão SC de solução salina;
- d) Grupo C/L: infusão ICV de aCSF / infusão SC de liraglutida;

- e) Grupo P/C: infusão ICV de palmitato / infusão SC de solução salina;
 f) Grupo P/L: infusão ICV de palmitato / infusão SC de liraglutida.

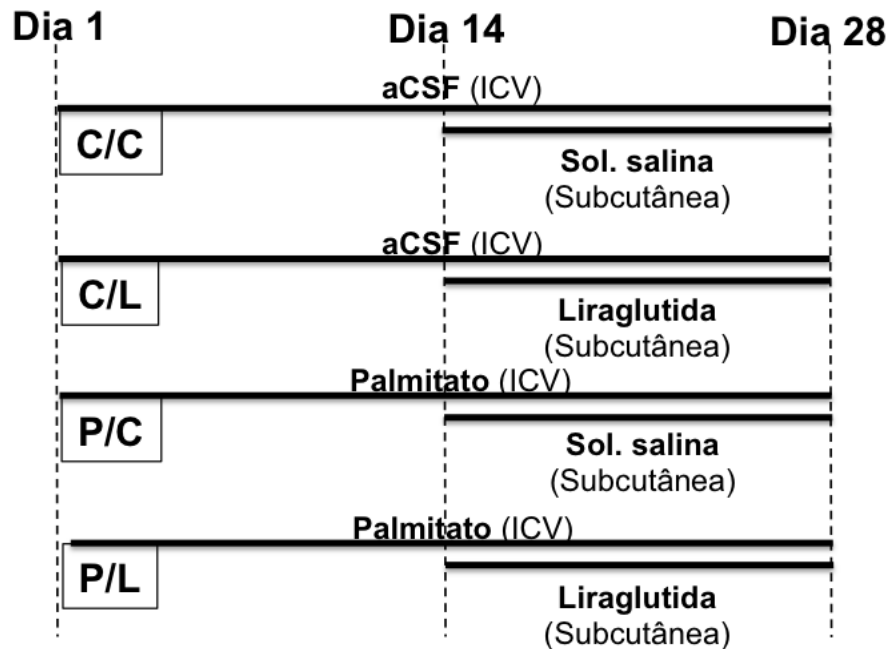


Figura 1. Desenho experimental. A cirurgia foi realizada no dia 1 para a implantação de cânula intracerebroventricular (ICV) acoplada à bomba osmótica para infusão de aCSF (grupos C/C e C/L) ou palmitato (grupos P/C e P/L). A infusão ICV foi realizada de forma contínua, do dia 1 ao dia 28. No dia 14, foi realizada a segunda cirurgia para implantação da bomba osmótica de infusão subcutânea com solução salina nos grupos C/C e P/C ou liraglutida nos grupos C/L e P/L. A infusão SC foi realizada de forma contínua do dia 14 ao dia 28. No dia 28 os animais foram sacrificados.

3.2 Infusão intracerebroventricular de palmitato

Os animais foram anestesiados (administração intraperitoneal de cetamina, 90 mg/kg e xilazina, 10 mg/kg) e colocados em uma plataforma para cirurgia estereotáxica (Insight, Ribeirão Preto, SP). Assim, implantamos uma cânula esterilizada (Alzet Brain Infusion, Kit 3) no ventrículo lateral esquerdo, de acordo com as coordenadas estereotáxicas (rostrocaudal: -0,22 mm; mediolateral: +1 mm; dorsoventral: -2,5 mm, usando como referência o Bregma (Paxinos e Franklin, 2001). A cânula foi fixada ao crânio com adesivo de cianoacrilato e conectada por um cateter de vinil à bomba osmótica Alzet (Alzet Corporations, Palo Alto, CA, modelo 1004), que foi inserida no compartimento subcutâneo, na região dorsal do camundongo. A bomba utilizada possuía a taxa de secreção de 0,11 μ l/h, de acordo com as diretrizes do fabricante e foi previamente preenchida com aCSF (250 μ M) ou palmitato (500 μ M).

A dose de palmitato foi escolhida com base na literatura. Nesta dose, o palmitato é capaz de mimetizar no SNC efeitos comparados com o apresentado pelos animais alimentados com alto teor de gordura, sem alterar a massa de tecido adiposo e a ingestão alimentar durante um período de duas semanas, porém, afetando a resistência à insulina (Kleinridders et al., 2009). Dessa forma, escolhemos utilizar neste trabalho a mesma dose, porém prolongamos a infusão ICV de palmitato por quatro semanas (ao invés de 2 semanas, como visto no trabalho de Kleinridders et al. (2009)). Devido à insolubilidade do palmitato em solventes polares, adicionamos ciclodextrina (hidroxipropil-beta-ciclodextrina, # 297560250, Acros Organics, Bélgica) na solução aCSF. O palmitato, na formulação sólida cristalina, foi diluído em aCSF com 40% m/v de ciclodextrina para obter a solução final de 500 μ M de palmitato. A ciclodextrina na mesma concentração também foi adicionada à solução de aCSF utilizada nos grupos C/C e C/L (uma vez que a ciclodextrina é um veículo adequado para a distribuição central de ácidos graxos). Antes de preencher a bomba osmótica com o palmitato solubilizado, a solução foi filtrada através de um filtro com malha de 0,22 μ m.

3.3 Infusão subcutânea de liraglutida

As bombas osmóticas (Alzet Corporations, Palo Alto, CA, modelo 1004) para infusão SC foram preenchidas com solução salina (veículo) ou liraglutida (200 µg/kg, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca). Para a implantação das bombas osmóticas de veículo ou liraglutida, os animais foram anestesiados com isoflurano (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi aberto um compartimento na região dorsal dos animais e a bomba foi implantada ao lado da bomba de infusão ICV. As feridas foram limpas e tratadas com pomada antibiótica (Neomicina + Bacitracina) durante 3 a 5 dias.

3.4 Massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital de precisão 0,01 g (BL-3200H), sempre no mesmo dia da semana e no mesmo horário. A massa corporal média dos grupos foi calculada para fins comparativos.

O controle da ingestão alimentar foi realizado através da quantidade fornecida subtraída pelo resto do dia anterior e a ração remanescente não foi reutilizada.

3.5 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI)

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado ao final do experimento, após os animais passarem por um período de seis horas de jejum. Amostras de sangue para determinação da concentração de glicose plasmática foram obtidas após uma pequena incisão na ponta da cauda. Em seguida, uma solução de glicose (1,0 g/kg) foi administrada por gavagem orogástrica. A concentração de glicose plasmática foi aferida antes da administração de glicose e

nos tempos subsequentes: 15, 30, 60 e 120 minutos, utilizando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnósticos, Alemanha).

O teste intraperitoneal de tolerância à insulina (TITI) foi realizado na última semana do experimento, após os animais estarem com quatro horas de jejum alimentar. Após a determinação da concentração de glicose plasmática de jejum, a insulina (Humalog Lispro, Lilly) foi administrada na dose de 0,5 UI/kg, via intraperitoneal. Em seguida, amostras de sangue da cauda foram coletadas aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de insulina. As concentrações de glicose no sangue foram medidas com um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnósticos, Alemanha).

A área sob a curva (ASC) foi calculada em unidades arbitrárias (u.a.) para ambas as análises considerando o tempo total de zero a 120 minutos. Para tanto, utilizou-se a ferramenta trapezoidal do programa GraphPad Prisma (versão 6.02 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) com objetivo de avaliar a tolerância à glicose e a resistência à insulina.

3.6 Coleta de sangue

Ao final da 4ª semana de experimento os animais receberam por via intraperitoneal administração de heparina sódica (0,03 ml), seguida por sobredose de cetamina e xilazina. O animal profundamente anestesiado foi colocado em decúbito dorsal e sua cavidade torácica foi exposta. O sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma foi separado por centrifugação (120 g por 15 min) em temperatura ambiente, imediatamente aliqotado, congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer a -80°C para posterior análise.

3.7 Microscopia de luz e confocal

Para imunofluorescência (n = 5 / grupo), os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com a solução salina a 0,9%, e depois com paraformaldeído a 4% (PFA, tampão fosfato 0,1 M, PBS, pH 7,4). Os cérebros isolados foram imediatamente imersos em uma solução de 4% de PFA (por 4 h a 4°C) e depois crioprotetidos com sacarose com concentrações crescentes de 10% a 30% em PBS (por 12 h a 4°C). O encéfalo foi congelado em meio específico (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europa) e exaustivamente seccionado com criostato em espessura de 20 µm, contendo todo o hipotálamo e o hipocampo. As secções foram tratadas com solução a 0,3% de PBS-Triton e bloqueadas com 5% de albumina sérica bovina (BSA) durante 1 h. Após o bloqueio, as secções foram incubadas durante 12 horas a 4°C com os seguintes anticorpos primários:

- a) POMC (H02930, Phoenix Pharmaceuticals, USA, CA 1:60)
- b) NPY (SC-28943, Santa Cruz, EUA, TX, 1:100),
- c) IBA-1 (019-19741, Wako Chemicals, VA, 1:600),
- d) MHC-II (NB100-65541, Novus Biologicals, USA, CO, 1:50),
- e) GFAP (C9269, Sigma-Aldrich, USA, MO, 1:200),
- f) TNF-alpha (SC-1350, Santa Cruz, USA, TX, 1:50).

Após a exposição do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Alexa Fluor, Life Technologies).

Os núcleos foram marcados com dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), e as lâminas montadas em meio ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA) e cobertas com lamínulas de vidro. Os procedimentos de controle foram realizados com a omissão de anticorpos primários e com a inclusão do anticorpo secundário. As imagens de fluorescência foram obtidas com o microscópio laser confocal Modelo C2 (Nikon Inc., Tóquio). Foram realizadas cinco imagens contendo o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (n = 5 em cada grupo) e as quantificações da imunorreatividade foram avaliadas usando o software Image J (versão 1.50i, 64bit, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

As quantificações de imunorreatividade foram avaliadas usando o software Image J, onde foi definida a região de interesse e o canal do confocal correspondente à proteína marcada foi mensurado. Os resultados foram apresentados como uma porcentagem do grupo C/C.

A ativação de micróglia foi avaliada por imunofluorescência com IBA-1 e subsequentemente confirmada por uma expressão aumentada do marcador de ativação MHC-II, que é expresso pela micróglia ativada.

O tecido adiposo branco epididimário foi dissecado e mantido em solução fixadora (formaldeído a 4% p/v, tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,2) durante 48 h à temperatura ambiente e depois incorporado em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os blocos foram cortados com uma espessura nominal de cinco micrômetros e corados com hematoxilina e eosina.

A estereologia foi utilizada para estimar a área seccional média dos adipócitos como a relação entre a densidade de volume dos adipócitos (V_v [adipócitos] determinada pela contagem de pontos) e o dobro da densidade numérica por área de adipócitos (Q_A [adipócito]). Q_A [adipócito] é a relação entre o número de adipócitos contados em um quadro de área conhecida sem atingir a "linha proibida" e a área teste (Gundersen, 1977; Mandarim-de-Lacerda, 2003).

3.8 Densidade e análise morfológica das micróglias

IBA-1 é uma proteína específica de micróglia. As sub-regiões CA1 e giro dentado (GD) do hipocampo foram analisadas sobre uma grade de área conhecida (AT). A densidade numérica por área (NA) de células imunorreativas foi estimada contando o número de células marcadas (N) em quatro lâminas por animal ($n = 5$ animais / grupo): $NA = N / AT$ (Mandarim-de-Lacerda et al., 2010). Utilizamos as lâminas imunocoradas com IBA-1 para analisar a morfologia das micróglias no hipocampo, e os parâmetros foram analisados para, pelo menos, 15 células por lâmina (quatro lâminas por animal, $n = 5$ / grupo).

Para visualização dos ramos das micróglias, a intensidade máxima do canal referente à imunomarcção positiva do IBA-1 em microscopia confocal foi regulada, seguida de remoção dos ruídos fluorescentes do fundo da imagem (Morrison e

Filosa, 2013). A imagem foi binarizada, esqueletonizada e a imagem resultante foi analisada usando o plug-in ImageJ AnalyzeSkeleton (criado por Ignácio Arganda-Carreras, <http://imagej.net/AnalyzeSkeleton>). Além disso, a circularidade e o diâmetro de Feret (diâmetro máximo da estrutura) foram estimados. A circularidade foi calculada como o produto 4π (área/perímetro²) (Zanier et al., 2015). Todas as regiões de cada subcampo do hipocampo foram incluídas nas análises (por exemplo para o giro denteado foram incluídas as camadas molecular, granular e o hilo).

3.9 Análise plasmática de GLP-1 e insulina

O plasma foi separado por centrifugação (120 G durante 15 min) à temperatura ambiente e armazenado a -80 ° C até os testes bioquímicos serem realizados. A concentração plasmática dos hormônios foi analisada em duplicata usando o kit específico de ensaio de imunoabsorção enzimática usando o equipamento TP-READER Thermoplate (Bio Tek Instruments, Inc Highland Park, EUA): GLP-1 ELISA Kit Cat. # EZGLP1T-36K (Millipore, Missouri, EUA) e Insulina ELISA Kit Cat. # EZRMI-13K (Millipore, Missouri, EUA).

3.10 Real-time PCR

A expressão do mRNA dos tecidos hipotálamo, tecido adiposo marrom e hipocampo foi medida por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR). O RNA total dos tecidos foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, CA, EUA). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 RPM, durante 10 minutos a 4 °C) e a porção correspondente ao extrato de RNA foi reservada. A essa porção foram adicionados 500 µL de isopropanol que reagiu por dez minutos para que o RNA precipitasse e logo após foi centrifugado (11.200 RPM, durante 10 min, a 4°C). O isopropanol foi retirado, o pellet formado foi ressuspendido com 500 µL de etanol 75% e, logo após, centrifugado (11.200 RPM, durante cinco minutos a 4°C). O etanol

foi retirado e o pellet ressuspendido em 20 μ L de água deionizada (MilliQ). As amostras foram submetidas ao banho seco (50°C, por 5 min) e quantificadas no equipamento Nanovue (GE Life Sciences). O produto final, já quantificado, foi diluído na proporção 1:100 em água MilliQ.

Para transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA), 1,0 μ g de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, CA, EUA), e a primeira cadeia de DNAc foi sintetizada utilizando os iniciadores oligo (dT) para RNAm e o kit SuperScript III (Invitrogen, CA, EUA). O RT-qPCR foi realizado utilizando termociclador BioRad CFX96 e mix SYBRGreen (Invitrogen, CA, EUA). As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (95 °C durante 4 min), com subsequentes 44 ciclos, cada um a 95 °C durante dez segundos e a 60 °C durante 15 segundos. A especificidade da amplificação foi determinada por meio de curvas de fusão (60 a 95 °C, com uma taxa de aquecimento de 0,1 °C/s). A expressão gênica da proteína constitutiva beta-actina foi quantificada em todas as amostras, sendo então utilizada como controle endógeno para normalização do RNAm. Os sinais foram quantificados utilizando o método $\Delta\Delta$ Ct para estimar a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e do controle endógeno. Os iniciadores (primers) para RT-PCR estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados no RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica

| Gene | Sequência 5'→3' | Sequência 3'→5' |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>β-actina</i> | TGTTACCAACTGGGACGACA | GGGGTGTGAAGGTCTCAA |
| <i>IL-1β</i> | ACGGATTCCATGGTGAAGTC | CTCACAAGCAGAGCACAAGC |
| <i>NPY</i> | TGGA CTGACCCTCGCTCTAT | TAGTGTCGCAGAGCGGAGTA |
| <i>CART</i> | CTACTCTGCCGTGGATGATG | AGGACTTCTTCTTGCAACGCTTC |
| <i>IL-6</i> | AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA | ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT |
| <i>TNF-α</i> | TCAGCCGATTTGCTATCTCA | TGGAAGACTCCTCCCAGGTA |
| <i>IL-10</i> | CCAGAGCCACATGCTCCTAGA | GGTCCTTTGTTTGAAAGAAAGTCTTC |
| <i>CD-36</i> | CCCTCCAGAATCCAGACAAC | TGCATTTGCCAATGTCTAGC |
| <i>PLIN-2</i> | AATATGCACAGTGCCAACCA | CGATGCTTCTCTTCCACTCC |
| <i>TFAM</i> | GAAGAACGCATGGAGGAGAG | TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT |

Abreviações: Beta-actina (*β-actina*); Interleucina-1beta (*IL-1 β*); Neuropeptídeo Y (*NPY*); Transcrito regulado por cocaína e anfetamina (*CART*); Interleucina-6 (*IL-6*); Fator de necrose tumoral (*TNF-α*); Interleucina-10 (*IL-10*); Grupo de diferenciação-36 (*CD-36*); Perilipina-2 (*PLIN-2*); Fator de transcrição mitocondrial A (*TFAM*).

3.11 Western blotting

Os camundongos foram anestesiados e decapitados para análise de níveis de proteína. Imediatamente após a decapitação, o hipotálamo e os tecidos adiposos branco e marrom foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer (-80° C) até o uso.

Para a análise protéica do hipotálamo, as proteínas de todo o tecido foram extraídas e homogeneizadas com tampão de lise HEPES e inibidores de protease e fosfatase, sendo centrifugado (10.000 RPM por 30 min) e o sobrenadante recolhido. Já para a análise protéica dos tecidos adiposos branco e marrom, foram separados aproximadamente 40 mg de tecido que foi homogeneizado em tampão de lise RIPA, acrescido de inibidores de protease e fosfatase e centrifugado (10.000 RPM por 20 min) para separação do sobrenadante.

Em ambos os tecidos, a concentração total de proteínas foi determinada utilizando kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Após desnaturação (5 min a 95 °C), quantidades iguais de proteínas (70 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 – 12% SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). A membrana foi então bloqueada em 5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA, ambos diluídos em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCl] em temperatura ambiente, durante 2 horas para evitar ligações inespecíficas.

