

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Fisiologia

Deborah Teixeira

RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
INDUZIDA POR OBESIDADE EM RATAS *WISTAR* DE
DIFERENTES IDADES

Porto Alegre-RS, 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Deborah Teixeira

RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
INDUZIDA POR OBESIDADE EM RATAS *WISTAR* DE
DIFERENTES IDADES

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Coorientação: Prof. Dra. Renata Padilha Guedes

Porto Alegre-RS, 2014

Agradecimentos

Agradeço:

Ao meu namorado, Cláudio Felipe Kolling da Rocha, pela sua incomparável capacidade de compreensão, que vem sendo aprimorada ao longo dos últimos anos. Pela ajuda indispensável, pelas ideias, pela força, pelo apoio, pelo carinho e por muitas outras atitudes positivas que poderiam preencher muitas e muitas páginas.

À minha mãe Dóres Teixeira, pelo exemplo de força e coragem, por sempre confiar no meu potencial, por me incentivar a estudar, desde pequena, e por proporcionar as condições necessárias para que eu possa atingir meus objetivos. Ao meu pai Sergio Teixeira, pelo exemplo de honestidade e de paciência, pelo suporte, pelos cuidados. Amo vocês com todas as minhas forças.

À minha irmã Bárbara Teixeira pela ajuda, pela compreensão, pelo companheirismo, pelos cuidados, pela lealdade e pelo amor incondicional.

Aos meus avós Iedo e Glória, Erna (*in memoriam*) e Alfredo (*in memoriam*), Herlita (*in memoriam*) e José (*in memoriam*), por serem meus exemplos de retidão de caráter, de força, de trabalho e de honestidade.

Aos meus tios José Pedro (*in memoriam*) e Neusa Schuh, Maria Orlani Schwendler, Salete Teixeira e Rosilda Fraga por estarem sempre por perto, me cuidando e incentivando. À toda minha -enorme- família pelo apoio prestado e pela compreensão nos momentos de ausência.

À Josiane e ao Ricardo Schwendler pela amizade, diversão, pelas discussões filosóficas sobre a existência e por todo amor fraternal que temos um pelo outro.

À Sônia e ao Claudio da Rocha por comemorarem minhas conquistas junto comigo, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos, por torcerem por mim e por compreenderem minhas eventuais ausências. À Leila Fonini e à Vivian Altmann pelo companheirismo desde a faculdade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar meu curso de mestrado.

À minha orientadora Maria Flávia Marques Ribeiro pela orientação, pelo amplo aprendizado que obtive durante nosso convívio, pelo incentivo, pelos conselhos e, acima de tudo, pela confiança na seriedade do meu trabalho e da minha personalidade.

À minha coorientadora Renata Padilha Guedes, que, apesar de sua agenda muito ocupada, sempre soube como reservar tempo suficiente para me auxiliar durante a realização do meu trabalho. Agradeço pela ajuda indispensável, pelas conversas animadas, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por muitas outras coisas boas.

Aos professores do PPG Fisiologia por propiciarem minha formação. Meus agradecimentos especiais à professora Wania Aparecida Partata, que sempre disponibilizou seu laboratório para o que eu precisei, principalmente para a técnica de imuno-histoquímica; ao professor Luiz Carlos Rios Kucharski pelo apoio nos experimentos, pelo bom-humor contagiante, pelos cuidados (que geralmente eram traduzidos como paçoquinhas); ao professor Luciano Stürmer de Fraga por toda a ajuda, técnica e intelectual, e por toda paciência durante o meu curso de mestrado, especialmente durante meu estágio didático e minha prova de qualificação.

Aos colegas de mestrado do PPG Fisiologia, em especial à Juliana Rangel e à Amanda Martins pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Interação Neuro-Humoral: Ana Lucia Cecconello, Ana Lucia Hoefel, Bruno Dutra Arbo, Claudia Vieira Marques, Priscila Zanini, Vanessa Frighetto, que me ajudaram nos experimentos, que saíram comigo para tomar um café, que riram e se preocuparam junto comigo. Vocês, muitas vezes, facilitaram minha vida ao longo desses anos. Obrigada por estarem junto comigo nessa!

