

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica

**O lipopolissacarídeo altera a comunicação da leptina em hipocampo de ratos
Wistar**

Carollina Fraga Da Ré

Orientadora: Marina Concli Leite

Co-orientadora: Patrícia Sesterheim

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica

**O lipopolissacarídeo altera a comunicação da leptina em hipocampo de ratos
Wistar**

Carollina Fraga Da Ré

Orientadora: Marina Concli Leite

Co-orientadora: Patrícia Sesterheim

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Da Ré, Carollina Fraga

O lipopolissacarídeo altera a comunicação da leptina em hipocampo de ratos Wistar / Carollina Fraga Da Ré. -- 2015.
50 f.

Orientadora: Marina Concli Leite.
Coorientadora: Patrícia Sesterheim.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2015.

1. leptina. 2. neuroinflamação. 3. lipopolissacarídeo. 4. astrócitos. I. Concli Leite, Marina, orient. II. Sesterheim, Patrícia, coorient. III. 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 (1910 – 1997)

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. Obrigada pelo apoio durante todos esses anos de estudo, sem vocês nada disso teria sido possível, vocês são tudo para mim.

Às minhas irmãs queridas Gabriella e Alessandra pela paciência e apoio nos momentos difíceis. Ao meu sobrinho Bernardo pelos momentos de alegria.

À toda a minha família que sempre me estimulou a continuar os estudos e me concedeu estrutura emocional para que conseguisse este feito.

À minha orientadora Marina, pelo conhecimento transmitido durante todos esses anos, pela confiança em mim depositada e pelo incansável auxílio, sem teu apoio esta jornada seria muito mais difícil. Obrigada por tudo.

À minha co-orientadora Patrícia, pela disponibilidade e pelo jeito sempre querida de ser, espero poder ter muitas outras parcerias contigo. Ao professor Carlos Alberto, pelo auxílio durante esta e outras etapas da minha vida acadêmica, quero continuar aprendendo muito contigo.

À Maria, por tudo que me ensinou durante a iniciação científica, pela ajuda durante o mestrado e pelos momentos de carinho e apoio.

À Fafá pelo auxílio e ensinamentos durante o início do mestrado, e pela alegria transmitida e amizade.

Às meninas do Lab 31M: Fezinha, Lili, Jéssica, Jeh e Jaiza pelo auxílio durante esse período, sem vocês esse trabalho não seria possível.

À minha prima/irmã, amiga e colega Dani, por ter me apresentado o mundo da pesquisa e estar sempre disposta a me ajudar e ouvir desabafos.

Ao JP, que abraçou o trabalho de última hora e dividiu comigo momentos de angústia e de alegria.

Às amigas e colegas do Lab 33, obrigada pelas opiniões científicas sempre bem vindas e pelos momentos de descontração que tornam o trabalho muito mais fácil no dia a dia.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fapergs.

À UFRGS e ao PPG-Bioquímica pela oportunidade de ter um ensino de qualidade.

Índice

Agradecimentos	IV
Índice	V
Resumo	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
1. Introdução.....	5
1.1. Neuroinflamação.....	5
1.1.1. Mecanismos moleculares da neuroinflamação	5
1.1.2. Tipos celulares envolvidos na neuroinflamação.....	6
1.1.3. Modelo de neuroinflamação com o uso de LPS	8
1.2. Leptina	9
1.2.1. Sinalização da leptina	9
1.2.2. Leptina na regulação do controle alimentar	11
1.2.3. Leptina na memória e aprendizagem.....	12
1.2.4. Leptina nas doenças neurodegenerativas.....	13
1.2.4.1. Doença de Alzheimer.....	13
1.2.4.2. Doença de Parkinson	14
1.2.5. Leptina na resposta imune	14
1.2.6. Neuroinflamação e leptina.....	15
1.2.6.1. Resistência à leptina.....	16
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Metodologia.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Indução de neuroinflamação por LPS e obtenção das amostras.....	18
3.3. Técnicas Bioquímicas e Imunológicas	19
3.3.1. S100B	19
3.3.2. GFAP.....	20
3.3.3. IL-1 β	21
3.3.4. TNF- α	21
3.3.5. Leptina	22
3.3.6. Imunoconteúdo de ObRb e SOCS3.....	22
3.3.7. Análise estatística	23
4. Resultados.....	24
5. Discussão.....	30

6. Conclusões.....	37
7. Referências	38

Resumo

A neuroinflamação tem sido demonstrada como um fator presente em diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson. O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula constituinte da membrana de bactérias gram-negativas e, após a ligação desta molécula ao receptor TLR4 ocorre a ativação de diversas vias de sinalização as quais aumentam a produção e secreção de moléculas pró-inflamatórias. Devido a sua alta imunotividade o LPS tem sido utilizado em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro*. O LPS também parece ser capaz de modular, através de uma inflamação sistêmica, a resposta da leptina. A leptina é um hormônio peptídico secretado principalmente pelo tecido adiposo, esta adipocina tem sua ação mediada pela ligação ao receptor ObR, o qual quando ativado pode induzir a ativação de diversas vias de sinalização, levando, por exemplo a produção de SOCS3, que age como um fator de regulação negativo da sinalização pelo ObR. A função mais conhecida e estudada da leptina é na regulação do controle alimentar, onde após a ingestão de alimentos a leptina age no hipotálamo sinalizando a sensação saciedade. Entretanto, já há evidências da presença de seu receptor em outras áreas cerebrais, como no hipocampo, onde esta adipocina pode ter um papel na regulação da memória e aprendizagem. Além disso, também tem sido implicada como neuroprotetora em doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, sendo a leptina capaz de melhorar tanto aspectos moleculares quanto comportamentais destas patologias. A leptina tem se mostrado importante na regulação da resposta imune, podendo servir como uma molécula de sinalização de uma inflamação sistêmica para o cérebro. A neuroinflamação tem sido implicada como um dos fatores que podem levar a resistência à leptina no hipotálamo. Tendo este hormônio ações distintas entre os tecidos, nós investigamos como a neuroinflamação induzida por injeção ICV de LPS poderia modular a resposta à leptina no hipocampo. Além disso, foram avaliados parâmetros inflamatórios centrais e periféricos e também a resposta astrocítica à neuroinflamação pela dosagem de proteínas características desse tipo celular, todos os parâmetros foram analisados após 48 horas da indução do modelo. Nosso estudo não encontrou diferença no imunocontéudo da leptina no hipocampo, porém houve um aumento no conteúdo proteico do receptor ObR neste tecido nos ratos tratados e não ocorreu alteração significativa nos níveis intracelulares de SOCS3. Nós encontramos uma diminuição nos níveis séricos de leptina e da proteína S100B nos ratos do grupo LPS. A expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α foram alterados no hipocampo após a injeção ICV de LPS, tendo um aumento nos níveis intracelulares de IL-1 β e uma diminuição de TNF- α . A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) teve um aumento em seu imunocontéudo no hipocampo dos ratos tratados, em contrapartida os níveis de S100B intracelulares não foram alterados significativamente. Os níveis séricos de TNF- α tiveram um aumento em resposta à neuroinflamação induzida, além disso, os ratos que receberam injeção ICV de LPS mostraram uma maior perda de peso em relação aos ratos que receberam apenas veículo. Nossos dados mostram que a neuroinflamação é capaz de modular a resposta hipocampal e periférica de leptina, colaborando assim para uma melhor compreensão do papel da sinalização por leptina na neuroinflamação e possivelmente nas doenças neurodegenerativas.

Abstract

Neuroinflammation has been established as a factor present in various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. LPS is a constituent molecule of the membrane of gram-negative bacteria and, after binding of this molecule in the TLR4 occurs activation of several signaling pathways which increase the production and secretion of pro-inflammatory molecules, due to their high immunoactivity LPS has been used in models of inflammation in vivo and in vitro. LPS also seems to be able to modulate, through a systemic inflammation, the response of leptin. Leptin is a peptide hormone secreted mainly by the adipose tissue, that adipokine has its action mediated by binding to the ObRb receptor which when activated can induce activation of several signaling pathways, leading to, for example, production of SOCS3 which acts as a negative feedback on ObRb. The most studied and known function of leptin is in the regulation of food control, where after the food intake leptin signaling in the hypothalamus acts feeling of hunger. However, there is evidence of the presence of its receptor in other brain regions such as hippocampus, where this may adipokine play a role in the regulation of memory and learning. Furthermore, as has also been implicated as neuroprotective in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, and leptin can improve both molecular and behavioral aspects of these diseases. Leptin has been shown to be important in regulating the immune response, may serve as a signaling molecule to a systemic inflammation of the brain. The neuroinflammation has been implicated as a factor that can lead to leptin resistance in the hypothalamus. As this hormone have distinct actions between tissues, we investigated as a neuroinflammation induced by ICV injection of LPS could modulate the response to leptin in the hippocampus. In addition, we assessed the central and peripheral inflammatory parameters, and also the astrocytic response to neuroinflammation by measuring protein characteristics of this cell type, all parameters were analyzed after 48 hours of induction model. Our study found no difference in leptin immunocontent in the hippocampus, but there was an increase in the protein content of the ObR receptor in this tissue in the treated rats and no significant change in intracellular levels of SOCS3. We found a decrease in serum leptin and S100B protein in rats of LPS group. Protein expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α were changed in the hippocampus after ICV injection of LPS, with an increase in intracellular levels of IL-1 β and TNF- α decreased. GFAP had an increase in their immunocontent in hippocampus of rats treated, in contrast to the intracellular S100B levels were not significantly altered. The TNF- α serum levels were increased in response to induced neuroinflammation, in addition, rats receiving ICV injection of LPS showed greater weight loss compared to rats receiving vehicle only. Our data demonstrate that neuroinflammation is capable of modulating hippocampal and peripheral leptin response, thus contributing to a better understanding of the role of leptin signaling in the neuroinflammation and possibly in the neurodegenerative diseases.

Lista de Abreviaturas

AMPK – proteína cinase ativada por AMP

AP-1 – ativador de proteína 1

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – barreira hematoencefálica

COX-2 – ciclooxigenase 2

ERK – sinal extracelular regulado por cinase

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

HBSS – *Hank's balanced salt solution*

ICV – intracerebroventricular

IKK β – cinase de IK β

IL – interleucina

IMC – índice de massa corporal

JAK2 – janus cinase 2

LPS – lipopolissacarídeo

LTD – depressão de longa duração

LTP – potencial de longa duração

NF- κ B – fator nuclear B

NPY – neuropeptídeo Y

ObR – receptor de leptina

PI3K – fosfatidinositol cinase 3

POMC – proopiomelanocortina

PRR – receptor de reconhecimento de padrões

RAGE – receptor para produtos de glicação avançada

RNA – ácido ribonucleico

SHP2 – proteína tirosina fosfatase 2

SNC – sistema nervoso central

SOCS3 – supressor de sinalização de citocina 3

STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição

TLR – receptor *toll-like*

TNF- α – fator de necrose tumoral α

1. Introdução

1.1. Neuroinflamação

A inflamação é caracterizada por uma resposta de defesa do corpo que o protege contra insultos e repara o dano tecidual causado por estes. Desta maneira, as células, em resposta à situação de injúria, alteram a expressão e liberação de moléculas, como citocinas e quimiocinas que servirão como mediadores nesta resposta inflamatória (Medzhitov, 2008). Tradicionalmente acreditava-se que o Sistema Nervoso Central (SNC) era um local imunologicamente privilegiado devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE) e a ausência de vasos linfáticos, o que protegeria de uma infiltração de células imunitárias e, conseqüentemente, de uma resposta inflamatória. Entretanto, nos últimos anos, tem sido demonstrada a presença de uma resposta imune cerebral em resposta a algum estímulo nocivo, tanto por uma reação das células gliais residentes neste órgão, como pela presença de células imunológicas periféricas, as quais têm seu acesso ao SNC após algum dano na BHE (Ransohoff e Brown, 2012).

