

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Carollina Fraga Da Ré

Avaliação de alterações hipocampais e de memória na progressão do diabetes mellitus tipo 2
não associado à obesidade em ratos Wistar.

Porto Alegre
2023

Carollina Fraga Da Ré

Avaliação de alterações hipocampais e de memória na progressão do diabetes mellitus tipo 2
não associado à obesidade em ratos Wistar.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à
obtenção de grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Concli Leite

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Fraga Da Ré, Carollina

Avaliação de alterações hipocampais e de memória na progressão do diabetes mellitus tipo 2 não associado à obesidade em ratos Wistar. / Carollina Fraga Da Ré. -- 2023.

108 f.

Orientadora: Marina Concli Leite.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Leptina. 2. Diabetes Mellitus. 3. Alzheimer. 4. S100B. 5. Sistema Nervoso Central. I. Concli Leite, Marina, orient. II. Título.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho a minha vó Magali (em memória) e aos meus pais que sempre me incentivaram aos estudos e foram meu principal apoio sempre.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ary e Márcia, por terem me ensinado que o conhecimento é o bem mais valioso que podemos adquirir durante a vida, e, por terem proporcionado estrutura física e emocional para que tudo isso fosse possível. Vocês são tudo para mim.

Às minhas irmãs, Gabriella e Allessandra, pelo apoio e paciência, por estarem sempre dispostas a ajudar no que fosse possível. Aos meus sobrinhos Bernardo, Anthony e Antonella por encherem meus dias de alegria e me darem força para seguir em frente. Amo vocês.

À toda minha família, dindos, tios, primos e cunhados pelo exemplo e apoio que sempre me deram nessa trajetória. Principalmente minha prima, quase irmã, Daniela, que me apresentou o mundo da pesquisa e sempre teve minha admiração, obrigada por toda ajuda não tenho nem palavras para te agradecer.

À minha orientadora Marina, por todos os ensinamentos durante esses anos, pelo apoio incondicional e pela compreensão. Obrigada por sempre respeitar minhas decisões e meu momento para cada etapa. Esse caminho teria sido muito mais difícil sem tu seres exatamente como és. Obrigada por tudo.

Ao CA por ter aberto as portas da pesquisa para mim, por todos os ensinamentos e disponibilidade durante todas as etapas da minha vida acadêmica.

À minha eterna IC Jé pela ajuda e amizade, aprendi muito contigo e me orgulho do caminho que segui até aqui, tens muito o que conquistar.

Ao Gabriel pelo auxílio incansável na parte prática, por todo ensinamento fora da caixa e pelas risadas diárias.

Às colegas e amigas Fezinha, Marina e Jéssica por toda ajuda e apoio em todos os momentos.

À Maria e à Fafá por terem sido meu exemplo e terem me ensinado a base para minha pesquisa. Obrigada por tudo.

Aos amigos e colegas dos Labs 31 e 33 pelo apoio científico e pela amizade e descontração que tornaram toda a rotina mais leve. Obrigada por terem feito parte desse período tão importante da minha vida.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fapergs. À UFRGS e ao PPG-Bioquímica pela oportunidade de ter um ensino de qualidade.

Índice

PARTE I.....	1
Resumo.....	2
Abstract	3
Lista de Abreviaturas.....	4
1. Introdução.....	5
1.1. Diabetes mellitus	5
1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1	5
1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	6
1.1.3. DM2 e memória.....	7
1.1.1. Leptina e DM2.....	8
1.2. Leptina.....	9
1.2.1. Produção de leptina	9
1.2.2. Sinalização de leptina	10
1.2.3. Resistência à leptina	11
1.2.4. Leptina na resposta imune	13
1.2.4.1. Leptina e neuroinflamação	15
1.3. Neuroinflamação	17
1.3.1. Neuroinflamação e memória	19
1.4. Doenças neurodegenerativas	19
1.4.1. Doença de Alzheimer	20
1.4.2. DM2 e doença de Alzheimer.....	21
2. Justificativa.....	22
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
PARTE II.....	23
Capítulo I.....	24
Capítulo II	58
PARTE III	67
4. Discussão.....	68

4.1. Prejuízos cognitivos e leptina.....	68
4.2. Atividade hipocampal.....	76
4.3. Alterações periféricas	80
5. Conclusões	85
6. Perspectivas.....	85
7. Referências Bibliográficas	86
ANEXO I.....	98

PARTE I

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é caracterizado por uma hiperglicemia crônica, em resposta a uma resistência tecidual à insulina com posterior prejuízo na sua secreção ao longo da progressão da doença. O DM2 é um fator de risco para diversas alterações centrais e periféricas, entre elas, prejuízos cognitivos e neuroinflamação. A leptina tem apresentado papel importante no funcionamento cerebral, inclusive nos processos de memória e aprendizagem, porém, uma associação direta do DM2 com essa adipocina ainda não está clara, uma vez que seus níveis podem variar de acordo com o peso corporal e grande parte dos indivíduos e modelos animais de DM2 apresentam obesidade. Com isso, o objetivo do presente estudo foi investigar alterações de memória, hipocampais e periféricas durante a progressão do diabetes mellitus tipo 2 e na neuroinflamação aguda em ratos Wistar adultos machos. Para isso, utilizamos um modelo de DM2 em ratos Wistar adultos sem a presença de obesidade, induzido com estreptozotocina (STZ) e nicotinamida (NA), avaliamos alterações de memória, hipocampais e séricas em dois estágios de progressão da doença, um estágio inicial, após 4 semanas, e um estágio avançado, após 16 semanas. Além disso, utilizamos um modelo de neuroinflamação aguda com lipopolissacarídeo (LPS), avaliando os parâmetros após 48 h. Encontramos alterações de memória nos dois modelos utilizados, tanto ao longo do DM2 quanto em resposta a neuroinflamação aguda. Porém, relacionando-se essas alterações à sinalização de leptina os resultados foram diferentes. Nos animais com DM2 induzida, pode-se observar uma redução nos níveis séricos de leptina nos animais com um estágio de doença avançada, porém não há diferença significativa no estágio inicial. Além disso, não houve alteração na sinalização de leptina no hipocampo desses animais. Em contrapartida, 48 h após a indução de neuroinflamação os níveis séricos de leptina se mostraram reduzidos e a concentração de seu receptor foi maior em comparação ao grupo sham. Investigamos, também, a atividade astrocítica no hipocampo dos ratos após a indução de DM2 e de neuroinflamação. A concentração de GFAP no hipocampo dos animais com DM2 se mostrou aumentada apenas no estágio inicial da doença, assim como em resposta a neuroinflamação aguda. Além disso, a proteína S100B no líquor dos animais com DM2 foi reduzida em comparação ao grupo sham, também, apenas no estágio inicial da doença. Por outro lado, a S100B sérica foi reduzida após a indução de neuroinflamação aguda, porém não houve alteração em resposta ao DM2. A concentração de β -amiloide e de proteína tau fosforilada se mostrou aumentada no hipocampo dos ratos com DM2 após 16 semanas, demonstrando uma alteração similar à doença de Alzheimer no estágio avançado da doença. Com isso, concluímos que, o DM2 leva a prejuízos cognitivos mesmo em um estágio inicial da doença e estes estão relacionados com alterações astrocíticas. Já em um estágio avançado, os parâmetros neuronais é que estão alterados. Assim como no modelo de DM2, o modelo agudo de neuroinflamação também ocasionou um prejuízo de memória, o que pode ou não estar relacionados à resposta por leptina em ambos os modelos.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by chronic hyperglycemia, in response to tissue resistance to insulin with subsequent impairment of insulin secretion over the course of disease. T2DM is a risk factor for several central and peripheral changes, including cognitive impairment and neuroinflammation. Leptin has played an important role in brain functioning, including memory and learning processes, however, a direct association of T2DM with this adipokine is still unclear, since its levels may vary according to body weight and most of the individuals and animal models of T2DM have obesity. Therefore, the aim of the present study was to investigate memory, hippocampal and peripheral alterations during the progression of type 2 diabetes mellitus and in acute neuroinflammation in adult male Wistar rats. For this, we used a T2DM model in adult Wistar rats without the presence of obesity, induced by streptozotocin (STZ) and nicotinamide (NA), we evaluated memory, hippocampal and serum alterations in two stages of diabetes progression, an initial stage, after 4 weeks, and an advanced stage after 16 weeks. Furthermore, we used a model of acute neuroinflammation with lipopolysaccharide (LPS), evaluating the parameters after 48 h. We found memory alterations in two models, during T2DM progression and in response to acute neuroinflammation. However, these results were not related to leptin signalling. In animals with induced T2DM, a reduction in serum leptin levels can be observed in animals with an advanced disease stage, but there is no significant difference in the initial stage. Furthermore, there was no change in leptin signaling in the hippocampus of these animals. On the other hand, 48 h after neuroinflammation induction, serum leptin levels were reduced and the concentration of its receptor was higher compared to the sham group. We also investigated the astrocytic activity in the hippocampus of rats after induction of T2DM and neuroinflammation. The concentration of GFAP in hippocampus of animals with T2DM was increased only in the initial stage of the disease, as well as in response to acute neuroinflammation. Furthermore, the S100B protein in the CSF of animals with T2DM was reduced compared to the sham group, also only in the initial stage of the disease. On the other hand, serum S100B was reduced after the induction of acute neuroinflammation, but there was no change in response to T2DM. The concentration of β -amyloid and phosphorylated tau protein was increased in the hippocampus of rats with DM2 after 16 weeks, demonstrating an alteration similar to Alzheimer's disease in the advanced stage of the disease. Thus, we conclude that T2DM leads to cognitive impairments even an early stage of disease and these are related to astrocytic changes. Already in an advanced stage, neuronal parameters are altered. As in T2DM model, the acute model of neuroinflammation also caused memory impairment, which may or may not be related to the leptin response in both models.

Lista de Abreviaturas

AP-1 – ativador de proteína 1

BHE – barreira hematoencefálica

COX-2 – ciclooxigenase-2

DM – diabetes mellitus

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

GS – glutamina sintetase

GSH – glutatona reduzida

HIV – vírus da imunodeficiência humana

ICV – intracerebroventricular

IL-1 β – interleucina 1 β

IP – intraperitoneal

JAK2 – janus cinase 2

LCR – líquido

LPS – lipopolissacarídeo

NA – nicotinamida

NF- κ B – fator nuclear κ B

ObR – receptor de leptina

PTP1B – proteína-tirosina fosfatase 1B

RAGE – receptor para produtos de glicação avançada

SNC – sistema nervoso central

SOCS3 – supressor de sinalização de citocina 3

STAT3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

STZ – estreptozotocina

TLR4 – receptor *toll-like* 4

TNF- α – fator de necrose tumoral α

1. Introdução

1.1. Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma patologia metabólica crônica que ocorre devido a uma incapacidade pancreática em produzir insulina ou a uma resistência tecidual e consequente redução na sinalização de insulina nos tecidos (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022). Devido ao papel deste hormônio na homeostase da glicose, o DM tem como principal consequência hiperglicemia (INZUCCHI, 2013).

O DM pode ser classificado em DM tipo 1 (DM1), que abrange 5 a 10 % do total de diabéticos, no qual ocorre uma deficiência na produção de insulina pelo pâncreas, e DM tipo 2 (DM2), que equivale a 90 a 95 % do total de diabéticos, onde ocorre uma diminuição gradativa da sensibilidade dos tecidos a insulina, levando a resistência dos tecidos a este hormônio (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022). Existem também outros tipos de diabetes, dentre os quais pode-se citar o diabetes mellitus gestacional, no qual a etiologia ainda é desconhecida, porém é bastante frequente e tem como principal característica a hiperglicemia durante a gestação (KOIVUSALO; RÖNÖ; KLEMETTI; ROINE *et al.*, 2016).

1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1

O DM1 é uma doença autoimune, onde há destruição parcial ou total das células β -pancreáticas, levando a consequente deficiência na produção de insulina pelo pâncreas resultando em um quadro crônico de hiperglicemia (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). O diagnóstico de DM1 pode ser feito, após detecção sintomas metabólicos como a hiperglicemia ou pela presença de anticorpos específicos, responsáveis pela resposta autoimune sobre as células β -pancreáticas (ZACCARDI; WEBB; YATES; DAVIES, 2016). Dentre os principais sintomas em crianças pode haver poliúria, polidipsia e algumas apresentam cetoacidose diabética (DABELEA; MAYER-DAVIS, 2014). O DM1 também pode levar a prejuízos cognitivos, demonstrados em humanos e roedores com essa patologia. Estudos

relataram prejuízos na eficiência mental, velocidade psicomotora, funcionamento executivo e no quociente de inteligência (NUNLEY; ROSANO; RYAN; JENNINGS *et al.*, 2015; ZANOTTO; SIMÃO; GASPARIN; BIASIBETTI *et al.*, 2017).

1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico caracterizado por aumento de glicemia e por uma diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina, além de alterações na secreção deste hormônio pelo pâncreas (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022). O risco para desenvolver o DM2 aumenta com envelhecimento, presença de obesidade e inatividade física (BARBAGALLO; DOMINGUEZ, 2014), sendo assim, sua prevalência tem aumentado em países em desenvolvimento (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). O diagnóstico de DM2 pode ser feito através de exames de glicemia de jejum, teste de tolerância oral à glicose e hemoglobina glicada sérica alterados (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022).

Inicialmente o DM2 é caracterizado pela redução na capacidade de sinalização da insulina nos tecidos (BIDDINGER; KAHN, 2006; SCHWARTZ; SEELEY; TSCHÖP; WOODS *et al.*, 2013). Em um quadro inicial da doença (pré-diagnóstico) ocorre, em resposta à hiperglicemia causada pela resistência à insulina, uma compensação na secreção deste hormônio pelas células β -pancreáticas, conseguindo assim manter a glicemia em níveis normais. Com esse aumento na estimulação das células β -pancreáticas, ocorre uma disfunção gradativa destas, levando assim, a redução na secreção de insulina e consequente hiperglicemia crônica (SCHWARTZ; SEELEY; TSCHÖP; WOODS *et al.*, 2013). A resistência à insulina afeta principalmente células hepáticas, musculares e adiposas.

O DM2 pode levar a alterações micro e macrovasculares, ocasionando diversas complicações. Essas alterações podem levar a diversas complicações periféricas e centrais, podendo afetar os rins e os nervos (ASLAM; SINGH; RAJBHANDARI, 2014; CURRIE; MCKAY; DELLES, 2014), e também a complicações centrais, como retinopatia e acidente

vascular cerebral (GREEN, 2014; SONG; WONG, 2014). Além disso, estudos clínicos têm demonstrado uma associação entre a presença de DM2 e um risco aumentado de desenvolver prejuízos cognitivos e doenças neurodegenerativas (SOARES; PREDIGER; NUNES; CASTRO *et al.*, 2013). Diversos estudos longitudinais mostraram que a intolerância à glicose e a diminuição da secreção de insulina estão associados a um maior risco de desenvolver demência ou doença de Alzheimer (MORRIS; VIDONI; HONEA; BURNS *et al.*, 2014; RÖNNEMAA; ZETHELIUS; SUNDELÖF; SUNDSTRÖM *et al.*, 2008).

1.1.3. DM2 e memória

Como dito anteriormente, indivíduos com DM2 apresentam redução na capacidade cognitiva, desde comprometimento cognitivo leve até avançado (EBADY; ARAMI; SHAFIGH, 2008; FEINKOHL; KELLER; ROBERTSON; MORLING *et al.*, 2013; ZHAO; ROBERTS; DING; CHA *et al.*, 2015). Com os avanços científicos no tratamento do DM2 os pacientes têm uma sobrevida aumentada, podendo desenvolver assim, outras patologias associadas ao envelhecimento, como as demências (SAEDI; GHEINI; FAIZ; ARAMI, 2016). Além disso, pacientes com DM2 apresentam risco aumentado de desenvolver demências, incluindo a doença de Alzheimer (BARBAGALLO; DOMINGUEZ, 2014).

Durante os últimos anos a relação do DM2 com distúrbios na memória já vem sendo estabelecida, então, alguns estudos vêm buscando estabelecer quais fatores contribuem para esses prejuízos. Um estudo de coorte avaliou cerca de 2000 pacientes durante 15 anos, e mostrou que nos pacientes com DM2, a redução na capacidade cognitiva estava associada às alterações cardiovasculares (WESSELS; LANE; GAO; HALL *et al.*, 2011). Outro estudo prospectivo publicado em 2013, mostrou que os acidentes vasculares cerebrais e os marcadores subclínicos de doenças cardiovasculares e aterosclerose estão associados ao declínio cognitivo em pacientes idosos com DM2 (FEINKOHL; KELLER; ROBERTSON; MORLING *et al.*, 2013). Além disso, o papel do DM2 na neurodegeneração foi avaliado através de estudos de

neuroimagem, os quais mostraram uma associação do DM2 com atrofia cerebral, onde a taxa de atrofia no envelhecimento nos pacientes com DM2 é até 3 vezes mais rápida em comparação com os pacientes saudáveis (KOOISTRA; GEERLINGS; MALI; VINCKEN *et al.*, 2013; MORAN; PHAN; CHEN; BLIZZARD *et al.*, 2013; VAN ELDEREN; DE ROOS; DE CRAEN; WESTENDORP *et al.*, 2010). Sendo assim, com algumas relações entre DM2 e prejuízos cognitivos estabelecidas, estudos em modelos animais da doença tem buscado definir as alterações moleculares e celulares envolvidas.

Diversos modelos animais de DM2 são utilizados na literatura para avaliar os efeitos da doença e seus possíveis tratamentos, que podem ser categorizados em: modelos espontaneamente obesos, modelos de obesidade induzida por dieta, modelos não obesos, modelos geneticamente induzidos por disfunção de células β e modelos animais diabéticos induzidos geneticamente (KING, 2012; WINZELL; AHRÉN, 2004; YOSHIDA; TANAKA; OSHIMA; YAMAZAKI *et al.*, 2010). A maioria dos modelos utilizados associa os efeitos da obesidade para o desenvolvimento do DM2.

1.1.1. Leptina e DM2

A concentração sérica de leptina tem se mostrado aumentada em indivíduos obesos, onde se sabe haver uma resistência hipotalâmica a este hormônio (STEFANOVIĆ; KOTUR-STEVLJEVIĆ; SPASIĆ; BOGAVAC-STANOJEVIĆ *et al.*, 2008). Além disso, pacientes diabéticos do tipo 2 também apresentam níveis circulantes deste hormônio aumentados quando a patologia essa associada com obesidade (ABDELLA; MOJIMINIYI; MOUSSA; ZAKI *et al.*, 2005; LÓPEZ-JARAMILLO; GÓMEZ-ARBELÁEZ; LÓPEZ-LÓPEZ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014), entretanto, em indivíduos com diabetes tipo 2 e peso corporal dentro da normalidade os níveis de leptina podem estar diminuídos (MOHAMMADZADEH; ZARGHAMI, 2013). Uma vez que grande parte dos pacientes diabéticos também apresenta obesidade, a relação direta entre o diabetes tipo 2 e as alterações da leptina ainda não é clara.

1.2. Leptina

A leptina é um hormônio peptídico produzido e secretado principalmente pelo tecido adiposo branco, sendo seus níveis circulantes proporcionais à quantidade de ácidos graxos estocada, podendo servir como um sinal de adiposidade (FREDERICH; HAMANN; ANDERSON; LÖLLMANN *et al.*, 1995). De fato, indivíduos obesos apresentam níveis circulantes de leptina maiores que indivíduos eutróficos, ao passo que, pessoas com baixo peso, como no caso de anoréxicos, os níveis de leptina são menores (STEINER; SCHILTZ; WALTER; WUNDERLICH *et al.*, 2010). Apesar de uma deficiência na produção ou na sinalização da leptina levar ao desenvolvimento da obesidade, esse hormônio não pode ser utilizado como uma forma de tratamento para a obesidade causada por dieta, uma vez que estes indivíduos já apresentam níveis circulantes de leptina acima da normalidade (CRUJEIRAS; CARREIRA; CABIA; ANDRADE *et al.*, 2015; SÁINZ; BARRENETXE; MORENO-ALIAGA; MARTÍNEZ, 2015).

Devido a ineficiência de utilizar a leptina como forma terapêutica para a obesidade, os estudos concluíram que, possivelmente, durante o desenvolvimento desta patologia, o organismo entre em um estado de resistência à leptina. Esta adipocina, após sua liberação para a corrente sanguínea, tem a capacidade de entrar no sistema nervoso central através de um transporte regulado e saturável pela barreira hematoencefálica (BANKS; KASTIN; HUANG; JASPAN *et al.*, 1996). Sua ação na homeostase energética é mediada no núcleo arqueado do hipotálamo, local mais estudado na identificação dos fatores que levam à resistência à leptina.

1.2.1. Produção de leptina

A produção de leptina pelo tecido adiposo reflete o tamanho deste tecido com o intuito de comunicar a quantidade de energia estocada (FREDERICH; HAMANN; ANDERSON; LÖLLMANN *et al.*, 1995; SCHWARTZ; PESKIND; RASKIND; BOYKO *et al.*, 1996). Além disso, os níveis circulantes de leptina variam de acordo com o estado alimentar, onde, durante

o jejum seus níveis são reduzidos enquanto que durante a alimentação ocorre um aumento (JØRGENSEN; BERNIER; MAULE; VIJAYAN, 2016).

Os níveis séricos de leptina também podem seguir o ritmo circadiano. Em ratos, os níveis atingem o pico durante o escurecer (período ativo) e seu ponto mais baixo no período mais inativo (SUKUMARAN; XUE; JUSKO; DUBOIS *et al.*, 2010). Porém, estas mudanças na leptina de acordo com o ciclo circadiano são modestas em comparação às mudanças metabólicas, como jejum ou exposição ao frio, durante as quais ocorrem alterações rápidas na síntese de leptina independente de alterações na massa adiposa (JØRGENSEN; BERNIER; MAULE; VIJAYAN, 2016).

O tecido adiposo subcutâneo produz e secreta mais leptina em comparação com o tecido adiposo visceral, assim como os níveis de leptina circulantes são maiores em mulheres do que em homens (MONTAGUE; PRINS; SANDERS; DIGBY *et al.*, 1997; PARK; AHIMA, 2015). Diversos outros fatores podem interferir na concentração de leptina circulante, como, por exemplo, a concentração de citocinas inflamatórias, glicocorticoides e insulina (MÜNZBERG; MORRISON, 2015).