Aos amigos do meu primeiro laboratório, o Laboratório 11, principalmente à Silvana Jacobs, minha eterna chefe, ao Bruno Cerpa, à Márcia de Azevedo, ao Wagner Nunes e, claro, ao Felipe Rocha, por nunca se esquecerem de mim, por sempre me incentivarem e se colocarem à disposição para tudo que eu venha a precisar. A amizade de vocês, bem como a memória do que já vivemos juntos, é e sempre será muito importante para mim.

Aos laboratórios dos Profs.: Aldo e Gilberto, Roselis e Luiz, Márcia e Luciano, Paulo Ivo, Adriane e Alex, Wania e Denise, Ilma e aos seus integrantes pela ajuda nas técnicas e pelo empréstimo de reagentes e equipamentos.

Aos demais colegas do PPG Fisiologia pela força.

Resumo

A obesidade é uma doença que atualmente atinge proporções pandêmicas. A atividade inflamatória subsequente ao aumento do tecido adiposo está associada a vários prejuízos causados pela obesidade. Pacientes obesos tendem a apresentar inflamação de baixo grau sustentada, conhecida como metainflamação, principalmente pela produção excessiva de mediadores proinflamatórios pelo tecido adiposo. Dentre os distúrbios causados pela obesidade, destaca-se a potencialização das mudanças fisiológicas que ocorrem no envelhecimento, levando à diminuição da capacidade de adaptação do indivíduo ao ambiente e aumentando a sua vulnerabilidade a processos patológicos. Dessa forma, as doenças associadas à obesidade parecem ser ainda mais prejudiciais em idosos. Diante do conhecimento dos prejuízos à saúde causados pela obesidade, esse trabalho tem como objetivo avaliar a participação da obesidade, induzida por uma dieta de cafeteria, no perfil metabólico e na ativação de vias proinflamatórias no sistema nervoso central e verificar a diferença de suscetibilidade a essas alterações devido às diferentes idades dos indivíduos. Ratas *Wistar* de 3 e 18 meses, no início do experimento, foram tratadas por 12 semanas, com dieta de cafeteria (5,6 kcal/g) ou ração padrão (2,9 kcal/g) à vontade. Ao final das 12 semanas, no período do diestro do ciclo estral, os animais foram decapitados. Os animais que foram tratados com dieta de cafeteria, tanto de 3 quanto de 18 meses, apresentaram aumento do consumo energético diário. Além disso, apresentaram resistência à insulina e número aumentado de astrócitos observados no córtex cerebral. Houve efeito da idade e da dieta de cafeteria sobre o aumento do ganho de peso corporal ao longo do tratamento, o acúmulo de gordura abdominal e o aumento do índice adiposo. Houve efeito da interação entre os fatores idade e dieta na alteração dos níveis séricos de triacilgliceróis e na elevação da concentração da citocina proinflamatória interleucina 1 β no córtex cerebral e no hipocampo. O fator idade atuou, de forma estatisticamente significativa no decréscimo da concentração sérica de HDL e de leptina, além de promover aumento da concentração da citocina proinflamatória IL-1 β no hipocampo e do número de astrócitos observados no hipocampo dos animais analisados. Esse estudo mostra que, embora a dieta de cafeteria não seja capaz de induzir um quadro completo de dislipidemia em 12 semanas, em animais submetidos a essa dieta a partir dos 3 e dos 18 meses de idade, seria suficiente para induzir resistência à insulina em um período de tempo relativamente curto. Além disso, a dieta de cafeteria contribuiu para a deposição de tecido adiposo abdominal, que está associado a vários prejuízos à saúde, bem como para a manifestação de características de inflamação, como aumento da expressão de IL1- β e astrogliose em estruturas relacionadas à cognição, como o hipocampo e o córtex.