A neuroinflamação ocorre através de mecanismos moleculares e celulares em resposta a algum tipo de injúria ou infecção com o intuito de conter o dano e auxiliar no reparo da área atingida. Porém, a inflamação pode ocorrer de uma forma desregulada, devido à persistência de estímulo inflamatório ou falha nos mecanismos de resolução, resultando na produção de fatores neurotóxicos. Deste modo, a neuroinflamação tem sido demonstrada como um fator presente em diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson (Glass *et al.*, 2010).

1.1.1. Mecanismos moleculares da neuroinflamação

A resposta inflamatória é normalmente iniciada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), nos quais se ligam os chamados padrões moleculares associados a

patógenos. Os receptores *Toll-like* (TLR) são a maior e mais estudada família de PRRs, esses receptores reconhecem diversos tipos de moléculas associadas a patógenos e estranhas ao organismo. Os TLRs estão presentes em diversos tipos celulares, sendo altamente expressos em células envolvidas na resposta imune, como macrófagos e microglia (Glass *et al.*, 2010). A ligação de moléculas aos TLRs leva à indução de uma cascata de sinalização intracelular, causando a ativação de uma série de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas e enzimas (Fekonja, Avbelj e Jerala, 2012).

Algumas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e a IL-11, levam à ativação de diversas vias de sinalização, entre elas pode-se citar a via de transcrição do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3). Esta molécula tem como principal papel intracelular a inibição da atividade do receptor de citocinas, agindo como um regulador negativo na resposta imune celular (Carow e Rottenberg, 2014).

1.1.2. Tipos celulares envolvidos na neuroinflamação

A microglia é o primeiro tipo celular a responder em uma situação nociva no SNC, sendo conhecida como um macrófago especializado. Sabe-se que quando estas células não estão ativadas podem ter um papel na neurogênese (Sierra *et al.*, 2010) e neuroproteção (Vinet *et al.*, 2012). Entretanto, a principal função da microglia no SNC é na resposta imune inata, onde, em resposta a algum dano, estas células são recrutadas e atuam fagocitando patógenos ou restos celulares e também liberando citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 e IL-6, além de quimiocinas (Shastri, Bonifati e Kishore, 2013).

Os astrócitos são células gliais do SNC os quais são 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 (Wang e Bordey, 2008). Dentre as funções conhecidas destas células pode-se citar: promoção da maturação neuronal, formação de sinapses (Christopherson *et al.*, 2005), regulação da angiogênese (Lattera e Goldstein, 1991), indução e manutenção da BHE (Abbott, Rönnbäck e Hansson, 2006), metabolismo e captação de neurotransmissores (GABA e glutamato) (Allaman *et al.*, 2011), entre outras. 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 (Hamby e Sofroniew, 2010).

A astrogliose é uma resposta não homogênea e finamente graduada que varia com o tipo, duração e gravidade do insulto (Sofroniew e Vinters, 2010). Durante este processo ocorre a alteração de proteínas de citoesqueleto como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que é uma proteína característica de astrócitos, a qual tem um aumento em sua expressão durante situações de injúria (Pekny e 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 (Goncalves, Leite e Nardin, 2008).

Deste modo, 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 receptor de 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 (Glass *et al.*, 2010).

1.1.3. Modelo de neuroinflamação com o uso de LPS

O LPS é uma molécula constituinte da membrana de bactérias gram-negativas, sendo uma endotoxina bacteriana. Este composto é o padrão molecular de resposta a patógenos responsável pela sinalização de defesa imune do hospedeiro contra uma infecção por bactérias gram-negativas. A molécula de LPS é composta por três domínios distintos: Lipídeo A (domínio lipídico), 2-ceto-3-ácido deoxioctônico (domínio de oligossacarídeo) e Antígeno O (domínio de cadeia lateral de polissacarídeo). O Lipídeo A é o componente bioativo tóxico que é reconhecido pelo organismo na resposta imune (Leon *et al.*, 2008).

O LPS tem sua ação mediada através da ligação ao receptor TLR4, o qual pertence à família de receptores TLRs discutidos anteriormente. Após sua ligação ao receptor o LPS estimula a expressão de genes envolvidos na produção de moléculas inflamatórias, como citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas e a enzima COX-2 (Lu, Yeh e Ohashi, 2008). Essa ação ocorre principalmente em células envolvidas na resposta imune, como os macrófagos nos tecidos periféricos, a microglia e os astrócitos no SNC, onde já foi visto que o LPS estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (Quan, Sundar e Weiss, 1994).

Devido a sua alta imunotividade, o LPS tem sido utilizado em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro*, tanto em estudos periféricos como centrais. Em um estudo do nosso grupo, por exemplo, o LPS foi capaz de aumentar a concentração da proteína S100B no líquor e no soro de ratos tratados com injeção intracerebroventricular desta toxina (Guerra *et al.*, 2011). Além disso, o LPS foi capaz de modular a secreção de S100B e o conteúdo de GFAP em cultura primária de astrócitos (Guerra *et al.*, 2011). O

LPS também parece modular, através de uma inflamação sistêmica induzida por injeção intraperitoneal, a resposta da leptina em roedores (Grunfeld *et al.*, 1996; Rummel *et al.*, 2010).

1.2. Leptina

A leptina é um hormônio peptídico de 16 kDa com uma estrutura terciária semelhante a dos membros da família de citocinas de cadeia longa (Zhang *et al.*, 1994). Esse hormônio é produzido e secretado principalmente pelo tecido adiposo na proporção da quantidade de ácidos graxos estocada, podendo servir como um sinal de adiposidade (Frederich *et al.*, 1995). Após sua liberação a leptina entra no SNC passando pela BHE por um transporte regulado e saturável (Banks *et al.*, 1996).

Os níveis circulantes de leptina podem ser regulados por diversos hormônios, como insulina, glicocorticoides e a própria leptina. Além disso, estes níveis variam de acordo com a ingestão alimentar, estando menores durante o jejum e maiores após uma refeição (Park e Ahima, 2014).

1.2.1. Sinalização da leptina

A leptina tem sua ação mediada por receptores transmembrana que pertencem à família de receptores de classe I de citocinas (Frühbeck, 2006). O gene para a produção do receptor de leptina (ObR) contém *splices* para seis isoformas diferentes (a – f), sendo cinco delas consideradas isoformas curtas (ObRa, ObRc – ObRf) e 1 isoforma de cadeia longa (ObRb). As isoformas ObRa – ObRd e ObRf são idênticas em seus domínios extracelular e transmembrana diferenciando-se apenas no domínio intracelular (Tartaglia *et al.*, 1995). Já a isoforma ObRe é a forma solúvel do receptor, e tem sido proposta como um regulador da quantidade de leptina circulante disponível e não atuando diretamente na sua sinalização (Huang, Wang e Li, 2001). A isoforma ObRa tem demonstrado importância na passagem da leptina através da BHE, e a isoforma de

cadeia longa ObRb sabe-se atualmente ser a responsável pela sinalização intracelular (Peelman *et al.*, 2014).

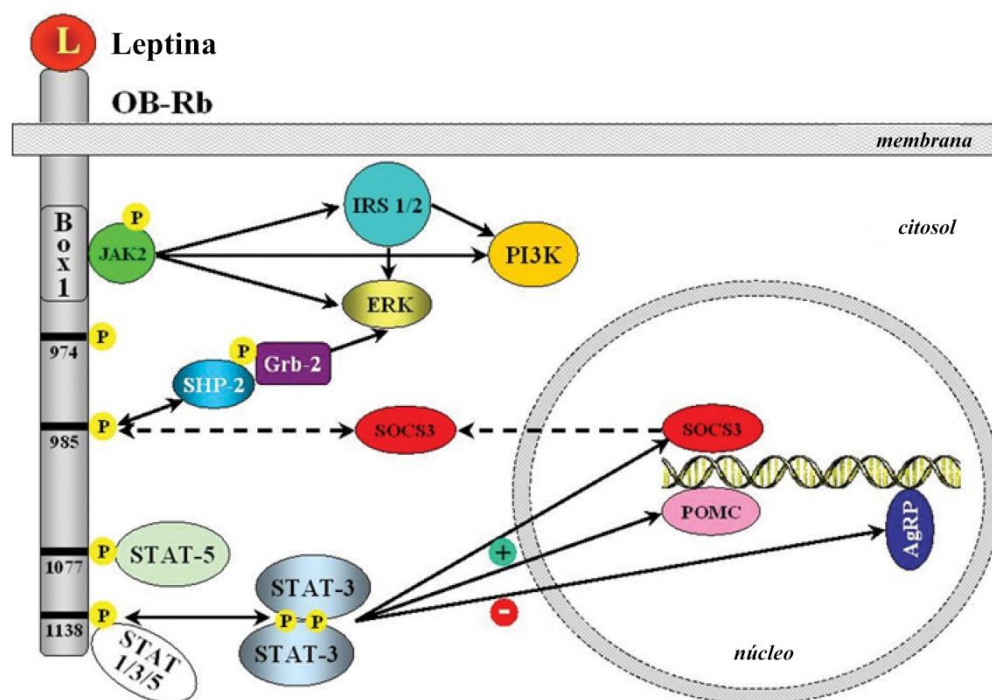


Figura 1. Vias de sinalização ativadas pela leptina (Adaptado de Frühbeck, 2006). AgRP – proteína relacionada ao Agouti; ERK – cinase regulada por sinal extracelular; Grb-2 – fator de crescimento receptor-proteína 2; IRS – substrato receptor de insulina; JAK – janus cinase; ObRb – receptor de leptina de isoforma longa; PI3K – fosfatidilinositol cinase 3; POMC – proopiomelanocortina; SOCS3 – supressor de sinalização de citocina 3; SH2 – proteína fosfatase 2; STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição.