Foram utilizados os seguintes anticorpos: contra beta3-AR (sc-1473, Santa Cruz, EUA, TX.), UCP-1 (sc-6529, Santa Cruz, EUA, TX.), HSL (sc-25843, Santa Cruz, EUA, TX.), HSL phospho-Ser 660 (orb335694, Biorbyt, EUA, Ca), NFκB (sc-109, Santa Cruz, EUA, TX.), IκBα (sc-847, Santa Cruz, EUA, TX.), SOCS-3 (SC-7009, Santa Cruz, EUA, TX.), POMC (SC-20148, Santa Cruz, EUA, TX.), NPY (SC-28943, Santa Cruz, EUA, TX.), TNF-α (sc-1350, Santa Cruz, EUA, TX.), ERK1 / 2 (sc-135900, Santa Cruz, EUA, TX.), ERK1 / 2 fosforescente (sc-81492, Santa Cruz, EUA, TX.), JNK (sc-7345, Santa Cruz, EUA, TX.), JNK phospho-Thr 183 / Tyr 185 (sc-12882, Santa Cruz, EUA, TX.). Adiponectina (Ab62551, Abcam, Cambridge, Reino Unido), beta- Actina (SC-81178, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A membrana foi feita usando ECL, e as imagens das manchas foram obtidas usando o Sistema de aquisição de imagem ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA). A intensidade da quimioluminescência foi analisada com ECL e as bandas foram quantificadas

usando o software ImageJ, versão 1.50i, 64bit, <http://imagej.nih.gov/ij/>. Os anticorpos ligados nas membranas foram removidos e reabastecidos com outro anticorpo.

Depois de incubada com anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico para a origem do anticorpo primário, durante uma hora em temperatura ambiente. A expressão das proteínas foi detectada por meio de um sistema de detecção de quimiluminescência com ECL e as imagens das bandas foram obtidas com o sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas quimioluminescentes foi quantificada utilizando o software ImageJ, versão 1.47 (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA).

O complexo de ligação do anticorpo foi desfeito e a membrana foi remarcada com beta-actina como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos pelo Western blotting.

3.12 Análise estatística

Testamos os dados para distribuição normal (teste Shapiro-Wilk) e igualdade de grupos (teste Brown-Forsythe). Os dados estão apresentados como média e desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram analisadas por pelo teste de variância unidirecional (*one-way* ANOVA) seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Prism versão 6.0c para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

CAPÍTULO 1

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal e consumo alimentar

No início do experimento os animais não apresentavam diferença em sua massa corporal. Após 4 semanas, a massa corporal do grupo P/C ($32,1 \pm 2,5$ g) foi estatisticamente maior que a massa corporal dos grupos C/C ($28,5 \pm 2,7$ g, $P = 0,0054$) e C/L ($29,2 \pm 2,9$ g, $P = 0,0276$). Não houve diferença na massa corporal entre os grupos C/C e C/L, nem comparando o grupo P/L ($30,5 \pm 2,7$ g) com os demais grupos. O consumo alimentar foi aferido diariamente e apresentou diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Comportamento alimentar, massa corporal, análise hormonal e metabolismo de carboidratos. Valores representados em média \pm DP, n= 5-15 por grupo. Diferenças significativas ($P < 0.05$), foram determinadas por *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak: grupo C/C [†], grupo C/L [‡] e grupo P/C [§].

| Parâmetros | C/C | C/L | P/C | P/L |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Consumo alimentar (g/semana/animal) | $4,2 \pm 0,39$ | $4,2 \pm 0,34$ | $4,1 \pm 0,36$ | $4,2 \pm 0,36$ |
| Massa corporal (g) | $28,5 \pm 2,75$ | $29,2 \pm 2,97$ | $32,1 \pm 2,50$ †‡ | $30,5 \pm 2,75$ |
| GLP-1 ativo (pg/mL) | $111,5 \pm 7,59$ | $155,1 \pm 35,77$ † | $92,3 \pm 10,42$ ‡ | $153,1 \pm 28,81$ †§ |
| Insulina (pg/mL) | $677,0 \pm 287,5$ | $956,0 \pm 340,1$ | $1280,0 \pm 555,6$ † | $1183,0 \pm 336,8$ † |
| TOTG (ASC) | $164,3 \pm 19,07$ | $178,3 \pm 7,87$ | $203,8 \pm 9,23$ † | $185,0 \pm 14,54$ |
| TITI (ASC) | $105,0 \pm 5,43$ | $91,13 \pm 4,86$ | $132,8 \pm 16,2$ †‡ | $116,6 \pm 16,65$ ‡ |

Abreviações: Peptídeo similar ao glucagon (GLP-1); Área sob a curva (ASC); Teste oral de tolerância à glicose (TOTG); Teste intraperitoneal de tolerância a insulina (TITI).

4.2 Níveis plasmáticos de GLP-1 e insulina

Os animais do grupo C/L apresentaram aumento no nível plasmático de GLP-1 em comparação aos animais do grupo C/C (+39%: $P = 0,0193$). Da mesma forma, os animais do grupo P/L apresentaram os níveis plasmáticos de GLP-1 aumentados em relação aos animais do grupo P/C (+66%: $P = 0,0013$) porém, não foi observada diferença entre os animais dos grupos C/C e P/C (Tabela 2).

A infusão ICV de palmitato aumentou os níveis plasmáticos de insulina e o tratamento com liraglutida não diminuiu esses níveis. Os níveis de insulina foram 89% maiores no grupo P/C ($P = 0,0126$) e 74% maiores no grupo P/L ($P = 0,0274$) em relação ao grupo C/C (Tabela 2).

4.3 Teste oral de tolerância à glicose e teste intraperitoneal de tolerância à insulina

O TOTG indicou intolerância à glicose no grupo P/C com maior área sob a curva (+24%, $P = 0,0080$) do que a apresentada pelo grupo C/C. A liraglutida diminuiu a área sob a curva no grupo P/L em comparação com o grupo P/C (-10%), embora sem significância estatística (Tabela 2).

Do mesmo modo, a infusão ICV de palmitato afetou o TITI, onde observamos um aumento na área sob a curva do grupo P/C (+ 26%, $P = 0,03$) em comparação com o grupo C/C. A liraglutida diminuiu a área sob a curva, indicando melhora na sensibilidade à insulina (Tabela 2).

4.4 Hipotálamo

Medimos as expressões de proteínas e genes de neuropeptídeos relacionados ao controle do metabolismo energético (NPY, POMC e CART) para compreender os efeitos da infusão ICV de palmitato no hipotálamo. Também avaliamos no hipotálamo os marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (TNF-alfa, IL-1beta, IL-10 e IL-6), assim como proteínas

relacionadas com a resistência à insulina (NF- κ B, I κ B α e SOCS3). Dessa forma, podemos verificar se a resistência à insulina sistêmica demonstrada pelo TITI também reflete em resistência hipotalâmica à insulina.

4.4.1 Neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados a regulação do metabolismo

A infusão ICV de palmitato não afetou os níveis gênicos do neuropeptídeo CART, mas reduziu a expressão da proteína POMC nos animais do grupo P/C (-22%, $P = 0,0343$) em comparação com os animais do grupo C/C. O tratamento com liraglutida aumentou a expressão da proteína POMC nos animais do grupo C/L (+29%, $P = 0,0078$) em comparação com os animais do grupo C/C, essa proteína também foi aumentada nos animais do grupo P/L em comparação aos animais do grupo P/C (+25%, $P = 0,0395$), este resultado mostra que a liraglutida é capaz de modular positivamente o neuropeptídeo POMC independentemente se o animal recebeu ou não infusão ICV de palmitato. (Figura 2).

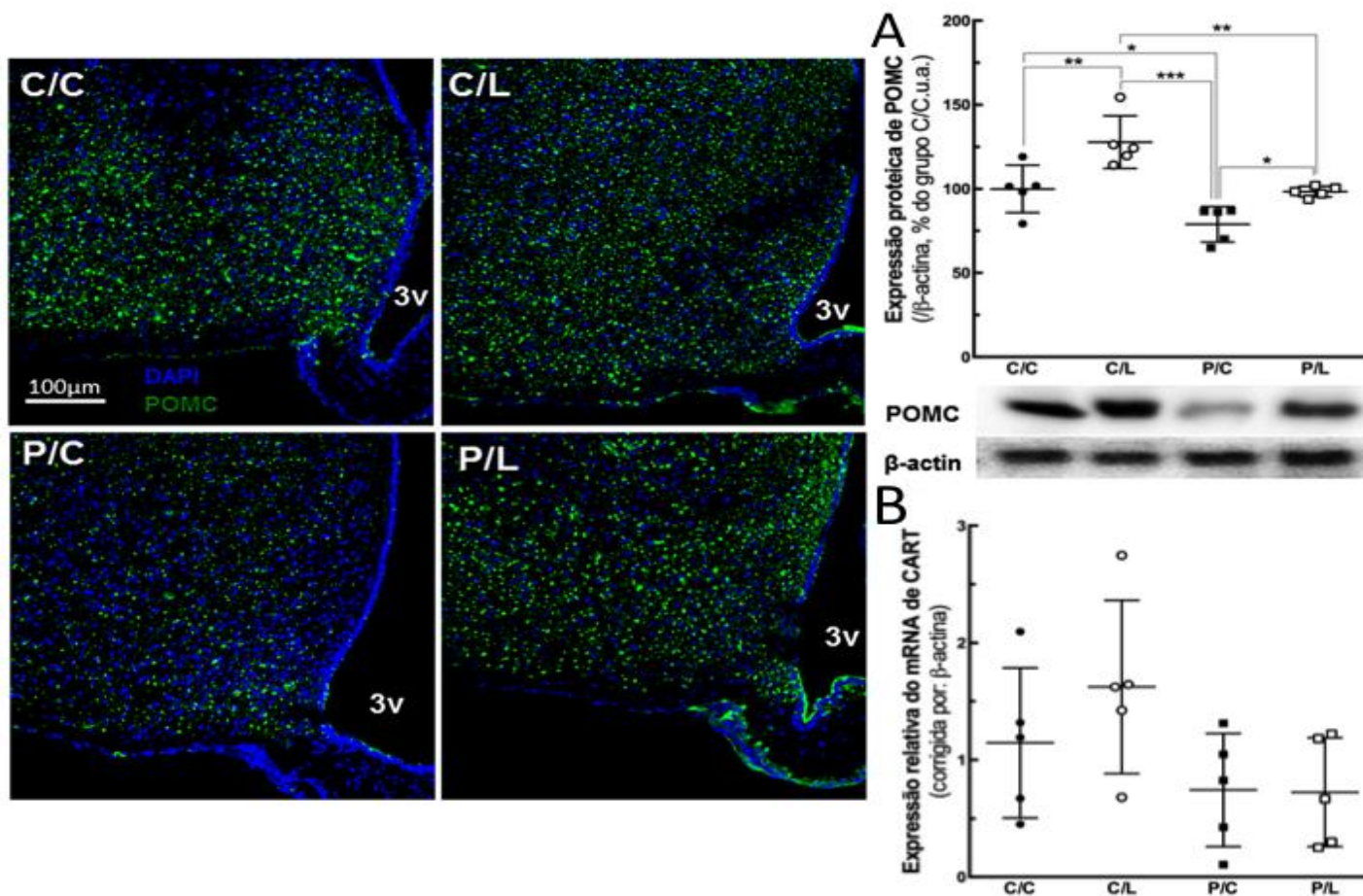


Figura 2. O palmitato modula a via anorexigênica no hipotálamo. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal do hipotálamo imunomarcado com anticorpo anti-POMC (verde) e DAPI (azul). **A** - Análise por Western blotting mostrando que o palmitato diminuiu os níveis proteicos do neuropeptídeo POMC no hipotálamo. **B** - Análise por RT-PCR mostrando que não houveram diferenças nos níveis gênicos do neuropeptídeo CART. As diferenças significativas (*One-way* ANOVA e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea. 3v = terceiro ventrículo.

A infusão ICV de palmitato aumentou significativamente os níveis proteicos e gênicos do NPY. Nos animais do grupo P/C observamos que os níveis proteicos de NPY aumentaram (+26%, $P = 0,04$) em relação aos animais do grupo C/C. Esse aumento foi revertido pela tratamento com liraglutida, como observado nos animais do grupo P/L em comparação aos animais do grupo P/C (-66%, $P = 0,02$). A expressão do gene NPY foi maior no grupo P/C (+200%, $P = 0,0002$) em relação ao grupo C/C e menor no grupo P/L (-60%, $P = 0,0009$) em relação ao grupo P/C (Figura 3).

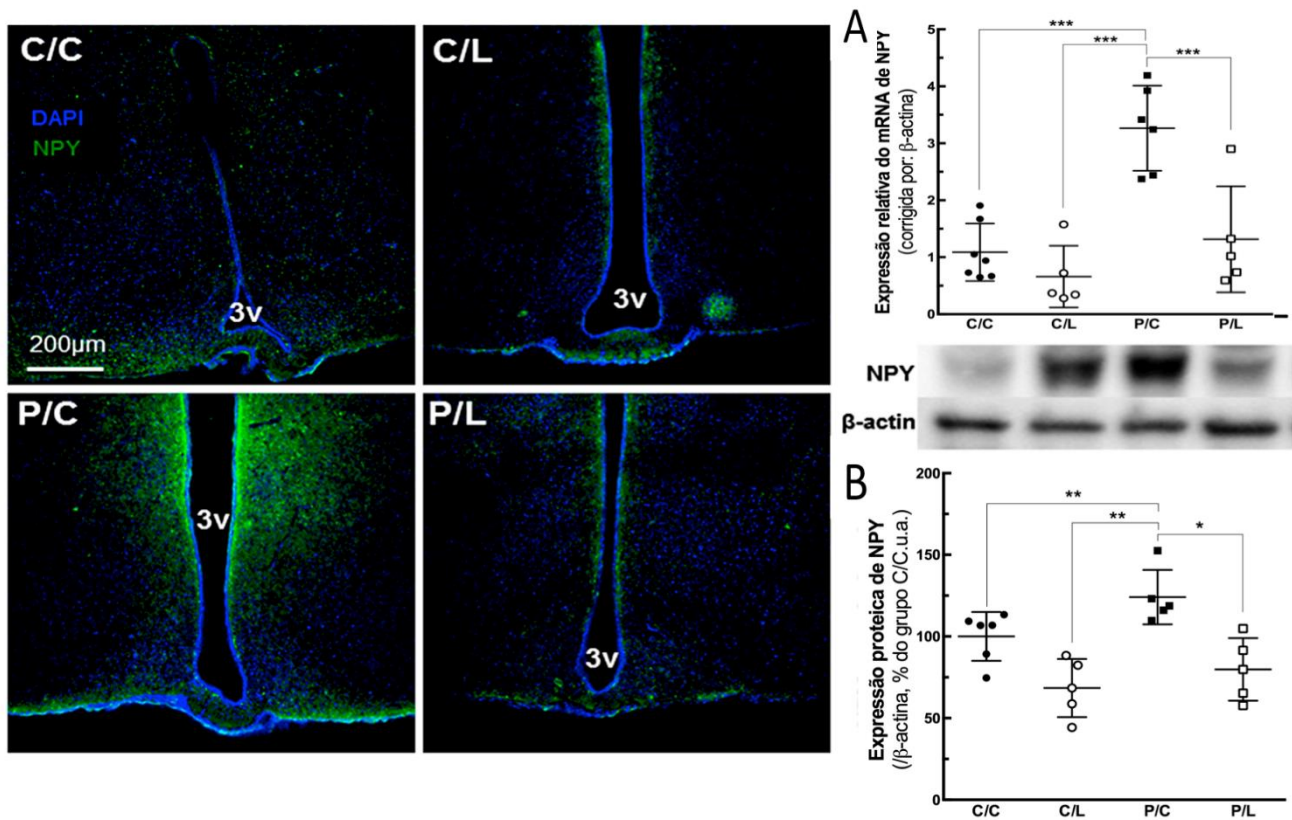


Figura 3. O palmitato modula a via orexigênica no hipotálamo. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal do hipotálamo imunomarcado com anticorpo anti-NPY (verde) e DAPI (azul). As análises por RT-PCR (**A**) e Western blotting (**B**) mostraram que a infusão ICV de palmitato aumentou os níveis gênicos e proteicos de NPY no hipotálamo. As diferenças significativas (*One-way* ANOVA e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea. 3v = terceiro ventrículo.

4.4.2 Perfil inflamatório no hipotálamo

A infusão ICV de palmitato estimulou a resposta inflamatória no hipotálamo, com o aumento das citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-1beta, e sem qualquer alteração nos níveis de IL-10, que tem efeito anti-inflamatório e IL-6, que tem propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

As citocinas TNF-alfa e IL-1beta, ambas potentes agentes pró-inflamatórios, aumentaram respectivamente 195% ($P = 0,003$) e 102% ($P = 0,02$) devido ao palmitato (como observado no grupo P/C). Assim, o palmitato estimulou a cascata pro-inflamatória no hipotálamo. A liraglutida teve sucesso em reduzir a ativação exacerbada do estímulo pró-inflamatório, já que tanto os níveis de TNF-alfa quanto os níveis de IL-1beta presentes nos animais do grupo P/L atingiram os valores similares aos dos animais do grupo C/C (Figura 4).

A infusão ICV de palmitato não alterou os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, porém nos animais do grupo P/L o tratamento com liraglutida aumentou (+85%, $P = 0,006$) a IL-10 em comparação com aos níveis do grupo P/C, indicando que a liraglutida estimulou a via anti-inflamatória. A IL-6, que possui tanto função neuroinflamatória, como função neuroprotetora, não apresentou diferença entre os grupos.