Abstract

Obesity is a pandemic disease. Obese patients are likely to show low-grade inflammation, named “metainflammation”, mainly due to an excessive production of inflammatory mediators by adipose tissue. Obesity intensifies age-related physiological changes, increasing the vulnerability of elderly patients to pathological processes. Thus, obesity-related diseases are accentuated in the elderly. Despite of obesity-related disorders, the aims of this study are to evaluate the role of cafeteria diet-induced obesity on the metabolic profile and on the proinflammatory pathways activation in the central nervous system, and to evaluate the vulnerability to the disorders accordingly the stage in life of the rats. Three and 18 months-old female Wistar rats were treated for 12 weeks with cafeteria diet (5,6 kcal/g) or standard chow (2,9 kcal/g) *ad libitum*. At the end of 12 weeks, at the diestrous phase of estrous cycle the rats were killed. All the cafeteria diet-fed rats showed increased diary energetic intake. Also, the cafeteria diet-fed rats showed insulin resistance, higher blood leptin level and increased number of astrocytes in the cerebral cortex. There were diet-induced effects on increasing body weight, abdominal fat deposition and adipose index. There was interaction between diet and age on the blood triglyceride levels and on the increase of Interleukin 1- β levels in hippocampus. The age-related effects were the decrease in HDL and leptin blood levels, the increased levels of IL1- β in the hippocampus and the astrogliosis in the hippocampus. This study shows that, although cafeteria diet for 12 weeks did not induce a complete dislipidemic profile, it was capable to induce insulin resistance in a short period of time. Also, cafeteria diet contributed to increased abdominal fat. Abdominal fat is related to several adverse health effects. Cafeteria diet also induced the manifestation of inflammation features, like increased expression of IL-1 β and astrogliosis in the hippocampus and in the cerebral cortex.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Alimentos oferecidos na dieta de cafeteria.	Página 18
Tabela 2: Grupos de alimentos oferecidos em dias alternados.....	Página 18
Tabela 3: Perfil lipídico.....	Página 27

Lista de Figuras

Figura 1. Grupos experimentais.....	Página 16
Figura 2. Desenho experimental.....	Página 16
Figura 3. Consumo de alimentos.....	Página 26
Figura 4. Peso corporal.....	Página 28
Figura 5. Tecido adiposo.....	Página 29
Figura 6. Homeostase da glicose.....	Página 30
Figura 7. Adipocinas.....	Página 31
Figura 8. Interleucina 10 no soro.....	Página 32
Figura 9: Interleucina-1 β no córtex e no hipocampo.....	Página 33
Figura 10: Imuno-histoquímica.....	Página 34
Figura 11: Marcação com CD68.....	Página 35
Figura 12: Marcação com GFAP no córtex.....	Página 35
Figura 13: Marcação com GFAP no hipocampo.....	Página 36
Figura 14: Proteína tau fosforilada.....	Página 37

Lista de Siglas e Abreviações

AgPR: peptídeo relacionado a Agouti
APC: célula apresentadora de antígeno
BHE: barreira hematoencefálica
Cap: proteína ativadora catabólica
CCL2: quimiocina C-C ligante 2
CRP: proteína C reativa
DAB: diaminobenzidina
DM 2: diabetes Mellitus do tipo 2
ELISA: ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
ERK: cinase reguladora de sinal extracelular
FABP4/ap2: proteína de ligação a ácidos graxos 4/ proteína de adipócito 2
GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFAP: proteína glial fibrilar ácida
GLP-1: peptídeo 1 semelhante ao glucagon
HDL: lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase
IKK: I κ B cinase
IL: interleucina
IL-10: interleucina 10
IL1- β : interleucina 1-beta
IL-6: interleucina 6
IRS-1: substrato 1 do receptor de insulina
JNK: cinase c-Jun N-terminal
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
mTor: *mammalian target of rapamycin*
Myd88: proteína de diferenciação mieloide 88
NF- κ B: fator nuclear kappa-B
NLR: Receptor do tipo *Noll*
NPY: neuropeptídeo Y
PBS: tampão fosfato-salino
PKR: proteína cinase dependente de RNA de dupla fita
SEK: proteína cinase ativada por estresse
SNC: sistema nervoso central
TCD4⁺: linfócitos T CD4⁺
TCD8⁺: linfócitos T CD8⁺
TGF- β : fator de transformação de crescimento beta
TLRs: receptores do tipo *Toll*
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