A ligação da leptina a seu receptor ObRb resulta na ativação de diversas vias de sinalização (Figura 1). A fosforilação do resíduo de tirosina 1138 (Tyr₁₁₃₈) no receptor ObRb leva ao recrutamento do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) ao receptor, permitindo a sua fosforilação (pSTAT3) e ativação por janus cinase 2 (JAK2). O pSTAT3 ativado se transloca para o núcleo onde modula a expressão de diversos genes, incluindo gene de produção de SOCS3, que por sua vez age inibindo a sinalização do ObRb (Banks *et al.*, 2000; Allison e Myers, 2014). Por sua vez, a fosforilação do resíduo Tyr₉₈₅ do ObRb recruta a proteína tirosina fosfatase 2 (SHP2) ao

receptor, contribuindo para a ativação da via de sinalização ERK (Bjørbaek *et al.*, 2001). Além disso, a Tyr₁₀₇₇, quando fosforilada, promove o recrutamento e ativação de STAT5, o qual também pode ser ativado pela fosforilação da Tyr₁₁₃₈ (Gong *et al.*, 2007).

No SNC o ObRb está principalmente presente no hipotálamo onde este hormônio tem um papel importante na regulação da homeostase energética (Park e Ahima, 2014). Por outro lado, já se tem evidências da presença desse receptor em outras áreas do cérebro, como no hipocampo, onde a leptina tem se mostrado importante nos processo de aprendizagem e memória (Irving e Harvey, 2014).

1.2.2. Leptina na regulação do controle alimentar

A ação mais conhecida e melhor estudada da leptina é na regulação da homeostase energética, onde em resposta a ingestão de alimentos este hormônio age diretamente no hipotálamo inibindo a ingestão alimentar assim como estimula o gasto energético aumentando a termogênese (Friedman e Halaas, 1998).

A regulação da ingestão alimentar é feita no hipotálamo, onde diversos fatores de origem central e periférica interagem entre si. Esse controle da homeostase energética abrange diversos peptídeos anorexígenos e orexígenos, os quais são responsáveis pelos sinais de saciedade e fome, respectivamente. Esta regulação é mediada principalmente pela atuação de dois tipos neuronais presentes no hipotálamo, mais precisamente no núcleo arqueado, os neurônios produtores de neuropeptídeo Y (NPY) e os neurônios produtores de proopiomelanocortina (POMC), tendo estes dois tipos neuronais papéis opostos no controle da ingestão alimentar (Keen-Rhinehart, Ondek e Schneider, 2013).

A leptina pode atuar sobre os neurônios NPY e POMC em diferentes níveis, ativando os neurônios POMC, os quais passam a expressar e liberar moléculas que sinalizam a sensação de saciedade (Mizuno e Mobbs, 1999; Cowley *et al.*, 2001) e

diminuindo a atividade dos neurônios NPY, os quais são responsáveis pela sinalização de fome (Mizuno *et al.*, 1998; Mizuno e Mobbs, 1999). Deste modo, a estimulação por leptina leva a uma consequente redução na ingestão alimentar.

Apesar deste efeito central da leptina sobre a redução da ingestão alimentar, em indivíduos obesos os níveis circulantes deste hormônio encontram-se aumentados, demonstrando uma situação de resistência central à leptina (Zhou e Rui, 2013). Esta diminuição na sensibilidade hipotalâmica à leptina em obesos tem sido proposta como resultado de uma saturação no sistema de transporte deste hormônio através da BHE e também a aumento da sinalização JAK2/STAT3/SOCS3 levando a dessensibilização do receptor (Levin, Dunn-Meynell e Banks, 2004; Münzberg *et al.*, 2005). Alguns estudos tem proposto que esta resistência também poderia ser causada por uma inflamação hipotalâmica presente nestes indivíduos (Zhou e Rui, 2013).

1.2.3. Leptina na memória e aprendizagem

Além do papel essencial na regulação do controle alimentar, a leptina tem demonstrado ser um fator importante nos processos de aprendizagem e memória no hipocampo (Irving e Harvey, 2014). Assim como no hipotálamo, a expressão proteica e gênica do receptor ObRb no hipocampo é alta, e há estudos mostrando que esta expressão é alta principalmente nas sinapses hipocampais (Shanley *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que a leptina pode modular a função sináptica excitatória no hipocampo (Durakoglugil, Irving e Harvey, 2005; Oomura *et al.*, 2006; Moulton *et al.*, 2010). De fato, roedores insensíveis à leptina (ratos Zucker *fa/fa* e camundongos *db/db*) apresentam déficits no potencial de longa duração (LTP) e na depressão de longa duração (LTD) hipocampais, assim como na memória espacial (Li *et al.*, 2002; Winocur *et al.*, 2005). Em fatias hipocampais de ratos a exposição à leptina levou a um aumento na capacidade de conversão de potencial de curta duração em LTP,

o que demonstra um aumento na capacidade de formação de memória (Shanley, Irving e Harvey, 2001). Além disso, a administração direta de leptina no hipocampo de roedores melhorou a performance destes em diversos testes de memória (Wayner *et al.*, 2004).

Os efeitos da leptina sobre a atividade sináptica podem ser atribuídos a sua capacidade em promover rápidas alterações no tráfego de receptores de glutamato levando à melhora das sinapses excitatórias no hipocampo. Entretanto, ao longo do envelhecimento, estes efeitos têm demonstrado uma diminuição, e os mecanismos relacionados a esta redução ainda não estão claros (Irving e Harvey, 2014).

1.2.4. Leptina nas doenças neurodegenerativas

1.2.4.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é caracterizada por uma perda da função cognitiva e pelo acúmulo e deposição extracelular de β -amiloide, sob a forma de placas proteicas. Outras características dessa doença incluem as alterações neurofibrilares, as quais resultam da hiperfosforilação da proteína tau que forma emaranhados, perturba a função dos microtúbulos e leva à ruptura dendrítica e perda sináptica entre outros fatores. O risco para desenvolver a doença de Alzheimer aumenta com a idade, porém a causa subjacente ainda é desconhecida (Ashford *et al.*, 1998). Alguns estudos já correlacionaram baixos níveis circulantes de leptina com maior risco de desenvolver a doença de Alzheimer (Holden *et al.*, 2009; Lieb *et al.*, 2009). 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 *et al.*, 2009).

Em modelos animais de doença de Alzheimer o tratamento com leptina se mostrou capaz de diminuir a deposição de β -amiloide e a fosforilação da proteína tau, sendo

capaz de melhorar a memória nestes animais (Greco *et al.*, 2010). Em estudos *in vitro* a leptina também se mostrou protetora em modelos celulares de doença de Alzheimer. Por exemplo, em neuroblastomas com aumento induzido de fosforilação de proteína tau a leptina diminuiu esta fosforilação. Após incubação destas células com β -amiloide, esta adipocina foi capaz de diminuir os níveis extracelulares deste peptídeo, de maneira dose e tempo dependentes (Greco *et al.*, 2009). O efeito sobre a proteína tau pode ser atribuído à sinalização da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (Greco *et al.*, 2009), enquanto que a diminuição de β -amiloide seria através da inibição da β -secretase (Wang *et al.*, 2013; Davis, Mudd e Hawkins, 2014).

1.2.4.2. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é caracterizada por uma perda da função motora e uma diminuição significativa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra através de um mecanismo desconhecido (Cai, Shuraih e Nagueh, 2012). Em modelos *in vitro* de Parkinson, a leptina promoveu a diminuição da morte neuronal (Lu *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2010), através da sinalização por fosfatidinositol cinase 3 (PI3K) e consequente ativação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Signore *et al.*, 2008). A leptina também se mostrou capaz de melhorar o comportamento motor em animais com doença de Parkinson induzida por exposição à neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (Davis, Mudd e Hawkins, 2014).

1.2.5. Leptina na resposta imune

Tem sido demonstrado nos últimos anos que a leptina exerce um papel importante na modulação do sistema imune. De fato, algumas células imunes expressam o receptor de leptina, como as células T (Lord *et al.*, 1998), macrófagos (Loffreda *et al.*, 1998) e neutrófilos (Moore *et al.*, 2003), sendo que a leptina se mostrou capaz de modular diretamente suas funções (La Cava e Matarese, 2004).

Este hormônio é capaz de modular a indução de citocinas e melhorar a sobrevivência durante a sepse (La Cava e Matarese, 2004; Aguilar-Valles *et al.*, 2012). Por exemplo, camundongos deficientes de leptina tiveram maior mortalidade e maiores danos teciduais em um modelo de indução de sepse. O tratamento com leptina diminuiu a mortalidade e foi capaz de modular a secreção de citocinas (Tschöp *et al.*, 2010). Além disso, camundongos com obesidade induzida por dieta e níveis aumentados de leptina tiveram uma melhor taxa de sobrevivência em resposta à indução de sepse. Neste mesmo estudo, o tratamento com leptina em camundongos sépticos com peso normal levou a uma redução na resposta de citocinas pró-inflamatórias e estabilização da temperatura corporal resultando em melhora na sobrevivência (Siegl *et al.*, 2014).

Alguns estudos mostram um aumento dos níveis circulantes de leptina em resposta à indução de inflamação sistêmica por LPS ou citocinas (IL-1 β e TNF- α) em roedores e primatas (Berkowitz *et al.*, 1998; Faggioni *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 1999; Landman *et al.*, 2003). Este hormônio tem sido proposto como um fator importante na anorexia e na febre induzidas por LPS (Sachot, Poole e Luheshi, 2004).

1.2.6. Neuroinflamação e leptina

A leptina tem sido proposta como um sinal de interação entre uma resposta inflamatória sistêmica e o cérebro. A indução de inflamação periférica com LPS é capaz de aumentar os níveis de RNAm para leptina no tecido adiposo e seus níveis circulantes em roedores (Grunfeld *et al.*, 1996). Por sua vez, como resultado deste aumento, esta adipocina pode levar a maior permeabilidade da BHE através da modulação de células endoteliais. Este efeito da leptina parece ser mediado através da ativação de STAT3 nestas células (Rummel *et al.*, 2008).

O recrutamento e a entrada de neutrófilos no SNC em resposta à inflamação sistêmica é modulado pela ação da leptina. Este efeito é mediado através da ativação do

receptor ObRb, demonstrando uma ação indireta sobre os neutrófilos, que por sua vez apresentam apenas receptores de isoforma curta (Rummel *et al.*, 2010). A leptina já se mostrou capaz de aumentar os níveis de IL-1 β pela microglia, o que conseqüentemente levaria a um aumento no recrutamento de neutrófilos para o cérebro (Lafrance *et al.*, 2010).

Dessa forma, a leptina, em resposta à inflamação periférica, induz o aumento da permeabilidade da BHE, a infiltração de neutrófilos no SNC e o aumento de produção de citocinas pela microglia, podendo levar a uma resposta neuroinflamatória.

1.2.6.1. Resistência à leptina

A neuroinflamação tem sido proposta como um dos mecanismos que levam à resistência hipotalâmica à leptina durante a obesidade. Já foi demonstrado aumento na sinalização inflamatória no hipotálamo em resposta a alimentação com altos níveis de gordura (Thaler *et al.*, 2012). Esta resposta inflamatória ocorre através de mudanças na expressão e atividade de diversos mediadores do sistema imune, como o TLR4, I κ B cinase- β (IKK β) / NF- κ B, SOCS3 e citocinas pró-inflamatórias (De Git e Adan, 2015).