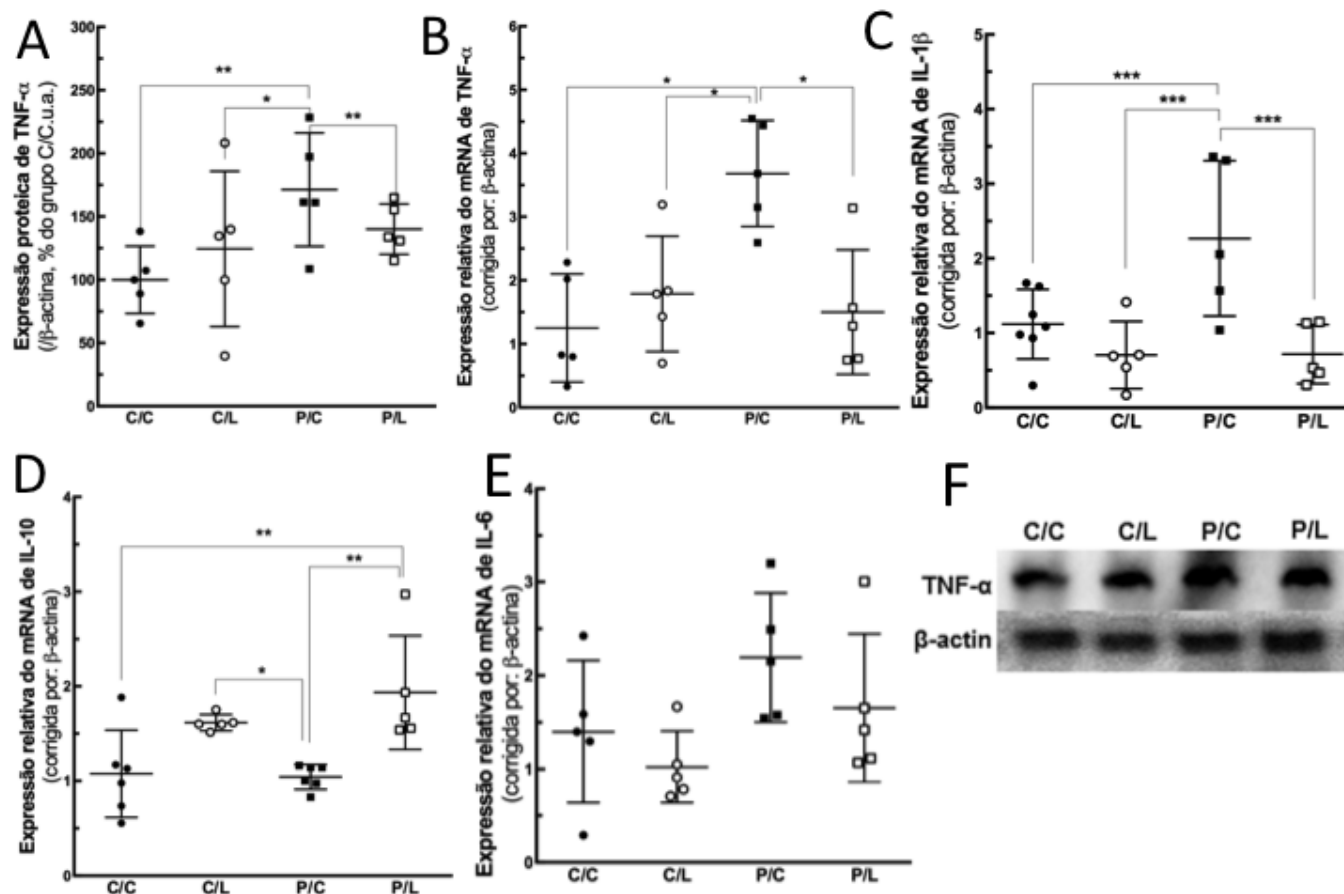


Figura 4. O palmitato estimula a via pró-inflamatória no hipotálamo. **A** - Análise por Western blotting dos níveis proteicos de TNF- α . **B** - Análise por RT-PCR dos níveis gênicos de TNF- α . **C** - Análise por RT-PCR dos níveis gênicos de IL-1 β . **D** - Análise por RT-PCR dos níveis gênicos de IL-10. **E** - Análise por RT-PCR dos níveis gênicos de IL-6. **F** - Bandas representativas do western blotting. As diferenças significativas (*One-way ANOVA* e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

4.4.3 Resistência hipotalâmica à insulina

A infusão ICV de palmitato aumentou os níveis de NFκB e IκBα. O NFκB está envolvido na ativação do SOCS-3 que, por sua vez, participa na sinalização de insulina. Através de um mecanismo de feedback negativo o SOCS-3 diminui a sensibilidade à insulina. No presente estudo, verificamos que a infusão ICV de palmitato aumentou os níveis da proteína SOCS-3, como observado nos animais do grupo P/C (+ 68%, $P = 0,0005$) em comparação com os animais do grupo C/C. Os animais do grupo P/L tiveram redução na transcrição de SOCS-3, mas essa redução não foi suficiente para apresentar diferença significativa em relação aos animais do grupo P/C, e não houve diferença estatística em relação ao grupo C/C (Figura 4). Portanto, esses resultados sustentam nossa hipótese de que o palmitato por si só pode levar à resistência central à insulina.

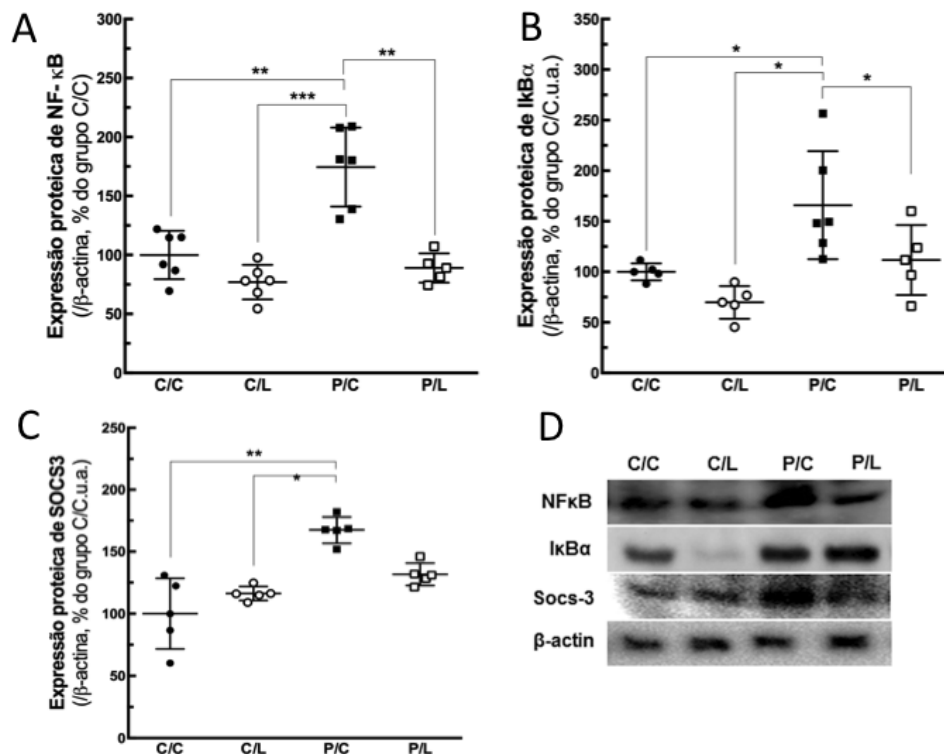


Figura 5. O palmitato causa resistência hipotalâmica à insulina. A infusão ICV de palmitato aumentou os níveis proteicos de NFκB (A) e IκBα (B). O NFκB está envolvido na ativação do SOCS-3 (C), que, por sua vez, participa na sinalização da insulina através de um mecanismo de feedback negativo, diminuindo a sensibilidade à insulina. Bandas representativas de western blotting (D). As diferenças significativas (One-way ANOVA e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). Grupos: C/C: ICV aCSF + solução salina subcutânea; C/L: ICV aCSF + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

4.5 Tecido adiposo marrom

No tecido adiposo marrom nós quantificamos a expressão gênica do transportador de ácidos graxos CD36, e da PLIN, que atua regulando o armazenamento e a liberação de ácidos graxos, objetivamos assim, avaliar o metabolismo deste tecido. A ativação adrenérgica da termogênese foi avaliada através da expressão dos níveis proteicos do beta3AR. Do mesmo modo, avaliamos os níveis da proteína de desacoplamento mitocondrial, UCP1, que está diretamente envolvida na efetuação da termogênese.

A infusão ICV de palmitato aumentou a CD36 em comparação com os grupos que receberam apenas infusão ICV de aCSF. A liraglutida não alterou os níveis de CD36 nos animais do grupo C/L em comparação com os animais do grupo C/C, entretanto o grupo P/L apresentou os níveis de CD36 maiores do que no grupo P/C (+49%, $P = 0,01$). Além disso, o grupo P/C apresentou os níveis da PLIN mais elevados em comparação com todos os outros grupos, sugerindo que os ácidos graxos que estão sendo internalizados nos adipócitos do tecido adiposo marrom estão, no grupo P/C, sendo armazenados e, no grupo P/L, sendo utilizados como combustível (Figura 6).

O estímulo adrenérgico é controlado diretamente pelo hipotálamo, centro do sistema nervoso autônomo. O tecido adiposo marrom é estimulado pela via adrenérgica através da ativação do receptor beta3AR, culminando com lipólise e termogênese. Verificamos que os animais do grupo P/C apresentaram menor expressão do beta3AR em relação aos animais dos demais grupos. A expressão aumentada do beta3AR nos animais do grupo P/L (+210%, $P = 0,0002$) em comparação com os animais do grupo P/C pode indicar que os ácidos graxos que estão sendo internalizados pelos adipócitos marrons estão sendo utilizados como combustível para a termogênese. Encontramos resultados semelhantes na expressão da proteína UCP-1. Os animais do grupo P/C apresentaram menor expressão de UCP-1 em comparação com os animais dos demais grupos. Os animais do grupo C/L apresentaram maior expressão de UCP-1 (+ 43%, $P = 0,03$) do que os animais do grupo C/C e os animais do grupo P/L apresentaram maior expressão de UCP-1 (+100 %, $P = 0,01$) do que os do grupo P/C (Figura 6).

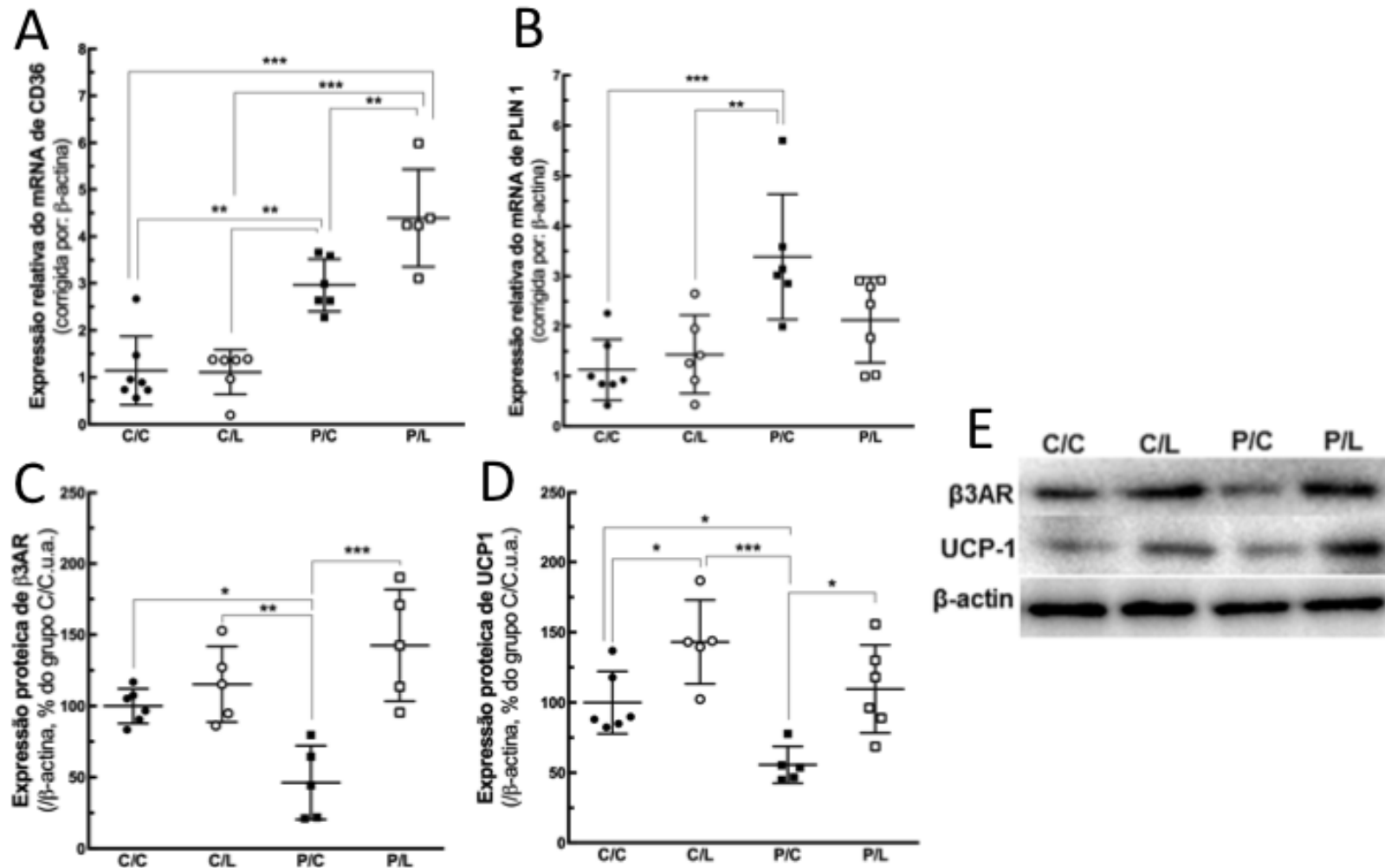


Figura 6. Metabolismo do tecido adiposo marrom e termogênese. O palmitato regulou os níveis gênicos do transportador CD36 (**A**) e do regulador de armazenamento de ácido graxo PLIN (**B**). Além de diminuir os níveis proteicos de β 3AR (**C**) e de UCP-1 (**D**). Bandas representativas de western blotting (**E**). As diferenças significativas (*One-way ANOVA* e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

4.6 Tecido adiposo branco

A área seccional média dos adipócitos brancos foi maior nos animais do grupo P/C do que a observada nos demais grupos. No entanto, não houve diferença na área seccional média entre os grupos C/C, C/L e P/L (Figura 7).

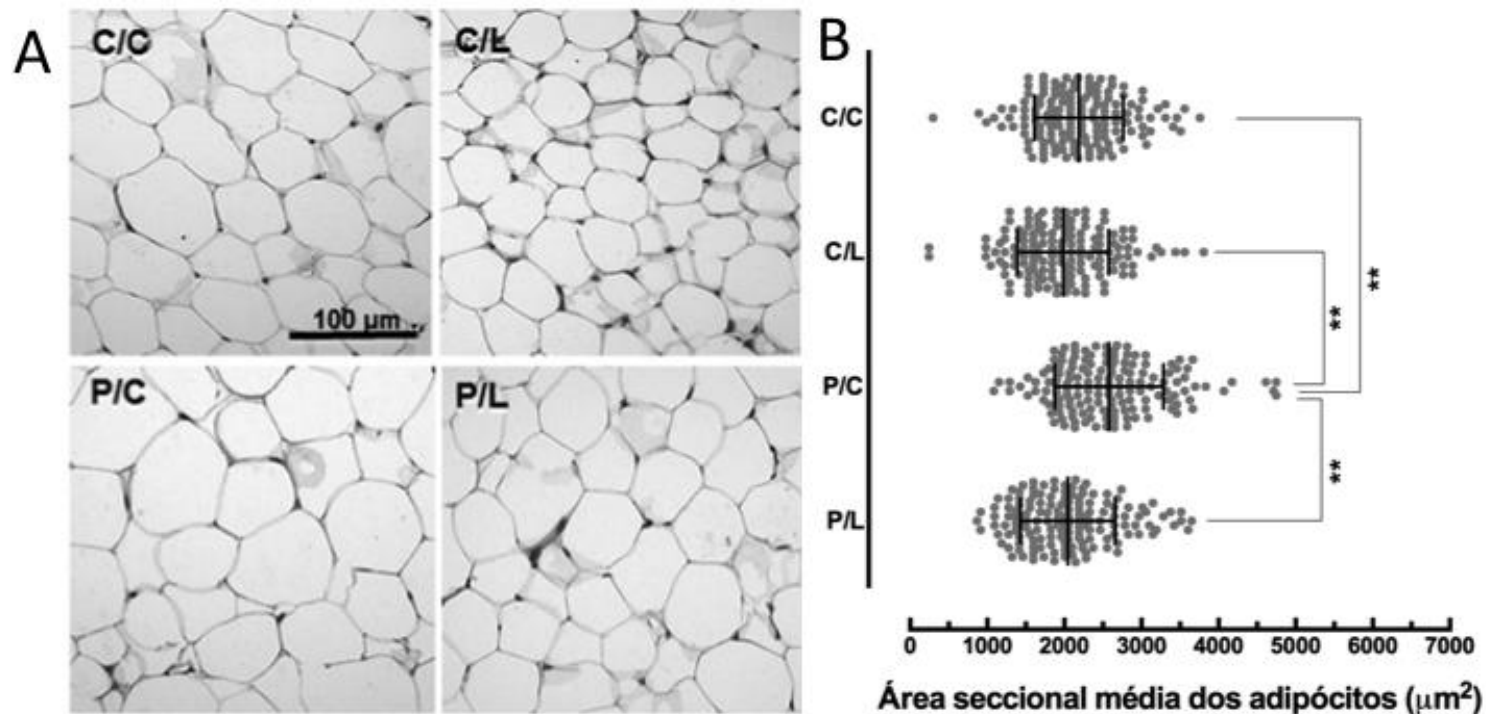


Figura 7. O palmitato aumenta a deposição de gordura no tecido adiposo branco. Fotomicrografia representativa do tecido adiposo branco (A) mostrando aumento da área seccional média de adipócitos (B). As diferenças significativas (*One-way ANOVA* e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

O NFκB é um regulador primário das respostas inflamatórias no tecido adiposo branco, sua ativação é relacionada com a resistência à insulina. Os animais do grupo P/L apresentaram menor expressão do NFκB em comparação com os animais do grupo P/C (-50%, $P < 0,0001$). Não foi observada diferença entre os grupos C/C, C/L e P/L. A adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória não apresentou diferença em seus níveis entre os grupos.