Introdução.....	2
Hipótese.....	15
Objetivo geral	15
Objetivos específicos	15
Material e métodos.....	16
1. Animais	16
2. Dieta	17
3. Consumo alimentar	18
4. Acompanhamento das fases do ciclo estral	19
5. Coleta de tecidos	19
6. Dosagens séricas.....	20
7. Dosagem de citocinas no encéfalo.....	20
8. Imuno-histoquímica.....	21
8.1 Fixação.....	21
8.2 Emblocamento em parafina	21
8.3 Imuno-histoquímica.....	21
9. Homogeneização	23
10. <i>Western blotting</i>	23
11. Análise estatística	24
Resultados.....	25
1. Consumo alimentar	25
2. Perfil lipídico	28
3. Peso corporal	28
4. Tecido adiposo	29
5. Homeostase da glicose	30
6. Adipocinas	32
7. Citocinas	32
09. Ativação microglial e astrocitária	34
10. Proteína <i>tau</i> fosforilada	37
Conclusão.....	50
Referências.....	52

Introdução

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada como uma doença multifatorial, diagnosticada quando o índice de massa corporal (IMC) é maior do que 30 kg/m^2 para humanos (Kanasaki e Koya, 2011). Também é considerado como um caso de obesidade quando a circunferência abdominal é superior a 89 centímetros para mulheres e 102 centímetros para homens, ou a relação cintura/quadril é superior a 0,8 para mulheres e 0,9 para homens (Cetin e Nasr, 2014). Os números crescentes nos casos de obesidade humana, em sua maioria, são causados pelo desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, o que resulta em um aumento do tecido adiposo, que, quando está acima de determinados valores, é prejudicial à saúde. O acúmulo excessivo de tecido adiposo resulta em diminuição da qualidade e da expectativa de vida por estar relacionado ao aumento da prevalência de doenças como o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, doenças das vias respiratórias, neurodegeneração e alguns tipos de câncer (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Atualmente, a obesidade assume proporções pandêmicas e, segundo a Organização Mundial da saúde (OMS, 2011), o sobrepeso (quando o IMC está entre 24,9 e 30) atinge cerca de 1,6 bilhões de indivíduos acima de 15 anos. No Brasil, cerca de 40% da população apresenta excesso de peso, sendo que a obesidade atinge 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres adultas (dados do IBGE para 2002/2003). A projeção da OMS – feita em 2005, quando os obesos somavam aproximadamente 400 milhões de indivíduos- é de que, em 2015, o número de obesos ultrapasse os 700 milhões (um aumento de 75% dos casos em 10 anos).

O tecido adiposo secreta inúmeros peptídeos e proteínas biologicamente ativos, chamados de adipocinas. Esses componentes atuam controlando o balanço energético do organismo e também exercem um papel no controle imunológico. Entre as adipocinas secretadas, estão incluídas as citocinas produzidas pelo tecido adiposo. A inflamação é caracterizada pelo envolvimento entre citocinas pró e anti-inflamatórias. As citocinas proinflamatórias são, por exemplo, interleucina-1, fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (IFN- γ), interleucina-12, interleucina-18, entre outros. As citocinas anti-inflamatórias são a interleucina-4, interleucina-10, interleucina-13, interferon alfa (IFN- α), entre outros (Cavaillon, 2001).

Na década de 1990, a descrição da expressão e secreção aumentada de Fator de necrose tumoral α pelo tecido adiposo de roedores obesos, fez a primeira ponte entre a inflamação na obesidade e a resistência à insulina (Hotamisligil e Spiegelman, 1994). Logo após, a partir da descrição da leptina, um hormônio específico dos adipócitos, com capacidade de controlar o balanço energético do organismo, o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um verdadeiro órgão endócrino (Zhang et al., 1994).

Praticamente todas as adipocinas estão com a regulação da sua secreção alterada na obesidade. Assim como o TNF- α , várias adipocinas que estão implicadas na patogênese da inflamação e também da resistência à insulina são produzidas em maior quantidade na medida em que o tecido adiposo vai aumentando, as quais geram alterações metabólicas. Por outro lado, algumas adipocinas com efeitos anti-inflamatórios ou que favorecem a sensibilidade à insulina, como a adiponectina, estão diminuídas. Algumas vezes, ainda, pode ocorrer resistência à ação de adipocinas, o que pode impedir os efeitos antiobesidade e sensibilizadores à insulina de algumas adipocinas, como a leptina (Maury e Brichard, 2010).