1.2.2. Sinalização de leptina

A leptina tem sua sinalização intracelular mediada pela sua ligação ao receptor transmembrana ObR, também chamado de LepR, um receptor da família de receptores classe I de citocinas. Após a ligação da leptina à isoforma longa de seu receptor ObRb ocorre a ativação de diversas vias de sinalização (FRÜHBECK, 2006), como a ativação por fosforilação da molécula de STAT3 pela JAK2. A STAT3, após ativada, é translocada para o núcleo onde modula a produção de diversos genes como o gene para SOCS3 que tem sua produção aumentada por esta molécula (ALLISON; MYERS, 2014). A SOCS3 por sua vez age inibindo a atividade do receptor ObRb, através da ligação a um resíduo de tirosina específico nesse

receptor, tendo um papel na regulação negativa da sinalização por leptina (ALLISON; MYERS, 2014).

Esse receptor está presente em diversas áreas do cérebro, principalmente no hipotálamo, onde a leptina tem um papel na regulação da homeostase energética (PARK; AHIMA, 2014). Por outro lado, já se tem evidências da presença desse receptor em outras áreas cerebrais, como no hipocampo, onde a leptina tem se mostrado importante nos processos de memória e aprendizagem (IRVING; HARVEY, 2014).

1.2.3. Resistência à leptina

Como dito anteriormente, indivíduos obesos apresentam níveis de leptina circulante maiores que indivíduos eutróficos, porém esta não é efetiva em sua sinalização de saciedade (CRUJEIRAS; CARREIRA; CABIA; ANDRADE *et al.*, 2015). Isso ocorre, possivelmente, devido à resistência hipotalâmica à leptina, a qual pode ser resultante de uma redução na passagem deste hormônio através da barreira hematoencefálica (BHE) e/ou a uma redução na capacidade de sinalização tecidual por leptina (IZQUIERDO; CRUJEIRAS; CASANUEVA; CARREIRA, 2019).

A leptina é transportada através da BHE por um transporte específico e saturável. Portanto, alterações na BHE decorrentes da obesidade podem prejudicar a passagem de leptina para o sistema nervoso central (SNC) (BANKS, 2015). Com o aumento da adiposidade ocorre um aumento nos níveis circulantes de leptina o que, por sua vez, pode levar à resistência dos transportadores de leptina na BHE, diminuindo assim seu transporte (IZQUIERDO; CRUJEIRAS; CASANUEVA; CARREIRA, 2019). Isso leva a consequente diminuição da ativação das vias de sinalização desse hormônio, desregulando o controle da homeostase energética e consequentemente do peso corporal. Estudos anteriores já demonstraram que ratos obesos apresentam sensibilidade para administração de leptina intracerebroventricular (ICV) mas não a administração subcutânea ou intraperitoneal (IP) (HALAAS; BOOZER; BLAIR-

WEST; FIDAHUSEIN *et al.*, 1997; VAN HEEK; COMPTON; FRANCE; TEDESCO *et al.*, 1997). Isso levou a crer que a redução na capacidade de sinalização central a leptina poderia ser resultado, também, de uma diminuição em sua passagem através da BHE.

O mecanismo exato da passagem da leptina através da BHE ainda não está elucidado, porém sabe-se que este é dependente da presença das isoformas curtas de seus receptores (ObRa e ObRc) (HILEMAN; PIERROZ; MASUZAKI; BJØRBAEK *et al.*, 2002; PAN; HSUCHOU; HE; SAKHARKAR *et al.*, 2008), em modelos animais utilizando inibição genética da produção destes receptores ocorreu uma redução na passagem de leptina da periferia para o cérebro (DI SPIEZIO; SANDIN; DORE; MÜLLER-FIELITZ *et al.*, 2018; HILEMAN; PIERROZ; MASUZAKI; BJØRBAEK *et al.*, 2002). Com isso, espera-se que mecanismos regulatórios levem à redução dos receptores de leptina em resposta ao aumento de leptina circulante, o que reduziria sua passagem para o SNC. Entretanto, outros estudos têm colocado em contradição a redução da leptina no SNC como um fator para o desenvolvimento de resistência. A administração ICV de leptina em camundongos com obesidade induzida por dieta não levou a redução alimentar ou a perda de peso (EL-HASCHIMI; PIERROZ; HILEMAN; BJØRBAEK *et al.*, 2000). Um estudo utilizando técnica de fluorescência com leptina marcada em camundongos obesos demonstrou que não houve diferença entre animais obesos e magros no acúmulo de leptina em diferentes partes do cérebro (HARRISON; SCHRIEVER; FEUCHTINGER; KYRIAKOU *et al.*, 2019). Além disso, a perda de peso nesses animais levou a um aumento na expressão de leptina e de seu receptor em algumas áreas cerebrais (HARRISON; SCHRIEVER; FEUCHTINGER; KYRIAKOU *et al.*, 2019). Isso sugere que, em um estado de obesidade, o acúmulo de leptina é mantido nas principais áreas do cérebro envolvidas no metabolismo e controle de peso corporal. Com isso, podemos perceber que o envolvimento da BHE na resistência à leptina ainda não está bem compreendido.

A redução na capacidade de sinalização por leptina tem sido proposta como um dos fatores que levam à resistência central a esse hormônio. A SOCS3 tem sua produção aumentada após a ativação do ObR e tem um papel em sua regulação negativa (ALLISON; MYERS, 2014). Além disso, a proteína-tirosina fosfatase 1B (PTP1B) também apresenta um papel na regulação negativa da sinalização por leptina, através da desfosforilação da JAK2 (ZABOLOTNY; BENCE-HANULEC; STRICKER-KRONGRAD; HAJ *et al.*, 2002). Sendo assim, o aumento na quantidade de leptina circulante, como na obesidade, pode levar a um aumento na expressão de SOCS3 e de PTP1B, dessensibilizando, assim, os receptores de leptina, dificultando sua sinalização (YE; LIU; GUO; SU, 2018).

O estresse de retículo endoplasmático também tem sido proposto como um fator importante na resistência à leptina, o retículo endoplasmático é o responsável pela síntese, maturação e tráfico das proteínas nas células eucarióticas (VINCENZ-DONNELLY; HIPPEL, 2017). O acúmulo anormal de proteínas mal ou não dobradas no lúmen do retículo leva a um estado chamado de estresse de retículo endoplasmático, no qual há a ativação de diversas vias de sinalização com o intuito de compensar essa situação (HETZ; PAPA, 2018; WALTER; RON, 2011). Diversos estudos já demonstraram que modelos de indução de obesidade levam a estresse de retículo endoplasmático com consequente indução de vias pró-inflamatórias no hipotálamo e resistência à leptina (OZCAN; CAO; YILMAZ; LEE *et al.*, 2004; ZHANG; ZHANG; ZHANG; KARIN *et al.*, 2008). Levando, assim, a um ciclo de causa e consequência entre o estresse de retículo endoplasmático e a obesidade.

1.2.4. Leptina na resposta imune

A leptina, além do seu papel na regulação metabólica agindo como um hormônio anorexígeno, apresenta características de uma citocina, tendo uma função importante na regulação da resposta imune, agindo como uma mediadora entre o estado metabólico e imune no organismo (LA CAVA, 2017). Pode-se observar essa característica em obesos, onde os

níveis circulantes elevados de leptina estão relacionados a uma inflamação crônica de baixo grau (MATARESE; PROCACCINI; DE ROSA; HORVATH *et al.*, 2010). Ao passo que, em situações em que há baixos níveis circulantes desta adipocina, como na anorexia ou na desnutrição, há um aumento no risco de infecção e redução da resposta imune (MATARESE; LA CAVA; SANNA; LORD *et al.*, 2002).

Essa regulação da leptina no sistema imune pode ser observada em sua ação sobre monócitos/macrófagos, onde essa adipocina estimula a expressão e secreção de moléculas pró-inflamatórias assim como regula a proliferação e apoptose (GABAY; DREYER; PELLEGRINELLI; CHICHEPORTICHE *et al.*, 2001; GELSOMINO; GIORDANO; CAMERA; SISI *et al.*, 2020). Além disso, a leptina é capaz de regular a atividade de outros tipos celulares envolvidos na resposta imune como neutrófilos, linfócitos, entre outros (SOUZA-ALMEIDA; PALHINHA; LIECHOCKI; DA SILVA PEREIRA *et al.*, 2020). Porém, o papel exato da leptina na resposta inflamatória ainda não está bem elucidado, uma vez que essa adipocina já demonstrou ação pró- e anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (FLATOW; KOMEGAE; FONSECA; BRITO *et al.*, 2017; GABAY; DREYER; PELLEGRINELLI; CHICHEPORTICHE *et al.*, 2001).

Essa regulação imune pela leptina mostrou-se capaz de melhorar a sobrevivência em modelos animais de sepse (AGUILAR-VALLES; JUNG; POOLE; FLORES *et al.*, 2012; LA CAVA, 2017). Camundongos deficientes de leptina tiveram maior mortalidade e maiores danos teciduais em modelos de indução de sepse, ao passo que o tratamento com leptina diminuiu esses efeitos (TSCHÖP; NOGUEIRAS; HAAS-LOCKIE; KASTEN *et al.*, 2010). Além disso, camundongos com obesidade induzida por dieta e consequente aumento nos níveis de leptina apresentam uma maior taxa de sobrevivência em resposta à indução de sepse (SIEGL; ANNECKE; JOHNSON; SCHLAG *et al.*, 2014). Em humanos, pacientes recuperados de sepse apresentaram maior concentração de leptina circulante em comparação aos pacientes que não sobreviveram,

demonstrando, possivelmente um papel protetor dessa adipocina no processo de resposta à sepse (GJERTSSON; HULTGREN; STENSON; HOLMDAHL *et al.*, 2000; TSCHÖP; NOGUEIRAS; HAAS-LOCKIE; KASTEN *et al.*, 2010). Tem sido proposto, inclusive, que a redução na concentração de leptina circulante em pacientes com HIV pode ser um fator que contribui para a imunodeficiência (ESTRADA; SERRANO-RÍOS; MARTÍNEZ LARRAD; VILLAR *et al.*, 2002; PÉREZ-PÉREZ; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ; VILARIÑO-GARCÍA; SÁNCHEZ-MARGALET, 2020).

Em contrapartida, em situações de inflamação crônica, como na obesidade, há aumento nos níveis de leptina circulantes (CRUJEIRAS; CARREIRA; CABIA; ANDRADE *et al.*, 2015). Essa adipocina, então, estimula a resposta pró-inflamatória, regulando positivamente a produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β , ao mesmo tempo que estas citocinas aumentam a produção de leptina pelo tecido adiposo levando a manutenção da inflamação de maneira crônica (LA CAVA, 2017).

Desta forma, a leptina tem sido proposta como iniciadora e intensificadora das funções imunológicas. Em situações de baixa concentração ou sinalização prejudicada ocorre um déficit na resposta imune e em altas concentrações patológicas, como a obesidade, auxilia em uma resposta inflamatória.

1.2.4.1. Leptina e neuroinflamação

A neuroinflamação pode ser considerada um dos fatores que levam a resistência hipotalâmica à leptina na obesidade, mas também, em situações patológicas pode agir como uma adipocina aumentando a sinalização pró-inflamatória no SNC (DRAGANO; HADDAD-TOVOLLI; VELLOSO, 2017). Em modelos animais de obesidade induzida por dieta há aumento na sinalização central de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (ZHOU; URSO; JADEJA, 2020). Os ácidos graxos saturados de cadeia longa podem agir através de sua ligação ao receptor TLR4, estimulando assim uma resposta pró-inflamatória no hipotálamo (LI;

LEUNG; CHAN; YIU *et al.*, 2020). Esta resposta pró-inflamatória induzida pela dieta na obesidade ocorre, inclusive, anteriormente ao aumento da adiposidade (THALER; YI; SCHUR; GUYENET *et al.*, 2012), resultando, então, em resistência à leptina nesse tecido, através do aumento de SOCS3 e do estresse de retículo endoplasmático, levando a hiperfagia (DRAGANO; HADDAD-TOVOLLI; VELLOSO, 2017).

A leptina, além de ter sua sinalização alterada em resposta a neuroinflamação, pode, por sua vez, ter um papel importante nesta sinalização neuroinflamatória, sendo proposta como um sinal de interação entre uma resposta inflamatória sistêmica e o cérebro (PÉREZ-PÉREZ; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ; VILARIÑO-GARCÍA; SÁNCHEZ-MARGALET, 2020). Em modelos animais de inflamação periférica, ocorre um aumento na produção de leptina pelo tecido adiposo, assim como seus níveis circulantes (RUMMEL, 2016). Essa adipocina, por sua vez, age aumentando a permeabilidade da BHE e recrutando neutrófilos para o SNC, através do estímulo de uma resposta pró-inflamatória por parte da microglia (LAFRANCE; INOUE; KAN; LUHESHI, 2010).

Em contrapartida, a leptina tem demonstrado um papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas como nas doenças de Alzheimer e Parkinson (SIGNORE; ZHANG; WENG; GAO *et al.*, 2008). Indivíduos que apresentam menores níveis circulantes de leptina tem maior risco de desenvolver a doença de Alzheimer (KHEMKA; BAGCHI; BANDYOPADHYAY; BIR *et al.*, 2014; LIEB; BEISER; VASAN; TAN *et al.*, 2009), além disso, em modelos de indução animal desta doença o tratamento com leptina foi capaz de melhorar a memória nestes animais, assim como melhorou os aspectos moleculares da doença (GRECO; BRYAN; SARKAR; ZHU *et al.*, 2010). Entretanto, quando os níveis de leptina foram correlacionados com índice de massa corporal (IMC) e percentual de gordura, os níveis de leptina não eram protetores em indivíduos obesos, possivelmente devido a um mecanismo de resistência à leptina presente nesta população (LIEB; BEISER; VASAN; TAN *et al.*, 2009).

1.3. Neuroinflamação

A neuroinflamação é um fator presente em diversas doenças neurodegenerativas, principalmente associadas ao déficit cognitivo (SHARMA; SRIVASTAVA; SETH; TRIPATHI *et al.*, 2019). A inflamação, de uma maneira geral, é caracterizada como uma resposta de defesa que protege o organismo contra insultos e repara o dano tecidual causado por estes. Sendo assim, em resposta à uma situação de injúria as células reagem alterando a expressão e secreção de diversas moléculas que servirão de mediadoras da resposta inflamatória (DAS NEVES; SOUSA; SOUSA; CERQUEIRA *et al.*, 2020). No SNC, a resposta inflamatória ocorre através da ativação de células residentes neste órgão, como as células gliais, ou também, através de células imunológicas periféricas que têm acesso devido à algum dano na BHE (KWON; KOH, 2020).

A microglia é o primeiro tipo celular cerebral a responder em uma situação de injúria, sendo conhecida como um macrófago especializado (SIMPSON; OLIVER, 2020). Além do seu papel importante na resposta imune do SNC, a microglia pode ter um papel na neurogênese (SIERRA; ENCINAS; DEUDERO; CHANCEY *et al.*, 2010) e neuroproteção (VINET; WEERING; HEINRICH; KÄLIN *et al.*, 2012). Na resposta imune inata no SNC, essas células, em resposta à algum dano, são recrutadas e atuam fagocitando patógenos ou restos celulares, além disso, atuam liberando citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, além de quimiocinas que atuam ativando e recrutando outros tipos celulares, como os astrócitos (SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013).

Os astrócitos são células gliais do SNC que são, principalmente, conhecidos pela sua função na manutenção do ambiente extracelular viável para a sobrevivência neuronal (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Porém, atualmente, sabe-se que os astrócitos desempenham diversos outros papéis fundamentais para o funcionamento cerebral, como promoção da maturação neuronal, formação de sinapses, (CHRISTOPHERSON; ULLIAN; STOKES;

MULLOWNEY *et al.*, 2005), regulação de angiogênese (ZHOU; SHAO; YAO; TU *et al.*, 2020), formação e manutenção da BHE, metabolismo e captação de neurotransmissores, entre outras (COHEN-SALMON; SLAOU; MAZARÉ; GILBERT *et al.*, 2021). Além disso, os astrócitos tem um papel importante na vigilância imunológica no SNC, onde em resposta a patógenos ocorre a alteração na expressão de diversas proteínas, num processo de ativação astrocítica conhecido como astrogliose (DAS NEVES; SOUSA; SOUSA; CERQUEIRA *et al.*, 2020). Durante esse processo os astrócitos alteram a expressão de proteínas de citoesqueleto, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que é uma proteína característica desse tipo celular e tem sua expressão aumentada em situações de injúria no SNC (PEKNY; PEKNA, 2004). Outra proteína envolvida na ativação astrocítica é a S100B, que é principalmente expressa e secretada pelos astrócitos no SNC e que tem sido proposta como um marcador periférico de dano cerebral (GONÇALVES; LEITE; NARDIN, 2008). Seus níveis séricos podem ser atribuídos a sua secreção por parte dos astrócitos, uma vez que essa proteína tem a capacidade de atravessar a BHE, mas também pelos adipócitos (GONÇALVES; LEITE; GUERRA, 2010). Além disso, assim como a leptina, a concentração de S100B no soro está relacionada ao IMC, onde obesos apresentam níveis circulantes maiores enquanto em anoréxicos esses níveis encontram-se reduzidos em comparação com indivíduos saudáveis (STEINER; SCHILTZ; WALTER; WUNDERLICH *et al.*, 2010).

Então, em uma situação de injúria no SNC, como um processo inflamatório, astrócitos e microglia são ativados. A microglia ativada secreta citocinas como a IL-1 β , a qual ativa os astrócitos, levando a um aumento na liberação de S100B por estas células. Essa proteína por sua vez liga-se ao RAGE na microglia resultando na ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e o ativador de proteína 1 (AP-1) os quais cooperam para estimular a liberação de IL-1 β , TNF- α e a indução da síntese da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2),

contribuindo assim para um ciclo neuroinflamatório, presente em algumas doenças neurodegenerativas (VAINCHTEIN; MOLOFSKY, 2020).

1.3.1. Neuroinflamação e memória

A neuroinflamação é proposta como um fator chave no desenvolvimento e na progressão das doenças neurodegenerativas (VAINCHTEIN; MOLOFSKY, 2020). Além disso, o déficit cognitivo presente nessas doenças tem sido relacionado com o aumento da produção e sinalização de citocinas pró-inflamatórias no SNC (AGUILAR-VALLES; INOUE; RUMMEL; LUHESHI, 2015; GLASS; SAIJO; WINNER; MARCHETTO *et al.*, 2010). De fato, IL-1 β , IL-6 e TNF- α são capazes de modular a atividade neuronal no hipocampo, principalmente em relação a plasticidade sináptica (ISING; HENEKA, 2018).

Em modelos de neuroinflamação utilizando lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana de bactérias gram-negativas que estimula uma resposta pró-inflamatória, foi observado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo (DAULATZAI, 2016). Essas citocinas, por sua vez, regulam vias de sinalização intracelular levando ao aumento do estresse oxidativo nas células cerebrais, levando a morte neuronal e prejuízos cognitivos (ZAKARIA; WAN YAACOB; OTHMAN; LONG *et al.*, 2017). Inclusive, essa resposta pró-inflamatória central pode levar a aumento da deposição de peptídeo β -amilóide, característica presente na doença de Alzheimer, principal causa de demência (DAULATZAI, 2016).

1.4. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma disfunção e perda progressiva de populações neuronais em resposta a compostos tóxicos, formados a partir de disfunções metabólicas multifatoriais (AMOR; PEFEROEN; VOGEL; BREUR *et al.*, 2014). Como principais exemplos podemos citar as doenças de Alzheimer e de Parkinson. O risco para

desenvolver estas doenças aumenta com a idade, por este motivo, com o aumento da expectativa de vida há um aumento na prevalência dessas patologias (HOU; DAN; BABBAR; WEI *et al.*, 2019). Como citado anteriormente, o DM2 é um dos fatores de risco para as doenças neurodegenerativas e a neuroinflamação tem se mostrado um fator chave no desenvolvimento e progressão destas (KWON; KOH, 2020; SIMPSON; OLIVER, 2020).

1.4.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência e a doença neurodegenerativa mais prevalente na população (SHARMA; SRIVASTAVA; SETH; TRIPATHI *et al.*, 2019). Essa patologia é caracterizada por uma perda progressiva da função cognitiva atribuída à diversas alterações neuronais. O acúmulo e deposição extracelular de β -amiloide na forma de placas proteicas é um dos fatores característicos do cérebro de indivíduos com a doença de Alzheimer (DUGGER; DICKSON, 2017). Alterações neurofibrilares também são consideradas características desse distúrbio, essas, são decorrentes da hiperfosforilação da proteína tau que forma emaranhados neurofibrilares resultando em perturbação da função dos microtúbulos e à ruptura dendrítica com consequente perda sináptica entre outros fatores (HUYNH; MOHAN, 2017).

Sabe-se que a evolução da doença de Alzheimer ocorre muito antes do aparecimento dos primeiros sintomas de demência. Ocorre uma resposta das células do SNC a fim de manter a homeostase cerebral até que finalmente ocorra a morte neuronal e as alterações já conhecidas da doença (PREMAN; ALFONSO-TRIGUERO; ALBERDI; VERKHRATSKY *et al.*, 2021). Neste contexto as alterações astrocíticas parecem estar presentes nos estágios pré-clínicos da doença de Alzheimer. De fato, além da astrogliose, atrofia astrogliar também já foi vista em cérebros com doença de Alzheimer, tanto em modelos animais quanto em indivíduos (HSU; GANGOLLI; SU; HOLLERAN *et al.*, 2018).

1.4.2. DM2 e doença de Alzheimer

A associação entre o DM2 e a doença de Alzheimer tem sido estudada há alguns anos, como já citado, sabe-se que indivíduos com DM2 apresentam risco aumentado de desenvolver demência, mas, os mecanismos moleculares que ligam esses dois distúrbios ainda não estão claros. Disfunção endotelial, resistência à insulina, neuroinflamação e estresse oxidativo estão presentes no DM2 e parecem ser fatores importantes no desenvolvimento da doença de Alzheimer em resposta a essa doença (SHARMA; PARIHAR; TALAIYA; DUBEY *et al.*, 2020; YOU; LIU; CHEN; XU *et al.*, 2021).