A ativação de TLR4 por ácidos graxos levou a uma resistência hipotalâmica à leptina em camundongos (Kleinridders *et al.*, 2009) e este receptor pode ativar a sinalização de IKK β /NF- κ B (De Git e Adan, 2015). Estudos já demonstraram que esta ativação leva à diminuição na resposta celular hipotalâmica da leptina através do aumento da expressão de SOCS3 (Zhang *et al.*, 2008). Então, uma resposta inflamatória central induzida pela ativação de TLR4 pode levar à resistência à leptina no hipotálamo.

A leptina tem ações distintas nos diferentes tecidos, porém ainda não existem estudos mostrando como uma inflamação central poderia interferir na resposta desta adipocina no hipocampo, assim como em seus níveis séricos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da neuroinflamação induzida por LPS sobre a via de sinalização da leptina em hipocampo de ratos Wistar adultos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da neuroinflamação induzida por LPS sobre:

- concentração sérica e hipocampal de leptina;
- imunoconteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização da leptina (ObR e SOCS3);
- parâmetros de função astrocitária hipocampal, utilizando a avaliação da concentração de S100B e GFAP;
- parâmetros inflamatórios centrais e periféricos, através da medida da concentração sérica e hipocampal de citocinas inflamatórias.

3. Metodologia

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 dias de idade (peso: 250 g – 300 g) provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica, sendo necessários 5 a 8 animais por grupo experimental. Desde o nascimento até a eutanásia os ratos foram mantidos em ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, à temperatura constante de 22°C ± 1°C com acesso a alimento e água *ad libitum*. Os animais foram alojados em caixas de propileno (41 x34 x 16 cm), com distribuição de 4 ratos por caixa, as quais foram limpas e trocadas 3 vezes por semana. A manipulação e tratamento dos animais respeitaram todas as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Indução de neuroinflamação por LPS e obtenção das amostras

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Sham e LPS. No dia da indução do modelo, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina (0,9 e 0,6 ml / Kg de peso, respectivamente) administrada via intraperitoneal seguida pelo posicionamento do animal no aparelho estereotáxico. O LPS ou o veículo foram administrados via intracerebroventricular. O acesso aos ventrículos laterais foi feito de acordo com as coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma, 1,5 mm lateral da linha sagital, 3,6 mm abaixo da superfície do cérebro (Tramontina *et al.*, 2011). Os ratos receberam uma infusão única bilateral de forma lenta, com o uso de uma agulha de injeção conectada a um tubo de polietileno ligado a uma seringa Hamilton. No grupo LPS foi injetado 50 µg de LPS (Sigma, cat: L4391) diluído em 10 µl de veículo (*Hank's balanced salt solution* – HBSS) e no grupo Sham 10 µl de veículo (Tyagi *et al.*, 2008).

Após 48 horas do final da infusão de LPS ou veículo os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina/xilazina para a retirada de sangue por punção intracardíaca e, em seguida, os animais foram decapitados para dissecação do hipocampo. As amostras de sangue ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos para a coagulação e, após, foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do soro, o qual foi separado e armazenado em freezer -20°C até as análises posteriores. O hipocampo foi fatiado a 300 µm em chopper McIlwain e as fatias foram então separadas e armazenadas em freezer -80°C até que fossem processadas conforme o procedimento para cada análise.

3.3. Técnicas Bioquímicas e Imunológicas

3.3.1. S100B

A medida do imunoconteúdo de S100B nas fatias hipocampais e no soro foi feita através de técnica de ELISA com dois tipos de protocolos diferentes como descrito anteriormente (Leite *et al.*, 2008). As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão de lise (PBS contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de EGTA) com a ajuda de uma seringa de insulina e após, separadas em alíquotas para diluição em PBS contendo 0,2% de ovoalbumina, enquanto que as amostras de soro não sofreram processamento, e foram apenas diluídas na mesma solução. A medida de quantidade de proteínas foi feita nas fatias hipocampais através de técnica de Lowry (Peterson, 1977).

A concentração de S100B das amostras de soro foi mensurada através da utilização do protocolo de maior sensibilidade, sendo a curva padrão diluída também em PBS contendo 2% de ovoalbumina e abrangendo concentrações de 0,001 a 1 ng/mL. A placa foi inicialmente coberta com anticorpo monoclonal anti-S100B (1:1000 em tampão carbonato (Sigma) e, após 12 horas, a placa foi lavada com solução de lavagem (PBS contendo 0,1% de ovoalbumina e 0,005 % de Twen20) e bloqueada com PBS contendo

2% de ovoalbumina durante 2 horas. Após, a placa foi lavada e, então, as amostras previamente diluídas ou a curva padrão foram incubadas juntamente com tampão Tris 50 mM durante 2 horas à temperatura de 37°C. Em seguida, a placa foi lavada, o anticorpo policlonal anti-S100 (1:5000) foi incubado durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Após, a placa foi novamente lavada e incubada durante 30 minutos com o anticorpo anti-rabbit conjugado à peroxidase. A reação de cor foi feita pela incubação de o-fenilenediamina e, após 30 minutos, a reação foi parada com ácido clorídrico (3 M) e a coloração foi então medida em 492 nm. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,5% de ovoalbumina. Os resultados foram expressos em ng de S100B / mL de soro.

A medida de S100B das amostras de fatias hipocâmpais foi feita pela utilização de um protocolo com menor sensibilidade, sendo a curva padrão diluída da mesma maneira do que no protocolo com maior sensibilidade, porém, abrangendo concentrações entre 0,01 e 10 ng/mL. Além disso, o protocolo é feito basicamente com os mesmos procedimentos descritos anteriormente, diferenciando apenas na incubação dos anticorpos policlonal anti-S100 e o anti-rabbit conjugado à peroxidase os quais foram diluídos juntos em mesma solução e incubados durante 1 hora à temperatura de 37°C. Os resultados foram expressos em ng de S100B / mg de proteína.

3.3.2. GFAP

A medida do imunocônteuído de GFAP foi feita através de técnica de ELISA como descrito anteriormente (Tramontina *et al.*, 2007). As amostras de fatias hipocâmpais para este procedimento foram homogeneizadas em tampão de lise (PBS contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de EGTA) com o auxílio de uma seringa de insulina e diluídas em tampão Tris para análise posterior. Inicialmente, a placa foi incubada com as amostras ou a curva padrão (com concentrações entre 0,1 e 10 ng/mL) juntamente com albumina

1 ng/ μ l durante 24 horas a 4°C. A placa foi então lavada e bloqueada com TBS, contendo 5% de leite em pó desnatado durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, a placa foi lavada e, então, incubada com anticorpo policlonal anti-GFAP durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida o anticorpo anti-rabbit conjugado à peroxidase foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente. Após, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o-fenilenediamina para a reação colorimétrica. Após 30 minutos, a reação foi parada com ácido clorídrico (3 M) e a leitura da absorbância foi realizada em 492 nm. A medida de quantidade de proteínas nas fatias hipocâmpais foi feita através de técnica de Lowry (Peterson, 1977). Os resultados foram expressos em ng de GFAP / μ g de proteína.

3.3.3. IL-1 β

A medida da concentração da citocina IL-1 β foi feita através de técnica de ELISA com a utilização de kit comercial da e-Bioscience (cat: 88-6010-22). As amostras de fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em diluente proveniente do kit com a ajuda de uma seringa de insulina e após, foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, sendo utilizado o sobrenadante para a técnica de ELISA e para a medida de quantidade de proteínas através de técnica de Lowry (Peterson, 1977). O procedimento foi realizado conforme a indicação do fabricante. Os resultados foram expressos em pg de IL-1 β / mg de proteína.

3.3.4. TNF- α

O conteúdo de TNF- α nas fatias hipocâmpais e no soro foi feito por técnica de ELISA com a utilização de kit comercial da Peprotech (cat: 900-M54). As amostras de fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em diluente indicado pelo fabricante com a ajuda de uma seringa de insulina e após, foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a técnica de ELISA e para a medida da

quantidade de proteínas através de técnica de Lowry (Peterson, 1977). As amostras de soro não sofreram processamento. A técnica de ELISA foi, então, feita conforme a indicação do fabricante. Os resultados foram expressos em pg de TNF- α / mg de proteína para as amostras de hipocampo e em pg TNF- α / mL de soro para as amostras de soro.

3.3.5. Leptina

A quantidade de leptina nas fatias hipocampais e no soro foi medida através de técnica de ELISA com a utilização de kit comercial da Sigma (cat: RAB0335). As amostras de fatias hipocampais foram homogeneizadas em diluente proveniente do kit com a ajuda de uma seringa de insulina e após, foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, com o sobrenadante foi feita a mensuração da leptina pela técnica de ELISA e a medida da quantidade de proteínas através de técnica de Lowry (Peterson, 1977). As amostras de soro não sofreram processamento. O procedimento foi feito, então, conforme a indicação do fabricante. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, equivalendo a (absorbância - branco)/concentração de proteínas para as amostras de hipocampo e absorbância - branco para as amostras de soro.

3.3.6. Imunoconteúdo de ObRb e SOCS3

O imunoconteúdo de ObRb e SOCS3 foi medido através de técnica de Western blot. As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em Stopping Solution A (*SDS Stopping Solution 4%*) com o auxílio de uma seringa de insulina e em seguida submetidas à desnaturação térmica (100°C por 5 minutos). As amostras foram centrifugadas (10000 g por 5 minutos a 4°C) e do sobrenadante foi dosada a quantidade de proteína através de método de Lowry e adicionado Stopping solution B (*Glycerol Sample Dilution Solution 40%*) contendo 5% de mercaptoetanol. Em seguida, foi feita a separação das proteínas com eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sendo

aplicados 30 µg de proteína por amostra, e utilizando voltagem de 180 V durante 1 h. Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando amperagem de 1,2 mA / área de membrana durante 1 hora.

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, as membranas foram bloqueadas com albumina bovina 2% diluída em TBS contendo 0,005% de Tween 20 (T-TBS) durante 1 h à 4°C sob agitação leve, a fim de evitar ligações inespecíficas. Os anticorpos foram incubados conforme tabela abaixo:

Proteína	Anticorpo primário (diluição / tempo)	Anticorpo secundário (tipo / diluição / tempo)
ObR	1:5000 / 12 h	Anti-cabra / 1:10000 / 1 h
SOCS3	1:1000 / 12 h	Anti-coelho / 1:10000 / 1 h

Todos os anticorpos foram incubados a 4°C sob agitação leve e entre cada uma das incubações as membranas foram lavadas com T-TBS sob agitação leve. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram novamente lavadas com T-TBS e, foi feita uma última lavagem de 10 minutos com TBS sob agitação leve. Ao final do procedimento as membranas foram expostas à ECL e foi feita a detecção com o uso de fotodocumentador (GE Healthcare Life Sciences) durante 10 minutos de exposição. As imagens obtidas foram quantificadas utilizando o software Image J.