Devido aos níveis de NFκB se apresentarem elevados no grupo P/C, indicando resistência à insulina, medimos os níveis da proteína JNK fosforilada corrigidos pelos níveis da JNK total, bem como os níveis ERK-1/2 corrigidos pelos níveis de ERK-1/2 total, que atuam como reguladores negativos da sinalização de insulina. Nos animais do grupo P/C, a relação entre os níveis de JNK fosforilada e JNK total aumentou (+ 95%, $P = 0,02$) em comparação com os grupos C/C, assim como, em comparação com o grupo C/L (+ 177%, $P = 0,006$). Os animais do grupo P/L não apresentaram diferença na relação entre JNK fosforilada e JNK total em comparação com os animais dos grupos C/C, C/L e P/C. A relação entre os níveis de ERK-1/2 fosforilada e ERK-1/2 total não apresentou diferença entre todos os demais grupos (Figura 8).

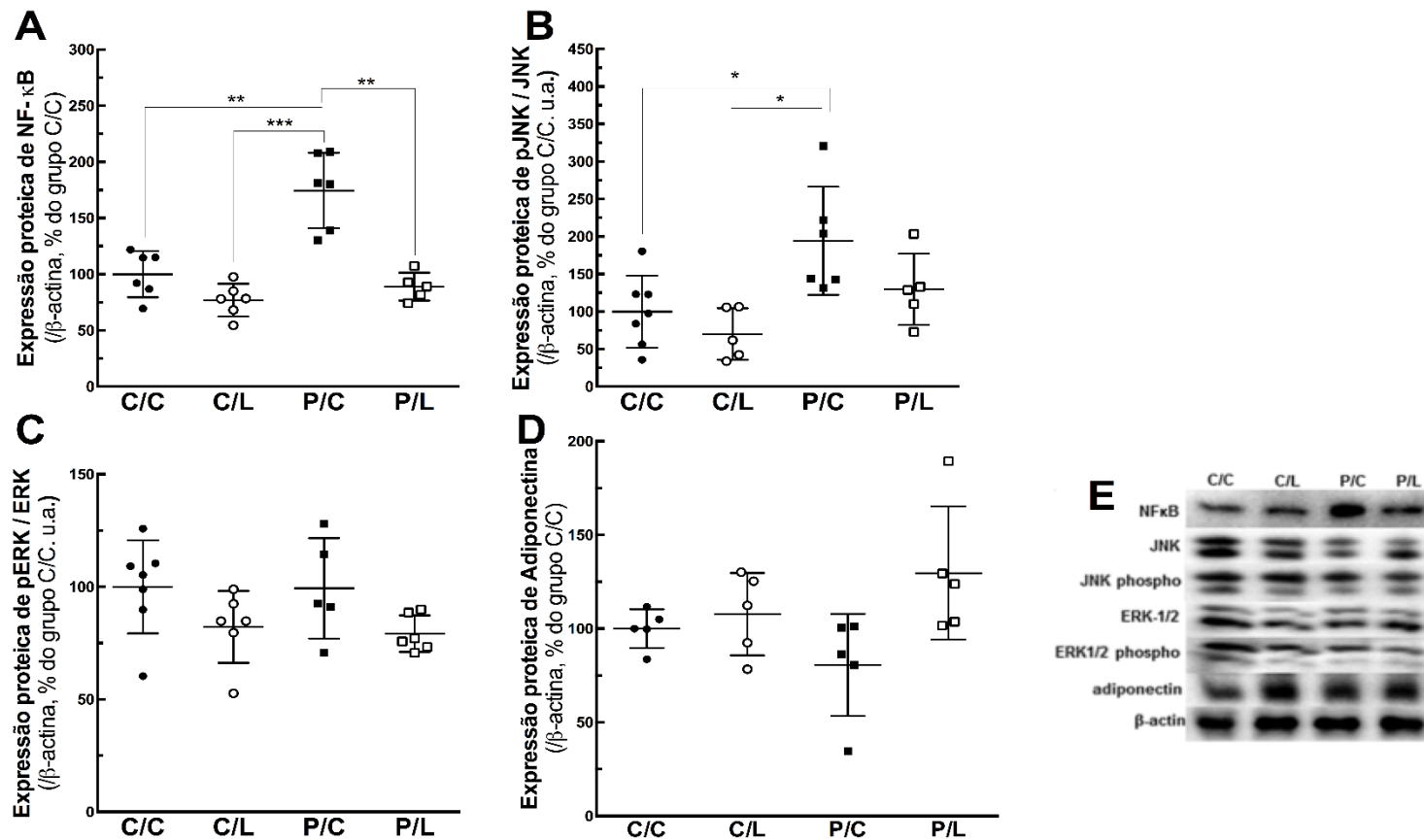


Figura 8. Resposta inflamatória e resistência à insulina no tecido adiposo branco. O palmitato aumentou os níveis de proteínas envolvidas na resposta inflamatória e resistência à insulina: NF κ B (**A**) e JNK (**B**), sem alterações nos níveis proteicos de ERK-1/2 (**C**) e de adiponectina (**D**). Bandas representativas de western blotting (**E**). As diferenças significativas (One-way ANOVA e pós teste de Holm-Sidak) são indicadas por: P <0,05 (*), P <0,01 (**), P <0,001 (***). Grupos: C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

5 DISCUSSÃO

A infusão ICV de palmitato durante 4 semanas culminou com alterações no hipotálamo associadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina e alterações nos neuropeptídeos envolvidos no controle do balanço energético. Essas alterações também modificaram significativamente o metabolismo energético sistêmico, estimulando a lipogênese e diminuindo a termogênese. O tratamento com liraglutida reverteu parcialmente estes efeitos do palmitato.

A liraglutida quando administrada por via periférica atravessa a barreira hematoencefálica e tem potencial para atuar sobre o sistema nervoso central (Hunter e Holscher, 2012; McClean e Holscher, 2014). Em seres humanos, a liraglutida é administrada uma vez por dia em doses de até 3 mg/dia. Para investigar os efeitos neuroprotetores da liraglutida na neuroinflamação induzida pelo palmitato, utilizamos uma extrapolação de dose entre humanos e camundongos (Nair e Jacob, 2016). Assim, no presente estudo, usamos uma dose de liraglutida equivalente ao máximo recomendado para humanos.

No hipotálamo, a dieta com alto teor de gordura desencadeia um processo inflamatório acompanhado de aumento de citocinas inflamatórias, ativação de células gliais, morte de neurônios do tipo POMC, ativação da cascata pró-apoptótica e inibição de proteínas autofágicas (Portovedo *et al.*, 2015). Esses efeitos em conjunto provocam resistência à insulina e à leptina, aumentando a obesidade. Em estudo *in vitro* com células de linhagem hipotalâmica, foi demonstrado que o palmitato culminou em ativação inflamatória, estresse do retículo endoplasmático (Diaz *et al.*, 2015; Dalvi *et al.*, 2017), resistência à insulina e resistência à leptina (Mayer e Belsham, 2010; Marwarha *et al.*, 2016). Como consequência, há uma estimulação da cascata de apoptose, causando morte celular (Duffy *et al.*, 2016), e mudanças na expressão de neuropeptídeos envolvidos no controle do balanço energético (Dalvi *et al.*, 2017).

Poucos estudos *in vivo* usaram protocolo de infusão ICV de palmitato como modelo de doenças neurodegenerativas, a maioria dos trabalhos existentes avaliaram apenas os efeitos agudos. Conforme mencionado, a exposição central aguda de palmitato desencadeou a resistência central à leptina (Benoit *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2013; Tung *et al.*, 2015), resistência periférica e central à insulina

(Benoit *et al.*, 2009; Posey *et al.*, 2009), diminuição da eficiência da autofagia no hipotálamo (Portovedo *et al.*, 2015), e alteraram os neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados com o controle da energia (Schwinkendorf *et al.*, 2011). Além de estimular a inflamação hipotalâmica (Milanski *et al.*, 2009; Posey *et al.*, 2009), e diminuição da produção de hepática de glicose (Benoit *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2010). Em um estudo de administração crônica de palmitato, durante um período de duas semanas, a massa de tecido adiposo e a ingestão alimentar não foram alteradas significativamente, mas a tolerância à insulina foi prejudicada (Kleinridders *et al.*, 2009).

No presente estudo verificamos que o palmitato causou aumento do NPY e diminuição do POMC. Da mesma forma, os achados concordam com o verificado em obesidade induzida pela dieta e cultura de neurônios hipotalâmicos. Em um único bolus ICV de diferentes ácidos graxos, observou-se níveis aumentados de NPY 24 h e 48 h após o insulto, porém, não foram observadas alterações nos níveis de POMC, na ingestão alimentar e na massa corporal (Schwinkendorf *et al.*, 2011). De forma contrária, observamos no grupo P/C um aumento moderado na massa corporal, mas não no consumo de alimentos. Assim como verificado no presente estudo, em cultura de neurônios expostos ao palmitato também ocorreu o aumento de NPY (Fick *et al.*, 2011; Dalvi *et al.*, 2017). Esses resultados foram consistentes com camundongos que receberam infusão aguda de lipídios durante 24 h e com camundongos alimentados com dieta com alto teor de lipídeos durante 8 a 20 semanas, que também mostraram elevação dos níveis de NPY (Dalvi *et al.*, 2017).

A liraglutida aumentou a expressão de POMC, mas reduziu a expressão de NPY. Em estudo anterior do nosso grupo, demonstramos que o agonista de GLP-1 modulou a expressão dos neurônios do tipo POMC, mas não os níveis de NPY (Barreto-Vianna *et al.*, 2016). Da mesma forma, outros mostraram que exendin-4, outro agonista de GLP-1, também estimulou os neurônios tipo POMC (Shirazi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Interpretamos esses resultados como uma ação potencial da liraglutida, que tem a capacidade de restaurar o controle do balanço energético perturbado pela infusão ICV de palmitato.

Em modelo de obesidade induzida por longos períodos de dieta hiperlipídica ocorre o aumento da expressão de TNF-alfa em neurônios do tipo NPY, acompanhado por uma alta relação entre os níveis de NPY e TNF-alfa nos neurônios tipo NPY, como consequência do acúmulo excessivo de energia (Dalvi *et*

al., 2017). Nos neurônios entéricos, durante a inflamação o aumento de TNF-alfa estimula a expressão de NPY, essa relação de aumento de NPY em decorrência do aumento de TNF-alfa agrava ainda mais a reação inflamatória (Chandrasekharan *et al.*, 2013). Verificamos que o grupo P/C aumentou os níveis de NPY, concomitantemente com a maior expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1b), corroborando com os trabalhos anteriores que utilizaram outros modelos. Outros demonstraram que a resposta inflamatória ao ácido graxo saturado é mediada pela sinalização de TLR-4, induzindo o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1beta e TNF-alfa (Milanski *et al.*, 2009; Portovedo *et al.*, 2015). Da mesma forma que o verificado no presente estudo, em modelo de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, o hipotálamo apresentou um aumento considerável nos níveis de TNF-alfa e outras citocinas pró-inflamatórias (De Souza *et al.*, 2005; Dalvi *et al.*, 2017).

O TNF-alfa desempenha um papel na patogênese da diabetes tipo 2 e da obesidade, além de modular os neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle do balanço energético, aumentando significativamente os níveis de NPY nas células neuronais (Miyazaki *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2006; Dalvi *et al.*, 2017). O aumento dos níveis de NPY, devido ao palmitato, também pode estar relacionado à lipotoxicidade, uma vez que a lipotoxicidade induzida por palmitato aumenta a síntese de NPY de uma maneira dependente de AMPK (Fick *et al.*, 2011). A lipotoxicidade hipotalâmica também possui grande relação com o estresse do retículo endoplasmático, já demonstrada em trabalho anterior com exposição crônica de células hipotalâmicas ao palmitato culminando com a resistência à insulina e apoptose dos neurônios hipotalâmicos (Mayer e Belsham, 2010).

A inflamação hipotalâmica induzida pelo palmitato promove a resistência à via anorexigênica e diminui o gasto energético, que pode ocorrer através da inibição da ativação do tecido adiposo marrom pelo sistema nervoso simpático, com consequente diminuição da termogênese (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017). Nossos dados, relativos aos níveis da proteína beta3AR em BAT, indicam que a infusão ICV de palmitato regula negativamente o estímulo simpático, que é diretamente controlado pelo hipotálamo. Portanto, a termogênese também pode ser inibida, como mostrado pela redução dos níveis de UCP-1. A liraglutida aumentou os níveis de B3AR e UCP-1, resultados estes, que sugerem regulação positiva da termogênese. Outros estudos também mostraram que o GLP-1 aumenta a

termogênese atuando diretamente no aumento da sinalização adrenérgica (Nogueiras *et al.*, 2009; Lockie *et al.*, 2012). Além disso, a injeção ICV de GLP-1 reduziu a massa corporal e aumentou a termogênese do tecido adiposo marrom, independente de alterações no consumo alimentar (Lopez *et al.*, 2015), como visto neste trabalho.

O tecido adiposo marrom é inervado através do sistema nervoso simpático, porém outros circuitos específicos do SNC, envolvendo o hipotálamo, também ativam a inervação simpática do tecido adiposo branco, regulando a adiposidade através de efeitos sobre o metabolismo lipídico, esses efeitos são independentes do comportamento alimentar (Nogueiras *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2017). O controle simpático fornece uma explicação de como a administração central de peptídeos como leptina, insulina, grelina e melanocortina pode alterar o metabolismo dos adipócitos. O GLP-1 atua no sistema nervoso central, modulando o metabolismo lipídico, diminuindo o teor e a deposição dos lipídios no tecido adiposo branco, fatores que ocorrem independentemente de suas ações anorexigênicas (Nogueiras *et al.*, 2009).

A infusão ICV de palmitato levou a um aumento significativo da área dos adipócitos brancos e aumento da expressão de NFκB e JNK, que estão envolvidos na indução da inflamação, assim como observado em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (De Souza *et al.*, 2005). O metabolismo dos adipócitos foi diminuído, independentemente da ingestão de alimentos, sem exercer alteração na massa magra de camundongos submetidos a uma infusão ICV de GLP-1 (Nogueiras *et al.*, 2009). A infusão de GLP-1 minimizou a síntese de triglicerídeos, assim como inibiu as vias de deposição, porém Nogueira *et al.*, 2009 administraram GLP-1 por via subcutânea por apenas dois dias, enquanto nós administramos por duas semanas. No entanto, um estudo *in vivo* propôs que o GLP-1 possui ação direta nos adipócitos, diminuindo os marcadores relativos à lipogênese e aumentando os fatores lipolíticos, envolvendo a diminuição da sinalização de adenilato ciclase/cAMP. Estes resultados são concomitantes com uma regulação positiva de HSL e PLIN, e redução de marcadores pró-inflamatórios (Vendrell *et al.*, 2011; El Bekay *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÃO

No modelo que utilizamos neste estudo, com infusão ICV de palmitato a longo prazo, os efeitos hipotalâmicos de um consumo crônico de dieta rica em gordura foram mimetizados, além de diminuir a termogênese pelo tecido adiposo marrom e prejudicar a sinalização de insulina no tecido adiposo branco. O modelo apresenta uma alteração no controle do balanço energético, neuroinflamação, ativação da via da lipogênese e diminuição da termogênese. A liraglutida apresentou efeitos benéficos significativos, restaurando, ao menos em parte, o dano causado pela infusão ICV de palmitato, reduzindo o processo de neuroinflamação verificado no hipotálamo, aumentando a termogênese pelo tecido adiposo marrom e melhorando a sinalização da insulina no tecido adiposo branco, com diminuição da lipogênese e aumento da lipólise.

7 RESULTADOS

7.1 Densidade de micróglia e imunorreatividade dos astrócitos

A densidade numérica das micróglia foi calculada a partir das lâminas imunomarcadas com o anticorpo anti-IBA-1, que é uma proteína envolvida nas vias de sinalização do cálcio, específica para identificação de micróglia. A partir da análise dessas lâminas, verificamos que os animais do grupo P/C apresentaram maior densidade numérica de micróglia do que a dos animais grupo C/C (GD +247%, CA1 +338%, $P < 0,0001$) (Figuras 9 e 10).