Apesar do cérebro ser considerado um órgão independente de insulina para a captação de glicose, esse hormônio parece ter um papel importante na sobrevivência neuronal e no funcionamento cerebral (APOSTOLATOS; SONG; ACOSTA; PEART *et al.*, 2012; CHIU; CHEN; CLINE, 2008). Sendo assim, é compreensível que alterações na concentração e na sinalização de insulina, como ocorre no DM2, levem a disfunções cerebrais.

Outra alteração metabólica presente no DM2 é a concentração sérica de leptina, além disso, essa adipocina já mostrou ações protetoras contra a doença de Alzheimer, tanto em indivíduos quanto em modelos animais da doença (GRECO; SARKAR; JOHNSTON; TEZAPSIDIS, 2009; HAMILTON; HARVEY, 2021). Sendo assim, alterações em sua sinalização no SNC poderiam ser outro fator em comum entre o DM2 e a doença de Alzheimer. Porém, os efeitos do DM2 sobre a leptina sérica ainda não estão claros, uma vez que indivíduos diabéticos com obesidade apresentam níveis elevados enquanto que indivíduos eutróficos apresentam níveis reduzidos dessa adipocina (LÓPEZ-JARAMILLO; GÓMEZ-ARBELÁEZ; LÓPEZ-LÓPEZ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014; MOHAMMADZADEH; ZARGHAMI, 2013).

2. Justificativa

A prevalência do DM2 e das doenças neurodegenerativas tem aumentado à medida que a expectativa de vida aumenta, afetando não apenas a saúde e a qualidade de vida dos pacientes, mas também a de seus familiares e cuidadores, causando assim um grande problema de saúde pública. Além disso, pacientes com DM2 têm um maior risco de desenvolver doenças neurodegenerativas por mecanismos moleculares e celulares ainda não elucidados. Dessa forma, o estudo de fatores envolvidos na relação entre essas desordens, como a neuroinflamação, assim como a leptina e suas vias de sinalização, é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar alterações de memória, assim como possíveis mecanismos hipocâmpais e periféricos que levam a essas alterações, durante a progressão do diabetes mellitus tipo 2 e na neuroinflamação aguda em ratos Wistar adultos machos.

3.2. Objetivos específicos

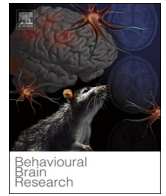
- 3.2.1.** Avaliar a capacidade cognitiva, a sinalização de leptina, a atividade astrocítica hipocâmpal e alterações metabólicas periféricas durante a progressão do DM2 e na neuroinflamação aguda;
- 3.2.2.** Investigar marcadores hipocâmpais de doença de Alzheimer durante a progressão do DM2.

PARTE II

Capítulo II

Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling

Artigo publicado no periódico “Behavioural Brain Research”



Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling

Carollina Da Ré^a, Jéssica Maria Souza^a, Fernanda Fróes^a, Jéssica Taday^a, João Paulo dos Santos^a, Letícia Rodrigues^a, Patrícia Sesterheim^b, Carlos Alberto Gonçalves^a, Marina Concli Leite^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Instituto de Cardiologia – Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leptin
Neuroinflammation
Memory
Astrocytes
Hippocampus
Lipopolysaccharide

ABSTRACT

Peripheral inflammation promotes immune-to-brain communication, mediated by cytokines that affect brain activity. Lipopolysaccharide (LPS) has been widely used to mimic systemic inflammation, and the adipokine leptin, released in this condition, modulates hypothalamic leptin receptors (ObR), contributing to sickness behavior. In this study, we used the intracerebroventricular (ICV) route for LPS administration in an attempt to evaluate an acute and direct effect of this pathogen-associated molecular pattern on leptin-mediated signaling in the hippocampus, where ObR has been implicated in modulating cognitive response. We used bilateral ICV injection of LPS (25 µg/ventricle) in 60-day-old male Wistar rats and the analysis was performed 48 h after surgery. Neuroinflammation was characterized in the LPS group by an increase in concentration of IL-1β, COX-2 and TLR4 in the hippocampus as well as glial fibrillary acidic protein (GFAP), indicating an astrocyte commitment. Cognitive damage was observed in the animals of the LPS group by an inability to increase the recognition index during the object recognition test. We observed an increase in the concentration of leptin receptors in the hippocampus, which was unaccompanied by changes in the proteins involved in leptin intracellular signaling (p-STAT3 and SOCS3). Moreover, we found a decrease in leptin concentration in the serum of the animals in the LPS group accompanied by an increase in TNF-α levels. Our results showed that neuroinflammation, even in an acute state, can lead to cognitive impairment and may be associated with leptin signaling disturbances in the hippocampus.

1. Introduction

Neuroinflammation has been well established as an important feature of various brain disorders. It can affect neural development, alter blood-brain barrier and lead to neurodegenerative diseases [1–5]. It has been suggested that neuroinflammation is involved in the progression of these disorders [2,6,7] and the cognitive impairment observed has been linked to proinflammatory cytokines [8–10]. In fact, IL-1β, IL-6, and TNF-α are able to modulate neuronal function, reducing hippocampal synaptic plasticity [11–14].

Behavioral and neurochemical changes, as a result of neuroinflammation, have been most frequently investigated by peripheral

administration of lipopolysaccharide (LPS), which can directly and indirectly (via peripheral release of cytokines and hormones) affect the central nervous system (CNS). This leads to the establishing of immune-to-brain communication [15–17]. However, it is necessary, complementary and relevant to understand the direct and acute effect of LPS on CNS receptors for the molecular pattern associated with the pathogen, even to characterize bidirectional communication [18,19]. The brain circuitry involved in recognition memory includes the medial prefrontal cortex, the perirhinal cortex and the hippocampus, all of which play a critical role in object recognition (OR) task, in rodents (see [20] for a review). Cognitive deficits associated with hippocampal dysfunction assessed by OR have been used to study models of

Abbreviations: COX, cyclooxygenase; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; HBSS, Hank's balanced salt solution; ICV, intracerebroventricular; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; OF, open field; OR, object recognition; SOCS, suppressor of cytokine signaling; STAT, signal transducer and activator of transcription; TLR, toll-like receptor; TNF-α, tumor necrosis factor alpha

* Corresponding author at: Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

E-mail addresses: carollinafdare@gmail.com (C. Da Ré), souza.jessicams@gmail.com (J.M. Souza), fernandatellesfroes@hotmail.com (F. Fróes), jessicataday@hotmail.com (J. Taday), jpadossantos@gmail.com (J.P. dos Santos), letigues@gmail.com (L. Rodrigues), patriciasester@gmail.com (P. Sesterheim), casg@ufrgs.br (C.A. Gonçalves), marina.leite@ufrgs.br (M.C. Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112360>

Received 18 May 2019; Received in revised form 21 October 2019; Accepted 13 November 2019

Available online 14 November 2019

0166-4328/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

neuroinflammation [21,22].

In the case of peripheral inflammation, leptin has been suggested as one of the adipose signals that modulates the inflammatory response in the brain. This hormone has a critical role in leukocyte recruitment in the brain following severe systemic inflammation [23]. Leptin is a peptide hormone secreted mainly by the adipose tissue and its action is mediated by the ObR receptor [24]. It regulates many physiological functions, including energy homeostasis and immunity [25–27]. It acts as an adipokine on many cells of the immune system, stimulating its activation and proliferation, as well as reducing its apoptosis [28,29]. However, the specific roles played by leptin in neuroinflammation are still under debate. There is evidence of leptin exerting pro-inflammatory action [30–32], as well as anti-inflammatory action in rats and mice [33–35]. More recently, leptin has been suggested as a licenser and enhancer of immune functions. In situations of low concentration or impaired signaling a deficit occurs in the immune response and in high pathological concentrations, such as obesity, it assists in a harmful inflammatory response [29].

In CNS, the most studied and known function of leptin is in the regulation of food intake, acting on the hypothalamus. Neuroinflammation in this tissue has been implicated in leptin resistance, which is one of the factors that leads to obesity [36]. This may occur in the hypothalamus through the LPS activation of inflammatory pathways, such as TLR4- $\text{IKK}\beta$ [37,38], which, in turn, lead to an increase in SOCS3 and PTP1B. These molecules inhibit JAK2-STAT3 signaling of leptin through binding to a specific tyrosine residue on ObR or dephosphorylating JAK2, respectively [36,39].

The presence of ObR in other brain regions, such as the hippocampus, has already been identified, where leptin may play a role in the regulation of memory and learning [40]. In support of this, db/db mice and Zucker rats, both of which have mutations in the leptin receptor gene, exhibit a cognitive deficit [41,42]. Furthermore, leptin has also been implicated as neuroprotective in certain neurodegenerative diseases associated with neuroinflammation, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [43]. On the other hand, in multiple sclerosis, high levels of serum leptin are related to episodes of exacerbation of the disease, while a reduction is associated with an improvement of symptomatology [44].

Information is limited on the effect of neuroinflammation *per se* on leptin signaling in the hippocampus, which could be associated with the cognitive impairment observed in neuroinflammatory conditions. Considering the involvement of leptin in neuroinflammatory diseases and its relation with memory and learning, we investigated acute neuroinflammation induced by a single intracerebroventricular (ICV) administration of LPS, hypothesizing a change in leptin signaling in the hippocampus and the subsequent cognitive response. In addition, we assessed the central and peripheral inflammatory parameters, as well as the astrocytic response to neuroinflammation.

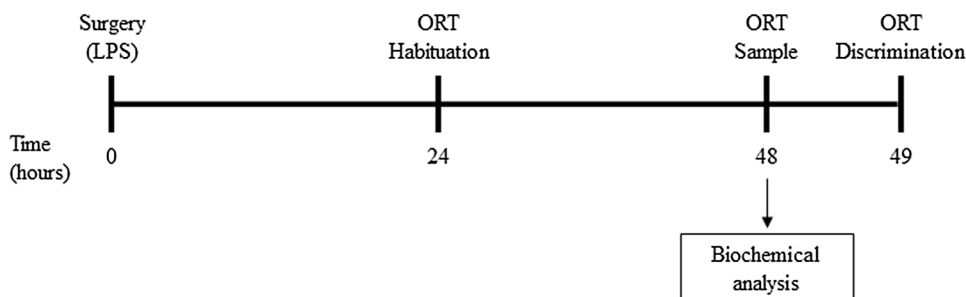


Fig. 1. Schematic representation of the experimental plan. Time is represented in hours. Cognitive evaluation is based on the Object Recognition Test (ORT) with three distinct phases: habituation, sample, and discrimination. Hippocampi and serum were harvested for biochemical evaluation. Different animals were used for behavioral tests and biochemical evaluation.

2. Material and methods

2.1. Materials

Monoclonal anti-S100B (SH-B1) and LPS from *Escherichia coli* 055:B5 were purchased from Sigma [Missouri, USA]. Polyclonal anti-S100B was purchased from DAKO [São Paulo, Brazil], anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat peroxidase-linked and ECL Western Blotting Detection Reagents were purchased from GE [Little Chalfont, United Kingdom]. Anti-ObR, anti-SOCS3, anti-p-STAT3 (Tyr705), anti-STAT3, anti-TLR4 and anti-COX-2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology [Texas, USA] and anti-actin was purchased from Millipore [Massachusetts, USA].

2.2. Animals

All the procedures complied with the ARRIVE guidelines and were carried out in accordance with the National Institute of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and were approved by the local authorities (Ethics Committee on the Use of Animals – UFRGS, n° 25337). Male adult Wistar rats (60 days old) were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). The animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light / 12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) and had free access to commercial chow and water.

The animals were weighed on digital scales before and 48 h after the surgical procedure to evaluate change in weight. The food and water consumption were evaluated during the 48 h after the surgery through weighing using digital scales. Different animals were used for behavioral tests and molecular measurements.

2.3. Surgical procedure

For ventricular access, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp and one burr hole was drilled in the skull over both ventricles. The following coordinates were used: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the brain surface [45]. The rats received an ICV injection of 5 μL of LPS 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ or vehicle (*Hank's balanced salt solution* – HBSS, containing in mM: 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl_2 , 0.41 MgSO_4 , 0.49 MgCl_2 , 0.63 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.44 KH_2PO_4 , 4.17 NaHCO_3 and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4) in each ventricle [46]. Forty-eight hours after the surgical procedure, rats were anesthetized and the blood samples were collected by careful intracardiac puncture, using a 5-mL non-heparinized syringe to obtain 3 mL of blood. The hippocampi were dissected out and chopped in transverse slices of 0.3 mm obtained using a McIlwain Tissue Chopper, and slices were then separated and stored in a freezer at -80°C until they were processed according to the procedure for each analysis. Blood samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 min and centrifuged at $1700 \times g$ for 10 min to obtain serum, which was

separated and stored at -80°C until further analysis. A schematic representation of the experimental procedure is shown in Fig. 1, indicating times of surgery, cognitive behavior and biochemical analysis.

2.4. Object recognition task (OR task)

All experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light (12 lx). All apparatuses were cleaned with 10 % ethanol solution and then dried with a paper towel after each trial. The OR task was conducted in the open field (OF), as previously described [47] and adapted by Hansen [48]. The test consisted of three distinct phases: habituation, sample, and discrimination. The habituation phase was performed 24 h after the ICV injection of LPS, during which time the rats were allowed to explore the OF for 10 min, 24 h before the next phase, thus totaling 48 h after surgery, as well as molecular measurements. In the sample phase, two identical objects (C1 and C2 cubes) were placed in opposite corners of the OF, 20 cm distant from the walls and ~ 60 cm apart from each other, and the rats were allowed to explore them for 5 min. After the end of the sample phase, the rats were removed from the OF and kept in the home cage for 1 h. After that, in the discrimination phase, an identical copy of the familiar object (C3) and a novel T-shaped object (T) were placed in the locations previously occupied by C1 and C2, and the rats were allowed to explore the objects for 5 min. The locations of the objects were counterbalanced in each session. The time spent by the rats exploring each object was monitored with a video system placed in an adjacent room and manually measured by a blinded researcher for group distribution. Exploration of an object was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. To analyze the cognitive performance of rats, a recognition index was calculated in each session, as follows; time exploring novel object/time exploring both objects. Recordings and mobility analyses were performed using ANY-maze behavioral tracking software version 6.17.

2.5. S100B and GFAP measurement

Hippocampal slices were homogenized in PBS (50 mM NaCl, 80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). S100B was measured by ELISA, as previously described [49]. Briefly, 50 μl of sample plus 50 μl of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. For serum samples, polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. For the hippocampal slices, both antibodies were incubated together for 1 h. Color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL for serum samples and 0.02–10 ng/ml for the hippocampal slices. ELISA for GFAP was carried out, as previously described [50], by coating microtiter plates with 100 μl of samples for 24 h at 4°C . Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with an anti-rabbit conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1–5 ng/mL. Data from hippocampal samples were normalized against total protein, which was measured by Lowry's method, modified by Peterson, using bovine serum albumin as a standard [51].

2.6. Quantification of IL-1 β , TNF- α and leptin

Hippocampal slices, for IL-1 β and leptin quantification, were homogenized in diluent buffer followed by centrifugation at $1000 \times g$ for 5 min at 4°C and the assay was carried out in 100 μl of supernatant. Serum samples, for TNF- α and leptin quantification, were collected and processed as indicated by the manufacturer. The IL-1 β , TNF- α and leptin content were measured using a rat ELISA from eBioscience (Ref.

88-6010-22, San Diego, USA), Peprotech (Ref. 900-M54, Rocky Hill, NJ, USA) and Sigma (Ref. 900-M54, Rocky Hill, NJ, USA), respectively. Leptin data are expressed as arbitrary units that represent the sample absorbance corrected for the absorbance value of the blank. Data from hippocampal samples were normalized against total protein.

2.7. Western blot analysis

Equal amounts (30 μg) of proteins from each sample were boiled in sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) β -mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol, 0.002 % (w/v) bromophenol blue, 1 mM sodium orthovanadate) and electrophoresed in 12 % (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. Antibodies anti-ObR, anti-SOCS3, anti-pSTAT3, anti-STAT3, anti-COX2, anti-TLR4 or anti-actin were used at a dilution of 1:5000. After incubating with the primary antibody overnight at 4°C , membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated antibody immunoglobulin (IgG) at a dilution of 1:10,000 for 1 h at 4°C . Actin expression was used as a control of the total amount of protein. The chemiluminescent reactions were developed using luminol as the substrate (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare) and evaluated in the luminescence image analyzer (Image Quant LAS4000 from GE). The immunoccontent of all proteins was determined for optical density using ImageJ software.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software version 20.0. We used the Student's *t*-test for the evaluation of all the results. For the behavioral experiments where we used the one-sample *t*-test to determine whether the recognition index was different from a chance performance (0.5). For the analysis of body weight variation we used repeated measures ANOVA followed by Sidak. We considered $p < 0.05$ as statistically significant.

3. Results

3.1. LPS induces neuroinflammation in hippocampus

The intracellular content of the proinflammatory cytokine IL-1 β , COX-2 and TLR4 in the hippocampus of rats was assessed 48 h after a single ICV injection of LPS or vehicle in order to determine the presence of an inflammatory response in this tissue. Intracellular levels of these inflammatory markers were significantly higher in the LPS group when compared to sham rats (Fig. 2) ($p < 0.001$ for IL-1 β ; $p = 0.034$ for COX-2; and $p = 0.037$ for TLR4), demonstrating the presence of neuroinflammation in this tissue.

3.2. Acute LPS ICV causes memory impairment

The object recognition task was used in order to verify memory impairment. We observed, in the discrimination phase, that acute LPS ICV injection cause memory impairment. The recognition index did not increase in the LPS group when compared to chance performance ($p = 0.438$), whereas, in the sham group, there was an increase in the recognition index ($p = 0.005$). It is important to notice, that in the sample phase, neither group differed significantly when comparing chance performance, indicating similar exploration of both familiar objects (Fig. 3) ($p = 0.225$ for LPS group; $p = 0.160$ for sham group). There was no significant difference between the groups in the total time of exploration of both objects during the sample and the discrimination phases ($p = 0.575$ and $p = 0.670$, respectively). Besides, there was no difference between total distance travelled, average speed, total time mobile and total time immobile during the habituation phase (Table 1) ($p = 0.969$, $p = 0.969$, $p = 0.932$, $p = 0.932$, respectively), demonstrating a similar exploratory capacity among the groups.

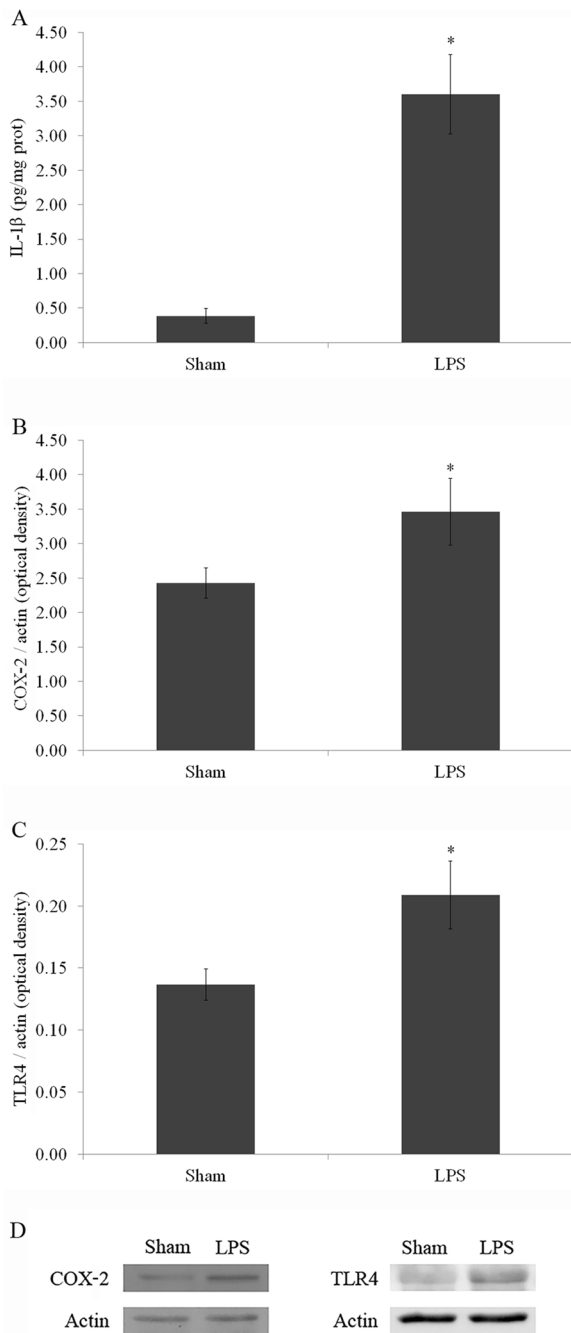


Fig. 2. LPS induces neuroinflammation in the hippocampus. ICV LPS or saline solution injection was carried out on adult Wistar rats under anaesthesia. After 48 h, the hippocampus was dissected and the IL-1 β (A), COX-2 (B) or TLR4 (C) content measured by immunoblot. Representative images are shown in D. Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 5–8 animals per group). * Significantly different from sham group (Student *t*-test, $p < 0.05$).

3.3. Acute LPS ICV causes an increase in GFAP, but not in S100B content in the hippocampus

The intracellular content of GFAP and S100B was analyzed in order to assess a possible astrocytic response in the hippocampus of rats subjected to acute LPS ICV. We observed a significant increase of GFAP in the hippocampus during the neuroinflammatory response (Fig. 4A) ($p = 0.007$), without any alteration in S100B immunocontent (Fig. 4B) ($p = 0.100$).

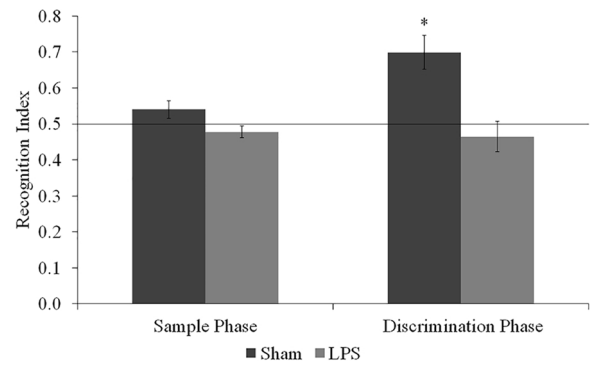


Fig. 3. Neuroinflammation causes memory impairment. The recognition index was evaluated 48 h after the ICV LPS or saline solution injection. The line on the graph indicates recognition index 0.5. Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 5–8 animals per group) and were analyzed by one-sample *t*-test. * indicates $p < 0.005$ versus chance level (indicated by the line).