O tecido adiposo apresenta várias características diferentes dos tecidos endócrinos clássicos (Guerre-Millo, 2004). Por exemplo, os diferentes depósitos de tecido adiposo, em diferentes regiões anatômicas (tecido adiposo visceral ou subcutâneo), são heterogêneos não só em sua capacidade metabólica, como também no padrão de secreção de adipocinas. As diferenças entre as características secretórias dos diferentes depósitos de tecido adiposo parecem ter repercussões locais via mecanismo autócrino ou parácrino. Diretamente no fígado, no caso das substâncias produzidas pela gordura intraperitoneal, ou nos outros órgãos, uma vez que o tecido adiposo pode contribuir para os níveis sistêmicos de algumas adipocinas (Klein et al., 2007). Outra diferença dos tecidos secretórios clássicos, é que o tecido adiposo é composto por tipos celulares distintos: adipócitos maduros e células estromais vasculares (incluindo macrófagos) que, por sua vez, podem contribuir para a variedade de substâncias produzidas pelo tecido adiposo (Maury e Brichard, 2010).

Uma das adipocinas com função especial sobre a inflamação é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O TNF- α é mais expresso no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo e é mais abundantemente produzido pelas células estromais vasculares (especialmente macrófagos) do que pelos adipócitos propriamente ditos (Fain et al., 2004, Maury et al., 2009). A maioria dos efeitos do TNF- α sobre o tecido adiposo são mediadas pelo subtipo de receptor 1 (TNFR1), e a

subsequente ativação de várias vias de transdução de sinal. Duas vias de sinalização intracelular, ativadas a partir de dois fatores de transcrição, estão associadas aos efeitos proinflamatórios e de resistência à insulina na obesidade, a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) e a via da cinase do c-JunNH2 terminal (JNK). Essas vias são ativadas por vários estímulos, incluindo citocinas proinflamatórias, como o próprio TNF- α , Interleucina-1 β , Interleucina-6, entre outros (Shoelson et al., 2006).

Além de estimular adipocinas proinflamatórias (Maury et al., 2009), o TNF- α inibe adipocinas antiinflamatórias, como a adiponectina (Bruun et al., 2003). Essas características do TNF- α o apontam como crucial para o prejuízo da regulação da secreção de adipocinas que ocorre na obesidade (Maury et al., 2009).

A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos. Inicialmente, a leptina foi descrita como o sinal do tecido adiposo ao sistema nervoso central para inibir o consumo de alimento e diminuir o peso corporal (Zhang et al., 1994). Esse conceito veio da observação de que tanto humanos quanto roedores sem leptina funcional manifestavam tanto comportamento alimentar voraz quanto obesidade, enquanto o tratamento com leptina exógena era capaz de reverter o quadro. Com o passar do tempo, viu-se que a leptina costuma estar presente em altos níveis no sangue de indivíduos obesos que possuem grandes reservas de energia e resistência à leptina (Ahima, 2008). Os níveis circulantes de leptina correspondem à massa adiposa, mas também refletem imediatamente as mudanças no estado nutricional. Por exemplo, os níveis circulantes caem logo após o início do jejum (Becker et al., 1995). A secreção de leptina depende do tipo de depósito adiposo, sendo produzida em mais quantidade pelo tecido adiposo subcutâneo do que pelo tecido adiposo visceral (Montague et al., 1998). A leptina age no encéfalo e em vários tecidos periféricos, como as células do pâncreas, do fígado e do sistema imune. As ações centrais da leptina, em particular no hipotálamo, estão mais relacionadas à homeostase energética e às funções reprodutivas (Badman e Flier, 2007).

A adiponectina é uma proteína produzida abundantemente pelo tecido adiposo e, como a leptina, sua expressão é restrita a células adiposas maduras (Maeda et al., 2012, Halleux et al., 2001). Ao contrário da maioria das adipocinas, a adiponectina circulante é correlacionada negativamente com o índice de massa corporal (Brichard et al., 2003) e está diminuída em indivíduos obesos, em pacientes com diabetes *mellitus* tipo dois ou em pacientes com doenças cardiovasculares (Ouchi e Walsh, 2007). Os mecanismos que estão envolvidos na subprodução de adiponectina envolvem o estado hormonal anormal, junto com o aumento do estresse oxidativo e o

estado proinflamatório que prevalece na obesidade (Delporte et al., 2002, Furukawa et al., 2004, Bruun et al., 2003). A ligação da adiponectina a seus receptores causa inibição da gliconeogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos, estímulo do gasto energético e inibição tanto do estresse oxidativo quanto da inflamação (Capeau, 2007, Yamauchi et al., 2007). A adiponectina também tem propriedades sensibilizantes à insulina, antiaterogênicas, antiinflamatórias e antioxidantes (Maury e Brichard, 2010).