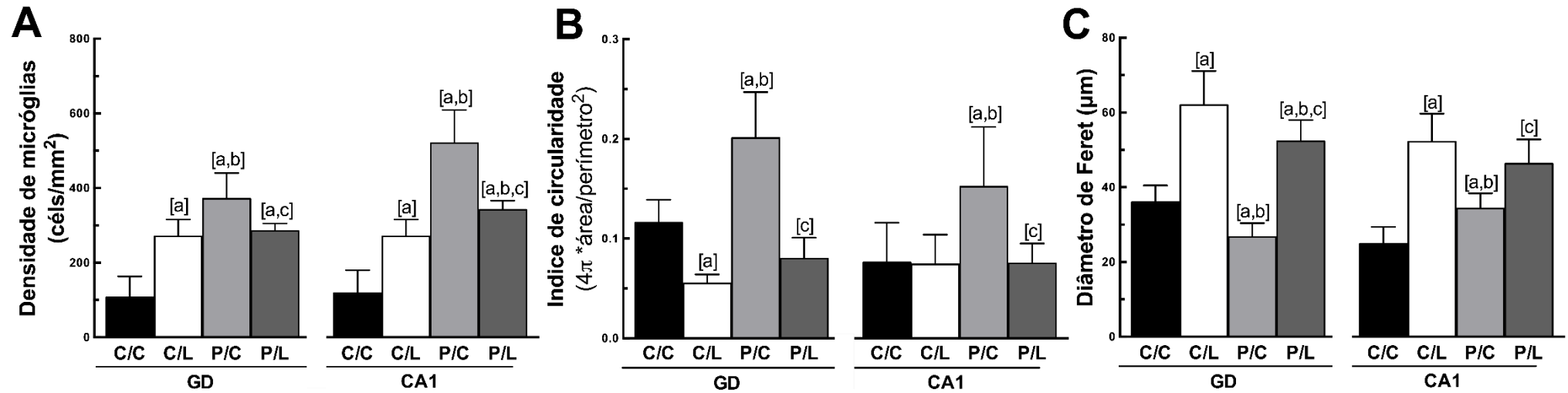


Figura 9. Densidade e morfologia das micróglia. A distribuição e a morfologia das micróglia foram alteradas no giro dentado e na área CA1 do hipocampo dos camundongos que receberam infusão ICV de palmitato e receberam tratamento com liraglutida. **(A)** Densidade de micróglia (células/mm²); **(B)** Índice de circularidade das micróglia ($4\pi \cdot \text{área}/\text{perímetro}^2$); **(C)** Diâmetro de Feret das micróglia (µm). Os valores estão representados como média \pm DP (n = 5). São indicadas diferenças significativas (P < 0,05, *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak): [a] \neq C/C, [b] \neq C/L, [c] \neq P/C. **Grupos:** C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

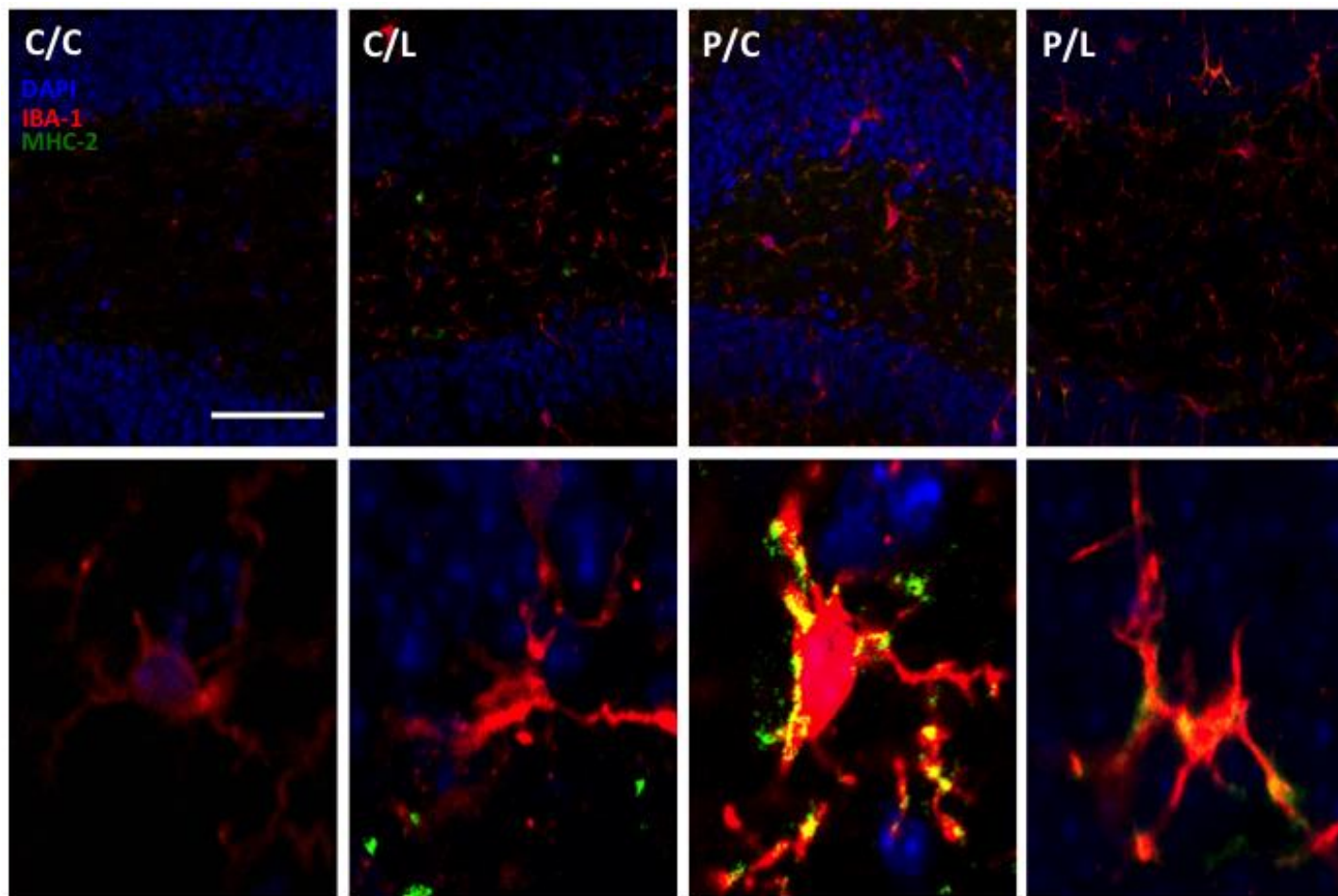


Figura 10. A liraglutida diminui a densidade e a ativação das micróglia no giro dentado. Imagens representativas de microscopia confocal do giro dentado imunomarcado com anti-IBA-1 (vermelho), anti-MHC-2 (verde) e DAPI (azul): barra de escala = 50 μ m (imagens de cima) e imagens das micróglia em maior aumento, mostrando sua co-localização com o MHC-II, que indica ativação (imagens de baixo).

A densidade dos astrócitos foi avaliada a partir de lâminas imunomarcadas com o anticorpo anti-GFAP, específico para visualização de astrócitos. Devido às características morfológicas dessas células, a quantificação foi realizada por imunorreatividade. Observamos que os animais do grupo P/C mostraram um aumento neste parâmetro tanto no GD, quanto na região CA1 do hipocampo quando comparados aos animais do grupo C/C (GD +1455%, CA1 +4392%, $P < 0,0001$). Estes resultados indicam que a infusão ICV de palmitato estimula a microgliose e a astrocitose nesse modelo (Figura 11).

Os animais que foram tratados com liraglutida entretanto não receberam infusão ICV de palmitato (grupo C/L) também apresentaram um aumento na densidade das micróglia em relação ao grupo C/C (GD +153%, CA1 +129%, $P < 0,001$) (Figura 9 e 12), porém sem que houvesse aumento na imunorreatividade dos astrócitos (Figura 11 e 13).

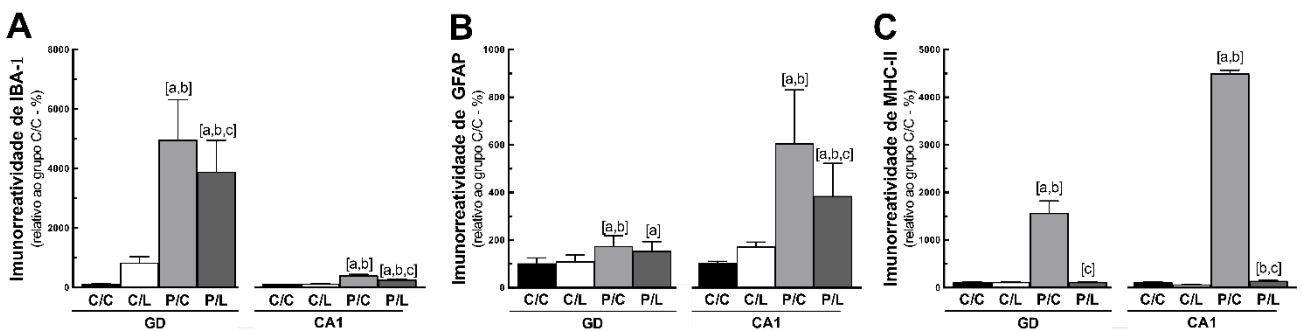


Figura 11. Imunorreatividade das micróglia e astrócitos. A liraglutida diminuiu a microgliose e a astrocitose no giro dentado e na área CA1 do hipocampo de camundongos que receberam infusão ICV de palmitato. **(A)** Imunorreatividade de IBA-1; **(B)** Imunorreatividade de GFAP; **(C)** Imunorreatividade de MHC-2. Os valores estão representados como média \pm DP ($n = 5$). São indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$, *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak): [a] \neq C/C, [b] \neq C/L, [c] \neq P/C. **Grupos:** C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

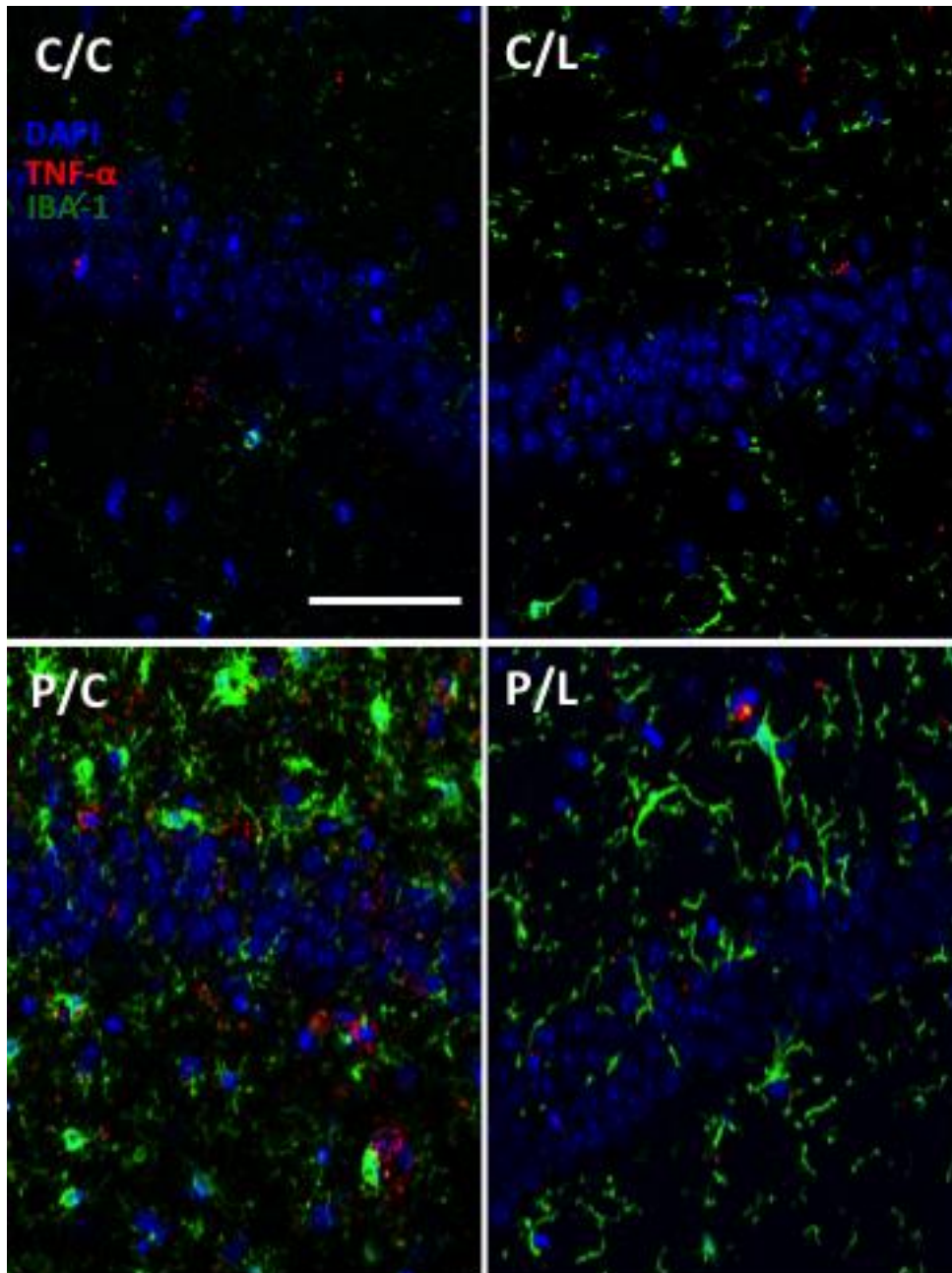


Figura 12. O palmitato aumenta a densidade de micróglia e a expressão de TNF-alfa na região CA1 do hipocampo. Imagens representativas de microscopia confocal da região CA1 do hipocampo imunomarcadas com anti-IBA-1 (verde), anti-TNF-alfa (vermelho) e DAPI (azul): barra de escala = 100 μ m.

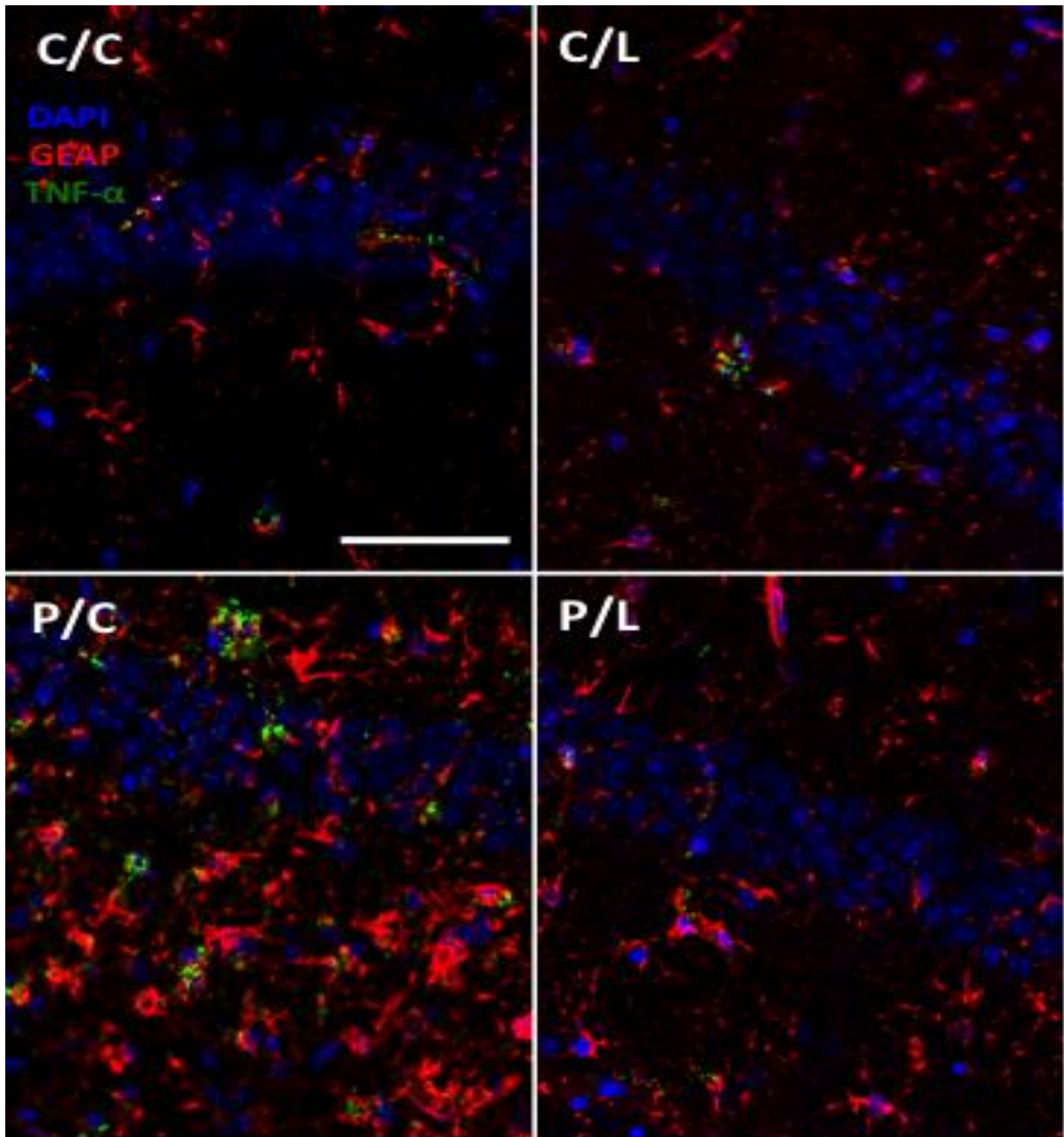


Figura 13. O palmitato aumenta a densidade de astrócitos e a expressão de TNF-alfa na região CA1 do hipocampo. Imagens representativas de microscopia confocal da região CA1 do hipocampo imunomarcadas com anti-GFAP (vermelho), anti-TNF-alfa (verde) e DAPI (azul), barra de escala: 100 μ m.

7.2 Morfologia das micróglia

A morfologia das micróglia foi avaliada a partir das lâminas imunomarcadas com o anticorpo anti-IBA-1. Imagens representativas de micróglia imunomarcadas e as mesmas células após processamento, utilizando o ImageJ, são mostradas na Figura 14.