Table 1
Mobility data in the behavioral habituation phase.

	Total distance travelled (m)	Average speed (mm/s)	Total time mobile (s)	Total time immobile (s)
Sham	9.56 \pm 1.68	32.0 \pm 5.5	121.0 \pm 19.1	171.9 \pm 19.1
LPS	9.44 \pm 2.49	31.6 \pm 8.3	111.3 \pm 23.0	181.62 \pm 23.0

All data are expressed as means \pm standard error (N = 5–8 animals per group) and were considered statistically different when $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

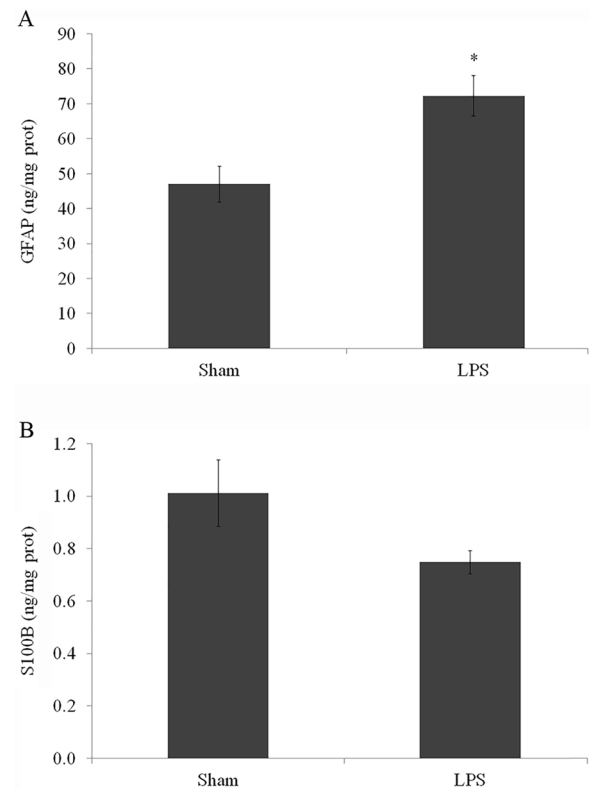


Fig. 4. Neuroinflammation causes an increase in GFAP, but does not change S100B content in the hippocampus. ICV LPS or saline solution injection was carried out on adult Wistar rats under anaesthesia. After 48 h, the hippocampus was dissected and the GFAP (A) and S100B (B) content measured by ELISA. Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 5–8 animals per group). * Significantly different from sham group (Student *t*-test, $p < 0.05$).

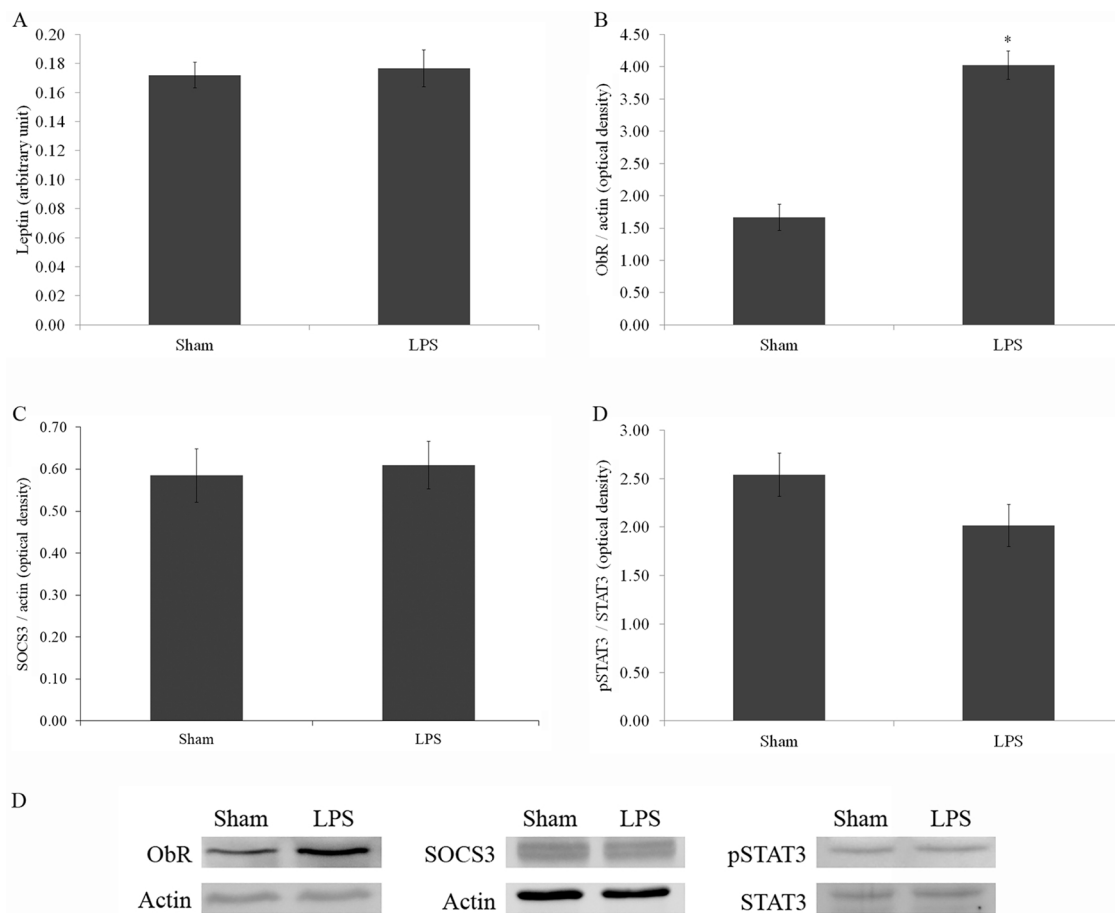


Fig. 5. Neuroinflammation increases leptin signaling in the hippocampus. ICV LPS or saline solution injection was carried out on adult Wistar rats under anaesthesia. After 48 h, the hippocampus was dissected and the leptin (A), ObR (B), SOCS3 (C) and STAT3 (D) content measured by western blot. Representative images are shown in D. Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 5–8 animals per group). * Significantly different from sham group (Student *t*-test, $p < 0.05$).

3.4. Neuroinflammation increases leptin signaling in the hippocampus

We evaluated the effect of neuroinflammation induced by acute LPS ICV injection on leptin expression in the hippocampus. Although neuroinflammation was not able to induce any significant change on intracellular levels of leptin in the hippocampus compared to sham rats (Fig. 5A) ($p = 0.766$), we observed a significantly higher immunocent of ObR in the hippocampus of LPS-treated rats (Fig. 5B) ($p < 0.001$). No alteration in SOCS3 immunocent or in p-STAT3 / STAT3 ratio were observed (Fig. 5C, D) ($p = 0.775$ and $p = 0.107$, respectively).

3.5. Neuroinflammation causes changes in serum TNF- α , leptin and S100B

In order to investigate if neuroinflammation induced by LPS could lead to a systemic inflammatory response we measured serum TNF- α levels. LPS-treated rats showed a slight increase in serum TNF- α (Fig. 6A) ($p = 0.020$). On the other hand, leptin and S100B in the serum were significantly decreased (Fig. 6B, C) ($p = 0.023$ and $p = 0.001$, respectively).

3.6. Neuroinflammation causes weight loss and reduces food intake

There was no significant difference in animal weights between the groups before or after ICV injection ($p = 0.188$ and $p = 0.135$, respectively). However, the LPS group showed a significant reduction in weight, forty-eight hours after surgery ($p < 0.001$), while the sham group maintained its weight ($p = 0.104$). Accordingly, the food

consumption in the LPS group was lower ($p = 0.020$). There was no difference in water consumption over the 48 h (Table 2) ($p = 0.698$).

4. Discussion

Cognitive deficits observed in tasks dependent on hippocampal integrity have been induced by neuroinflammation as a result of both peripheral and central LPS administration [18,52]. However, research has concentrated more on memory impairment caused by inflammation in response to chronic LPS exposure [5,10,53,54]. In the present study, we induced an acute neuroinflammation through a single ICV injection of LPS. Inflammation was demonstrated by an increase in IL-1 β , COX-2 and TLR4 expression found in the hippocampus, an important brain region for learning and memory [55,56]. We found object recognition task impairment in animals subjected to acute ICV-LPS inflammation.

Several studies have shown that induction of neuroinflammation following intraperitoneal injections of LPS leads to cognitive impairment in rodents. This was found in recognition memory, contextual fear conditioning and spatial memory [52,54,57–59]. Even though there are variations in doses and times used between studies, it is clear that peripheral inflammation can lead to a brain inflammatory response with consequent memory impairment. In addition, other neuroinflammation studies using LPS ICV injections have also shown cognitive impairment in rodents. Although most of these studies use multiple LPS injections to induce chronic neuroinflammation, a few studies have also shown cognitive impairment in models of acute neuroinflammation, such as the present study. Ioun et al. [60] and Wu et al. [18] using a single ICV LPS injection of similar doses, demonstrated cognitive

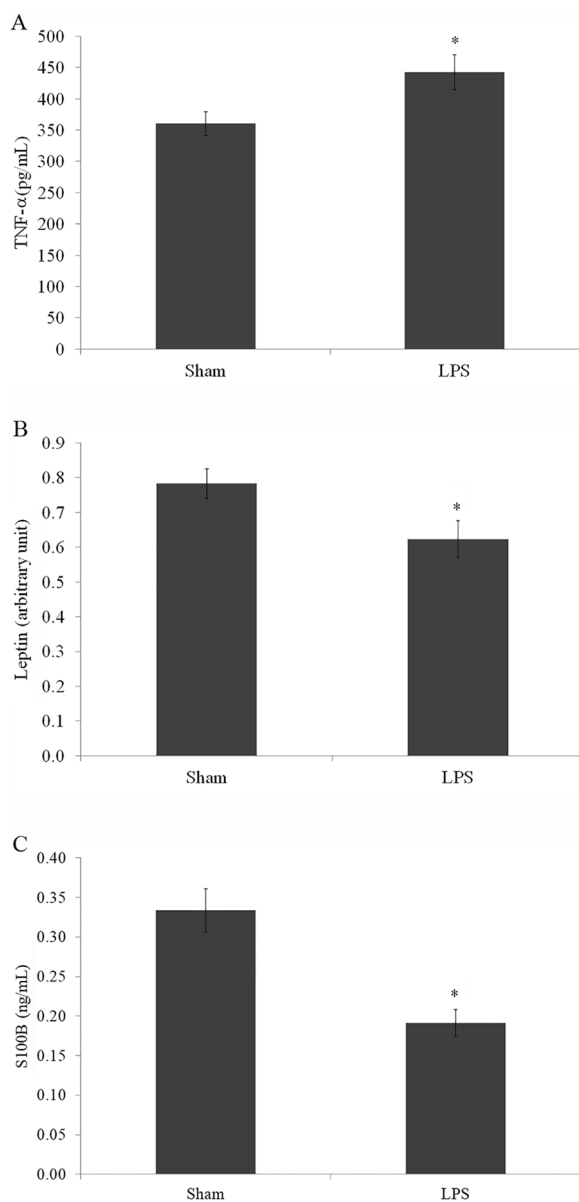


Fig. 6. Neuroinflammation causes changes in serum TNF- α , leptin and S100B. ICV LPS or saline solution injection was carried out on adult Wistar rats under anaesthesia. After 48 h, blood was collected by intracardiac puncture, and TNF- α (A), leptin (B) and S100B (C) were measured by ELISA from the serum obtained. Data are expressed as means \pm S.E.M (N = 5–8 animals per group). * Significantly different from Sham group (Student *t*-test, $p < 0.05$).

Table 2

Body weight, food intake and water consumption in response to neuroinflammation.

	Body weight before LPS (g)	Body weight 48 h after LPS (g)	Food intake (g)	Water consumption (mL)
Sham	273.8 \pm 8.7	269.6 \pm 7.2	22.0 \pm 1.4	32.0 \pm 1.6
LPS	289.3 \pm 6.5	254.7 \pm 5.5#	10.7 \pm 0.6*	32.9 \pm 0.4

All data are expressed as means \pm standard error (N = 5–8 animals per group) and were considered statistically different when $p < 0.05$. # indicates significantly different from body weight before LPS injection (repeated measures ANOVA) * indicates significantly different from sham group (Student's *t*-test).

impairment in spatial and recognition memory. However, despite being considered a model of acute neuroinflammation, the analyses were performed six days after the ICV injection. Our study may show that cognitive impairment has already begun prior to this, being seen 48 h after the ICV LPS injection. These effects of LPS have been related to the binding of LPS to TLR4 which activates the nuclear factor- κ B pathway in microglia and astrocytes [59,61]. This inflammatory activation of glial cells leads to the release of neurotoxic substances such as nitric oxide, glutamate, cytotoxic cytokines, and superoxide radicals that leading to memory impairment [52,62,63].

In a harmful CNS situation, the first cell type to respond is the microglia. These cells are recruited and act by phagocytosing cell pathogens or debris and releasing pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, as well as chemokines [64]. These inflammatory molecules activate other cell types involved in neuroinflammation, such as astrocytes. Moreover, astrocytes also exhibit TLR and are able to respond directly to LPS [17]. Therefore, the production of cytokines, in part, may be due to astroglial reactivity.

Several studies have shown that changes in astrocytic reactivity can lead to memory impairment and this has been associated with their ability to regulate synaptic formation, transmission and plasticity [65]. Astrocytes have been shown to play an important role in the immune surveillance of the CNS. These cells are able to modulate the expression and secretion of various proteins in response to injury in a process called glial reactivity [66]. The increase in GFAP expression, a cytoskeleton protein characteristic of astrocytes, is considered an indicator of this reactivity [67]. Moreover, an increase in cytokines and S100B secretion may occur in an inflammatory astroglial response [17]. In our study, neuroinflammation caused an increase in hippocampal GFAP expression, confirming the astroglial reactivity of this tissue. However, the increase in GFAP alone is not sufficient to identify an effect on astrocyte functionality (eg, a decrease in glutamate uptake), whose impairment may affect synaptic plasticity and contribute to cognitive impairment. Although S100B content was not significantly altered in the hippocampus of these animals, it should be noted that intracellular content and secretion of S100B are not necessarily related, as was observed in *in vitro* studies [17,68,69]. Furthermore, we previously observed that ICV LPS is able to increase cerebrospinal fluid S100B, which would also indicate astroglial reactivity [17].

Besides its role in the control of food intake, leptin has been shown to be an important factor in memory formation, since animals with a deficiency in leptin receptor or in the production of this hormone, develop cognitive impairment [41]. In support of this, intrahippocampal administration of leptin improved memory in animal models of neurodegenerative diseases [43,70,71]. Leptin plays an important role in the regulation of the immune system and may play a protective role in exacerbated inflammation. On the other hand, a pro-inflammatory effect of leptin has been associated with the progression of multiple sclerosis. In fact, an increase in the signaling of this adipokine in animal models with this disease has been identified [44]. In our study, we observed an increase in the immuncontent of leptin receptor in the hippocampus in response to acute neuroinflammation. A similar response was found in the immune cells of animal models with multiple sclerosis [72]. This suggests a possible increase in the signaling of this adipokine in this tissue. However, this change is not related to the JAK / STAT signaling pathway, evidenced by the fact that we did not find alteration in STAT3 phosphorylation (Tyr705) nor in the content of SOCS3 in the hippocampus. Possibly, the increase in the immuncontent of the leptin receptor may be leading to changes in other leptin-activated signaling pathways. It is important to mention that although we investigated only leptin signaling, there are many other hippocampal alterations which may be occurring, such as BDNF signaling [73] or glucocorticoid signaling [74]. These may contribute to explain the cognitive deficit found in LPS-treated group.

It is known that leptin plays an important role in neuroinflammation induced by a peripheral inflammation, serving as an adipokine from the

periphery to the brain [75,76]. Peripheral inflammation induced by LPS, using different signals including leptin, affect hippocampal plasticity in rodents [77–79]. On the other hand, reduced levels of leptin were found in survivor mice subjected to sepsis, cecal ligation and puncture [80]. Herein, we investigated serum leptin levels in response to a central inflammation induced by a single ICV administration of LPS. In contrast to peripheral inflammation, we found a reduction in serum leptin. Although we found an increase in serum TNF- α , suggesting a possible peripheral inflammation, we observed a decrease in the quantity of leptin released by adipose tissue. This indicates that the hormone/adipokine has its profile of secretion altered by inflammation depending on how it was initiated.

In addition, a decrease in serum S100B was found. S100B is an astrocyte marker in the CNS, but is also expressed in adipocytes [81]. The concentration of S100B in the serum can be attributed to the secretion of this protein by the adipocytes and also, in part, to astrocyte secretion [81]. This protein has been proposed as a peripheral marker of central damage, since in this situation BBB permeability may increase, leading to an increase in the passage of this protein to the bloodstream [82]. Conversely, S100B serum levels do not always directly reflect the concentration of this protein in the CNS [69]. In light of this, the decrease in serum S100B observed in this study should be carefully interpreted. It could be better attributed to alteration in peripheral release than to release in the CNS, since acute LPS induced an increase of cerebral spinal fluid S100B [17].

Moreover, a correlation between circulating levels of S100B and leptin with altered BMI in humans [83] has been shown. Obese individuals have higher levels of S100B and leptin, whereas in patients with anorexia nervosa, the lower levels of S100B and leptin observed return to normal with weight gain [84]. Therefore, we could consider that the decrease in the levels of these two compounds in the serum of animals exposed to LPS ICV injection may be reflect the fast weight loss, which was statistically significant in LPS-treated animals. However, it has been reported that single intraperitoneal administration of LPS, but not the repeated, decreased body weight [85]. It is also important to note that the present study was performed only on males, so research with females should be done in the future.

5. Conclusions

Our results demonstrate that acute central neuroinflammation induced by a single ICV administration of LPS, characterized IL-1 β , COX-2 and TLR4 in the hippocampus as well as of glial fibrillary acidic protein (GFAP), leads to cognitive impairment and may be associated with altered leptin signaling in the hippocampus. These data reinforce and broaden knowledge relative to the consequences of neuroinflammation in chronic inflammatory disorders. Acute central neuroinflammation also caused reduced serum leptin, suggesting that an additional peripheral alteration. This may help in the understanding of the role played by this hormone/adipokine during these neuroinflammatory events, as well as its role in neurodegenerative diseases.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Declaration of Competing Interest

None.

References

- [1] S. Amor, et al., Inflammation in neurodegenerative diseases—An update,

- Immunology 142 (2) (2014) 151–166.
- [2] A. Aguilar-Valles, et al., Obesity, adipokines and neuroinflammation, *Neuropharmacology* 96 (Pt A) (2015) 124–134.
- [3] A. Vezzani, et al., Epilepsy and brain inflammation, *Exp. Neurol.* 244 (2013) 11–21.
- [4] A. Tohidpour, et al., Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 276.
- [5] C.K. Glass, et al., Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration, *Cell* 140 (6) (2010) 918–934.
- [6] M. Stampanoni Bassi, et al., Amyloid- β homeostasis bridges inflammation, synaptic plasticity deficits and cognitive dysfunction in multiple sclerosis, *Front. Mol. Neurosci.* 10 (2017) 390.
- [7] E. Aronica, A. Mühlebner, *Neuropathology of epilepsy*, *Handb. Clin. Neurol.* 145 (2017) 193–216.
- [8] R.J. Guerreiro, et al., Peripheral inflammatory cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Neurodegener. Dis.* 4 (6) (2007) 406–412.
- [9] A. Gentile, et al., Role of amyloid- β CSF levels in cognitive deficit in MS, *Clin. Chim. Acta* 449 (2015) 23–30.
- [10] J.M. Moreno-Navarrete, et al., Neuroinflammation in obesity: circulating lipopolysaccharide-binding protein associates with brain structure and cognitive performance, *Int. J. Obes. (Lond.)* 41 (11) (2017) 1627–1635.
- [11] B.C. Albensi, M.P. Mattson, Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity, *Synapse* 35 (2) (2000) 151–159.
- [12] G. D'Arcangelo, et al., Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex, *Eur. J. Neurosci.* 12 (4) (2000) 1241–1252.
- [13] V. Tancredi, et al., The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK, *J. Neurochem.* 75 (2) (2000) 634–643.
- [14] A.M. Lynch, et al., Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10—a role for IL-1 beta? *J. Neurochem.* 88 (3) (2004) 635–646.
- [15] J. Czerniawski, et al., Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation, *Brain Behav. Immun.* 44 (2015) 159–166.
- [16] N.L. Sparkman, et al., Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze, *Physiol. Behav.* 86 (1–2) (2005) 244–251.
- [17] M.C. Guerra, et al., Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 128.
- [18] X. Wu, et al., Inhibitory effect of INT-777 on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment, neuroinflammation, apoptosis, and synaptic dysfunction in mice, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 88 (2019) 360–374.
- [19] B. Hauss-Wegrzyniak, et al., Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease, *Brain Res.* 780 (2) (1998) 294–303.
- [20] S.J. Cohen, R.W. Stackman, Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review, *Behav. Brain Res.* 285 (2015) 105–117.
- [21] A.F.K. Vizuete, et al., Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis, *J. Neuroinflammation* 15 (1) (2018) 68.
- [22] B. Bellaver, et al., Systemic inflammation as a driver of brain injury: the astrocyte as an emerging player, *Mol. Neurobiol.* 55 (3) (2018) 2685–2695.
- [23] C. Rummel, et al., Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation, *Mol. Psychiatry* 15 (5) (2010) 523–534.
- [24] G. Frühbeck, Intracellular signalling pathways activated by leptin, *Biochem. J.* 393 (Pt 1) (2006) 7–20.
- [25] R.L. Leibel, Molecular physiology of weight regulation in mice and humans, *Int. J. Obes. (Lond)* 32 (Suppl. 7) (2008) S98–108.
- [26] A. Pérez-Pérez, et al., Role of leptin in female reproduction, *Clin. Chem. Lab. Med.* 53 (1) (2015) 15–28.
- [27] G. Paz-Filho, et al., Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 56 (9) (2012) 597–607.
- [28] V. Abella, et al., Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders, *Nat. Rev. Rheumatol.* 13 (2) (2017) 100–109.
- [29] C. Naylor, W.A. Petri, Leptin regulation of immune responses, *Trends Mol. Med.* 22 (2) (2016) 88–98.
- [30] W. Inoue, et al., Leptin induces cyclooxygenase-2 via an interaction with interleukin-1beta in the rat brain, *Eur. J. Neurosci.* 24 (8) (2006) 2233–2245.
- [31] P. Mancuso, et al., Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (2) (2006) 212–218.
- [32] S.I. Moore, et al., Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*, *Infect. Immun.* 71 (7) (2003) 4182–4185.
- [33] E.A. Flatow, et al., Elucidating the role of leptin in systemic inflammation: a study targeting physiological leptin levels in rats and their macrophages, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 313 (5) (2017) R572–R582.
- [34] A. Hsu, et al., Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia, *Clin. Exp. Immunol.* 150 (2) (2007) 332–339.
- [35] D. Siegl, et al., Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis, *Anesthesiology* 121 (1) (2014) 98–114.
- [36] K.C. de Git, R.A. Adan, Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of