3.3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software SPSS versão 20.0, foi utilizado o teste T para a avaliação de todos os resultados e considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4. Resultados

Efeito do LPS sobre o imunoconteúdo de leptina, ObR e SOCS3 no hipocampo

Nós avaliamos o efeito de uma injeção intracerebroventricular (ICV) única de LPS sobre o imunoconteúdo de leptina no hipocampo após 48 h. Os ratos que receberam a injeção ICV de LPS não tiveram diferença significativa nos níveis intracelulares de leptina no hipocampo em relação aos ratos Sham (Figura 2A).

A expressão proteica do receptor de isoforma longa de leptina (ObRb) e do fator inibitório SOCS3 foi mensurada a fim de se avaliar se o LPS pode modular a sinalização desta adipocina no hipocampo. Pode-se observar um imunoconteúdo significativamente maior de ObRb no hipocampo dos ratos que receberam injeção de ICV de LPS em comparação aos ratos que receberam apenas veículo (Figura 2B), enquanto que a expressão proteica de SOCS3 não foi alterada no tecido hipocampal destes ratos (Figura 2C).

Efeito do LPS sobre os níveis séricos de leptina e S100B

Os níveis séricos do hormônio leptina se mostraram significativamente diminuídos após 48 horas da indução de neuroinflamação por injeção ICV de LPS (Figura 3A). Além disso, os ratos do grupo LPS apresentaram também níveis da proteína S100B no soro menores do que os ratos do grupo Sham (Figura 3B).

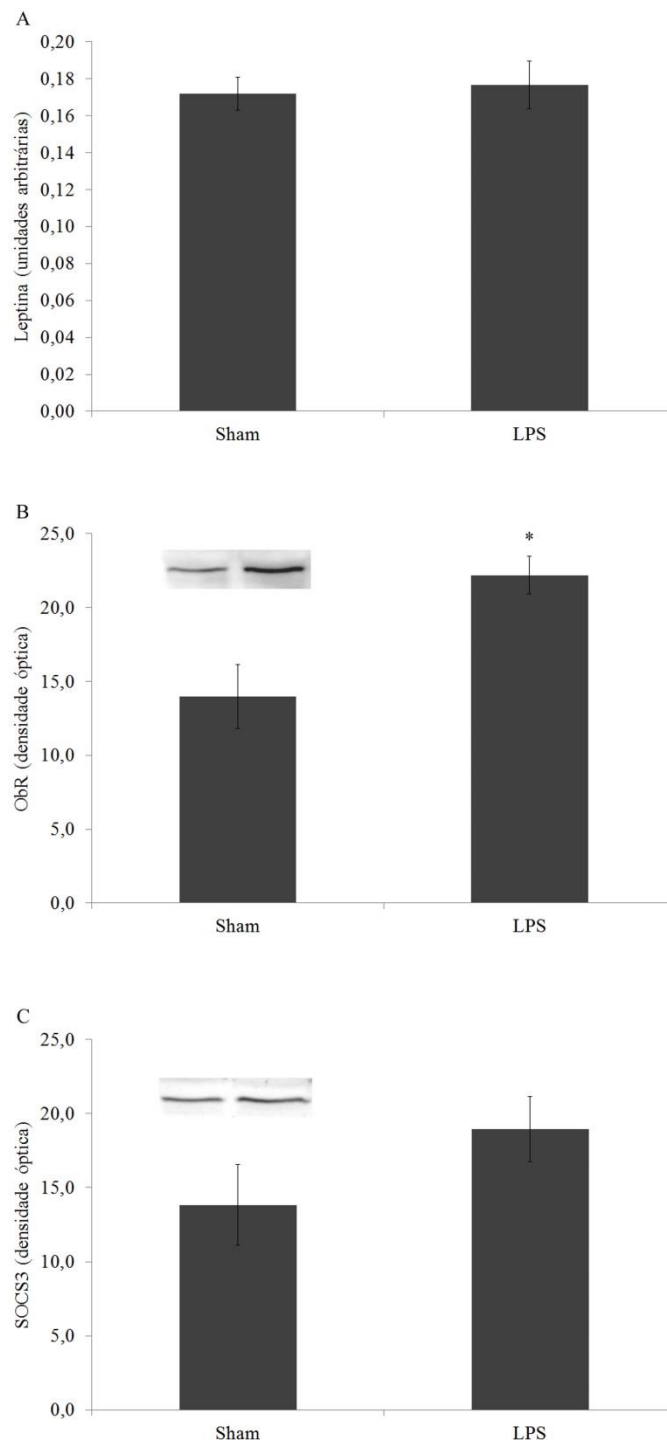


Figura 2. Efeito do LPS sobre o imunoc conteúdo de leptina, ObR e SOCS3 no hipocampo. Os ratos foram submetidos a uma injeção ICV bilateral única de LPS (50 μ g) e, após 48h, foram anestesiados, eutanasiados e o hipocampo foi removido. (A) representa a concentração de leptina, (B) representa a expressão proteica do receptor para leptina ObR e (C) representa a expressão proteica de SOCS3. Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 5 a 8 animais por grupo. * representa diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste T de Student.

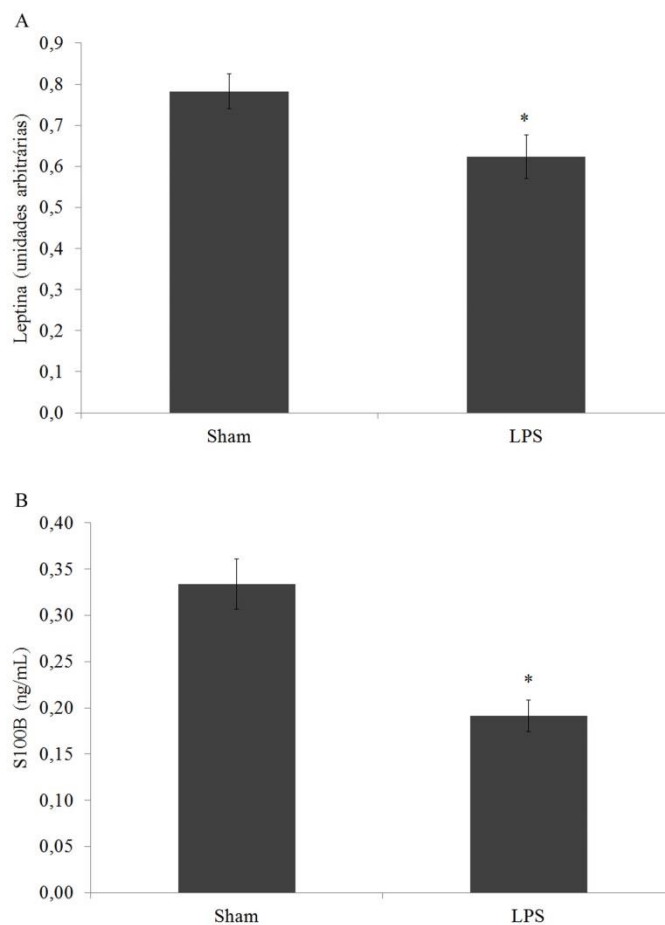


Figura 3. Efeito do LPS sobre os níveis séricos de leptina e S100B. Os ratos foram submetidos a uma injeção ICV bilateral única de LPS (50 μ g) e, após 48h, foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após a separação do soro, as análises foram realizadas. (A) representa a concentração de leptina e (B) representa a concentração de S100B. Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 5 a 8 animais por grupo. * representa diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste T de Student.

Efeito do LPS sobre os níveis proteicos das citocinas IL-1 β e TNF- α no hipocampo

O conteúdo intracelular das citocinas IL-1 β e TNF- α no hipocampo dos ratos foi avaliado 48 horas após uma injeção ICV única de LPS ou veículo a fim de se determinar a presença de uma resposta inflamatória neste tecido. Os níveis intracelulares de IL-1 β foram significativamente maiores nos ratos do grupo LPS em comparação aos ratos do grupo Sham (Figura 4A). Entretanto, o conteúdo intracelular

da citocina TNF- α teve uma diminuição no hipocampo dos ratos que receberam injeção ICV de LPS (Figura 4B).

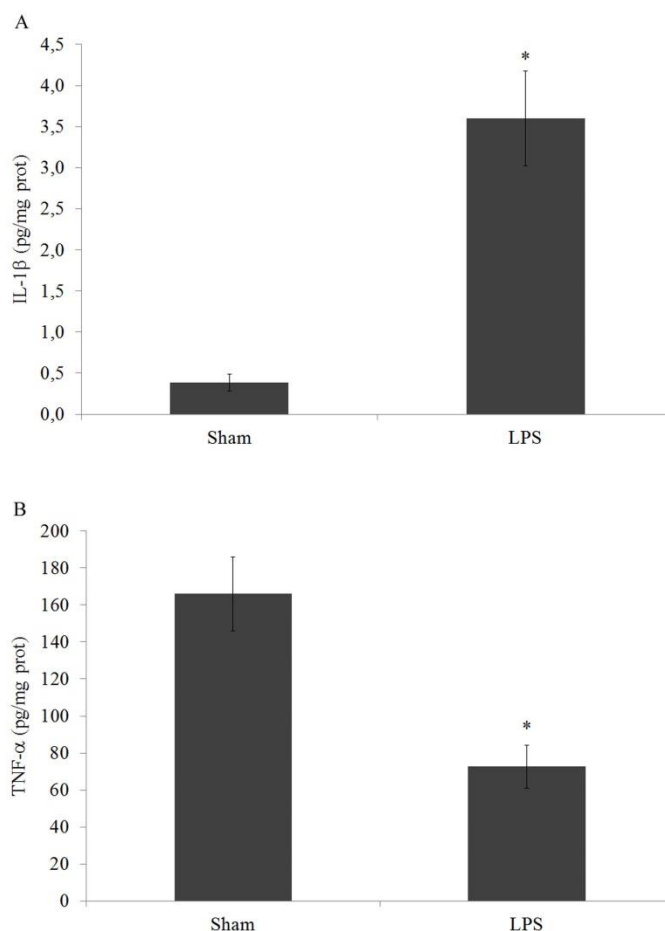


Figura 4. Efeito do LPS sobre os níveis proteicos das citocinas IL-1 β e TNF- α no hipocampo. Os ratos foram submetidos a uma injeção ICV bilateral única de LPS (50 μ g) e, após 48h, foram anestesiados, eutanasiados e o hipocampo foi removido. (A) representa a concentração de IL-1 β e (B) representa a concentração de TNF- α . Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 5 a 8 animais por grupo. * representa diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste T de Student.