A resistência à insulina começou a ser estudada em 1936, quando Himsworth observou que havia dois tipos de diabetes: aquele que é sensível à insulina, mas simplesmente não dispõe de insulina, e aquele em que não falta insulina, porém é insensível aos efeitos da insulina (Himsworth, 1936). Contudo, a mensuração direta da insulina só pode ser feita a partir de 1960 (Yalow et al., 1965), quando um estudo relatou que obesos diabéticos apresentavam mais insulina do que controles eutróficos.

A associação entre a resistência à insulina e a resposta imune foi reconhecida com a identificação da resistência à insulina em estados infecciosos (Clowes et al., 1978, Wichterman et al., 1979). Várias doenças associadas com a resposta inflamatória ativa podem apresentar resistência à insulina como característica (hepatite do tipo C, síndrome da imunodeficiência adquirida, artrite reumatóide (Bahtiyar et al., 2004, Sidiropoulos et al., 2008). Além disso, o salicilato, um medicamento com efeito anti-inflamatório, pode provocar melhora da sensibilidade à insulina (Shoelson et al., 2006).

Na década de 1990 (Hotamisligil e Spiegelman, 1994), o TNF- α foi apontado como possível inibidor da sinalização intracelular da insulina pela sua capacidade de bloquear o receptor de insulina. Nessa época, já se sabia que os pacientes com diabetes do tipo 2 apresentavam estado inflamatório (Fearnley et al., 1959, Ogston e McAndrew, 1964). A relação entre o estado inflamatório e o estado metabólico ainda não estava bem estabelecida. Essa conexão começa a se estabelecer mais tarde, com a observação de que, quando comparado ao tecido adiposo de indivíduos magros, o tecido adiposo de indivíduos obesos secreta maior quantidade de citocinas inflamatórias e que essas citocinas inflamatórias podem inibir a sinalização de insulina (Hotamisligil et al., 1995, Hotamisligil et al., 1996). Estudos genéticos usando RNA mensageiro de interferência em genes de mediadores inflamatórios também mostraram efeitos benéficos sobre a ação da insulina (Uysal et al., 1997).

O estado inflamatório devido ao estado metabólico obeso não se caracteriza pelos sinais cardinais da inflamação (rubor, inchaço, dor e calor). As respostas

clássicas incluem aumento do metabolismo basal e rápida resposta do sistema imune no local do dano ou da infecção. Normalmente, uma vez que a infecção ou o dano seja resolvido, o estado inflamatório também é freado (Hotamisligil, 2006). Por outro lado, o gatilho para a inflamação na obesidade é metabólico, causado pelo desequilíbrio entre a ingestão de nutrientes e o gasto energético e, caso haja perda de peso, a inflamação é revertida. Sinais metabólicos que emergem de células metabólicas (principalmente adipócitos), iniciam a resposta inflamatória e alteram a homeostase metabólica (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Geralmente, um patógeno inicia a inflamação, ativando uma via de sinalização na célula hospedeira ou na célula imune sentinela, que dá origem a uma resposta imune. Entretanto, ainda não se sabe exatamente como se dá o sinal para iniciar a inflamação em animais obesos ou que ingerem excesso de nutrientes, especialmente os ácidos graxos saturados. Contudo, já se pode afirmar que o sinal se origina nas células metabólicas (adipócitos, miócitos ou hepatócitos), as quais podem iniciar uma resposta frente a uma situação nociva. Por exemplo, o adipócito pode ativar várias vias de sinalização inflamatória, como a ativação do inflamassoma, das vias cinase c-JUN terminal (JNK) e fator nuclear κ B (NF- κ B), e produzir citocinas proinflamatórias. Cabe ressaltar que o aumento nos níveis de citocinas proinflamatórias em tecidos de indivíduos obesos é significativo, porém modesto em comparação àquele que ocorre durante uma infecção, trauma ou resposta imune aguda (Gregor e Hotamisligil, 2011).