- hypothalamic inflammation, *Obes. Rev.* (2015).
- [37] M. Milanski, 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.* 29 (2) (2009) 359–370.
- [38] G. Aragonès, et al., Modulation of leptin resistance by food compounds, *Mol. Nutr. Food Res.* 60 (8) (2016) 1789–1803.
- [39] Y. Zhou, L. Rui, Leptin signaling and leptin resistance, *Front. Med.* 7 (2) (2013) 207–222.
- [40] J.K. Elmquist, et al., Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain, *J. Comp. Neurol.* 395 (4) (1998) 535–547.
- [41] C. Van Doorn, et al., Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 207–213.
- [42] X.L. Li, et al., Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents, *Neuroscience* 113 (3) (2002) 607–615.
- [43] C. Davis, J. Mudd, M. Hawkins, Neuroprotective effects of leptin in the context of obesity and metabolic disorders, *Neurobiol. Dis.* 72 (Pt A) (2014) 61–71.
- [44] P. de Candia, G. Matarese, Leptin and ghrelin: sewing metabolism onto neurodegeneration, *Neuropharmacology* (2017).
- [45] A.C. Tramontina, et al., The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats, *J. Neural Transm.* 118 (11) (2011) 1641–1649.
- [46] E. Tyagi, et al., Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain, *J. Neuroimmunol.* 205 (1–2) (2008) 51–56.
- [47] A. Ennaceur, J. Delacour, A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data, *Behav. Brain Res.* 31 (1) (1988) 47–59.
- [48] F. Hansen, et al., Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain, *Physiol. Behav.* 164 (Pt A) (2016) 93–101.
- [49] M.C. Leite, et al., A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein, *J. Neurosci. Methods* 169 (1) (2008) 93–99.
- [50] F. Tramontina, et al., Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state, *J. Neurosci. Methods* 162 (1–2) (2007) 282–286.
- [51] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (2) (1977) 346–356.
- [52] P.K. Fröhlich, et al., Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice, *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 3.
- [53] R. Goel, et al., Perindopril attenuates lipopolysaccharide-induced amyloidogenesis and memory impairment by suppression of oxidative stress and RAGE activation, *ACS Chem. Neurosci.* 7 (2) (2016) 206–217.
- [54] A. Ahmad, et al., Phytomedicine-based potent antioxidant, fisetin protects CNS-Insult LPS-Induced oxidative stress-mediated neurodegeneration and memory impairment, *J. Clin. Med.* 8 (6) (2019).
- [55] N.J. Broadbent, et al., Object recognition memory and the rodent hippocampus, *Learn. Mem.* 17 (1) (2010) 5–11.
- [56] C.M. Bird, The role of the hippocampus in recognition memory, *Cortex* 93 (2017) 155–165.
- [57] V. Sorrenti, et al., Curcumin prevents acute neuroinflammation and long-term memory impairment induced by systemic lipopolysaccharide in mice, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 183.
- [58] J.W. Lee, et al., Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation, *J. Neuroinflammation* 5 (2008) 37.
- [59] N. Jamali-Raeufy, et al., Troxerutin exerts neuroprotection against lipopolysaccharide (LPS) induced oxidative stress and neuroinflammation through targeting SIRT1/SIRT3 signaling pathway, *Metab. Brain Dis.* (2019).
- [60] P. Iloun, et al., Investigating the role of P38, JNK and ERK in LPS induced hippocampal insulin resistance and spatial memory impairment: effects of insulin treatment, *EXCLI J.* 17 (2018) 825–839.
- [61] H. Badshah, T. Ali, M.O. Kim, Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24493.
- [62] J.A. Smith, et al., Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases, *Brain Res. Bull.* 87 (1) (2012) 10–20.
- [63] J.J. Bromfield, S.M. Iacovides, Evaluating lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bovine granulosa cells, *J. Assist. Reprod. Genet.* 34 (12) (2017) 1619–1626.
- [64] A. Shastri, D.M. Bonifati, U. Kishore, Innate immunity and neuroinflammation, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) 342931.
- [65] A. Adamsky, I. Goshen, Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions, *Neuroscience* 370 (2018) 14–26.
- [66] M.E. Hamby, M.V. Sofroniew, Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders, *Neurotherapeutics* 7 (4) (2010) 494–506.
- [67] M. Pekny, M. Pekna, Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration, *J. Pathol.* 204 (4) (2004) 428–437.
- [68] M.C. Leite, et al., Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition, *Brain Res. Bull.* 70 (2) (2006) 179–185.
- [69] A.F. Vizuete, et al., Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats, *Life Sci.* 92 (17–19) (2013) 923–928.
- [70] A.P. Signore, et al., Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials, *J. Neurochem.* 106 (5) (2008) 1977–1990.
- [71] S.J. Greco, et al., Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 19 (4) (2010) 1155–1167.
- [72] G. Matarese, et al., Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis, *Nat. Rev. Neurol.* 6 (8) (2010) 455–461.
- [73] X. Zhao, et al., Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression, *Behav. Brain Res.* 364 (2019) 494–502.
- [74] M. Clarke, et al., Ketamine modulates hippocampal neurogenesis and pro-inflammatory cytokines but not stressor induced neurochemical changes, *Neuropharmacology* 112 (Pt A) (2017) 210–220.
- [75] C. Rummel, et al., Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice, *J. Comp. Neurol.* 511 (3) (2008) 373–395.
- [76] C. Rummel, Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication, *Brain Behav. Immun.* 54 (2016) 1–14.
- [77] S.D. Bilbo, V. Tsang, Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring, *FASEB J.* 24 (6) (2010) 2104–2115.
- [78] A.L. Dinel, et al., Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome, *Psychoneuroendocrinology* 40 (2014) 48–59.
- [79] M. Astiz, et al., Short-term high-fat diet feeding provides hypothalamic but not hippocampal protection against acute infection in male mice, *Neuroendocrinology* 104 (1) (2017) 40–50.
- [80] N. Zaghoul, et al., Forebrain cholinergic dysfunction and systemic and brain inflammation in murine Sepsis survivors, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1673.
- [81] C.A. Gonçalves, M.C. Leite, M.C. Guerra, Adipocytes as an important source of serum S100B and possible roles of this protein in adipose tissue, *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010 (2010) 790431.
- [82] C.A. Gonçalves, M.C. Leite, P. Nardin, Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury, *Clin. Biochem.* 41 (10–11) (2008) 755–763.
- [83] J. Steiner, et al., S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research, *Psychoneuroendocrinology* 35 (2) (2010) 321–324.
- [84] K. Holtkamp, et al., Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain, *J. Neural Transm.* 115 (6) (2008) 937–940.
- [85] B. Borges, et al., Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308 (1) (2015) E40–50.

PARTE III

4. Discussão

4.1. Prejuízos cognitivos e leptina

O DM2 é um distúrbio metabólico caracterizado por aumento de glicemia no sangue e por uma diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina, além de alterações na secreção deste hormônio pelo pâncreas (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022). Em nosso estudo utilizamos um modelo proposto por Masiello e colaboradores (MASIELLO; BROCA; GROSS; ROYE *et al.*, 1998), em que uma disfunção pancreática é induzida com a utilização de STZ e NA, mimetizando alterações metabólicas similares ao DM2. Neste estudo, diferentemente de outros modelos animais de DM2, os animais não desenvolvem obesidade, apresentando manutenção ou em alguns casos perda de peso ao longo do estudo (KAMDI; BADWAIK; RAVAL; AJAZUDDIN *et al.*, 2021; SZKUDELSKI, 2012). Em nossas condições experimentais, após a determinação da melhor dose de NA a ser utilizada conforme nossos objetivos, os animais desenvolveram alterações metabólicas similares ao DM2. Ao longo de todo o período estudado os animais do grupo DM2 apresentaram uma glicemia de jejum elevada em relação ao grupo sham. Importante ressaltar que essa hiperglicemia não foi similar à glicemia encontrada em estudos com utilização de STZ para o desenvolvimento de DM1, onde o aumento de glicemia pode chegar a ser cinco vezes maior do que os animais controle (ZANOTTO; SIMÃO; GASPARIN; BIASIBETTI *et al.*, 2017). No nosso estudo, a glicemia média de jejum dos animais do grupo DM2 foi menos de três vezes maior em relação ao grupo sham. Este dado mostra que em nosso estudo encontramos uma alteração glicêmica similar ao DM2, apesar da metodologia utilizada ser o dano pancreático.

Além da glicemia em jejum, outros parâmetros são utilizados na prática clínica como diagnóstico para o DM2, como teste de tolerância à glicose e concentração de

hemoglobina glicada no sangue (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022). Em nosso estudo, encontramos intolerância à glicose nos animais do grupo DM2 já no estágio inicial da doença, esse resultado é avaliado através da capacidade de redução da glicemia ao longo do tempo após administração de uma solução concentrada de glicose, em nosso caso, via IP. Nos animais do grupo sham, após a injeção de glicose ocorre um aumento da glicemia, com posterior redução ao longo do período de 30 e 60 minutos, o que mostra uma capacidade de metabolização da glicose sanguínea por esses animais. Enquanto nos animais do grupo DM2, após a injeção de glicose, ocorre um aumento de glicemia, que persiste por mais de 60 minutos, mostrando uma intolerância à glicose, indicando a presença de resistência tecidual à insulina, fator chave no desenvolvimento do DM2 (AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION, 2022).

A hemoglobina glicada é formada nos eritrócitos a partir de uma reação irreversível e não enzimática entre a hemoglobina e a glicose (BLOOMGARDEN, 2009). A vida média da hemoglobina é de cerca de 120 dias, então, os níveis séricos de hemoglobina glicada indicam o controle glicêmico ao longo de um período de tempo maior (BLOOMGARDEN, 2009). De fato, indivíduos com DM apresentam uma maior concentração sérica de hemoglobina glicada do que indivíduos saudáveis (NADELSON; SATAPATHY; NAIR, 2016). Em nosso estudo, os animais com DM2 já apresentavam aumento na hemoglobina glicada sérica após 4 semanas da indução do modelo, indicando níveis glicêmicos maiores nesse período de tempo em relação ao grupo sham. A concentração de peptídeo C foi utilizada como um parâmetro de concentração de insulina, uma vez que o peptídeo C é o produto da clivagem de pró-insulina em insulina, seus níveis refletem a produção de insulina pelo pâncreas (PINGER; ENTWISTLE; BELL; LIU *et al.*, 2017). Em modelos animais de DM1, os níveis de peptídeo C são indetectáveis, uma vez que o mecanismo utilizado é de dano das células β -pancreáticas, impedindo a

produção de insulina (RAGY; AHMED, 2019; ZANOTTO; HANSEN; GALLAND; BATASSINI *et al.*, 2019). Em nosso estudo, por utilizarmos STZ, uma molécula conhecidamente tóxica ao pâncreas, utilizamos o peptídeo C para um controle de dano pancreático, uma vez que nosso objetivo é um dano brando, mimetizando o DM2, e não total como o visto em modelos de DM1. De fato, os animais do grupo DM2 apresentaram níveis séricos detectáveis de peptídeo C e reduzidos em relação ao grupo sham, mostrando alteração na produção de insulina similar ao que ocorre em indivíduos com DM2 e diferente em relação ao que ocorre no DM1.

Atualmente existem diversos modelos experimentais de indução de DM2, porém, a maioria utiliza indução de DM2 associada à obesidade, com o uso de dietas com alta concentração calórica, de gordura e/ou de açúcares (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020; MANAER; YU; ZHANG; XIAO *et al.*, 2015). Nosso objetivo foi avaliar alterações metabólicas do DM2 independente da obesidade, uma vez que, essa por si só causa alterações na concentração e sinalização de leptina, assim como, prejuízos cognitivos (FORNY-GERMANO; DE FELICE; VIEIRA, 2018), pontos chave de nosso estudo. De fato, os animais do grupo DM2 não apresentaram ganho de peso excessivo, diferenciando-se assim dos demais modelos de indução de DM2 amplamente utilizados na literatura (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020). Todos os animais do estudo ganharam peso ao longo do tempo, porém, os animais do grupo DM2 tiveram um ganho de peso mais brando quando comparado ao grupo sham, resultando em uma média de peso corporal menor ao final do estudo. Outro fator importante em nosso modelo é a diferença em relação aos modelos de DM1 utilizando STZ, onde ocorre uma redução do peso corporal ao longo do tempo, resultante da deficiência de insulina (ZANOTTO; HANSEN; GALLAND; BATASSINI *et al.*, 2019; ZANOTTO; SIMÃO; GASPARIN; BIASIBETTI *et al.*, 2017), apesar da média final de peso corporal do grupo DM2 ter sido

menor do que o grupo sham, os animais continuaram ganhando peso ao longo do tempo, o que indica uma alteração branda na resposta tecidual à insulina, diferente do que ocorre no DM1.

O DM2 pode levar a diversas complicações centrais e periféricas, dentre elas, podemos citar o aumento do risco de desenvolver prejuízos cognitivos, como já foi demonstrado em indivíduos diabéticos e em modelos animais desta patologia (KAMDI; BADWAIK; RAVAL; AJAZUDDIN *et al.*, 2021; SAEDI; GHEINI; FAIZ; ARAMI, 2016; YOU; LIU; CHEN; XU *et al.*, 2021). Entretanto os mecanismos moleculares que antecedem a disfunção cognitiva ainda não estão claros, uma vez que tanto em indivíduos quanto em modelos animais de DM2 a obesidade está associada, e esta por si só pode desencadear esses efeitos (DIONYSOPOULOU; CHARMANDARI; BARGIOTA; VLAHOS *et al.*, 2021). Então, em nosso modelo de indução de DM2 utilizando STZ e NA, investigamos as alterações de memória e hipocampus em animais diabéticos sem a presença de obesidade.

Nós avaliamos a capacidade cognitiva dos animais diabéticos através do teste de localização de objetos, que avalia a memória espacial dos animais, tarefa considerada dependente do hipocampo (LISSNER; WARTCHOW; TONIAZZO; GONÇALVES *et al.*, 2021). O teste foi realizado após 4 e 16 semanas da indução do modelo de DM2 e os resultados encontrados mostram que os animais diabéticos apresentam um prejuízo cognitivo no que se refere a memória espacial, tanto em relação à memória de curta duração quanto a memória de longa duração. Esse dado corrobora outros estudos que avaliaram a memória espacial em roedores com DM2 induzida através de diferentes modelos experimentais e encontraram prejuízos cognitivos (PANCANI; ANDERSON; BREWER; KADISH *et al.*, 2013; PANDEY; GARABADU, 2016; SHIMA; MATSUI; JESMIN; OKAMOTO *et al.*, 2017). Entretanto, estes modelos utilizados diferenciam-se

do presente trabalho, uma vez que, foram utilizados ratos com a presença de obesidade (PANCANI; ANDERSON; BREWER; KADISH *et al.*, 2013) ou ratos com a glicemia superior à utilizada neste estudo (SHIMA; MATSUI; JESMIN; OKAMOTO *et al.*, 2017). Apesar de um trabalho ter avaliado as alterações de memória em ratos submetidos ao modelo de DM2 com STZ e NA e encontrado prejuízos cognitivos nestes animais (PANDEY; GARABADU, 2016), a glicemia dos ratos diabéticos utilizados era superior a encontrada em nossos animais, ou seja, um dano pancreático maior, aproximando-se mais de um modelo de DM1 em alguns aspectos.

Diversas alterações metabólicas têm sido propostas como fatores chave no déficit cognitivo encontrado tanto em pacientes quanto em modelos animais de DM2, porém, ainda não há evidências suficientes sobre quais são as moléculas ou alterações responsáveis por esses danos. Nos últimos anos tem se investigado o papel da leptina nos processos de memória e aprendizagem (HAMILTON; HARVEY, 2021; VAN DOORN; MACHT; GRILLO; REAGAN, 2017). Por este motivo investigamos alterações centrais e periféricas dessa adipocina em resposta ao DM2 a curto e longo prazo. A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo, que serve como um indicador da quantidade de massa adiposa estocada, tendo um papel importante na regulação da homeostase energética (FREDERICH; HAMANN; ANDERSON; LÖLLMANN *et al.*, 1995).

Apesar do papel mais conhecido e estudado da leptina, no SNC, ser no controle da homeostase energética, fazendo essa regulação através de sua sinalização no hipotálamo (PARK; AHIMA, 2015), já foi demonstrada a presença do seu receptor em outras áreas cerebrais, como no hipocampo (HARVEY, 2003), demonstrando que há outras funções centrais importantes para essa adipocina. De fato, a leptina tem um papel na regulação da memória e aprendizagem, animais deficientes de leptina ou de seu receptor apresentam déficit cognitivo (CHEN; LIANG; ZHAN; ZHOU *et al.*, 2014; LI; AOU; OOMURA;

HORI *et al.*, 2002). Além disso, em indivíduos e em animais com Alzheimer a leptina demonstrou ser protetora contra a demência nessa doença (GRECO; BRYAN; SARKAR; ZHU *et al.*, 2010; HAMILTON; HARVEY, 2021). Por esse motivo, a leptina tem sido proposta como um fator importante nas alterações cerebrais associadas ao DM2 e outras doenças metabólicas. Sendo assim, nesse estudo, avaliamos proteínas envolvidas na sinalização de leptina no hipocampo, a fim de correlacionar possíveis danos a essa sinalização em resposta ao modelo de DM2 utilizado. Avaliamos as proteínas ObR, STAT3 e SOCS3, envolvidas na sinalização de leptina para investigar o efeito do DM2 sobre essa sinalização no hipocampo, porém, não houve alteração na sinalização de ObR no hipocampo mesmo com a redução dos níveis circulantes desse hormônio após 16 semanas em comparação com os animais do grupo sham. Vale ressaltar que, apesar de não encontrarmos alteração hipocampal nessas proteínas, os níveis circulantes de leptina já foram associados à disfunção cognitiva em humanos (WITTE; KÖBE; GRAUNKE; SCHUCHARDT *et al.*, 2016), então, possivelmente o déficit cognitivo apresentado em nosso estudo pode estar relacionado à ação da leptina no SNC, porém, não sendo diretamente ligado às vias de sinalização avaliadas no presente estudo. Além disso, o desenvolvimento e a progressão do DM2 estão associados à inflamação central e periférica (TSALAMANDRIS; ANTONOPOULOS; OIKONOMOU; PAPAMIKROULIS *et al.*, 2019), por isso, investigamos alterações cognitivas e hipocampais em resposta a neuroinflamação de uma forma aguda. Para isso, utilizamos injeção ICV de LPS e as avaliações foram feitas após 48 h da indução da neuroinflamação.

Em nosso modelo utilizando LPS, após 48 h, os animais desenvolveram neuroinflamação, caracterizada pelo aumento de IL-1 β , COX-2 e TLR4 no hipocampo. Além disso, os níveis séricos de TNF- α também tiveram um aumento significativo

quando comparados aos animais do grupo sham, demonstrando que apesar de ser uma inflamação induzida diretamente no SNC, através da injeção ICV, houve uma resposta inflamatória periférica nestes animais. Em um estudo prévio do nosso grupo, após injeção ICV de LPS, com uma concentração menor do que a utilizada em nosso estudo, não houve uma resposta inflamatória periférica após 24 h da indução (GUERRA; TORTORELLI; GALLAND; DA RÉ *et al.*, 2011). Sabe-se que uma inflamação periférica pode induzir uma resposta inflamatória central (DE GIT; ADAN, 2015) porém os efeitos de uma inflamação inicialmente central para uma inflamação periférica ainda não estão claros. Nossos dados indicam que uma inflamação central pode levar a uma resposta inflamatória periférica, ao menos no que diz respeito à concentração de TNF- α . Entretanto, esse efeito parece ser dependente da magnitude da inflamação, bem como do tempo de exposição ao agente inflamatório uma vez que esse efeito não foi observado em modelos mais brandos de neuroinflamação aguda.

A sinalização pró-inflamatória tem sido associada ao déficit cognitivo presente nas doenças neurodegenerativas (VAINCHTEIN; MOLOFSKY, 2020). Após a indução de neuroinflamação aguda os animais apresentaram déficit na memória de curta duração de reconhecimento de objetos 48 h após a indução do modelo. Diversos estudos utilizando neuroinflamação induzida por LPS resultaram em déficit cognitivo, porém, grande parte destes estudos utilizaram modelos de indução de inflamação periférica ou inflamação central de maneira crônica (AHMAD; ALI; REHMAN; KIM, 2019; GENTILE; MORI; BERNARDINI; CENTONZE, 2015; GLASS; SAIJO; WINNER; MARCHETTO *et al.*, 2010; GOEL; BHAT; HANIF; NATH *et al.*, 2016). Mesmo em estudos utilizando uma injeção ICV única de LPS a avaliação da memória foi feita seis dias após a indução do modelo (ILOUN; ABBASNEJAD; JANAHMADI; AHMADIANI *et al.*, 2018; WU; LV; DU; HU *et al.*, 2019). Sendo assim, nosso estudo demonstrou que as alterações cognitivas

em resposta ao modelo agudo utilizando injeção ICV de LPS já estão presentes 48 h após a indução do modelo.