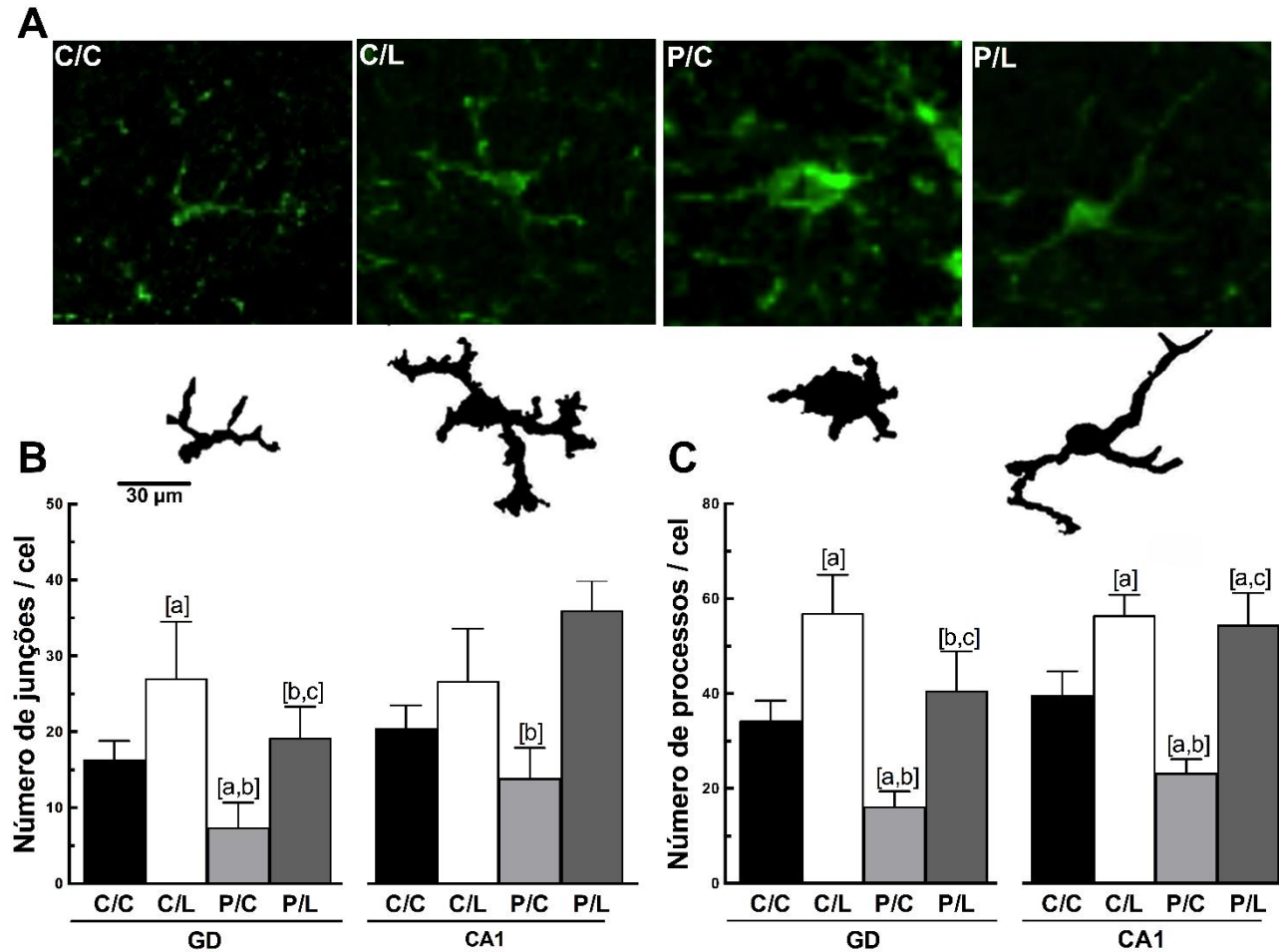


Figura 14. Análise morfológica das micróglia. A morfologia das micróglia foi alterada alterada no giro dentado e na área CA1 do hipocampo de camundongos que receberam infusão ICV de palmitato e foram tratados com liraglutida. **(A)** Imagens representativas de micróglia imunomarcadas com IBA-1 (acima) e as mesmas células após processamento de imagem (abaixo). **(B)** Número de junções das micróglia. **(C)** Número de processos das micróglia. Os valores estão representados como média \pm DP ($n = 5$). São indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$, *one-way ANOVA* e pós-teste de Holm-Sidak): [a] \neq C/C, [b] \neq C/L, [c] \neq P/C. **Grupos:** C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

A administração ICV de palmitato (grupo P/C), em comparação com o grupo C/C, levou a um grande aumento no número de micróglia ativas associada a uma modificação morfológica das mesmas nas regiões CA1 e GD do hipocampo. As mudanças consistiram em um grande corpo celular pouco ramificado em comparação com as micróglia do grupo C/C, como mostrado pelo número de junções (GD -55%, CA1 -32%, $P < 0,0001$) e pelo número de processos (GD -53%, CA1 -41%, $P < 0,0001$) (Figuras 9 e 14).

No entanto, nos camundongos tratados com liraglutida e infundidos com palmitato (grupo P/L), quando comparados com os camundongos de que receberam infusão ICV de palmitato, porém não foram tratados com liraglutida (grupo P/C), observamos um número diminuído de células positivas para imunomarcagem com MHC-II (GD -1452% , CA1 -4362%, $P < 0,0001$) (Figuras 10 e 11).

Além disso, o índice de circularidade do grupo P/C (GD 0,201 e CA1 0,152) esteve elevado quando comparado com os demais grupos (C/C = GD 0,116, CA1 0,076, $P < 0,0001$; C/L = GD 0,055, CA1 0,074, $P < 0,0001$; P/L = GD 0,080, CA1 0,075, $P < 0,0001$) (Figura 9).

No grupo C/L observamos o aumento na complexidade morfológica das micróglia quando comparada às micróglia do grupo C/C. Esse aumento da complexidade se dá pelo aumento no diâmetro de Feret (GD +72%, CA1 +108%, $P < 0,0001$), maior número de junções no GD (+66%, $P < 0,0001$) e maior número de processos (GD +66%, $P < 0,0001$; CA1 +42%, $P = 0,0422$) (Figuras 9 e 14).

No grupo P/C, as micróglia do hipocampo apresentam características de ativação, com morfologia ameboide, sugestivas de estágio M1 (perfil pró-inflamatório). No entanto, nos animais tratados com liraglutida, as micróglia apresentaram longas ramificações celulares, características consistentes com a ativação de estágio M2 (perfil neuroprotetor) (Figuras 9, 10 e 14).

7.3 Perfil inflamatório

O perfil inflamatório foi avaliado através das técnicas de imunofluorescência e RT-PCR. Através de imunomarcações duplas com anticorpos anti-MHC-II e anti-IBA-1 (figura 12), bem como imunomarcações evidenciando as micróglias e os astrócitos colocalizados com a citocina pró-inflamatória TNF-alfa (figs 12 e 13). A alta imunorreatividade do MHC-II pelas micróglias, e a secreção de TNF-alfa pelas micróglias e pelos astrócitos indicam a ativação do fenótipo pró-inflamatório dessas células.

Nos animais do grupo P/C em comparação com os animais do grupo C/C, observamos através da técnica de RT-PCR, a maior expressão de genes pró-inflamatórios no hipocampo: TNF-alfa (+190%, $P = 0,01$) e IL-6 (+91%, $P = 0,01$). O tratamento com liraglutida foi capaz de diminuir a expressão de TNF-alfa (-40%, $P = 0,03$) no grupo P/L em comparação com o grupo P/C, indicando uma ação anti-inflamatória (Figura 15).

De modo correspondente, no grupo P/C comparado ao grupo C/C, observamos um aumento da imunorreatividade TNF-alfa no GD (+1500%, $P = 0,03$) e na região CA1 (+40%, $P = 0,03$) do hipocampo, corroborando com os resultados do RT-PCR. Além disso, a liraglutida suprimiu o aumento da imunorreatividade de TNF-alfa induzido pelo palmitato, como observado pela comparação entre os grupos P/L e P/C (-1400% na GD, $P < 0,0001$; -180% em CA1, $P = 0,02$) (Figuras 12, 13 e 15).

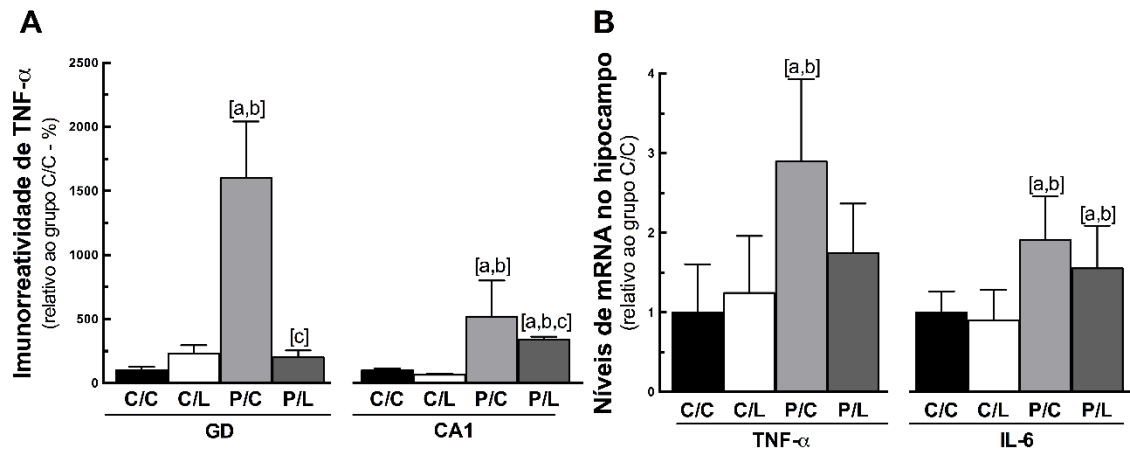


Figura 15. Análise das citocinas pró-inflamatórias. A liraglutida diminuiu no giro dentado e na região CA1 do hipocampo os marcadores de neuroinflamação induzidos pela infusão ICV de palmitato. **(A)** Imunorreatividade de TNF- α ; **(B)** Níveis de mRNA dos marcadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 no hipocampo. Os valores estão representados como média \pm DP ($n = 5-7$). São indicadas diferenças significativas ($P < 0,05$, *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak): [a] \neq C/C, [b] \neq C/L, [c] \neq P/C. **Grupos:** C/C: aCSF ICV + solução salina subcutânea; C/L: aCSF ICV + liraglutida subcutânea; P/C: palmitato ICV + solução salina subcutânea; P/L: palmitato ICV + liraglutida subcutânea.

8 DISCUSSÃO

A infusão ICV de palmitato ativou as micróglia e astrócitos no hipocampo. Essas micróglia alteraram sua morfologia de ramificadas para uma forma ameboide, caracterizada pela diminuição do número de ramos e junções, além de aumentar a expressão de MHC-II (proteína expressa na membrana das micróglia ativadas), com o conseqüente aumento das secreções das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6.

Mesmo com a infusão contínua de palmitato, o agonista GLP1, liraglutida, diminuiu a ativação dos astrócitos e das micróglia. Também observamos que a liraglutida aumentou a densidade das micróglia, porém estas apresentavam fenótipo consistente com perfil neuroprotetor, com maior quantidade de ramos e maior diâmetro de Feret.

O índice de circularidade fornece informações sobre a morfologia, ele varia de 0 (polígono linear) a 1 (objeto circular perfeito), nas micróglia ativadas o diâmetro de Feret se apresenta aumentado devido aos ramos encurtados (Zanier *et al.*, 2015), como mostrado no grupo P/C. Estes dados mostram que a infusão ICV de palmitato culminou com a ativação das micróglia, que apresentaram perfil pró-inflamatório, em contra partida, a administração de liraglutida apresentou efeito neuroprotetor neste modelo, diminuindo a ativação das micróglia e dos astrócitos, com conseqüente diminuição da neuroinflamação.

O consumo de ácidos graxos poliinsaturados, particularmente o omega-3, apresenta efeitos neuroprotetores (Zhang *et al.*, 2011; Michael-Titus e Priestley, 2014). Porém, ao contrário do que ocorre no consumo de ômega-3, estudos demonstraram que o consumo de ácidos graxos saturados aumenta as concentrações de palmitato no sangue e no encéfalo (Sabin *et al.*, 2007; Rodriguez-Navas *et al.*, 2016). Esse aumento nas concentrações de palmitato está associado à ativação das micróglia do hipotálamo e ao comprometimento da plasticidade do hipocampo (Hao *et al.*, 2016). Além disso, o consumo de dieta com alto teor de gordura é uma das principais causas de diabetes tipo 2, que leva a efeitos deletérios sobre a função cerebral, causando acúmulo de amilina no cérebro e, como conseqüência, pode gerar o desenvolvimento de déficits neurológicos, como a

diminuição da atividade exploratória e atividade de vestibulomotor prejudicada (Srodulski *et al.*, 2014).

Outro fator importante a ser considerado são as alterações observadas na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Estudos mostram que os ácidos graxos saturados aumentam a permeabilidade da barreira, causando o acúmulo ainda maior de ácidos graxos no sistema nervoso central. O acúmulo de ácidos graxos por si só já apresenta efeitos danosos para o parênquima cerebral, porém ele ainda causa o aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias e estimula a ativação das micróglia e astrócitos, esse conjunto de efeitos levam à lesão hipocampal (Callaghan *et al.*, 2012; Callaghan *et al.*, 2016).

Estes resultados fornecem uma ligação mecanicista entre a ruptura da barreira hematoencefálica e a diminuição da cognição vista em indivíduos obesos (Farr *et al.*, 2008). Porém a diminuição da função cognitiva também está relacionada à resistência à insulina nos neurônios (Grillo *et al.*, 2015).

Ao contrário dos ácidos graxos insaturados, os ácidos graxos saturados, como o palmitato, se ligam ao TLR-4 (Lee *et al.*, 2001), que no sistema nervoso central é expresso principalmente pelas micróglia (Lehnardt *et al.*, 2003).

Nós demonstramos que a infusão ICV de palmitato levou à inflamação do hipocampo, esse resultado é muito importante, pois mostra que os de ácidos graxos saturados são os principais responsáveis pelos efeitos nocivos relacionados a uma maior predisposição aos distúrbios no sistema nervoso central. Através dessa via de administração conseguimos, num primeiro momento, excluir os efeitos da inflamação sistêmica presente em indivíduos obesos.

O aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres está associado com a disfunção do sistema nervoso central (Kanoski e Davidson, 2011; Santiago e Potashkin, 2013) e com o aumento na captação de ácidos graxos pelo encéfalo (Karmi *et al.*, 2010). Em camundongos com obesidade genética (ob/ob) (Erion *et al.*, 2014), e em camundongos obesos induzidos por dieta (Hao *et al.*, 2016), a obesidade promoveu microgliose reativa no hipocampo com aumento da IL1 β (uma citocina pró-inflamatória) e perda de proteínas sinápticas no hipocampo. Da mesma forma, o presente estudo demonstrou o potencial que a infusão ICV de palmitato possui em induzir microgliose e astrogliose no hipocampo de camundongos. A ativação crônica das micróglia acompanhada de efeitos tóxicos (como o aumento

das citocinas pró-inflamatórias) são típicas das doenças neurodegenerativas (Lull e Block, 2010; McClean *et al.*, 2015).

Assim como as micróglia, os astrócitos reativos também podem produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL6), que são os principais efetores dos sinais neuroinflamatórios (Allan e Rothwell, 2003; Liu e Chan, 2014). Os astrócitos também são diretamente afetados pelo palmitato, em cultura de astrócitos suplementada com palmitato ocorre o aumento da secreção de TNF-alfa.

Apesar de os astrócitos serem diretamente afetados pelo palmitato, a astrocitose também pode ser um efeito indireto da ativação das micróglia. A astrocitose foi estimulada *in vitro* pelo contato com lipopolissacarídeos (LPS, também um agonista do receptor TLR4), na presença de micróglia (Holm *et al.*, 2012). Portanto, podemos dizer que o palmitato pode induzir indiretamente a ativação de astrócitos por meio de fatores pró-inflamatórios liberados pelas micróglia, como TNF-alfa e IL-6, dessa forma, o astrócito pode se tornar ativo e contribuir para a liberação de ainda mais fatores pró-inflamatórios.

Devido ao cérebro ser altamente responsivo aos mediadores inflamatórios, níveis elevados de citocinas inflamatórias como TNF-alfa e IL-6 podem interromper as vias envolvidas nas funções do hipocampo (Sahin *et al.*, 2015). Assim, a elevação das citocinas no encéfalo pode ter um papel significativo no desenvolvimento de complicações neurológicas vistas na obesidade, onde verificamos resistência à insulina a nível central (Letra *et al.*, 2014; Proctor *et al.*, 2017).

Existem evidências substanciais de que a sinalização de insulina é um participante obrigatório na função do hipocampo. Esta evidência vem de estudos que utilizam injeções intrahipocampal de insulina em animais não obesos e não diabéticos (Moosavi *et al.*, 2006; Babri *et al.*, 2007; Stern *et al.*, 2014). As injeções de insulina no hipocampo de ratos melhoraram o aprendizado e a memória espacial sem alterar os níveis circulantes de glicose (McNay *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2014). As consequências fisiológicas do tratamento com insulina intrahipocampal incluem redução da glicose extracelular e aumento do lactato extracelular, ambos diminuídos em animais com obesidade induzida por dieta (McNay *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2014). Quando comparados animais normais com animais resistentes à insulina, é possível concluir que a sinalização de insulina é necessária para que haja o

mecanismo de aprendizado e memória, e esse mecanismo é perdido em animais diabéticos (McNay *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 2014).

Em animais obesos com resistência central à insulina, foram observados déficits na função do hipocampo, principalmente na área CA1, estas foram reversíveis quando o fenótipo obeso foi atenuado por restrição calórica. A deterioração da plasticidade funcional nas sinapses da área CA1 do hipocampo foi acompanhada por um condicionamento do medo reduzido (Grillo *et al.*, 2011a; Grillo *et al.*, 2011b).