Efeito do LPS sobre o conteúdo intracelular das proteínas GFAP e S100B no hipocampo

O conteúdo intracelular das proteínas GFAP e S100B foi analisado a fim de se avaliar uma possível resposta astrocítica no hipocampo dos ratos submetidos à injeção

ICV de LPS. Os níveis intracelulares de GFAP tiveram um aumento significativo no hipocampo dos ratos do grupo LPS em relação aos ratos do grupo Sham (Figura 5A). Por outro lado o imunoconteúdo da proteína S100B no hipocampo não teve uma diferença significativa entre os grupos, porém pode-se notar uma tendência à redução no imunoconteúdo desta proteína no hipocampo dos ratos do grupo LPS (Figura 5B).

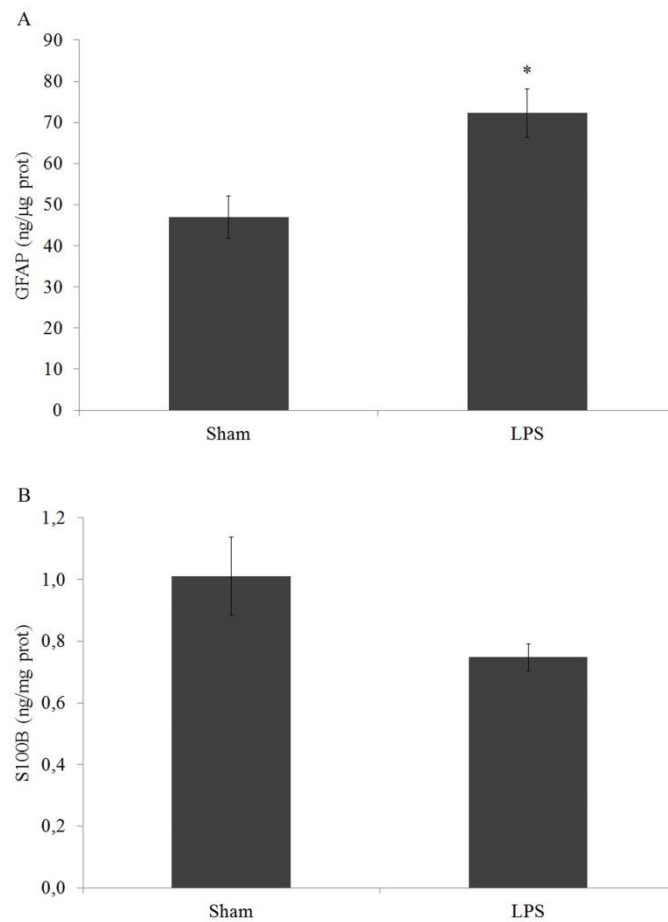


Figura 5. Efeito do LPS sobre o conteúdo intracelular das proteínas GFAP e S100B no hipocampo. Os ratos foram submetidos a uma injeção ICV bilateral única de LPS (50 µg) e, após 48h, foram anestesiados, eutanasiados e o hipocampo foi removido. (A) representa a concentração de GFAP e (B) representa a concentração de S100B. Os dados são apresentados na forma de média ± erro padrão de um número de 5 a 8 animais por grupo. * representa diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste T de Student.

Efeito do LPS sobre os níveis séricos de TNF- α e sobre o peso dos ratos

Foi observado um aumento nos níveis séricos de TNF- α em resposta a neuroinflamação induzida por injeção ICV de LPS (Figura 6A). Além disso, ocorreu uma maior perda de peso nos ratos do grupo LPS em comparação com os ratos do grupo Sham (Figura 6B).

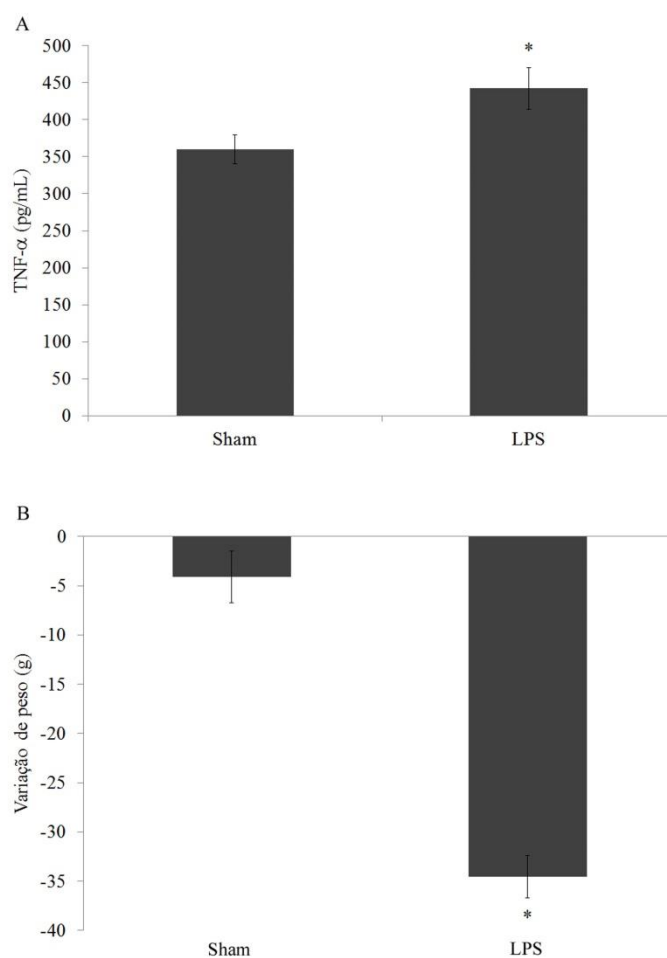


Figura 6. Efeito do LPS sobre os níveis séricos de TNF- α e sobre o peso dos ratos. Os ratos foram submetidos a uma injeção ICV bilateral única de LPS (50 μ g) e, após 48h, foram anestesiados e eutanasiados. (A) representa a concentração sérica de TNF- α e (B) representa a variação de peso corporal dos animais do dia da injeção e 48 h depois. Os dados são apresentados na forma de média \pm erro padrão de um número de 5 a 8 animais por grupo. * representa diferença significativa para um $p < 0,05$ no teste T de Student.

5. Discussão

A neuroinflamação é um processo envolvido em diversas doenças neurodegenerativas, nas quais se observa um quadro de demência (Glass *et al.*, 2010). Embora ainda não se saiba se a inflamação pode ter um papel desencadeante nessas doenças, há evidências de que a ativação microglial e astrocítica possa ter um papel em sua fisiopatologia (Amor *et al.*, 2014). Sabe-se também, que a ativação das células gliais pela neuroinflamação é um fator importante na progressão destas doenças, podendo aumentar a neurotoxicidade e assim agravar o quadro clínico (Glass *et al.*, 2010).

Em modelos das doenças de Alzheimer e Parkinson já foi observado um efeito neuroprotetor da leptina (Davis, Mudd e Hawkins, 2014). Sendo esta adipocina capaz de melhorar os parâmetros moleculares, como diminuição de deposição de β -amiloide e fosforilação da proteína tau em modelos de doença de Alzheimer (Greco *et al.*, 2010) e aumentar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na substância negra após indução de modelo da doença de Parkinson (Ho *et al.*, 2010). Além disso, a leptina melhorou a memória e o comportamento motor nestes modelos, respectivamente (Signore *et al.*, 2008; Greco *et al.*, 2010; Davis, Mudd e Hawkins, 2014).

O papel da leptina na inflamação ainda é controverso e a maior parte dos estudos foi realizada com inflamação periférica, onde já foi demonstrado que LPS injetado sistemicamente pode modular a liberação e produção da leptina, fazendo com que o tecido adiposo responda aumentando a produção deste peptídeo e a sua liberação para a corrente sanguínea (Grunfeld *et al.*, 1996; Landman *et al.*, 2003). Nesse caso, ela pode ter um importante papel na comunicação entre a periferia e o sistema nervoso central, uma vez que este hormônio pode agir como uma citocina inflamatória, tendo a capacidade de induzir a febre, a infiltração de neutrófilos no SNC e a produção de citocinas, como a IL-1 β (Luheshi *et al.*, 1999; Sachot, Poole e Luheshi, 2004). Por outro

lado, alguns estudos já demonstraram uma ação protetora deste peptídeo em modelos de inflamação periférica (Landgraf *et al.*, 2014).

Poucos estudos relacionam inflamação central e sinalização por leptina. Diversos modelos experimentais, como a dieta com alto teor de gordura ou injeção de LPS já mostraram que essa inflamação sistêmica pode levar a uma inflamação central com consequente alteração na sinalização por leptina no hipotálamo (De Git e Adan, 2015). Nosso trabalho mostrou, pela primeira vez, uma alteração na sinalização por leptina no hipocampo em resposta a uma inflamação central, o que poderia contribuir de alguma forma para um déficit de memória. Esse efeito da inflamação sobre a sinalização de leptina poderia ser um fator importante na progressão das doenças neurodegenerativas. Uma vez que a leptina tem sido mostrada como neuroprotetora nestas doenças, a alteração de sua sinalização pela neuroinflamação poderia interferir na sua resposta de proteção no hipocampo, levando a uma maior neurotoxicidade e consequentemente influenciando na progressão das doenças neurodegenerativas.

A expressão do receptor de isoforma longa de leptina (ObRb) se mostrou aumentada no hipocampo após a indução da neuroinflamação. Inclusive, já foi demonstrado em linhagem astrogliar C6 que a expressão do receptor de leptina aumenta em resposta a exposição ao LPS ou a outro estímulo inflamatório como o TNF- α de uma forma dose dependente (Hsuchou *et al.*, 2009). Além disso, variações na concentração de leptina podem modular a expressão de seu receptor, como foi demonstrado em um estudo com células de neuroblastoma humano, onde a expressão do receptor de leptina diminuiu em resposta a tratamento com esta adipocina de uma maneira dose e tempo dependentes (Hikita *et al.*, 2000). Deste modo, caso a diminuição de leptina no soro encontrada nos ratos com neuroinflamação induzida aconteça também no líquido, a diminuição de leptina juntamente com a presença de moléculas

inflamatórias no SNC poderiam ser os mecanismos pelos quais os níveis do receptor de leptina encontram-se aumentados nos ratos que receberam injeção ICV de LPS. Porém serão necessários mais estudos a fim de se verificar o efeito da neuroinflamação induzida por LPS sobre os níveis de leptina no líquido.

Levando em consideração o aumento nos níveis do receptor de leptina, tornou-se necessário a avaliação de uma molécula envolvida na via de sinalização ativada por esse receptor, como o fator inibitório SOCS3. Após a ativação do receptor ObRb ocorre o aumento na produção da molécula de SOCS3 a qual age diretamente sobre este receptor inibindo-o, sendo então o regulador negativo da via de sinalização da leptina (Park e Ahima, 2014). Em nosso estudo, não encontramos diferença significativa na expressão proteica de SOCS3 no hipocampo dos ratos que receberam injeção ICV de LPS, demonstrando que, apesar do aumento nos níveis do receptor neste tecido, o aumento na transcrição de SOCS3 não ocorre como resposta.