Como dito anteriormente, a leptina tem demonstrado um papel importante nos processos de memória e aprendizagem, por isso, investigamos possíveis alterações centrais e periféricas desta adipocina em resposta a neuroinflamação aguda. A sinalização de leptina no hipocampo em resposta a neuroinflamação foi avaliada através da concentração das proteínas ObR, STAT3 e SOCS3. Após 48 hs da indução do modelo, observamos um aumento na concentração de ObR no hipocampo dos animais. Essa modulação poderia ser uma resposta de compensação pela redução dos níveis circulatórios desse hormônio. Porém, no modelo de DM2 induzido por STZ e NA, não houve alteração na sinalização de ObR no hipocampo mesmo com a redução dos níveis circulantes desse hormônio após 16 semanas. Sendo assim, não podemos descartar a hipótese de uma relação direta da sinalização pró-inflamatória no possível aumento da sinalização de leptina no hipocampo, similar ao que ocorre em modelos animais de esclerose múltipla, uma doença neuroinflamatória (DE CANDIA; MATARESE, 2017; MATARESE; CARRIERI; MONTELLA; DE ROSA *et al.*, 2010). Nestes estudos o aumento da concentração de ObR nos tecidos cerebrais foi associado a progressão e gravidade da doença (MATARESE; CARRIERI; MONTELLA; DE ROSA *et al.*, 2010). Em nosso estudo, além do aumento da concentração do ObR no hipocampo os animais com a neuroinflamação induzida por LPS tiveram um déficit na memória de reconhecimento de objetos, podendo esse efeito na sinalização da leptina no hipocampo ser uma resposta ou uma causa da redução da capacidade cognitiva, uma vez que essa adipocina já demonstrou um papel importante nos processos de memória e aprendizagem (VAN DOORN; MACHT; GRILLO; REAGAN, 2017). Em contrapartida, no modelo de indução de DM2, não houve diferença na sinalização de leptina no hipocampo mas houve

alteração na capacidade cognitiva nesses animais, possivelmente, sem associação com a sinalização dessa adipocina.

4.2. Atividade hipocampal

Os astrócitos são células gliais do SNC conhecidos, principalmente, por sua função na manutenção do meio extracelular viável para a sobrevivência neuronal, entretanto, sabe-se atualmente que os astrócitos desempenham outros papéis fundamentais ao cérebro (COHEN-SALMON; SLAOUI; MAZARÉ; GILBERT *et al.*, 2021; PREMAN; ALFONSO-TRIGUERO; ALBERDI; VERKHRATSKY *et al.*, 2021). Os astrócitos são capazes de modular a expressão e secreção de várias proteínas em resposta a patógenos em um processo de ativação glial conhecido como astrogliose (HAMBY; SOFRONIEW, 2010; LI; LI; ZHENG; QIN, 2019). O aumento da expressão de GFAP, uma proteína de citoesqueleto característica dos astrócitos, é considerado um indicador desse processo (LI; LI; ZHENG; QIN, 2019). Além disso, um aumento na secreção de citocinas e S100B pode ocorrer em uma resposta inflamatória astrogliosa (KWON; KOH, 2020). Alterações na atividade astrocítica têm sido relacionadas ao comprometimento cognitivo e ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (PREMAN; ALFONSO-TRIGUERO; ALBERDI; VERKHRATSKY *et al.*, 2021; YU; LI; LIU; DU *et al.*, 2020). Por este motivo, em nosso estudo, avaliamos a resposta astrocítica através da concentração de GFAP e de S100B. Após 4 semanas da indução de DM2, ocorreu um aumento na concentração de GFAP no hipocampo destes animais, indicando um processo de astrogliose nesse tecido no estágio inicial da doença. Interessantemente, após 16 semanas, representando um estágio mais avançado de doença, os animais do grupo DM2 não apresentavam diferença significativa na concentração de GFAP no hipocampo em relação aos animais do grupo sham, indicando a presença de astrogliose apenas em estágios

iniciais da doença, com uma possível estabilização da atividade astrocítica com o avanço do DM2. Diferentemente do que foi observado em nosso estudo, outros modelos animais de DM2 já mostraram um aumento de GFAP no hipocampo mesmo após um tempo prolongado da doença (DUARTE; SKOUG; SILVA; CARVALHO *et al.*, 2018; HASCUP; BRODERICK; RUSSELL; FANG *et al.*, 2019). Em contrapartida em um estudo do nosso grupo, com indução de DM1 utilizando STZ, a concentração de GFAP não se mostrou alterada no hipocampo dos ratos diabéticos 60 dias após a indução do modelo (NARDIN; ZANOTTO; HANSEN; BATASSINI *et al.*, 2016). Vale ressaltar que em modelos animais de DM1 a glicemia média de jejum dos animais atinge níveis cerca de cinco vezes maior do que animais controle, e, mesmo com uma alteração glicêmica desta magnitude os níveis de GFAP nos estágios mais avançados da doença não estão alterados no hipocampo. Sendo assim, a resposta astrocítica hipocampal, no que se refere aos níveis intracelulares de GFAP, parece estar associada aos estágios iniciais de doenças hiperglicêmicas, porém, ainda há controvérsias na literatura, sendo necessário mais estudos para uma melhor compreensão.

A proteína S100B é outra proteína envolvida na atividade astrocítica, esta é, principalmente, expressa e secretada pelos astrócitos no SNC e tem sido proposta com um marcador periférico de dano central (MICHETTI; D'AMBROSI; TOESCA; PUGLISI *et al.*, 2019). Após a indução de DM2, os níveis de S100B no líquido (LCR) se mostraram reduzidos nos animais do grupo DM2 quando comparados ao grupo sham, esse resultado foi observado apenas no estágio inicial da doença (após 4 semanas) e não nos animais no estágio avançado (16 semanas), assim como a concentração intracelular de GFAP. Em cultura de astrócitos, após incubação com alta concentração de glicose, a S100B extracelular mostrou-se reduzida em relação ao controle (NARDIN; TRAMONTINA; LEITE; TRAMONTINA *et al.*, 2007), demonstrando que um aumento de glicose

extracelular pode levar a uma redução na secreção de S100B por parte dos astrócitos como visto em nosso estudo. Esses dados reforçam a hipótese de que a resposta astrocítica está ligada às alterações hipocâmpais iniciais da doença.

Investigamos, também, captação de glutamato e atividade de glutamina sintetase (GS) no hipocampo dos animais após a indução de DM2 a fim de avaliar possíveis alterações hipocâmpais em resposta ao diabetes, porém, não encontramos alteração significativa em nenhum destes parâmetros em comparação com os animais do grupo sham. Uma vez que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, alterações no sistema glutamatérgico podem estar relacionadas a prejuízos na neurotransmissão e conseqüentemente na memória (BUKKE; ARCHANA; VILLANI; ROMANO *et al.*, 2020). Essas alterações já foram vistas em modelos animais de DM1 (COLEMAN; DENNIS; BRADEN; JUDD *et al.*, 2010; NARDIN; ZANOTTO; HANSEN; BATASSINI *et al.*, 2016), e em modelos de DM2 associada à obesidade (ANDERSEN; NISSEN; CHRISTENSEN; MARKUSSEN *et al.*, 2017; DUARTE; SANTOS; SEIÇA; RESENDE DE OLIVEIRA, 2000) porém, em nosso estudo, o DM2 não afetou o sistema glutamatérgico no hipocampo. Então, alterações neste processo, podem estar relacionadas às mudanças metabólicas presentes no DM1 e na obesidade, mas não no DM2 por si só.

A glutatona reduzida (GSH) é um tripeptídeo considerado como a principal defesa antioxidante cerebral, sua concentração pode ser alterada em situações de injúria e relacionada ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas (DWIVEDI; MEGHA; MISHRA; MANDAL, 2020). Uma redução de GSH cerebral já foi demonstrada em modelos animais de DM1 e de DM2 associada à obesidade (CHANDRASEKARAN; CHOI; ARVAS; SALIMIAN *et al.*, 2020; MEHTA; SINGH; BANERJEE, 2019; RABABA'H; MARDINI; ALZOUBI; ABABNEH *et al.*, 2019).

Porém, em nosso estudo com DM2 sem a presença de obesidade, não houve diferença significativa na concentração desse tripeptídeo em comparação aos animais do grupo sham, indicando, mais uma vez, que as alterações hipocampais no diabetes podem estar relacionadas a outros fatores e não apenas a hiperglicemia crônica resultante dessa patologia.

As alterações astrocíticas podem levar a disfunção neuronal e consequente redução na capacidade cognitiva (ADAMSKY; GOSHEN, 2018; ZHOU; SHAO; YAO; TU *et al.*, 2020), sendo, a astrogliose um fator chave no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (PREMAN; ALFONSO-TRIGUERO; ALBERDI; VERKHRATSKY *et al.*, 2021). Em nosso estudo utilizando um modelo animal de DM2, avaliamos a concentração de proteína tau fosforilada e β -amiloide no hipocampo a fim de investigar possíveis alterações similares às encontradas na doença de Alzheimer (HUYNH; MOHAN, 2017). Os animais não apresentaram diferença na concentração dessas proteínas após 4 semanas da indução de DM2, porém, após, 16 semanas, os animais diabéticos mostraram um aumento na concentração dessas proteínas no hipocampo em relação ao grupo sham. Esses resultados demonstram que, durante a progressão do DM2, as alterações cognitivas podem estar relacionadas à atividade astrogliar em um período inicial, e, com a progressão da doença ocorre uma disfunção neuronal, com aumento da fosforilação da proteína tau e deposição amiloide.

A neuroinflamação tem sido relacionada como um fator chave na progressão e desenvolvimento das doenças neurodegenerativas (SHARMA; SRIVASTAVA; SETH; TRIPATHI *et al.*, 2019). Os astrócitos, além das diversas funções já citadas anteriormente, são importantes para a vigilância imunológica no SNC (DAS NEVES; SOUSA; SOUSA; CERQUEIRA *et al.*, 2020). Em uma situação de injúria, a microglia responde aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, levam

a uma reação inflamatória em outros tipos celulares, como os astrócitos (SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013). Esses, após a ativação de vias pró-inflamatórias, alteram a concentração e secreção de diversas proteínas como a GFAP e a S100B (GONÇALVES; LEITE; NARDIN, 2008; PEKNY; PEKNA, 2004). A neuroinflamação aguda, com o uso de LPS ICV, levou a um aumento de GFAP hipocampal em nosso estudo, esses resultados corroboram com outros estudos utilizando este tipo de modelo (LIU; ZHANG; ZHENG; FANG *et al.*, 2018; ZHOU; DENG; LI; YIN *et al.*, 2019). Esses dados, indicam que uma neuroinflamação leva a ativação glial no hipocampo.

A S100B é outra proteína envolvida na resposta astrocítica, além disso, essa proteína tem um papel importante na resposta inflamatória cerebral, onde, em uma situação de injúria pode ocorrer um aumento na secreção de S100B e de citocinas pró-inflamatórias (GUERRA; TORTORELLI; GALLAND; DA RÉ *et al.*, 2011). Porém, em nosso estudo, com indução de neuroinflamação aguda, não foi observada diferença significativa na concentração de S100B hipocampal, reforçando que a secreção e a concentração intracelular de S100B não estão relacionadas (GUERRA; TORTORELLI; GALLAND; DA RÉ *et al.*, 2011; LEITE; BROLESE; DE ALMEIDA; PIÑERO *et al.*, 2006; VIZUETE; HANSEN; NEGRI; LEITE *et al.*, 2018).

4.3. Alterações periféricas

A concentração sérica de leptina, além de estar diretamente relacionada com a quantidade de tecido adiposo no organismo, pode ser alterada em resposta a situações fisiológicas ou patológicas (MÜNZBERG; MORRISON, 2015; SUKUMARAN; XUE; JUSKO; DUBOIS *et al.*, 2010). Durante o estado alimentado, por exemplo, os níveis de leptina circulante aumentam e durante o jejum reduzem (JØRGENSEN; BERNIER; MAULE; VIJAYAN, 2016). O peso corporal também tem relação direta com a

concentração sérica de leptina, sendo sua concentração aumentada em indivíduos obesos e reduzida em pessoas anoréxicas (STEINER; SCHILTZ; WALTER; WUNDERLICH *et al.*, 2010). Em indivíduos com DM2, os níveis dessa adipocina se mostraram aumentados em indivíduos diabéticos e obesos e reduzidos em indivíduos diabéticos e eutróficos (LÓPEZ-JARAMILLO; GÓMEZ-ARBELÁEZ; LÓPEZ-LÓPEZ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014; MOHAMMADZADEH; ZARGHAMI, 2013). Esses dados nos levam a crer que o DM2 por si só é um fator que interfere na secreção de leptina pelo tecido adiposo, e a resposta depende do grau de adiposidade de cada organismo.

Em nosso modelo avaliamos a concentração sérica de leptina nos animais com DM2 induzida por STZ e NA após um período curto (4 semanas) ou longo (16 semanas) de tempo. Ao longo do tempo pôde-se observar nos animais do grupo sham um aumento nos níveis séricos de leptina, o que pode ser atribuído ao aumento de massa corporal que é esperado ocorrer nessa fase do desenvolvimento. Porém, os animais do grupo DM2 não tiveram essa mesma resposta, apesar do aumento do peso corporal ao longo do tempo, os níveis de leptina se mantiveram com os níveis similares aos animais com 4 semanas. Sendo assim, os animais do grupo DM2 apresentaram níveis séricos de leptina reduzidos em comparação ao grupo sham após 16 semanas de indução do modelo, similar ao que ocorre em indivíduos diabéticos eutróficos (LÓPEZ-JARAMILLO; GÓMEZ-ARBELÁEZ; LÓPEZ-LÓPEZ; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Em estudos animais com indução de DM2 utilizando dieta ocorre consequente indução de obesidade (DERKACH; BAKHTYUKOV; ROMANOVA; ZORINA *et al.*, 2020; KHAT-UDOMKIRI; TOEJING; SIRILUN; CHAIYASUT *et al.*, 2020; ZENG; YUAN; YU; ZHANG *et al.*, 2019). Nestes modelos ocorre um aumento nos níveis de leptina sérica nos animais diabéticos, diferentemente do que ocorreu em nosso estudo, reforçando a importância de uma investigação dos efeitos diretos do DM2 sobre esse

hormônio. Em estudos utilizando STZ e NA para a indução do DM2 os dados são divergentes, uma vez que alguns estudos encontraram uma redução dos níveis de leptina sérica com a indução de DM2 (OJUADE; OLORUNDARE; AKANBI; AFOLABI *et al.*, 2021) enquanto outros estudos mostraram um aumento nos níveis desta adipocina (AHANGARPOUR; SHABANI; FARBOOD, 2018). Porém, em alguns estudos, o critério de exclusão dos animais a partir da glicemia válida é de no mínimo 200 mg/dL, podendo o grupo DM2 abranger animais com aspectos metabólicos similares aos do DM1. De fato, em modelos animais com indução de DM1 ocorre um aumento nos níveis séricos de leptina (BEKTUR; SAHIN; BAYCU, 2019), similar aos resultados encontrados em alguns estudos utilizando o modelo de STZ e NA. Em nosso estudo, os animais do grupo sham apresentavam glicemia média de jejum de 70 mg/dL, então, para o grupo DM2 selecionamos os animais com uma glicemia média de jejum entre 100 e 250 mg/dL evitando que animais com alterações metabólicas similares ao DM1 fossem contabilizados. Sendo assim, a glicemia parece estar relacionada com a secreção de leptina pelo tecido adiposo, porém, essa relação ainda não está clara, uma vez que os resultados entre os estudos são divergentes.

A leptina tem um papel importante na resposta imune periférica, onde, em situações patológicas o tecido adiposo pode responder modulando a secreção de leptina para a corrente sanguínea (TSAI, 2017). Em modelos animais de indução de inflamação sistêmica com o uso de LPS já foi demonstrado um aumento na secreção de leptina por parte do tecido adiposo (RUMMEL; INOUE; SACHOT; POOLE *et al.*, 2008). Inclusive, essa modulação é proposta como parte da resposta imune ao estímulo pró-inflamatório e a leptina poderia ser um ponto chave da sinalização da inflamação periférica para o cérebro (AGUILAR-VALLES; INOUE; RUMMEL; LUHESHI, 2015). Porém, em nosso estudo, com inflamação central aguda com o uso de LPS através de injeção ICV, a

concentração sérica de leptina se mostrou reduzida nos animais do grupo LPS em relação aos animais do grupo sham. Esses dados podem demonstrar que os mecanismos de interação da inflamação do cérebro para a periferia são diferentes dos mecanismos da periferia para o cérebro.

A proteína S100B apesar de ser considerada uma proteína característica de astrócitos, possui níveis circulantes consideráveis. A concentração de S100B sérica pode ser resultante de sua secreção por parte dos adipócitos ou outras células periféricas, além de sua secreção central pelos astrócitos, uma vez que essa proteína possui a capacidade de atravessar a BHE (GONÇALVES; LEITE; GUERRA, 2010). Um aumento nos níveis séricos de S100B pode ocorrer em resposta a um dano central por um dano à barreira hematoencefálica, sendo utilizada, inclusive, como marcador periférico de dano central (GONÇALVES; LEITE; NARDIN, 2008). Os níveis séricos de S100B têm sido relacionados ao déficit cognitivo presente em pacientes com DM2 (YU; LI; LIU; DU *et al.*, 2020), que apresentam níveis séricos de S100B reduzidos em comparação com indivíduos saudáveis (CELIKBILEK; AKYOL; SABAH; TANIK *et al.*, 2014; HOVSEPYAN; HAAS; BOYAJYAN; GUEVORKYAN *et al.*, 2004). Em nosso estudo encontramos redução significativa nos níveis de S100B no LCR dos animais com DM2 induzida em relação ao grupo sham apenas no estágio inicial da doença (após 4 semanas de indução). Alguns estudos já mostraram alterações na secreção e concentração da proteína S100B em resposta a alterações no metabolismo de glicose (RODRIGUES; WARTCHOW; SUARDI; FEDERHEN *et al.*, 2019; STEINER; BERNSTEIN; SCHILTZ; HAASE *et al.*, 2014; ZANOTTO; SIMÃO; GASPARIN; BIASIBETTI *et al.*, 2017), mas o exato mecanismo ainda não está claro. A concentração dessa proteína no soro e no tecido hipocampal não apresentou alteração significativa no grupo DM2 em comparação ao sham, apesar da sua alteração no LCR.

Em nosso modelo de neuroinflamação aguda induzida por LPS os níveis da proteína S100B se mostraram reduzidos em comparação ao grupo sham, enquanto sua concentração no hipocampo não foi alterada. Estes dados, juntamente com os resultados encontrados em nosso modelo de DM2, demonstram, que os níveis de S100B no SNC não são diretamente relacionados aos seus níveis periféricos assim como sua secreção não está relacionada aos seus níveis intracelulares, corroborando com outros estudos de nosso grupo (GUERRA; TORTORELLI; GALLAND; DA RÉ *et al.*, 2011; LISSNER; RODRIGUES; WARTCHOW; BORBA *et al.*, 2021).

A concentração sérica de leptina e de S100B tem sido relacionada ao IMC em humanos, onde indivíduos obesos apresentam níveis circulantes destas proteínas maiores do que indivíduos saudáveis, ao passo que, pessoas com anorexia apresentam níveis circulantes reduzidos (STEINER; SCHILTZ; WALTER; WUNDERLICH *et al.*, 2010). Em nosso estudo, os animais com neuroinflamação induzida com LPS apresentaram uma perda de peso, não observada nos animais sham deste modelo, além disso, esses animais tiveram uma redução nos níveis séricos de leptina e S100B, corroborando com a literatura. Porém, os animais com DM2, após 16 semanas de indução do modelo, apresentavam peso inferior ao grupo sham, apesar de haver ganho de peso significativo ao longo do estudo. Apesar disso, os níveis séricos de leptina não acompanharam esse aumento ao longo do tempo, resultando em níveis séricos de leptina ao final do estudo menores nos animais diabéticos quando comparados aos animais do grupo sham. Além disso, não encontramos diferença nos níveis séricos de S100B nesse estudo com DM2, como discutido anteriormente. Sendo assim as mudanças nos níveis séricos de leptina e de S100B podem estar refletindo uma resposta dos adipócitos às alterações metabólicas e não apenas a uma diferença no peso dos animais em si.

5. Conclusões

Concluimos com esse trabalho que tanto um modelo de neuroinflamação aguda quanto a indução de DM2 levam a prejuízos cognitivos. Entretanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos podem não ser os mesmos, uma vez que apenas no modelo de neuroinflamação aguda observamos o envolvimento de alterações na sinalização por leptina. Por outro lado, o modelo de DM2 foi capaz de induzir dano cognitivo em um curto período de tempo, mesmo que o modelo não esteja associado com a obesidade. Esse é um achado importante, pois a obesidade por si só pode levar a prejuízos cognitivos e grande parte dos estudos avalia esses dois distúrbios simultaneamente, com esse achado concluimos que o DM2 é um fator de risco para essas alterações de memória independentemente da presença de obesidade. Com relação aos mecanismos envolvidos, pudemos observar que nesse modelo de DM2 as alterações astrocíticas precederam as alterações neuronais que ocorreram apenas em uma fase mais tardia. Esses resultados reforçam a importância dos astrócitos como alvos terapêuticos nas complicações centrais do DM2.

6. Perspectivas

- ✓ Avaliar parâmetros inflamatórios centrais e periféricos em resposta ao DM2.
- ✓ Avaliar a capacidade cognitiva dos animais, bem como os parâmetros astrocíticos em tempos menores para determinar se esses parâmetros já estão alterados antes do déficit cognitivo.