A primeira descrição da inflamação em tecidos de camundongos obesos mostrou níveis aumentados de TNF- α no tecido adiposo, e também dentro dos adipócitos, em comparação a indivíduos magros (Hotamisligil et al., 1995). Após o primeiro estudo, vários outros surgiram, cada vez mais, apontando para diferenças entre os perfis inflamatórios entre indivíduos obesos e eutróficos. Vários estudos apontam que, além do TNF- α , outras citocinas proinflamatórias se apresentam aumentadas em tecidos de indivíduos obesos, como IL-6, IL1- β e muitas outras (Shoelson et al., 2006, Berg e Scherer, 2005). Contudo, não apenas o tecido adiposo costuma apresentar maiores níveis de expressão de citocinas proinflamatórias. Sabe-se que outros tecidos também apresentam esse perfil, como fígado, músculo, pâncreas e encéfalo (Cai et al., 2005, Ehses et al., 2007, De Souza et al., 2005, Saghizadeh et al., 1996).

Estudos das vias de sinalização celular identificaram as proteínas JNK, IKK (I κ B cinase) e, mais recentemente, a proteína PKR (proteína cinase dependente de RNA) como contribuintes principais da indução da inflamação em tecidos envolvidos

com o metabolismo (Solinas e Karin, 2010, Nakamura et al., 2010). Além disso, o sensor imunológico conhecido como inflamassoma e os receptores Toll-Like (TLRs) do sistema imune inato, também estão mais ativados em tecidos de animais obesos do que quando comparados aos controles. Adicionalmente, embora os fatores de atração e/ou ativação de células imunes em tecidos obesos não estejam bem elucidados, sabe-se que células isoladas da medula óssea podem migrar até um meio de cultura contendo adipócitos explantados de animais obesos, identificando uma possível conexão entre tecidos de animais obesos e a infiltração de células imunológicas (Ito et al., 2008).

O estado de ativação das células imunes que migram para o tecido adiposo (seja M1 ou M2; pró-inflamatório ou anti-inflamatório, respectivamente) é influenciado por fatores metabólicos (Gregor e Hotamisligil, 2011). Sabe-se que tecidos de camundongos obesos tendem a apresentar um aumento da população pró-inflamatória (M1) de macrófagos que, por sua vez, podem prejudicar a ação da insulina (Olefsky e Glass, 2010).

Todavia, não apenas macrófagos podem migrar para tecidos metabólicos em obesos. Tanto mastócitos como células *Natural Killer* (NK) também estão aumentados no tecido adiposo de obesos e podem contribuir para o estado inflamatório e para a fisiopatologia metabólica (Liu et al., 2009, Ohmura et al., 2010). Além disso, já foi verificada alteração da população de células T do tecido adiposo de animais obesos. A relação de células T CD8+/ TCD4+ aumenta de acordo com o aumento da obesidade, e a população de células T reguladoras (T reg) diminui, criando um ambiente favorável à ativação imune (Feuerer et al., 2009, Nishimura et al., 2009).

Outro fator que diferencia a inflamação clássica da metainflamação (termo utilizado para indicar a inflamação em decorrência da obesidade, ou de vias metabólicas alteradas, é a cronicidade. A secreção de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de células imunológicas nos tecidos metabólicos, em caso de obesidade, crescem gradualmente e tendem a não desaparecer, a menos que haja perda de peso. Esses eventos contrastam com a resposta inflamatória aguda, que tende a terminar com a resolução da inflamação (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Um estudo relatou aumento na expressão de genes relacionados a macrófagos no tecido adiposo de indivíduos obesos já na terceira semana após o início de uma dieta hiperlipídica (Xu et al., 2003), embora um aumento mais acentuado ocorra a partir da décima sexta semana, coincidindo com a detecção da resistência à insulina. Outro estudo (Strissel et al., 2007), também verificou aumento da expressão

de genes relacionados a macrófagos em tecido adiposo, mas somente a partir da oitava semana. Esses autores correlacionaram o aumento da infiltração de macrófagos com a morte celular de adipócitos, apontando os macrófagos como responsáveis pela remoção das células mortas e pelo remodelamento do tecido adiposo. O motivo do remodelamento do tecido adiposo durante a obesidade ainda é uma área pouco explorada. Parece que o estado inflamatório induzido pela obesidade não é tão crítico a ponto de estimular a resolução desta condição, e, por isso, os sinais inflamatórios são mantidos a longo prazo. Além disso, uma vez que a obesidade é uma doença crônica, há a persistência do estímulo. Outra diferença entre o paradigma clássico de inflamação e a metainflamação é o estado metabólico. Enquanto no paradigma clássico há um aumento da taxa metabólica, a metainflamação é caracterizada pela diminuição da taxa metabólica (Gregor e Hotamisligil, 2011).