Os níveis de leptina nos tecidos do SNC podem decorrer de uma entrada desta adipocina provinda da periferia ou de sua produção nestes tecidos, uma vez que, já foi mostrada a presença de RNAm para a leptina no SNC, inclusive no hipocampo (Wilkinson *et al.*, 2007). Os níveis de leptina em nosso estudo não foram alterados no tecido hipocampal, corroborando, um estudo prévio utilizando injeção ICV de LPS, o qual não encontrou diferença nos níveis de RNAm para leptina no hipocampo (Brown *et al.*, 2008). Entretanto, em camundongos, injeção intraperitoneal de LPS levou a uma diminuição da passagem de leptina através da BHE (Nonaka *et al.*, 2004). Reforçando assim, que, possivelmente, os mecanismos que modulam a ação desta adipocina durante uma inflamação periférica não sejam os mesmos responsáveis por sua resposta à neuroinflamação.

Tendo em vista que a concentração de leptina não foi alterada, os níveis de ObRb tiveram um aumento e a expressão proteica de SOCS3 não variou no hipocampo em resposta a indução de neuroinflamação por LPS. Então, podemos afirmar que a neuroinflamação pode estar aumentando a sinalização de leptina neste tecido, o que poderia representar uma compensação do hipocampo em resposta a neuroinflamação a fim de aumentar a resposta da leptina nesse tecido, uma vez que esta adipocina pode ter um papel neuroprotetor. Entretanto, a leptina também pode aumentar a sinalização pró-inflamatória, podendo então, o hipocampo estar aumentando a sinalização de leptina a fim de aumentar a resposta inflamatória no tecido no intuito de conter o insulto.

Em resposta a uma injúria, as células responsáveis pela defesa imune no SNC agem aumentando a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α , com o intuito de sinalizar a situação de risco. De fato, no presente estudo, foi encontrado um aumento da expressão de IL-1 β no hipocampo dos animais 48 horas após a injeção de LPS, corroborando com outros estudos (Tyagi *et al.*, 2008) e confirmando a presença de resposta inflamatória. Inesperadamente, os níveis da citocina TNF- α tiveram uma diminuição de sua concentração no tecido hipocampal. Estudos anteriores, utilizando o mesmo protocolo de indução de neuroinflamação mostram que os níveis de TNF- α hipocampais aumentam nas primeiras 24 h e retornam ao normal após 48 horas da estimulação inflamatória (Tyagi *et al.*, 2008).

Os astrócitos tem demonstrado um papel importante na vigilância imunológica do SNC. Estas células podem alterar a expressão e secreção de diversas proteínas em resposta a patógenos, num processo de ativação glial, conhecido como astrogliose (Hamby e Sofroniew, 2010). O aumento na expressão de GFAP, uma proteína de citoesqueleto característica de astrócitos, é considerado um indicador de astrogliose

(Pekny e Pekna, 2004). Além disso, em uma resposta inflamatória astrogliar pode ocorrer o aumento na secreção de citocinas e da proteína S100B (Guerra *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, os ratos que receberam injeção ICV de LPS tiveram um aumento na expressão de GFAP hipocampal, indicando que houve ativação astrogliar neste tecido. Diversos estudos *in vitro* já mostraram que a exposição de astrócitos a LPS causa um aumento na expressão de GFAP por estas células (Brahmachari, Fung e Pahan, 2006; Guerra *et al.*, 2011), porém os mecanismos pelos quais ocorre o aumento de GFAP pelos astrócitos ainda não estão elucidados.

O conteúdo de S100B não foi significativamente alterado no hipocampo dos animais expostos a injeção ICV de LPS, porém pode-se notar uma tendência à redução deste conteúdo. Deve-se destacar que o conteúdo intracelular e a secreção de S100B não estão necessariamente relacionados, como foi observado em estudos *in vitro* (Leite *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2011) e *in vivo* (Vizueté *et al.*, 2013). De fato, em um estudo anterior, utilizando uma única injeção ICV de LPS, os níveis de S100B no líquido encontraram-se aumentados após 24 horas, indicando que pode haver um aumento na secreção de S100B pelos astrócitos em resposta ao LPS (Guerra *et al.*, 2011).

Além de uma resposta central esperada após a indução de neuroinflamação com o LPS, foram avaliados parâmetros periféricos a fim de se analisar se há conexão entre uma resposta inflamatória no cérebro e uma sinalização sistêmica. De fato, os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no soro tiveram um aumento em resposta a inflamação central. Um estudo prévio do nosso grupo não mostrou alteração na concentração de TNF- α após 24 h da indução de neuroinflamação por injeção ICV contendo 25 μ g de LPS (Guerra *et al.*, 2011). Corroborando esse resultado, outro trabalho utilizando uma injeção ICV contendo 5 μ g de LPS como modelo de neuroinflamação também não encontrou alteração na concentração de TNF- α circulante após 4 h da indução (Zhang *et*

al., 2010). Sabe-se que uma inflamação periférica pode levar a uma inflamação central (De Git e Adan, 2015). Nossos dados indicam que uma inflamação central também pode levar a uma sinalização 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 e de forma aguda.

Além do aumento de TNF- α , outras alterações periféricas foram observadas. Em nosso estudo, foi encontrada uma diminuição nos níveis séricos de S100B. A concentração de S100B no soro pode ser atribuída à secreção desta proteína por parte dos adipócitos e também, sendo esta proteína capaz de atravessar a BHE, sua secreção por parte dos astrócitos no SNC pode contribuir para seus níveis séricos (Gonçalves, Leite e Guerra, 2010). Além disso, a S100B tem sido proposta como um marcador periférico de dano central, uma vez que, nessa situação a permeabilidade da BHE pode aumentar, levando a um aumento da passagem desta proteína para a periferia (Goncalves, Leite e Nardin, 2008). Sendo assim, a concentração sérica de S100B pode refletir a secreção de diversas fontes celulares, entretanto estes níveis no soro não refletem diretamente a concentração desta proteína no SNC, como já foi demonstrado em outros estudos (Vizuet *et al.*, 2013). Então a diminuição na concentração de S100B no soro dos animais com neuroinflamação induzida observada nesse estudo poderia ser atribuída a mecanismos periféricos e não ser um reflexo da concentração central.

Os níveis de leptina no soro dos ratos com neuroinflamação induzida tiveram uma diminuição. Este efeito pode ser reflexo de uma resposta do tecido adiposo à sinalização inflamatória (visto que o TNF- α está aumentado perifericamente). Porém, em outros estudos de indução de inflamação periférica, o tecido adiposo responde aumentando a

secreção de leptina, que por sua vez é um fator importante da sinalização inflamatória para o cérebro (Rummel *et al.*, 2008). Estes resultados nos levam a crer que os mecanismos de interação da inflamação do cérebro para a periferia são diferentes dos mecanismos da periferia para o cérebro. Entretanto, estes animais também apresentaram uma grande perda de peso em relação ao grupo Sham, se esta perda de peso foi ocasionada por uma diminuição de adiposidade, então poderia explicar a queda nos níveis do hormônio, o qual é secretado na proporção de quantidade de tecido adiposo. Para isso, mais análises precisam ser feitas a fim de identificar se a perda de peso dos animais foi por desidratação, perda de massa muscular ou por diminuição de adiposidade.

Um estudo em humanos encontrou correlação entre os níveis circulantes de S100B e de leptina com o IMC (Steiner *et al.*, 2010). Além disso, em indivíduos obesos há níveis de S100B e leptina maiores, enquanto que em pacientes com anorexia nervosa são menores, e neste caso, os níveis de S100B e leptina voltam ao normal com o ganho de peso (Holtkamp *et al.*, 2008). Então, não podemos descartar que a diminuição nos níveis destes dois compostos no soro dos animais expostos a injeção ICV de LPS poderia ser atribuída à perda de peso. Além disso, poderia haver um mecanismo de regulação entre a S100B e a leptina diretamente, o que ocasionaria esta resposta semelhante nos níveis delas em resposta a neuroinflamação.

6. Conclusões

Nossos resultados demonstram que a neuroinflamação pode modular a sinalização da leptina no hipocampo e os níveis desta adipocina no soro, contribuindo para a compreensão do papel deste hormônio durante a neuroinflamação, assim como nas doenças neurodegenerativas. Foi demonstrado, também, que a neuroinflamação pode alterar parâmetros astrocitários e inflamatórios hipocampais, assim como parâmetros inflamatórios periféricos.

7. Referências

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006. ISSN 1471-003X.

AGUILAR-VALLES, A. et al. Leptin and interleukin-6 alter the function of mesolimbic dopamine neurons in a rodent model of prenatal inflammation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 7, p. 956-69, Jul 2012. ISSN 1873-3360.

ALLAMAN, I. et al. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 216, n. 1, p. 75-84, Jul 2011. ISSN 1432-2072.

ALLISON, M. B.; MYERS, M. G. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. **J Endocrinol**, v. 223, n. 1, p. T25-35, Oct 2014. ISSN 1479-6805.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151-66, Jun 2014. ISSN 1365-2567.

ASHFORD, J. W. et al. Neuropil threads are collinear with MAP2 immunostaining in neuronal dendrites of Alzheimer brain. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 57, n. 10, p. 972-8, Oct 1998. ISSN 0022-3069.

BANKS, A. S. et al. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14563-72, May 2000. ISSN 0021-9258.

BANKS, W. A. et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, v. 17, n. 2, p. 305-11, 1996. ISSN 0196-9781.

BERKOWITZ, D. E. et al. Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E992-7, Jun 1998. ISSN 0002-9513.

BJØRBAEK, C. et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. **J Biol Chem**, v. 276, n. 7, p. 4747-55, Feb 2001. ISSN 0021-9258.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **J Neurosci**, v. 26, n. 18, p. 4930-9, May 2006. ISSN 1529-2401.

BROWN, R. et al. Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain. **Neurosci Lett**, v. 432, n. 1, p. 73-8, Feb 2008. ISSN 0304-3940.

CAI, Q.; SHURAIH, M.; NAGUEH, S. F. The use of echocardiography in Wolff-Parkinson-White syndrome. **Int J Cardiovasc Imaging**, v. 28, n. 4, p. 725-34, Apr 2012. ISSN 1875-8312.

CAROW, B.; ROTTENBERG, M. E. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. **Front Immunol**, v. 5, p. 58, 2014. ISSN 1664-3224.