7. Referências Bibliográficas

- ABDELLA, N. A.; MOJIMINIYI, O. A.; MOUSSA, M. A.; ZAKI, M. *et al.* Plasma leptin concentration in patients with Type 2 diabetes: relationship to cardiovascular disease risk factors and insulin resistance. **Diabet Med**, 22, n. 3, p. 278-285, Mar 2005.
- ADAMSKY, A.; GOSHEN, I. Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions. **Neuroscience**, 370, p. 14-26, Feb 2018.
- AGUILAR-VALLES, A.; INOUE, W.; RUMMEL, C.; LUHESHI, G. N. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, 96, n. Pt A, p. 124-134, Sep 2015.
- AGUILAR-VALLES, A.; JUNG, S.; POOLE, S.; FLORES, C. *et al.* Leptin and interleukin-6 alter the function of mesolimbic dopamine neurons in a rodent model of prenatal inflammation. **Psychoneuroendocrinology**, 37, n. 7, p. 956-969, Jul 2012.
- AHANGARPOUR, A.; SHABANI, R.; FARBOOD, Y. The effect of betulinic acid on leptin, adiponectin, hepatic enzyme levels and lipid profiles in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. **Res Pharm Sci**, 13, n. 2, p. 142-148, Apr 2018.
- AHMAD, A.; ALI, T.; REHMAN, S. U.; KIM, M. O. Phytomedicine-Based Potent Antioxidant, Fisetin Protects CNS-Insult LPS-Induced Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration and Memory Impairment. **J Clin Med**, 8, n. 6, Jun 2019.
- ALLISON, M. B.; MYERS, M. G. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. **J Endocrinol**, 223, n. 1, p. T25-35, Oct 2014.
- AMERICAN-DIABETES-ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. **Diabetes Care**, 45, n. Suppl 1, p. S17-S38, 01 01 2022.
- AMOR, S.; PEFEROEN, L. A.; VOGEL, D. Y.; BREUR, M. *et al.* Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. **Immunology**, 142, n. 2, p. 151-166, Jun 2014.
- ANDERSEN, J. V.; NISSEN, J. D.; CHRISTENSEN, S. K.; MARKUSSEN, K. H. *et al.* Impaired Hippocampal Glutamate and Glutamine Metabolism in the db/db Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. **Neural Plast**, 2017, p. 2107084, 2017.
- APOSTOLATOS, A.; SONG, S.; ACOSTA, S.; PEART, M. *et al.* Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase CδII isoform. **J Biol Chem**, 287, n. 12, p. 9299-9310, Mar 16 2012.
- ASLAM, A.; SINGH, J.; RAJBHANDARI, S. Pathogenesis of painful diabetic neuropathy. **Pain Res Treat**, 2014, p. 412041, 2014.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, 383, n. 9911, p. 69-82, Jan 2014.
- BANKS, W. A. Peptides and the blood-brain barrier. **Peptides**, 72, p. 16-19, Oct 2015.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; HUANG, W.; JASPAN, J. B. *et al.* Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, 17, n. 2, p. 305-311, 1996.
- BARBAGALLO, M.; DOMINGUEZ, L. J. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **World J Diabetes**, 5, n. 6, p. 889-893, Dec 2014.

- BEKTUR, E.; SAHIN, E.; BAYCU, C. Mirtazapine may show anti-hyperglycemic effect by decreasing GLUT2 through leptin and galanin expressions in the liver of type 1 diabetic rats. **Iran J Basic Med Sci**, 22, n. 6, p. 676-682, Jun 2019.
- BIDDINGER, S. B.; KAHN, C. R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. **Annu Rev Physiol**, 68, p. 123-158, 2006.
- BLOOMGARDEN, Z. T. A1C: recommendations, debates, and questions. **Diabetes Care**, 32, n. 12, p. e141-147, Dec 2009.
- BUKKE, V. N.; ARCHANA, M.; VILLANI, R.; ROMANO, A. D. *et al.* The Dual Role of Glutamatergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease: From Pathophysiology to Pharmacotherapy. **Int J Mol Sci**, 21, n. 20, Oct 09 2020.
- CELIKBILEK, A.; AKYOL, L.; SABAH, S.; TANIK, N. *et al.* S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. **Neurosci Lett**, 558, p. 53-57, Jan 2014.
- CHANDRASEKARAN, K.; CHOI, J.; ARVAS, M. I.; SALIMIAN, M. *et al.* Nicotinamide Mononucleotide Administration Prevents Experimental Diabetes-Induced Cognitive Impairment and Loss of Hippocampal Neurons. **Int J Mol Sci**, 21, n. 11, May 26 2020.
- CHEN, J.; LIANG, L.; ZHAN, L.; ZHOU, Y. *et al.* ZiBuPiYin recipe protects db/db mice from diabetes-associated cognitive decline through improving multiple pathological changes. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e91680, 2014.
- CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron**, 58, n. 5, p. 708-719, Jun 12 2008.
- CHRISTOPHERSON, K. S.; ULLIAN, E. M.; STOKES, C. C.; MULLOWNEY, C. E. *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, 120, n. 3, p. 421-433, Feb 2005.
- COHEN-SALMON, M.; SLAOU, L.; MAZARÉ, N.; GILBERT, A. *et al.* Astrocytes in the regulation of cerebrovascular functions. **Glia**, 69, n. 4, p. 817-841, Apr 2021.
- COLEMAN, E. S.; DENNIS, J. C.; BRADEN, T. D.; JUDD, R. L. *et al.* Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. **Brain Res**, 1306, p. 131-141, Jan 08 2010.
- CRUJEIRAS, A. B.; CARREIRA, M. C.; CABIA, B.; ANDRADE, S. *et al.* Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. **Life Sci**, 140, p. 57-63, Nov 2015.
- CURRIE, G.; MCKAY, G.; DELLES, C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. **World J Diabetes**, 5, n. 6, p. 763-776, Dec 2014.
- DABELEA, D.; MAYER-DAVIS, E. J. Diabetes prevalence among youth--reply. **JAMA**, 312, n. 11, p. 1153-1154, Sep 2014.
- DAS NEVES, S. P.; SOUSA, J. C.; SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J. *et al.* Altered astrocytic function in experimental neuroinflammation and multiple sclerosis. **Glia**, Nov 2020.
- DAULATZAI, M. A. Fundamental role of pan-inflammation and oxidative-nitrosative pathways in neuropathogenesis of Alzheimer's disease in focal cerebral ischemic rats. **Am J Neurodegener Dis**, 5, n. 2, p. 102-130, 2016.

DE CANDIA, P.; MATARESE, G. Leptin and ghrelin: Sewing metabolism onto neurodegeneration. **Neuropharmacology**, Dec 2017.

DE GIT, K. C.; ADAN, R. A. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. **Obes Rev**, Jan 2015.

DERKACH, K. V.; BAKHTYUKOV, A. A.; ROMANOVA, I. V.; ZORINA, I. I. *et al.* The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. **Andrologia**, 52, n. 11, p. e13816, Dec 2020.

DI SPIEZIO, A.; SANDIN, E. S.; DORE, R.; MÜLLER-FIELITZ, H. *et al.* The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. **Mol Metab**, 8, p. 13-22, 02 2018.

DIONYSOPOULOU, S.; CHARMANDARI, E.; BARGIOTA, A.; VLAHOS, N. *et al.* The Role of Hypothalamic Inflammation in Diet-Induced Obesity and Its Association with Cognitive and Mood Disorders. **Nutrients**, 13, n. 2, 02 03 2021.

DRAGANO, N. R.; HADDAD-TOVOLLI, R.; VELLOSO, L. A. Leptin, Neuroinflammation and Obesity. **Front Horm Res**, 48, p. 84-96, 2017.

DUARTE, A.; SANTOS, M.; SEIÇA, R.; RESENDE DE OLIVEIRA, C. Effect of oxidative stress on the uptake of GABA and glutamate in synaptosomes isolated from diabetic rat brain. **Neuroendocrinology**, 72, n. 3, p. 179-186, Sep 2000.

DUARTE, J. M. N.; SKOUG, C.; SILVA, H. B.; CARVALHO, R. A. *et al.* Impact of Caffeine Consumption on Type 2 Diabetes-Induced Spatial Memory Impairment and Neurochemical Alterations in the Hippocampus. **Front Neurosci**, 12, p. 1015, 2018.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 9, n. 7, Jul 05 2017.

DWIVEDI, D.; MEGHA, K.; MISHRA, R.; MANDAL, P. K. Glutathione in Brain: Overview of Its Conformations, Functions, Biochemical Characteristics, Quantitation and Potential Therapeutic Role in Brain Disorders. **Neurochem Res**, 45, n. 7, p. 1461-1480, Jul 2020.

EBADY, S. A.; ARAMI, M. A.; SHAFIGH, M. H. Investigation on the relationship between diabetes mellitus type 2 and cognitive impairment. **Diabetes Res Clin Pract**, 82, n. 3, p. 305-309, Dec 2008.

EL-HASCHIMI, K.; PIERROZ, D. D.; HILEMAN, S. M.; BJØRBAEK, C. *et al.* Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **J Clin Invest**, 105, n. 12, p. 1827-1832, Jun 2000.

ESTRADA, V.; SERRANO-RÍOS, M.; MARTÍNEZ LARRAD, M. T.; VILLAR, N. G. *et al.* Leptin and adipose tissue maldistribution in HIV-infected male patients with predominant fat loss treated with antiretroviral therapy. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 29, n. 1, p. 32-40, Jan 2002.

FEINKOHL, I.; KELLER, M.; ROBERTSON, C. M.; MORLING, J. R. *et al.* Clinical and subclinical macrovascular disease as predictors of cognitive decline in older patients with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. **Diabetes Care**, 36, n. 9, p. 2779-2786, Sep 2013.

FLATOW, E. A.; KOMEGAE, E. N.; FONSECA, M. T.; BRITO, C. F. *et al.* Elucidating the role of leptin in systemic inflammation: a study targeting physiological leptin levels in rats and their macrophages. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 313, n. 5, p. R572-R582, Nov 2017.

FORNY-GERMANO, L.; DE FELICE, F. G.; VIEIRA, M. N. D. N. The Role of Leptin and Adiponectin in Obesity-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, 12, p. 1027, 2018.

FREDERICH, R. C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med**, 1, n. 12, p. 1311-1314, Dec 1995.

FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochem J**, 393, n. Pt 1, p. 7-20, Jan 2006.

GABAY, C.; DREYER, M.; PELLEGRINELLI, N.; CHICHEPORTICHE, R. *et al.* Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes. **J Clin Endocrinol Metab**, 86, n. 2, p. 783-791, Feb 2001.

GARCIA-SERRANO, A. M.; DUARTE, J. M. N. Brain Metabolism Alterations in Type 2 Diabetes: What Did We Learn From Diet-Induced Diabetes Models? **Front Neurosci**, 14, p. 229, 2020.

GELSOMINO, L.; GIORDANO, C.; CAMERA, G.; SISCI, D. *et al.* Leptin Signaling Contributes to Aromatase Inhibitor Resistant Breast Cancer Cell Growth and Activation of Macrophages. **Biomolecules**, 10, n. 4, 04 2020.

GENTILE, A.; MORI, F.; BERNARDINI, S.; CENTONZE, D. Role of amyloid- β CSF levels in cognitive deficit in MS. **Clin Chim Acta**, 449, p. 23-30, Sep 2015.

GJERTSSON, I.; HULTGREN, O. H.; STENSON, M.; HOLMDAHL, R. *et al.* Are B lymphocytes of importance in severe Staphylococcus aureus infections? **Infect Immun**, 68, n. 5, p. 2431-2434, May 2000.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C. *et al.* Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, 140, n. 6, p. 918-934, Mar 2010.

GOEL, R.; BHAT, S. A.; HANIF, K.; NATH, C. *et al.* Perindopril Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Amyloidogenesis and Memory Impairment by Suppression of Oxidative Stress and RAGE Activation. **ACS Chem Neurosci**, 7, n. 2, p. 206-217, Feb 2016.

GONÇALVES, C. A.; LEITE, M. C.; GUERRA, M. C. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. **Cardiovasc Psychiatry Neurol**, 2010, p. 790431, 2010.

GONÇALVES, C. A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clin Biochem**, 41, n. 10-11, p. 755-763, Jul 2008.

GRECO, S. J.; BRYAN, K. J.; SARKAR, S.; ZHU, X. *et al.* Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, 19, n. 4, p. 1155-1167, 2010.

GRECO, S. J.; SARKAR, S.; JOHNSTON, J. M.; TEZAPSIDIS, N. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 380, n. 1, p. 98-104, Feb 2009.

GREEN, J. B. Understanding the type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk paradox. **Postgrad Med**, 126, n. 3, p. 190-204, May 2014.

GUERRA, M. C.; TORTORELLI, L. S.; GALLAND, F.; DA RÉ, C. *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **J Neuroinflammation**, 8, p. 128, 2011.

HALAAS, J. L.; BOOZER, C.; BLAIR-WEST, J.; FIDAHUSEIN, N. *et al.* Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 16, p. 8878-8883, Aug 1997.

HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics**, 7, n. 4, p. 494-506, Oct 2010.

HAMILTON, K.; HARVEY, J. The Neuronal Actions of Leptin and the Implications for Treating Alzheimer's Disease. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 1, Jan 2021.

HARRISON, L.; SCHRIEVER, S. C.; FEUCHTINGER, A.; KYRIAKOU, E. *et al.* Fluorescent blood-brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. **Int J Obes (Lond)**, 43, n. 6, p. 1305-1318, 06 2019.

HARVEY, J. Novel actions of leptin in the hippocampus. **Ann Med**, 35, n. 3, p. 197-206, 2003.

HASCUP, E. R.; BRODERICK, S. O.; RUSSELL, M. K.; FANG, Y. *et al.* Diet-induced insulin resistance elevates hippocampal glutamate as well as VGLUT1 and GFAP expression in A β PP/PS1 mice. **J Neurochem**, 148, n. 2, p. 219-237, Jan 2019.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Mol Cell**, 69, n. 2, p. 169-181, 01 2018.

HILEMAN, S. M.; PIERROZ, D. D.; MASUZAKI, H.; BJØRBAEK, C. *et al.* Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. **Endocrinology**, 143, n. 3, p. 775-783, Mar 2002.

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y. *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 10, p. 565-581, Oct 2019.

HOVSEPYAN, M. R.; HAAS, M. J.; BOYAJYAN, A. S.; GUEVORKYAN, A. A. *et al.* Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. **Neurosci Lett**, 369, n. 3, p. 224-227, Oct 21 2004.

HSU, E. T.; GANGOLLI, M.; SU, S.; HOLLERAN, L. *et al.* Astrocytic degeneration in chronic traumatic encephalopathy. **Acta Neuropathol**, 136, n. 6, p. 955-972, Dec 2018.

HUYNH, R. A.; MOHAN, C. Alzheimer's Disease: Biomarkers in the Genome, Blood, and Cerebrospinal Fluid. **Front Neurol**, 8, p. 102, 2017.

ILOUN, P.; ABBASNEJAD, Z.; JANAHMADI, M.; AHMADIANI, A. *et al.* Investigating the role of P38, JNK and ERK in LPS induced hippocampal insulin resistance and spatial memory impairment: effects of insulin treatment. **EXCLI J**, 17, p. 825-839, 2018.

INZUCCHI, S. E. Diagnosis of diabetes. **N Engl J Med**, 368, n. 2, p. 193, 01 2013.

IRVING, A. J.; HARVEY, J. Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 369, n. 1633, p. 20130155, Jan 2014.

ISING, C.; HENEKA, M. T. Functional and structural damage of neurons by innate immune mechanisms during neurodegeneration. **Cell Death Dis**, 9, n. 2, p. 120, 01 2018.

IZQUIERDO, A. G.; CRUJEIRAS, A. B.; CASANUEVA, F. F.; CARREIRA, M. C. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? **Nutrients**, 11, n. 11, Nov 2019.

JØRGENSEN, E. H.; BERNIER, N. J.; MAULE, A. G.; VIJAYAN, M. M. Effect of long-term fasting and a subsequent meal on mRNA abundances of hypothalamic appetite regulators, central and peripheral leptin expression and plasma leptin levels in rainbow trout. **Peptides**, 86, p. 162-170, 12 2016.

KAMDI, S. P.; BADWAIK, H. R.; RAVAL, A.; AJAZUDDIN *et al.* Ameliorative potential of phloridzin in type 2 diabetes-induced memory deficits in rats. **Eur J Pharmacol**, 913, p. 174645, Dec 15 2021.

KHAT-UDOMKIRI, N.; TOEJING, P.; SIRILUN, S.; CHAIYASUT, C. *et al.* Antihyperglycemic effect of rice husk derived xylooligosaccharides in high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rat model. **Food Sci Nutr**, 8, n. 1, p. 428-444, Jan 2020.

KHEMKA, V. K.; BAGCHI, D.; BANDYOPADHYAY, K.; BIR, A. *et al.* Altered serum levels of adipokines and insulin in probable Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, 41, n. 2, p. 525-533, 2014.

KING, A. J. The use of animal models in diabetes research. **Br J Pharmacol**, 166, n. 3, p. 877-894, Jun 2012.

KOIVUSALO, S. B.; RÖNÖ, K.; KLEMETTI, M. M.; ROINE, R. P. *et al.* Gestational Diabetes Mellitus Can Be Prevented by Lifestyle Intervention: The Finnish Gestational Diabetes Prevention Study (RADIEL): A Randomized Controlled Trial. **Diabetes Care**, 39, n. 1, p. 24-30, Jan 2016.

KOOISTRA, M.; GEERLINGS, M. I.; MALI, W. P.; VINCKEN, K. L. *et al.* Diabetes mellitus and progression of vascular brain lesions and brain atrophy in patients with symptomatic atherosclerotic disease. The SMART-MR study. **J Neurol Sci**, 332, n. 1-2, p. 69-74, Sep 2013.

KWON, H. S.; KOH, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Transl Neurodegener**, 9, n. 1, p. 42, 11 2020.

LA CAVA, A. Leptin in inflammation and autoimmunity. **Cytokine**, 98, p. 51-58, 10 2017.

LAFRANCE, V.; INOUE, W.; KAN, B.; LUHESHI, G. N. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. **Brain Behav Immun**, 24, n. 3, p. 358-365, Mar 2010.

LEITE, M. C.; BROLESE, G.; DE ALMEIDA, L. M.; PIÑERO, C. C. *et al.* Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. **Brain Res Bull**, 70, n. 2, p. 179-185, Jun 2006.

LI, B.; LEUNG, J. C. K.; CHAN, L. Y. Y.; YIU, W. H. *et al.* A global perspective on the crosstalk between saturated fatty acids and Toll-like receptor 4 in the etiology of inflammation and insulin resistance. **Prog Lipid Res**, 77, p. 101020, 01 2020.

LI, K.; LI, J.; ZHENG, J.; QIN, S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. **Aging Dis**, 10, n. 3, p. 664-675, Jun 2019.

LI, X. L.; AOU, S.; OOMURA, Y.; HORI, N. *et al.* Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. **Neuroscience**, 113, n. 3, p. 607-615, 2002.

- LIEB, W.; BEISER, A. S.; VASAN, R. S.; TAN, Z. S. *et al.* Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. **JAMA**, 302, n. 23, p. 2565-2572, Dec 2009.
- LISSNER, L. J.; RODRIGUES, L.; WARTCHOW, K. M.; BORBA, E. *et al.* Short-Term Alterations in Behavior and Astroglial Function After Intracerebroventricular Infusion of Methylglyoxal in Rats. **Neurochem Res**, 46, n. 2, p. 183-196, Feb 2021.
- LISSNER, L. J.; WARTCHOW, K. M.; TONIAZZO, A. P.; GONÇALVES, C. A. *et al.* Object recognition and Morris water maze to detect cognitive impairment from mild hippocampal damage in rats: A reflection based on the literature and experience. **Pharmacol Biochem Behav**, 210, p. 173273, 11 2021.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; FANG, T. *et al.* Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. **J Neuroinflammation**, 15, n. 1, p. 112, Apr 18 2018.
- LÓPEZ-JARAMILLO, P.; GÓMEZ-ARBELÁEZ, D.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, C. *et al.* The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 18, n. 1, p. 37-45, Apr 2014.
- MANAER, T.; YU, L.; ZHANG, Y.; XIAO, X. J. *et al.* Anti-diabetic effects of shubat in type 2 diabetic rats induced by combination of high-glucose-fat diet and low-dose streptozotocin. **J Ethnopharmacol**, Apr 2015.
- MASIELLO, P.; BROCA, C.; GROSS, R.; ROYE, M. *et al.* Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, 47, n. 2, p. 224-229, Feb 1998.
- MATARESE, G.; CARRIERI, P. B.; MONTELLA, S.; DE ROSA, V. *et al.* Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol**, 6, n. 8, p. 455-461, Aug 2010.
- MATARESE, G.; LA CAVA, A.; SANNA, V.; LORD, G. M. *et al.* Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? **Trends Immunol**, 23, n. 4, p. 182-187, Apr 2002.
- MATARESE, G.; PROCACCINI, C.; DE ROSA, V.; HORVATH, T. L. *et al.* Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. **Trends Mol Med**, 16, n. 6, p. 247-256, Jun 2010.
- MEHTA, B. K.; SINGH, K. K.; BANERJEE, S. Effect of exercise on type 2 diabetes-associated cognitive impairment in rats. **Int J Neurosci**, 129, n. 3, p. 252-263, Mar 2019.
- MICHETTI, F.; D'AMBROSI, N.; TOESCA, A.; PUGLISI, M. A. *et al.* The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. **J Neurochem**, 148, n. 2, p. 168-187, 01 2019.
- MOHAMMADZADEH, G.; ZARGHAMI, N. Serum leptin level is reduced in non-obese subjects with type 2 diabetes. **Int J Endocrinol Metab**, 11, n. 1, p. 3-10, 2013.
- MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; DIGBY, J. E. *et al.* Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. **Diabetes**, 46, n. 3, p. 342-347, Mar 1997.
- MORAN, C.; PHAN, T. G.; CHEN, J.; BLIZZARD, L. *et al.* Brain atrophy in type 2 diabetes: regional distribution and influence on cognition. **Diabetes Care**, 36, n. 12, p. 4036-4042, Dec 2013.