Os agonistas do hormônio GLP-1 são mais conhecidos pelos seus efeitos sobre a homeostase da glicose e sensibilização da cascata da insulina e, como tal, agentes que ativam o receptor GLP-1 foram desenvolvidos para uso no tratamento de diabetes mellitus tipo 2. Muitas evidências sugerem que os análogos do hormônio GLP-1 possuem vários efeitos extra-pancreáticos, independentes da homeostase da glicose, podendo atravessar a barreira hematoencefálica e atuar em inúmeras vias do sistema nervoso central, como na neuroinflamação, função mitocondrial e proliferação celular (Athauda e Foltynie, 2016). Além disso, um número crescente de estudos demonstram efeitos neuroprotetores da estimulação do receptor GLP-1 em modelos de obesidade e doenças neurodegenerativas (During *et al.*, 2003; Parthasarathy e Holscher, 2013a; Cork *et al.*, 2015; Barreto-Vianna *et al.*, 2016; Joers *et al.*, 2017).

As ações do GLP-1 são mediadas pelo GLP-1R, um receptor acoplado à proteína transmembrânica G que, embora principalmente expresso em ilhotas pancreáticas, também é expresso seletivamente em todo o cérebro, com altas densidades no córtex do lobo frontal, no hipotálamo, no tálamo, no hipocampo e no cerebelo (Alvarez *et al.*, 2005; Cork *et al.*, 2015). Assim como ocorre nas ilhotas pancreáticas, que podem aumentar a expressão de GLP-1 em condições estressantes, como na diabetes tipo 2, (Habener e Stanojevic, 2013), foi demonstrado recentemente que as micróglia também podem aumentar a expressão do receptor do GLP-1 em resposta a estímulos inflamatórios (Kappe *et al.*, 2012), sugerindo que o GLP-1 endógeno é uma resposta natural para limitar estímulos prejudiciais.

A iniciação e progressão das doenças neurodegenerativas estão associadas à astrocitose e microgliose reativa e à inflamação crônica (Bruck *et al.*, 2016). As

micróglia e os astrócitos exibem receptores GLP-1 (Iwai *et al.*, 2006). Em cultura de astrócitos que são desafiados com LPS, as células adquirem fenótipo pró-inflamatório, porém quando tratadas com agonistas GLP-1, este hormônio se liga aos receptores na membrana dos astrócitos e é observada uma diminuição da secreção de IL-6 e de IL1 β (Iwai *et al.*, 2006).

A morfologia das micróglia, bem como as análises gênicas e protéicas, demonstraram um efeito direto da liraglutida no fenótipo das micróglia. A liraglutida estimulou a formação de ramificações nas micróglia dos grupos C/L e P/L, ou seja, o estímulo para desenvolvimento de ramos ocorre independentemente da micróglia ter sido previamente desafiada ou não com palmitato. Além disso, as secreções pró-inflamatórias foram parcialmente inibidas nas micróglia ativadas pelo palmitato e tratadas com liraglutida. Os efeitos neuroprotetores da liraglutida de redução da ativação das micróglia e dos astrócitos também foram observados em outros modelos de neuroinflamação crônica, como na neuroinflamação induzida por irradiação (Parthsarathy e Holscher, 2013b).

A maior densidade numérica associada à morfologia mais complexa das micróglia, observada nos animais tratados com liraglutida, sugere que a liraglutida estimula o perfil de neuroproteção. Além disso, Hou *et al.* (2012) mostraram que o GLP-1 (9-36)_a, produto da degradação de GLP-1 pela enzima DPP-4, pode atuar em conjunto com o GLP-1, inibindo a inflamação. Para que ocorra a função neuroprotetora das micróglia, não é pré-requisito que estas apresentem um perfil ativado. As micróglia ramificadas não atuam somente como células sentinelas, elas são cruciais e possuem um papel ativo na proteção de neurônios contra excitotoxicidade (Vinet *et al.*, 2012).

Para suportar os efeitos anti-inflamatórios do agonista do hormônio GLP-1 vistos neste estudo, seria de grande interesse para um futuro estudo realizar o bloqueio central do receptor do GLP-1. A ausência desse bloqueio é uma limitação deste estudo.

9 CONCLUSÃO

O resumo da interpretação dos achados deste capítulo foi exposto na Figura 16. O estudo fornece evidências experimentais para o uso eficiente da liraglutida como agente terapêutico neuroprotetor contra a inflamação induzida pelo palmitato. A inflamação induzida por palmitato é caracterizada por microgliose e astrocitose reativas com aumento da expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com liraglutida diminuiu no hipocampo todos os efeitos causados pela infusão central de palmitato.

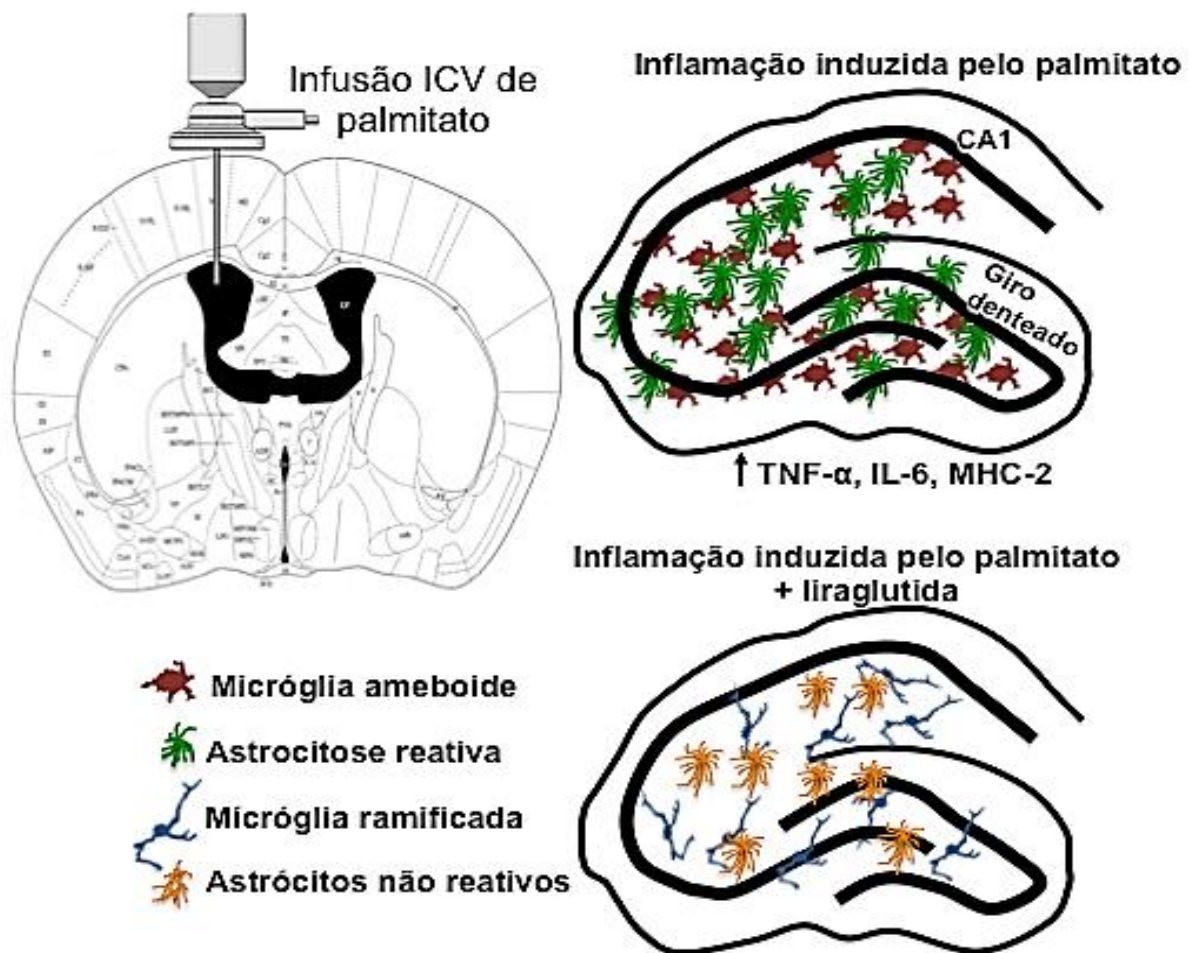


Figura 16. Resumo dos efeitos da infusão ICV de palmitato e tratamento com liraglutida no hipocampo. A infusão ICV de palmitato desencadeou uma resposta inflamatória com extensa astrogliose e microgliose e aumento da expressão de citocinas inflamatórias. O palmitato levou a um enorme aumento no número de micróglia ativadas associado a uma modificação morfológica nas regiões CA1 e DG. Em animais infundidos com palmitato, a liraglutida reduziu o número de células positivas ao MHC-II, indicando uma diminuição da ativação das micróglia, aumentou a complexidade das micróglia e diminuiu a secreção de citocinas inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358: 1669-1677.
- Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gispert JD et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 2005; 92: 798-806.
- Amaral ME, Barbuio R, Milanski M, Romanatto T, Barbosa HC, Nadruz W et al. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. *J Neurochem* 2006; 98: 203-212.
- Anstey K, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late - life as a risk factor for dementia: a meta - analysis of prospective studies. *Obesity Reviews* 2011; 12.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34: 2-11.
- Arruda AP, Milanski M, Velloso LA. Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 53-58.
- Astrup A, Rossner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 2009; 374: 1606-1616.
- Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today* 2016; 21: 802-818.
- Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO. Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain Cogn* 2007; 64: 86-91.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131-2157.
- Baron R, Babcock AA, Nemirovsky A, Finsen B, Monsonego A. Accelerated microglial pathology is associated with Abeta plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2014; 13: 584-595.
- Barreto-Vianna AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of liraglutide in hypothalamic arcuate nucleus of obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2016; 24: 626-633.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience*: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: p.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 2002; 22: 9048-9052.
- Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 2009; 119: 2577-2589.

Bernoud N, Fenart L, Benistant C, Pageaux J, Dehouck M, Moliere P et al. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood–brain barrier endothelial cells in vitro. *Journal of lipid research* 1998; 39: 1816-1824.

Berthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 2008; 59: 55-92.

Bewick GA, Gardiner JV, Dhillon WS, Kent AS, White NE, Webster Z et al. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J* 2005; 19: 1680-1682.

Bock T, Pakkenberg B, Buschard K. The endocrine pancreas in non-diabetic rats after short-term and long-term treatment with the long-acting GLP-1 derivative NN2211. *APMIS* 2003; 111: 1117-1124.

Bode B. An overview of the pharmacokinetics, efficacy and safety of liraglutide. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 97: 27-42.

Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 2005; 54: 3458-3465.

Bruce KD, Zsombok A, Eckel RH. Lipid Processing in the Brain: A Key Regulator of Systemic Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8: 60.

Bruck D, Wenning GK, Stefanova N, Fellner L. Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiol Dis* 2016; 85: 262-274.

Butler AA, Cone RD. The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides* 2002; 36: 77-84.

Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; (*em impressão*, doi: 10.1002/14651858.CD007543.pub2): CD007543.

Callaghan BC, Xia R, Banerjee M, de Rekeneire N, Harris TB, Newman AB et al. Metabolic Syndrome Components Are Associated With Symptomatic Polyneuropathy Independent of Glycemic Status. *Diabetes Care* 2016; 39: 801-807.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.

Chandrasekharan B, Jeppsson S, Pienkowski S, Belsham DD, Sitaraman SV, Merlin D et al. Tumor necrosis factor-neuropeptide Y cross talk regulates inflammation, epithelial barrier functions, and colonic motility. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2535-2546.

Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 301-311.

Chen S, Liu AR, An FM, Yao WB, Gao XD. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)* 2012; 34: 1211-1224.

Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 2016; 136 Suppl 1: 10-17.

- Christou GA, Katsiki N, Kiortsis DN. The Current Role of Liraglutide in the Pharmacotherapy of Obesity. *Curr Vasc Pharmacol* 2016; 14: 201-207.
- Colton C, Wilcock DM. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9: 174-191.
- Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 2006; 27: 736-749.
- Contreras C, Nogueiras R, Dieguez C, Rahmouni K, Lopez M. Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biol* 2017; 12: 854-863.
- Cork SC, Richards JE, Holt MK, Gribble FM, Reimann F, Trapp S. Distribution and characterisation of Glucagon-like peptide-1 receptor expressing cells in the mouse brain. *Mol Metab* 2015; 4: 718-731.
- Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han DY, Wellhauser L, Liu Y et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF-alpha on appetite-regulating NPY neurons. *Int J Obes (Lond)* 2017; 41: 149-158.
- De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, Convit A, Tarshish CY, Roche A et al. Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 529-539.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192-4199.
- Diaz B, Fuentes-Mera L, Tovar A, Montiel T, Massieu L, Martinez-Rodriguez HG et al. Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Res* 2015; 1627: 80-89.
- DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 2016; 139 Suppl 2: 136-153.
- Duffy CM, Nixon JP, Butterick TA. Orexin A attenuates palmitic acid-induced hypothalamic cell death. *Mol Cell Neurosci* 2016; 75: 93-100.
- Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot MC et al. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 2012; 60: 717-727.
- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 2003; 9: 1173-1179.
- El Bekay R, Coin-Araguez L, Fernandez-Garcia D, Oliva-Olivera W, Bernal-Lopez R, Clemente-Postigo M et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 1820-1834.
- Ellenbroek JH, Tons HA, Westerouen van Meeteren MJ, de Graaf N, Hanegraaf MA, Rabelink TJ et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist treatment reduces beta cell mass in normoglycaemic mice. *Diabetologia* 2013; 56: 1980-1986.

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1964; 24: 1076-1082.

Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci* 2011; 31: 12189-12197.

Erion JR, Wosiski-Kuhn M, Dey A, Hao S, Davis CL, Pollock NK et al. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 2014; 34: 2618-2631.

Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE et al. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 2008; 149: 2628-2636.

Fernandes A, Miller-Fleming L, Pais TF. Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 3969-3985.

Fick LJ, Fick GH, Belsham DD. Palmitate alters the rhythmic expression of molecular clock genes and orexigenic neuropeptide Y mRNA levels within immortalized, hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413: 414-419.

Flint A, Kapitza C, Zdravkovic M. The once-daily human GLP-1 analogue liraglutide impacts appetite and energy intake in patients with type 2 diabetes after short-term treatment. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 958-962.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223.

Gault VA, Kerr BD, Harriott P, Flatt PR. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 107-117.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841-845.

Gonzalez-Garcia I, Ferno J, Dieguez C, Nogueiras R, Lopez M. Hypothalamic Lipids: Key Regulators of Whole Body Energy Balance. *Neuroendocrinology* 2017; 104: 398-411.

Grillo CA, Piroli GG, Evans AN, Macht VA, Wilson SP, Scott KA et al. Obesity/hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. *Physiol Behav* 2011a; 104: 235-241.

Grillo CA, Piroli GG, Junor L, Wilson SP, Mott DD, Wilson MA et al. Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus. *Physiol Behav* 2011b; 105: 138-144.

Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wrihten SA, Green AJ, Wilson SP et al. Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes* 2015; 64: 3927-3936.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111: 219-223.

- Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem* 2012; 120: 1060-1071.
- Gustafson D, Lissner L, Bengtsson C, Bjorkelund C, Skoog I. A 24-year follow-up of body mass index and cerebral atrophy. *Neurology* 2004; 63: 1876-1881.
- Habener JF, Stanojevic V. Alpha cells come of age. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24: 153-163.
- Hamilton A, Holscher C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport* 2009; 20: 1161-1166.
- Hao S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun* 2016; 51: 230-239.
- Harlan SM, Morgan DA, Agassandian K, Guo DF, Cassell MD, Sigmund CD et al. Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ Res* 2011; 108: 808-812.
- Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998; 780: 294-303.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lynch MA, Vraniak PD, Wenk GL. Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. *Exp Neurol* 2002; 176: 336-341.
- Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol* 2015; 27: 149-160.
- Henneman WJ, Sluimer JD, Barnes J, van der Flier WM, Sluimer IC, Fox NC et al. Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures. *Neurology* 2009; 72: 999-1007.
- Holm TH, Draeby D, Owens T. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* 2012; 60: 630-638.
- Holscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *J Endocrinol* 2014; 221: T31-41.
- Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 297: 127-136.
- Horowitz M, Flint A, Jones KL, Hindsberger C, Rasmussen MF, Kapitza C et al. Effect of the once-daily human GLP-1 analogue liraglutide on appetite, energy intake, energy expenditure and gastric emptying in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 97: 258-266.
- Hunter K, Holscher C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neurosci* 2012; 13: 33.
- Hurren KM, Pinelli NR. Drug-drug interactions with glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Ann Pharmacother* 2012; 46: 710-717.

- Hyun Lee C, Yan B, Yoo KY, Choi JH, Kwon SH, Her S et al. Ischemia - induced changes in glucagon - like peptide - 1 receptor and neuroprotective effect of its agonist, exendin - 4, in experimental transient cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research* 2011; 89: 1103-1113.
- Iuliano L, Pacelli A, Ciacciarelli M, Zerbinati C, Fagioli S, Piras F et al. Plasma fatty acid lipidomics in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013; 36: 545-553.
- Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 2006; 55: 352-360.
- Jelsing J, Vrang N, Hansen G, Raun K, Tang-Christensen M, Knudsen LB. Liraglutide: short-lived effect on gastric emptying -- long lasting effects on body weight. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14: 531-538.
- Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012; 61: 1444-1454.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem* 2016; 159: 491-496.
- Joers V, Tansey MG, Mulas G, Carta AR. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol* 2017; 155: 57-75.
- Juhl CB, Hollingdal M, Sturis J, Jakobsen G, Agerso H, Veldhuis J et al. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 424-429.
- Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav* 2011; 103: 59-68.
- Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology* 2011; 152: 3103-3112.
- Kappe C, Tracy LM, Patrone C, Iverfeldt K, Sjöholm A. GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 276.
- Karimi SA, Salehi I, Komaki A, Sarihi A, Zarei M, Shahidi S. Effect of high-fat diet and antioxidants on hippocampal long-term potentiation in rats: an in vivo study. *Brain Res* 2013; 1539: 1-6.
- Karmi A, Iozzo P, Viljanen A, Hirvonen J, Fielding BA, Virtanen K et al. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes* 2010; 59: 2171-2177.
- Kastin AJ, Akerstrom V. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 313-318.
- Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 2016; 1.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91: 461-553.

Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC, Jr., Xu AW, Barsh GS et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med* 2006; 12: 534-540.

Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab* 2009; 10: 249-259.

Konner AC, Bruning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 16-23.

Konner AC, Bruning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 2012; 16: 144-152.

Konner AC, Klockener T, Bruning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 2009; 97: 632-638.

Lam TK, Van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 2003; 284: E281-E290.

Larsen PJ, Fledelius C, Knudsen LB, Tang-Christensen M. Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. *Diabetes* 2001; 50: 2530-2539.

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 16683-16689.

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8514-8519.

Letra L, Santana I, Seica R. Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: the role of adipocytokines. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 563-568.

Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017; 541: 481-487.

Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2014; 15: 6-15.

Liu W, Jalewa J, Sharma M, Li G, Li L, Holscher C. Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2015; 303: 42-50.

Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2007; 27: 2846-2857.

Liu YH, Zhang Y, Xu Q, Yu XM, Zhang XS, Wang J et al. Increased norepinephrine by medium-chain triglyceride attributable to lipolysis in white and brown adipose tissue of C57BL/6J mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76: 1213-1218.

- Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 2012; 61: 2753-2762.
- Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, Holscher C et al. The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-beta plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2013; 15: 102-114.
- Lopez M, Dieguez C, Nogueiras R. Hypothalamic GLP-1: the control of BAT thermogenesis and browning of white fat. *Adipocyte* 2015; 4: 141-145.
- Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404: 652-660.
- Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 354-365.
- Luo XG, Chen SD. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener* 2012; 1: 9.
- Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 2009; 40: 139-156.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486.
- Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611: 211-225.
- Martin SJ, Clark RE. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 401-431.
- Marwarha G, Claycombe K, Schommer J, Collins D, Ghribi O. Palmitate-induced Endoplasmic Reticulum stress and subsequent C/EBPalpha Homologous Protein activation attenuates leptin and Insulin-like growth factor 1 expression in the brain. *Cell Signal* 2016; 28: 1789-1805.
- Mashiko S, Moriya R, Ishihara A, Gomori A, Matsushita H, Egashira S et al. Synergistic interaction between neuropeptide Y1 and Y5 receptor pathways in regulation of energy homeostasis. *Eur J Pharmacol* 2009; 615: 113-117.
- Matyszak MK. Inflammation in the CNS: balance between immunological privilege and immune responses. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 19-35.
- Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 2010; 151: 576-585.
- McClean PL, Gault VA, Harriott P, Holscher C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2010; 630: 158-162.

McClellan PL, Holscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2014; 76 Pt A: 57-67.

McClellan PL, Jalewa J, Holscher C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice. *Behav Brain Res* 2015; 293: 96-106.

McClellan PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2011; 31: 6587-6594.

McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93: 546-553.

Michael-Titus AT, Priestley JV. Omega-3 fatty acids and traumatic neurological injury: from neuroprotection to neuroplasticity? *Trends Neurosci* 2014; 37: 30-38.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009; 29: 359-370.

Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 88-94.

Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience* 2015; 302: 59-73.

Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. *Horm Behav* 2006; 50: 748-752.

Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 2009; 4: e5045.

Morgan DA, Thedens DR, Weiss R, Rahmouni K. Mechanisms mediating renal sympathetic activation to leptin in obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1730-1736.

Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 4.

Mrak R. Alzheimer-type neuropathological changes in morbidly obese elderly individuals. *Clinical neuropathology* 2008; 28: 40-45.

Myers MG, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell metabolism* 2009; 9: 117-123.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 2016; 7: 27-31.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318.

- Niswender K, Pi-Sunyer X, Buse J, Jensen KH, Toft AD, Russell-Jones D et al. Weight change with liraglutide and comparator therapies: an analysis of seven phase 3 trials from the liraglutide diabetes development programme. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 42-54.
- Nogueiras R, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Morgan DA, Varela L, Haynes WG et al. Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. *J Neurosci* 2009; 29: 5916-5925.
- Pandey NR, Zhou X, Qin Z, Zaman T, Gomez-Smith M, Keyhanian K et al. The LIM domain only 4 protein is a metabolic responsive inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B that controls hypothalamic leptin signaling. *J Neurosci* 2013; 33: 12647-12655.
- Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 2013; 45: e66.
- Parthasarathy V, Holscher C. Chronic treatment with the GLP1 analogue liraglutide increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. *PLoS One* 2013a; 8: e58784.
- Parthasarathy V, Holscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 2013b; 700: 42-50.
- Patil S, Chan C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 2005; 384: 288-293.
- Patil S, Sheng L, Masserang A, Chan C. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci Lett* 2006; 406: 55-59.
- Paxinos GF, Franklin K. 2001. *KBJ: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. In: New York: Academic Press.
- Perry T, Holloway HW, Weerasuriya A, Mouton PR, Duffy K, Mattison JA et al. Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp Neurol* 2007; 203: 293-301.
- Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM et al. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res* 2003; 72: 603-612.
- Porter DW, Kerr BD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA. Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12: 891-899.
- Porter WD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA. Liraglutide improves hippocampal synaptic plasticity associated with increased expression of Mash1 in ob/ob mice. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 678-684.
- Portovedo M, Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Coope A, Reginato A, Razolli DS et al. Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. *PLoS One* 2015; 10: e0119850.

Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E1003-1012.

Proctor C, Thiennimitr P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Diet, gut microbiota and cognition. *Metab Brain Dis* 2017; 32: 1-17.

Qin Z, Sun Z, Huang J, Hu Y, Wu Z, Mei B. Mutated recombinant human glucagon-like peptide-1 protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by amyloid-beta peptide (1-42). *Neurosci Lett* 2008; 444: 217-221.

Rahmouni K, Morgan DA. Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin. *Hypertension* 2007; 49: 647-652.

Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016; 353: 777-783.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951.

Richard D. Energy expenditure: a critical determinant of energy balance with key hypothalamic controls. *Minerva Endocrinol* 2007; 32: 173-183.

Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34 Suppl 2: S59-66.

Rodriguez-Navas C, Morselli E, Clegg DJ. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol Metab* 2016; 5: 680-689.

Ross RA, Rossetti L, Lam TK, Schwartz GJ. Differential effects of hypothalamic long-chain fatty acid infusions on suppression of hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: E633-639.

Rotondo A, Janssen P, Mule F, Tack J. Effect of the GLP-1 analog liraglutide on satiation and gastric sensorimotor function during nutrient-drink ingestion. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 693-698.

Sabin MA, De Hora M, Holly JM, Hunt LP, Ford AL, Williams SR et al. Fasting nonesterified fatty acid profiles in childhood and their relationship with adiposity, insulin sensitivity, and lipid levels. *Pediatrics* 2007; 120: e1426-1433.

Sahin TD, Karson A, Balci F, Yazir Y, Bayramgurler D, Utkan T. TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behav Brain Res* 2015; 292: 233-240.

Sanchez-Lasheras C, Konner AC, Bruning JC. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 4-15.

Santiago JA, Potashkin JA. Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. *Trends Mol Med* 2013; 19: 176-186.

Schaeffer M, Hodson DJ, Mollard P. 2014. *The blood - brain barrier as a regulator of the gut - brain axis*. In: How Gut and Brain Control Metabolism: Karger Publishers. p 29-49.

Schwinkendorf DR, Tsatsos NG, Gosnell BA, Mashek DG. Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 336-344.

Seeley RJ, Woods SC. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 901-909.

Sharma MK, Jalewa J, Holscher C. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress. *J Neurochem* 2014; 128: 459-471.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 3015-3025.

Shi YC, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G et al. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab* 2013; 17: 236-248.

Shirazi R, Palsdottir V, Collander J, Anesten F, Vogel H, Langlet F et al. Glucagon-like peptide 1 receptor induced suppression of food intake, and body weight is mediated by central IL-1 and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16199-16204.

Smith QR, Nagura H. Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *J Mol Neurosci* 2001; 16: 167-172; discussion 215-121.

Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol* 2016; (*em impressão*, doi: 10.1007/s12035-016-0297-1).

Srodulski S, Sharma S, Bachstetter AB, Brelsfoard JM, Pascual C, Xie XS et al. Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain accumulation of amylin. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 30.

Stern SA, Chen DY, Alberini CM. The effect of insulin and insulin-like growth factors on hippocampus- and amygdala-dependent long-term memory formation. *Learn Mem* 2014; 21: 556-563.

Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience* 2015; 309: 125-139.

Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008; 18: 1085-1088.

Sun H, Knippenberg S, Thau N, Ragancokova D, Korner S, Huang D et al. Therapeutic potential of N-acetyl-glucagon-like peptide-1 in primary motor neuron cultures derived from non-transgenic and SOD1-G93A ALS mice. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 347-357.

Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of neuroimmunology* 2001; 113: 49-62.

Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 181.

Tews D, Wabitsch M. Renaissance of brown adipose tissue. *Horm Res Paediatr* 2011; 75: 231-239.

- Tooyama I, Kimura H, Akiyama H, McGeer PL. Reactive microglia express class I and class II major histocompatibility complex antigens in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1990; 523: 273-280.
- Tung YC, Gulati P, Liu CH, Rimmington D, Dennis R, Ma M et al. FTO is necessary for the induction of leptin resistance by high-fat feeding. *Mol Metab* 2015; 4: 287-298.
- Unger JR, Parkin CG. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: Differentiating the new medications. *Diabetes Ther* 2011; 2: 29-39.
- Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 189-193.
- Vendrell J, El Bekay R, Peral B, Garcia-Fuentes E, Megia A, Macias-Gonzalez M et al. Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance. *Endocrinology* 2011; 152: 4072-4079.
- Vinet J, Weering HR, Heinrich A, Kalin RE, Wegner A, Brouwer N et al. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 27.
- Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. *Lancet Neurol* 2015; 14: 945-955.
- Wang SW, Wang M, Grossman BM, Martin RJ. Effects of dietary fat on food intake and brain uptake and oxidation of fatty acids. *Physiol Behav* 1994; 56: 517-522.
- Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 347-355.
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149: 871-885.
- Xu W, Yang Y, Yuan G, Zhu W, Ma D, Hu S. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces Alzheimer disease-associated tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes. *J Investig Med* 2015; 63: 267-272.
- Yang Y, Moghadam AA, Corder ZA, Liang NC, Moran TH. Long term exendin-4 treatment reduces food intake and body weight and alters expression of brain homeostatic and reward markers. *Endocrinology* 2014; 155: 3473-3483.
- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H. Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 235-239.
- Zanier ER, Fumagalli S, Perego C, Pischutta F, De Simoni MG. Shape descriptors of the "never resting" microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Med Exp* 2015; 3: 39.
- Zhang W, Li P, Hu X, Zhang F, Chen J, Gao Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16: 2653-2670.
- Zhang Y, Kilroy GE, Henagan TM, Prpic-Uhing V, Richards WG, Bannon AW et al. Targeted deletion of melanocortin receptor subtypes 3 and 4, but not CART, alters nutrient partitioning

and compromises behavioral and metabolic responses to leptin. *FASEB J* 2005; 19: 1482-1491.

Zhu H, Zhang Y, Shi Z, Lu D, Li T, Ding Y et al. The Neuroprotection of Liraglutide Against Ischaemia-induced Apoptosis through the Activation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways. *Sci Rep* 2016; 6: 26859.

APÊNDICE – Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/030/2014 sobre "Efeito da liraglutida (agonista do receptor do peptídeo similar ao glucagon-GLP-1) na inflamação hipotalâmica induzida por lipopolissacarídeo intracerebroventricular" sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarin de Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 24/07/2014. Este certificado expira em 24/07/2018.

Rio de Janeiro, 24 de Julho de 2014.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br



Beneficial effects of liraglutide (GLP1 analog) in the hippocampal inflammation

Andre R. C. Barreto-Vianna¹ · Marcia B. Aguilã¹ · Carlos A. Mandarim-de-Lacerda^{1,2}

Received: 25 October 2016 / Accepted: 20 June 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract The brain is very sensitive to metabolic dysfunctions induced by diets high in saturated fatty acids, leading to neuroinflammation. The liraglutide has been found to have neuroprotective effects. However, its neuroprotective action in a model of palmitate-induced neuroinflammation had not yet been evaluated. Mice were intracerebroventricular (ICV) infused with palmitate and received subcutaneous liraglutide. The hippocampal dentate gyrus and CA1 regions were analyzed (morphology and inflammation-related proteins in microglia and astrocyte by confocal microscopy). Also, a real-time PCR was performed to measure the levels of tumor necrosis factor (TNF) *alpha* and interleukin (IL) 6. Palmitate ICV infusion resulted in pronounced inflammation response in the hippocampus, reactive microgliosis, and astrogliosis, with hypertrophied IBA1 immunoreactive microglia, increased microglial density with ameboid shape, decreased in the number of branches and junctions and increased the major histocompatibility complex (MHC) II expression. Also, we observed in the hippocampus of ICV palmitate infused mice

an elevation in the pro-inflammatory cytokine levels TNF α and IL6. Liraglutide induced the neuroprotective microglial phenotype, characterized by an increased microglia complexity (enlarged Feret's diameter), an improved number of both cell junctions and processes, and lower circularity, accompanied by a significant reduction in TNF α and IL6 expressions. The study provides evidence that liraglutide may be a suitable treatment against the palmitate-induced neuroinflammation, which it is characterized by the reactive microgliosis and astrogliosis, as well as increased pro-inflammatory cytokines, which has been described as one of the primary causes of several pathologies of the central nervous system.

Keywords Intracerebroventricular infusion · Saturated fatty acids · Neuroinflammation · Hippocampus · Microglia

Introduction

The uncontrolled neuroinflammation plays a key role in early-onset and progression of neurodegenerative diseases (Baron et al. 2014; Milanski et al. 2009), which is related to a process similar to peripheral insulin resistance, and associated with obesity (Gupta et al. 2012). Thus, the demand for drugs that minimize the harmful effects of obesity in the central nervous system (CNS), like the restoration of brain insulin sensitivity become increasingly significant (Athauda and Foltynie 2016; Park et al. 2017).

Obese individuals have elevated levels of serum saturated fatty acids, mainly palmitate (Sabin et al. 2007). The increase of palmitate concentration is observed in the brain of mice fed a high-fat (HF) diet (Rodríguez-Navas et al. 2016). Although the fatty acids are essential in the constitution of cell membranes and used as cellular messengers in areas of the nervous

✉ Carlos A. Mandarim-de-Lacerda
mandarim@uerj.br

Andre R. C. Barreto-Vianna
andrercbv@hotmail.com

Marcia B. Aguilã
marciaguila@gmail.com

¹ Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Centro Biomedico, Instituto de Biologia, Laboratorio de Morfometria, Metabolismo e doenca Cardiovascular (www.lmmc.uerj.br), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil

ANEXO B – Artigo submetido

PLOS ONE

Liraglutide (GLP-1 analog) has beneficial effects in the hypothalamus impairment caused by a long-term intracerebroventricular infusion of palmitate

--Manuscript Draft--

| | |
|---|--|
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Research Article |
| Full Title: | Liraglutide (GLP-1 analog) has beneficial effects in the hypothalamus impairment caused by a long-term intracerebroventricular infusion of palmitate |
| Short Title: | Hypothalamic inflammation and liraglutide |
| Corresponding Author: | Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, M.D., Ph.D. Universidade do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ BRAZIL |
| Keywords: | neuroinflammation; energy control; type 2 diabetes; thermogenesis; hypothalamus microscopy |
| Abstract: | Saturated fatty acids are associated with diet-induced neuroinflammation. GLP-1 agonists, such as liraglutide, have neuroprotective effects against the consequences of obesity. C57BL/6 mice were submitted to an intracerebroventricular (ICV) infusion of palmitate (500 μ M) or artificial liquor for four weeks, and subcutaneous injection of liraglutide (200 μ g/kg) or saline during the last two weeks. We investigated the effects of ICV infusion of palmitate in the hypothalamus, white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues through protein and gene expressions of inflammatory markers, and energy balance through the analysis of hypothalamic neuropeptides, lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis. Palmitate decreased glucose tolerance, but increased body mass and insulin resistance. Palmitate led to the high hypothalamic expression of inflammatory markers (IL1-beta and TNF-alpha), impaired energy balance, increased NPY levels and diminished POMC levels, and hypothalamic insulin resistance through increased levels of NFkB, Ikbalpha, and SOCS-3. Palmitate also led to large WAT adipocytes with increased NFkB and JNK levels. In BAT, palmitate resulted in high levels of fatty acid transporter CD36 and the regulator of fatty acid storage and release, PLIN. Palmitate decreased the adrenergic pathway to BAT and reduced the UCP-1, inhibiting lipolysis and thermogenesis. Liraglutide was effective in attenuating the effects associated with palmitate infusion. Liraglutide restored the energy control, attenuated the neuroinflammation and the insulin resistance induced by palmitate, and stimulated lipolysis in WAT and increased thermogenesis in BAT. The data imply that ICV infusion of palmitate could mimic the effects of the high-fat diet in the hypothalamus, causing a dysregulation of energy control, neuroinflammation, activation of lipogenesis pathway and a decrease of thermogenesis. Liraglutide showed significant beneficial effects, restoring, at least in part, the damage caused by the ICV infusion of palmitate in the hypothalamus, reducing the neuroinflammation process, the thermogenesis in BAT and insulin signaling in WAT. |
| Order of Authors: | Andre R. Barreto-Vianna Marcia Barbosa Aguila Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, M.D., Ph.D. |
| Opposed Reviewers: | |
| Additional Information: | |
| Question | Response |
| Financial Disclosure Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and | The work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) grant numbers 442673/2014-0 and 302.920/2016-1 to CML, and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho do Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro), grant numbers E-26/201.186/2014 to CML, and E-26/201.335/2014 to MBA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. |