- CHRISTOPHERSON, K. S. et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v. 120, n. 3, p. 421-33, Feb 2005. ISSN 0092-8674.
- COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480-4, May 2001. ISSN 0028-0836.
- DAVIS, C.; MUDD, J.; HAWKINS, M. Neuroprotective effects of leptin in the context of obesity and metabolic disorders. **Neurobiol Dis**, v. 72 Pt A, p. 61-71, Dec 2014. ISSN 1095-953X.
- DE GIT, K. C.; ADAN, R. A. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. **Obes Rev**, Jan 2015. ISSN 1467-789X.
- DURAKOGLUGIL, M.; IRVING, A. J.; HARVEY, J. Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression. **J Neurochem**, v. 95, n. 2, p. 396-405, Oct 2005. ISSN 0022-3042.
- FAGGIONI, R. et al. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. **Am J Physiol**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. R204-8, Jan 1998. ISSN 0002-9513.
- FEKONJA, O.; AVBELJ, M.; JERALA, R. Suppression of TLR signaling by targeting TIR domain-containing proteins. **Curr Protein Pept Sci**, v. 13, n. 8, p. 776-88, Dec 2012. ISSN 1875-5550.
- FRANCIS, J. et al. Systemic administration of lipopolysaccharide increases plasma leptin levels: blockade by soluble interleukin-1 receptor. **Endocrine**, v. 10, n. 3, p. 291-5, Jun 1999. ISSN 1355-008X.
- FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med**, v. 1, n. 12, p. 1311-4, Dec 1995. ISSN 1078-8956.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-70, Oct 1998. ISSN 0028-0836.
- FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **Biochem J**, v. 393, n. Pt 1, p. 7-20, Jan 2006. ISSN 1470-8728.
- GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-34, Mar 2010. ISSN 1097-4172.
- GONCALVES, C. A.; LEITE, M. C.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clin Biochem**, v. 41, n. 10-11, p. 755-63, Jul 2008. ISSN 1873-2933 (Electronic).
- GONG, Y. et al. The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 31019-27, Oct 2007. ISSN 0021-9258.

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**, v. 2010, p. 790431, 2010. ISSN 2090-0171.

GRECO, S. J. et al. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 19, n. 4, p. 1155-67, 2010. ISSN 1875-8908.

_____. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 380, n. 1, p. 98-104, Feb 2009. ISSN 1090-2104.

GRUNFELD, C. et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **J Clin Invest**, v. 97, n. 9, p. 2152-7, May 1996. ISSN 0021-9738.

GUERRA, M. C. et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 128, 2011. ISSN 1742-2094.

HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 494-506, Oct 2010. ISSN 1878-7479.

HIKITA, M. et al. Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 271, n. 3, p. 703-9, May 2000. ISSN 0006-291X.

HO, P. W. et al. Mitochondrial uncoupling protein-2 (UCP2) mediates leptin protection against MPP+ toxicity in neuronal cells. **Neurotox Res**, v. 17, n. 4, p. 332-43, May 2010. ISSN 1476-3524.

HOLDEN, K. F. et al. Serum leptin level and cognition in the elderly: Findings from the Health ABC Study. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 9, p. 1483-9, Sep 2009. ISSN 1558-1497.

HOLTKAMP, K. et al. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. **J Neural Transm**, v. 115, n. 6, p. 937-40, Jun 2008. ISSN 0300-9564 (Print)0300-9564 (Linking).

HSUCHOU, H. et al. Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2275-80, Dec 2009. ISSN 1873-5169.

HUANG, L.; WANG, Z.; LI, C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 9, p. 6343-9, Mar 2001. ISSN 0021-9258.

IRVING, A. J.; HARVEY, J. Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1633, p. 20130155, Jan 2014. ISSN 1471-2970.

KEEN-RHINEHART, E.; ONDEK, K.; SCHNEIDER, J. E. Neuroendocrine regulation of appetitive ingestive behavior. **Front Neurosci**, v. 7, p. 213, 2013. ISSN 1662-4548.

KLEINRIDDERS, A. et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. **Cell Metab**, v. 10, n. 4, p. 249-59, Oct 2009. ISSN 1932-7420.

LA CAVA, A.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 5, p. 371-9, May 2004. ISSN 1474-1733..

LAFRANCE, V. et al. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 358-65, Mar 2010. ISSN 1090-2139.

LANDGRAF, M. A. et al. Leptin downregulates LPS-induced lung injury: role of corticosterone and insulin. **Cell Physiol Biochem**, v. 33, n. 3, p. 835-46, 2014. ISSN 1421-9778.

LANDMAN, R. E. et al. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1285-91, Mar 2003. ISSN 0021-972X.

LATERRA, J.; GOLDSTEIN, G. W. Astroglial-induced in vitro angiogenesis: requirements for RNA and protein synthesis. **J Neurochem**, v. 57, n. 4, p. 1231-9, Oct 1991. ISSN 0022-3042.

LEITE, M. C. et al. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. **Brain Res Bull**, v. 70, n. 2, p. 179-85, Jun 30 2006. ISSN 0361-9230 (Print).

_____. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **J Neurosci Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-9, Mar 2008. ISSN 0165-0270.

LEON, C. G. et al. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. **Pharm Res**, v. 25, n. 8, p. 1751-61, Aug 2008. ISSN 0724-8741.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A.; BANKS, W. A. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 1, p. R143-50, Jan 2004. ISSN 0363-6119.

LI, X. L. et al. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 607-15, 2002. ISSN 0306-4522.

LIEB, W. et al. Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. **JAMA**, v. 302, n. 23, p. 2565-72, Dec 2009. ISSN 1538-3598.

LOFFREDA, S. et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J**, v. 12, n. 1, p. 57-65, Jan 1998. ISSN 0892-6638.

LORD, G. M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897-901, Aug 1998. ISSN 0028-0836.

- LU, J. et al. Leptin inhibits 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death in SH-SY5Y cells. **Neurosci Lett**, v. 407, n. 3, p. 240-3, Oct 2006. ISSN 0304-3940.
- LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-51, May 2008. ISSN 1096-0023.
- LUHESHI, G. N. et al. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 12, p. 7047-52, Jun 1999. ISSN 0027-8424.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 2008. ISSN 1476-4687.
- MIZUNO, T. M. et al. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. **Diabetes**, v. 47, n. 2, p. 294-7, Feb 1998. ISSN 0012-1797.
- MIZUNO, T. M.; MOBBS, C. V. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 814-7, Feb 1999. ISSN 0013-7227.
- MOORE, S. I. et al. Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 71, n. 7, p. 4182-5, Jul 2003. ISSN 0019-9567.
- MOULT, P. R. et al. Leptin regulates AMPA receptor trafficking via PTEN inhibition. **J Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 4088-101, Mar 2010. ISSN 1529-2401.
- MÜNZBERG, H. et al. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 6, p. 642-52, Mar 2005. ISSN 1420-682X.
- NONAKA, N. et al. Effects of lipopolysaccharide on leptin transport across the blood-brain barrier. **Brain Res**, v. 1016, n. 1, p. 58-65, Jul 2004. ISSN 0006-8993.
- OOMURA, Y. et al. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2738-49, Nov 2006. ISSN 0196-9781.
- PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Leptin signaling. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 73, 2014. ISSN 2051-7599.
- PEELMAN, F. et al. 20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor. **J Endocrinol**, v. 223, n. 1, p. T9-23, Oct 2014. ISSN 1479-6805.
- PEKONY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**, v. 204, n. 4, p. 428-37, Nov 2004. ISSN 0022-3417.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977. ISSN 0003-2697.
- QUAN, N.; SUNDAR, S. K.; WEISS, J. M. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. **J Neuroimmunol**, v. 49, n. 1-2, p. 125-34, Jan 1994. ISSN 0165-5728. >

- RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1164-71, Apr 2012. ISSN 1558-8238.
- RUMMEL, C. et al. Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 523-34, May 2010. ISSN 1476-5578.
- _____. Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. **J Comp Neurol**, v. 511, n. 3, p. 373-95, Nov 2008. ISSN 1096-9861.
- SACHOT, C.; POOLE, S.; LUHESHI, G. N. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. **J Physiol**, v. 561, n. Pt 1, p. 263-72, Nov 2004. ISSN 0022-3751.
- SHANLEY, L. J.; IRVING, A. J.; HARVEY, J. Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 21, n. 24, p. RC186, Dec 2001. ISSN 1529-2401.
- SHANLEY, L. J. et al. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. **J Physiol**, v. 545, n. Pt 3, p. 933-44, Dec 2002. ISSN 0022-3751.
- SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 342931, 2013. ISSN 1466-1861..
- SIEGL, D. et al. Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis. **Anesthesiology**, v. 121, n. 1, p. 98-114, Jul 2014. ISSN 1528-1175.
- SIERRA, A. et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 4, p. 483-95, Oct 2010. ISSN 1875-9777.
- SIGNORE, A. P. et al. Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. **J Neurochem**, v. 106, n. 5, p. 1977-90, Sep 2008. ISSN 1471-4159.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 1432-0533.
- STEINER, J. et al. S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 321-4, Feb 2010. ISSN 1873-3360.
- TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-71, Dec 1995. ISSN 0092-8674.
- THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 153-62, Jan 2012. ISSN 1558-8238.
- TRAMONTINA, A. C. 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**, v. 118, n. 11, p. 1641-9, Nov 2011. ISSN 1435-1463.

- TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282-6, May 2007. ISSN 0165-0270.
- TSCHÖP, J. et al. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. **J Neurosci**, v. 30, n. 17, p. 6036-47, Apr 2010. ISSN 1529-2401.
- TYAGI, E. et al. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. **J Neuroimmunol**, v. 205, n. 1-2, p. 51-6, Dec 2008. ISSN 0165-5728.
- VINET, J. et al. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 27, 2012. ISSN 1742-2094.
- VIZUETE, A. F. et al. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. **Life Sci**, v. 92, n. 17-19, p. 923-8, May 2013. ISSN 1879-0631.
- WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Prog Neurobiol**, v. 86, n. 4, p. 342-67, Dec 11 2008. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082 (Linking).
- WANG, R. et al. Metabolic stress modulates Alzheimer's β -secretase gene transcription via SIRT1-PPAR γ -PGC-1 in neurons. **Cell Metab**, v. 17, n. 5, p. 685-94, May 2013. ISSN 1932-7420.
- WAYNER, M. J. et al. Orexin-A (Hypocretin-1) and leptin enhance LTP in the dentate gyrus of rats in vivo. **Peptides**, v. 25, n. 6, p. 991-6, Jun 2004. ISSN 0196-9781.
- WENG, Z. et al. Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. **J Biol Chem**, v. 282, n. 47, p. 34479-91, Nov 2007. ISSN 0021-9258.
- WILKINSON, M. et al. Adipokine gene expression in brain and pituitary gland. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 3, p. 191-209, 2007. ISSN 1423-0194.
- WINOCUR, G. et al. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. **Behav Neurosci**, v. 119, n. 5, p. 1389-95, Oct 2005. ISSN 0735-7044.
- ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 61-73, Oct 2008. ISSN 1097-4172.
- ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836.
- ZHANG, Z. H. et al. Centrally administered lipopolysaccharide elicits sympathetic excitation via NAD(P)H oxidase-dependent mitogen-activated protein kinase signaling. **J Hypertens**, v. 28, n. 4, p. 806-16, Apr 2010. ISSN 1473-5598.
- ZHOU, Y.; RUI, L. Leptin signaling and leptin resistance. **Front Med**, v. 7, n. 2, p. 207-22, Jun 2013. ISSN 2095-0225.