- MORRIS, J. K.; VIDONI, E. D.; HONEA, R. A.; BURNS, J. M. *et al.* Impaired glycemia increases disease progression in mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging**, 35, n. 3, p. 585-589, Mar 2014.
- MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism**, 64, n. 1, p. 13-23, Jan 2015.
- NADELSON, J.; SATAPATHY, S. K.; NAIR, S. Glycated Hemoglobin Levels in Patients with Decompensated Cirrhosis. **Int J Endocrinol**, 2016, p. 8390210, 2016.
- NARDIN, P.; TRAMONTINA, F.; LEITE, M. C.; TRAMONTINA, A. C. *et al.* S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. **Neurochem Int**, 50, n. 5, p. 774-782, Apr 2007.
- NARDIN, P.; ZANOTTO, C.; HANSEN, F.; BATASSINI, C. *et al.* Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. **Neurochem Res**, 41, n. 8, p. 2006-2016, Aug 2016.
- NUNLEY, K. A.; ROSANO, C.; RYAN, C. M.; JENNINGS, J. R. *et al.* Clinically Relevant Cognitive Impairment in Middle-Aged Adults With Childhood-Onset Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, 38, n. 9, p. 1768-1776, Sep 2015.
- OJUADE, F. I.; OLORUNDARE, O. E.; AKANBI, O. B.; AFOLABI, S. O. *et al.* Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of aqueous extract of. **Heliyon**, 7, n. 6, p. e07363, Jun 2021.
- OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A. H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, 306, n. 5695, p. 457-461, Oct 2004.
- PAN, W.; HSUCHOU, H.; HE, Y.; SAKHARKAR, A. *et al.* Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. **Endocrinology**, 149, n. 6, p. 2798-2806, Jun 2008.
- PANCANI, T.; ANDERSON, K. L.; BREWER, L. D.; KADISH, I. *et al.* Effect of high-fat diet on metabolic indices, cognition, and neuronal physiology in aging F344 rats. **Neurobiol Aging**, 34, n. 8, p. 1977-1987, Aug 2013.
- PANDEY, S.; GARABADU, D. Piracetam Facilitates the Anti-Amnesic but not Anti-Diabetic Activity of Metformin in Experimentally Induced Type-2 Diabetic Encephalopathic Rats. **Cell Mol Neurobiol**, Sep 2016.
- PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Leptin signaling. **F1000Prime Rep**, 6, p. 73, 2014.
- PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism**, 64, n. 1, p. 24-34, Jan 2015.
- PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**, 204, n. 4, p. 428-437, Nov 2004.
- PINGER, C. W.; ENTWISTLE, K. E.; BELL, T. M.; LIU, Y. *et al.* C-Peptide replacement therapy in type 1 diabetes: are we in the trough of disillusionment? **Mol Biosyst**, 13, n. 8, p. 1432-1437, Jul 2017.
- PREMAN, P.; ALFONSO-TRIGUERO, M.; ALBERDI, E.; VERKHRATSKY, A. *et al.* Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways. **Cells**, 10, n. 3, 03 04 2021.
- PÉREZ-PÉREZ, A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; VILARIÑO-GARCÍA, T.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. **Int J Mol Sci**, 21, n. 16, Aug 2020.

RABABA'H, A. M.; MARDINI, A. N.; ALZOUBI, K. H.; ABABNEH, M. A. *et al.* The effect of cilostazol on hippocampal memory and oxidative stress biomarkers in rat model of diabetes mellitus. **Brain Res**, 1715, p. 182-187, Jul 15 2019.

RAGY, M. M.; AHMED, S. M. Protective effects of either C-peptide or l-arginine on pancreatic β -cell function, proliferation, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Cell Physiol**, 234, n. 7, p. 11500-11510, 07 2019.

RODRIGUES, L.; WARTCHOW, K. M.; SUARDI, L. Z.; FEDERHEN, B. C. *et al.* Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. **Neurochem Int**, 128, p. 85-93, 09 2019.

RUMMEL, C. Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. **Brain Behav Immun**, 54, p. 1-14, May 2016.

RUMMEL, C.; INOUE, W.; SACHOT, C.; POOLE, S. *et al.* Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. **J Comp Neurol**, 511, n. 3, p. 373-395, Nov 2008.

RÖNNEMAA, E.; ZETHELIUS, B.; SUNDELÖF, J.; SUNDSTRÖM, J. *et al.* Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. **Neurology**, 71, n. 14, p. 1065-1071, Sep 2008.

SAEDI, E.; GHEINI, M. R.; FAIZ, F.; ARAMI, M. A. Diabetes mellitus and cognitive impairments. **World J Diabetes**, 7, n. 17, p. 412-422, Sep 2016.

SCHWARTZ, M. W.; PESKIND, E.; RASKIND, M.; BOYKO, E. J. *et al.* Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. **Nat Med**, 2, n. 5, p. 589-593, May 1996.

SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; TSCHÖP, M. H.; WOODS, S. C. *et al.* Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. **Nature**, 503, n. 7474, p. 59-66, Nov 2013.

SHARMA, G.; PARIHAR, A.; TALAIYA, T.; DUBEY, K. *et al.* Cognitive impairments in type 2 diabetes, risk factors and preventive strategies. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, 31, n. 2, Jan 22 2020.

SHARMA, P.; SRIVASTAVA, P.; SETH, A.; TRIPATHI, P. N. *et al.* Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. **Prog Neurobiol**, 174, p. 53-89, 03 2019.

SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators Inflamm**, 2013, p. 342931, 2013.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, 87, n. 1, p. 4-14, Jan 2010.

SHIMA, T.; MATSUI, T.; JESMIN, S.; OKAMOTO, M. *et al.* Moderate exercise ameliorates dysregulated hippocampal glycometabolism and memory function in a rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, 60, n. 3, p. 597-606, Mar 2017.

SIEGL, D.; ANNECKE, T.; JOHNSON, B. L.; SCHLAG, C. *et al.* Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis. **Anesthesiology**, 121, n. 1, p. 98-114, Jul 2014.

SIERRA, A.; ENCINAS, J. M.; DEUDERO, J. J.; CHANCEY, J. H. *et al.* Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**, 7, n. 4, p. 483-495, Oct 2010.

SIGNORE, A. P.; ZHANG, F.; WENG, Z.; GAO, Y. *et al.* Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. **J Neurochem**, 106, n. 5, p. 1977-1990, Sep 2008.

SIMPSON, D. S. A.; OLIVER, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. **Antioxidants (Basel)**, 9, n. 8, Aug 2020.

SOARES, E.; PREDIGER, R. D.; NUNES, S.; CASTRO, A. A. *et al.* Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. **Neuroscience**, 250, p. 565-577, Oct 2013.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010.

SONG, S. J.; WONG, T. Y. Current concepts in diabetic retinopathy. **Diabetes Metab J**, 38, n. 6, p. 416-425, Dec 2014.

SOUZA-ALMEIDA, G.; PALHINHA, L.; LIECHOCKI, S.; DA SILVA PEREIRA, J. A. *et al.* Peripheral leptin signaling persists in innate immune cells during diet-induced obesity. **J Leukoc Biol**, Oct 2020.

STEFANOVIĆ, A.; KOTUR-STEVULJEVIĆ, J.; SPASIĆ, S.; BOGAVAC-STANOJEVIĆ, N. *et al.* The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. **Diabetes Res Clin Pract**, 79, n. 1, p. 156-163, Jan 2008.

STEINER, J.; BERNSTEIN, H. G.; SCHILTZ, K.; HAASE, T. *et al.* Decrease of serum S100B during an oral glucose tolerance test correlates inversely with the insulin response. **Psychoneuroendocrinology**, 39, p. 33-38, Jan 2014.

STEINER, J.; SCHILTZ, K.; WALTER, M.; WUNDERLICH, M. T. *et al.* S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. **Psychoneuroendocrinology**, 35, n. 2, p. 321-324, Feb 2010.

SUKUMARAN, S.; XUE, B.; JUSKO, W. J.; DUBOIS, D. C. *et al.* Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. **Physiol Genomics**, 42A, n. 2, p. 141-152, Oct 2010.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Exp Biol Med (Maywood)**, 237, n. 5, p. 481-490, May 2012.

SÁINZ, N.; BARRENETXE, J.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTÍNEZ, J. A. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. **Metabolism**, 64, n. 1, p. 35-46, Jan 2015.

THALER, J. P.; YI, C. X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, 122, n. 1, p. 153-162, Jan 2012.

TSAI, J. P. The association of serum leptin levels with metabolic diseases. **Ci Ji Yi Xue Za Zhi**, 29, n. 4, p. 192-196, 2017 Oct-Dec 2017.

TSALAMANDRIS, S.; ANTONOPOULOS, A. S.; OIKONOMOU, E.; PAPAMIKROULIS, G. A. *et al.* The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. **Eur Cardiol**, 14, n. 1, p. 50-59, Apr 2019.

TSCHÖP, J.; NOGUEIRAS, R.; HAAS-LOCKIE, S.; KASTEN, K. R. *et al.* CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. **J Neurosci**, 30, n. 17, p. 6036-6047, Apr 2010.

VAINCHTEIN, I. D.; MOLOFSKY, A. V. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. **Trends Neurosci**, 43, n. 3, p. 144-154, 03 2020.

VAN DOORN, C.; MACHT, V. A.; GRILLO, C. A.; REAGAN, L. P. Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits. **Physiol Behav**, 176, p. 207-213, Jul 2017.

VAN ELDEREN, S. G.; DE ROOS, A.; DE CRAEN, A. J.; WESTENDORP, R. G. *et al.* Progression of brain atrophy and cognitive decline in diabetes mellitus: a 3-year follow-up. **Neurology**, 75, n. 11, p. 997-1002, Sep 2010.

VAN HEEK, M.; COMPTON, D. S.; FRANCE, C. F.; TEDESCO, R. P. *et al.* Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. **J Clin Invest**, 99, n. 3, p. 385-390, Feb 1997.

VINCENZ-DONNELLY, L.; HIPPI, M. S. The endoplasmic reticulum: A hub of protein quality control in health and disease. **Free Radic Biol Med**, 108, p. 383-393, 07 2017.

VINET, J.; WEERING, H. R.; HEINRICH, A.; KÄLIN, R. E. *et al.* Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. **J Neuroinflammation**, 9, p. 27, 2012.

VIZUETE, A. F. K.; HANSEN, F.; NEGRI, E.; LEITE, M. C. *et al.* Effects of dexamethasone on the Lipilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. **J Neuroinflammation**, 15, n. 1, p. 68, Mar 2018.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, 334, n. 6059, p. 1081-1086, Nov 2011.

WESSELS, A. M.; LANE, K. A.; GAO, S.; HALL, K. S. *et al.* Diabetes and cognitive decline in elderly African Americans: a 15-year follow-up study. **Alzheimers Dement**, 7, n. 4, p. 418-424, Jul 2011.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, 53 Suppl 3, p. S215-219, Dec 2004.

WITTE, A. V.; KÖBE, T.; GRAUNKE, A.; SCHUCHARDT, J. P. *et al.* Impact of leptin on memory function and hippocampal structure in mild cognitive impairment. **Hum Brain Mapp**, 37, n. 12, p. 4539-4549, 12 2016.

WU, X.; LV, Y. G.; DU, Y. F.; HU, M. *et al.* Inhibitory effect of INT-777 on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment, neuroinflammation, apoptosis, and synaptic dysfunction in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 88, p. 360-374, Jan 2019.

YE, Z.; LIU, G.; GUO, J.; SU, Z. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance. **Obes Rev**, 19, n. 6, p. 770-785, 06 2018.

YOSHIDA, S.; TANAKA, H.; OSHIMA, H.; YAMAZAKI, T. *et al.* AS1907417, a novel GPR119 agonist, as an insulinotropic and β -cell preservative agent for the treatment of type 2 diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, 400, n. 4, p. 745-751, Oct 2010.

YOU, Y.; LIU, Z.; CHEN, Y.; XU, Y. *et al.* The prevalence of mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus patients: a systematic review and meta-analysis. **Acta Diabetol**, 58, n. 6, p. 671-685, Jun 2021.

YU, H.; LI, H.; LIU, X.; DU, X. *et al.* Levels of serum S100B are associated with cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes. **Aging (Albany NY)**, 12, n. 5, p. 4193-4203, 02 29 2020.

ZABOLOTNY, J. M.; BENICE-HANULEC, K. K.; STRICKER-KRONGRAD, A.; HAJ, F. *et al.* PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Dev Cell**, 2, n. 4, p. 489-495, Apr 2002.

ZACCARDI, F.; WEBB, D. R.; YATES, T.; DAVIES, M. J. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgrad Med J**, 92, n. 1084, p. 63-69, Feb 2016.

ZAKARIA, R.; WAN YAACOB, W. M.; OTHMAN, Z.; LONG, I. *et al.* Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. **Physiol Res**, 66, n. 4, p. 553-565, 09 2017.

ZANOTTO, C.; HANSEN, F.; GALLAND, F.; BATASSINI, C. *et al.* Glutamatergic Alterations in STZ-Induced Diabetic Rats Are Reversed by Exendin-4. **Mol Neurobiol**, 56, n. 5, p. 3538-3551, May 2019.

ZANOTTO, C.; SIMÃO, F.; GASPARIN, M. S.; BIASIBETTI, R. *et al.* Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers in Diabetic Rats. **Mol Neurobiol**, 54, n. 3, p. 2154-2166, 04 2017.

ZENG, Z.; YUAN, Q.; YU, R.; ZHANG, J. *et al.* Ameliorative Effects of Probiotic *Lactobacillus paracasei* NL41 on Insulin Sensitivity, Oxidative Stress, and Beta-Cell Function in a Type 2 Diabetes Mellitus Rat Model. **Mol Nutr Food Res**, 63, n. 22, p. e1900457, 11 2019.

ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; KARIN, M. *et al.* Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, 135, n. 1, p. 61-73, Oct 2008.

ZHAO, Q.; ROBERTS, R. O.; DING, D.; CHA, R. *et al.* Diabetes is Associated with Worse Executive Function in Both Eastern and Western Populations: Shanghai Aging Study and Mayo Clinic Study of Aging. **J Alzheimers Dis**, 47, n. 1, p. 167-176, 2015.

ZHOU, H.; URSO, C. J.; JADEJA, V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. **J Inflamm Res**, 13, p. 1-14, 2020.

ZHOU, J.; DENG, Y.; LI, F.; YIN, C. *et al.* Icariside II attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation through inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB pathway in rats. **Biomed Pharmacother**, 111, p. 315-324, Mar 2019.

ZHOU, Y.; SHAO, A.; YAO, Y.; TU, S. *et al.* Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. **Cell Commun Signal**, 18, n. 1, p. 62, 04 2020.

ANEXO I

Experimento Piloto: padronização da dose de nicotinamida

O modelo de indução de DM2 estabelecido por Masiello e colaboradores é amplamente utilizado na literatura. Entretanto, existe uma grande variação com relação às doses utilizadas de NA, assim como na glicemia de jejum atingida pelos animais nos diferentes grupos de pesquisa. Dessa forma, foram necessários experimentos piloto para a escolha da dose de NA utilizada em nosso estudo. Em nossas condições experimentais, pudemos observar, como o esperado, que os animais que receberam as menores doses de NA tiveram níveis glicêmicos maiores, ao mesmo tempo que, os animais que receberam as doses mais altas tiveram completa proteção contra a ação da STZ. Pôde-se observar que a dose de NA de 120 mg/Kg levou a uma proteção mínima contra a STZ (Figura 1A), tendo estes ratos um perfil de DM com maior gravidade, enquanto que os animais do grupo NA 140 tiveram níveis glicêmicos aumentados de forma mais branda (Figura 1B).

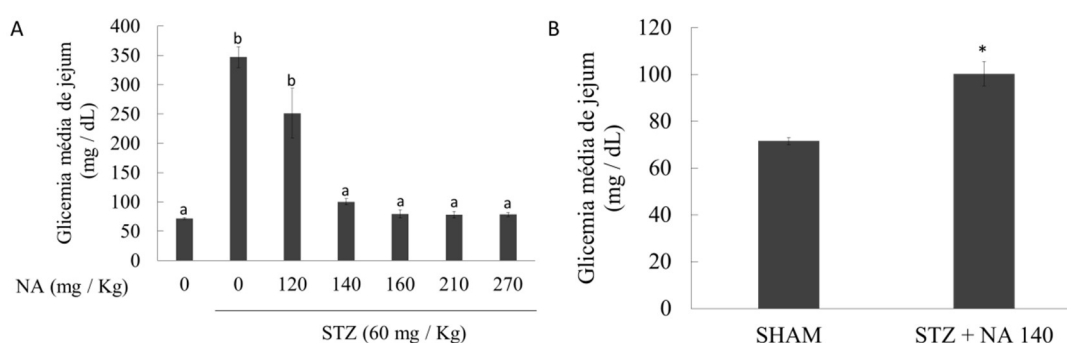


Figura 1. Glicemia de jejum. Após as injeções de STZ e NA, a glicemia de jejum foi medida semanalmente durante um período de 30 dias. Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 3 a 5 animais por grupo. (A) demonstra a comparação entre os grupos utilizando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan, letras distintas representam diferença significativa para um $p < 0,05$. (B) demonstra a comparação do grupo NA 140 com o grupo Sham no teste t de Student, *representa diferença significativa para um $p < 0,05$.

O grupo STZ apresentou uma perda de peso, enquanto os demais grupos tiveram um ganho de peso, sendo este, significativamente menor no grupo NA 120 em relação ao grupo Sham (Figura 2A). Os demais grupos não tiveram diferença significativa no ganho de peso quando comparados ao grupo Sham (Figura 2A). Em relação ao consumo

alimentar (Figura 2B) e hídrico (Figura 2C), observamos um aumento significativo nos dois parâmetros nos grupos STZ e NA 120 quando comparados aos demais grupos.

O teste de tolerância IP à glicose foi realizado apenas nos grupos Sham, NA 120 e NA 140 e pode-se perceber uma intolerância à glicose caracterizada pela curva glicêmica do grupo NA 120 (Figura 3A) do grupo NA 140 (Figura 3B) em relação a curva do grupo Sham.

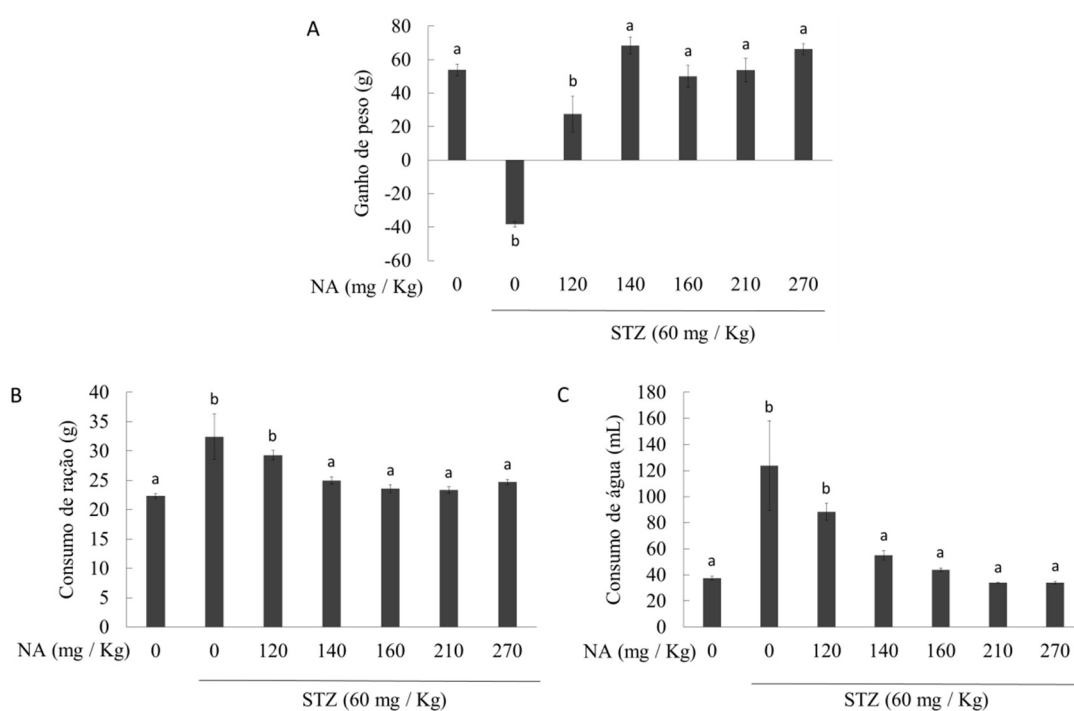


Figura 2. Ganho de peso, consumo alimentar e hídrico. Após as injeções de STZ e NA, o peso corporal, consumo de ração e de água foram medidos duas vezes por semana durante um período de 30 dias. Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 3 a 5 animais por grupo. Sendo (A) ganho de peso, (B) consumo diário de ração e (C) consumo diário de água. Letras distintas representam diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Duncan.

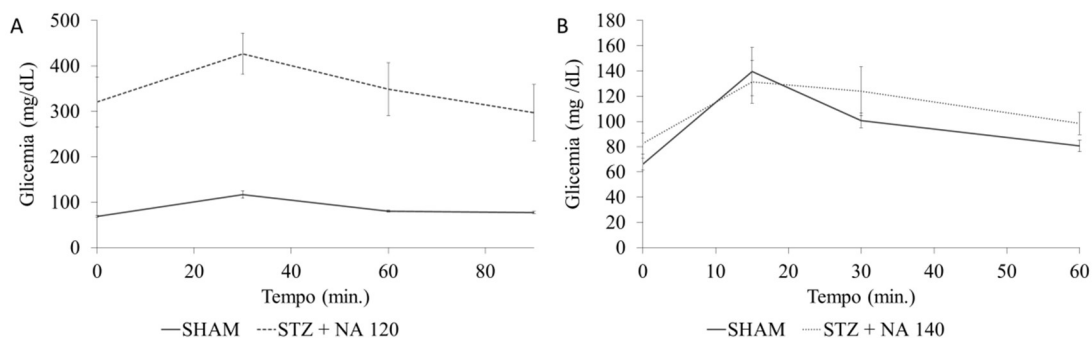


Figura 3. Teste de tolerância IP à glicose. Após 20 dias das injeções de STZ e NA foi realizado o teste de tolerância IP à glicose com os grupo NA 120 (A) e NA 140 (B). Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 5 animais por grupo.

Considerando que o objetivo do trabalho não era o de estudar DM tipo 1 e sim os efeitos centrais de uma hiperglicemia crônica e, tendo em vista que o tempo total de experimentação após a indução do modelo é longo (120 dias), optamos pela utilização da dose de NA de 140 mg/Kg de peso corporal para o restante do trabalho. Com essa dose, o índice de mortalidade é próximo de zero, mesmo durante os 120 dias de experimentação e sem nenhum tipo de tratamento com insulina, o que não seria viável sem o uso da NA.