O tecido adiposo é o local onde as primeiras alterações inflamatórias foram descritas. Mediadores inflamatórios no tecido adiposo podem causar resistência à insulina em adipócitos (Hotamisligil e Spiegelman, 1994). Por exemplo, adipócitos tratados com TNF- α exibem diminuição da sensibilidade à insulina e diminuição da captação de glicose (Engelman et al., 2000, Stephens et al., 1997). Além disso, como resposta a sinais provenientes de nutrientes ou de citocinas, JNK ou IKK são ativadas e podem ter como alvo o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), para fosforilação de serina, o que inibe a via de sinalização de insulina. Não apenas JNK e IKK estão envolvidas no bloqueio desta via, como muitas outras proteínas, como PKR, cinase ativada por estresse (SEK), cinase reguladora de sinal extracelular (ERK) e *mammalian target of rapamycin* (mTor), resultando na ativação de diversas vias celulares que podem culminar com a diminuição da sinalização da insulina (Boura-Halfon e Zick, 2009).

Alguns grupos de pesquisa fizeram deleções completas de populações de células do sistema imune. Um estudo depletou a população de células CD11c+, que incluem macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, entre outros, e mostrou que a sensibilidade à insulina aumentou nos animais que tiveram as células depletadas (Patsouris et al., 2008). Outros trabalhos, envolvendo a depleção de células T CD8+, com aumento de células T CD4+ e células T reguladoras, relataram melhora na sensibilidade à insulina de camundongos obesos (Feuerer et al., 2009, Nishimura et al., 2009). Pesquisas com depleção de mastócitos e células *natural killer* também verificaram redução da inflamação no tecido adiposo e melhora da homeostase da glicose (Liu et al., 2009, Ohmura et al., 2010). Esses estudos apontam o sistema imune e suas ações inflamatórias como contribuintes para a ruptura da função

metabólica. Portanto, a remoção de componentes imunológicos celulares seria benéfica para a sinalização da insulina. Dessa forma, evidencia-se o papel da inflamação do tecido adiposo na manifestação da resistência à insulina que acontece com a obesidade.

Embora não seja considerado um órgão metabólico clássico, o encéfalo é o local onde se dá a regulação do apetite e o controle do gasto energético. O encéfalo e, especificamente o hipotálamo, responde a sinais endócrinos e metabólicos, incluindo-se os próprios nutrientes, a insulina liberada pelo pâncreas e a leptina secretada pelo tecido adiposo (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Tanto a leptina quanto a insulina têm importantes efeitos anorexígenos, mediados pela sinalização hipotalâmica. É interessante notar que, na obesidade, o hipotálamo tende a apresentar resistência à insulina e à leptina, levando à perda do controle do comportamento alimentar e, conseqüentemente, exacerbando o ganho de peso (Obici e Rossetti, 2003). Além de influenciar o apetite, o sistema nervoso central pode influenciar também a resposta de órgãos periféricos a nutrientes, como se pode observar no controle hipotalâmico da produção hepática de glicose (Obici et al., 2002).

A inflamação tecidual do sistema nervoso central ocorre de forma diferente em relação aos tecidos periféricos. Isso acontece porque reações inflamatórias exageradas podem danificar esse tecido, que é muito delicado. Uma das características que diferencia a ação inflamatória do tecido nervoso e a inflamação nos tecidos periféricos é a presença da barreira hematoencefálica. Esta barreira hematoencefálica proporciona um ambiente controlado para a otimização da função neuronal, limitando a inflamação, impedindo a entrada de proteínas plasmáticas, bem como de células imunológicas periféricas e dos mediadores inflamatórios produzidos por elas (DeSalvo et al., 2011, Banerjee e Bhat, 2007). Além disso, o parênquima do sistema nervoso central apresenta um perfil anti-inflamatório, principalmente devido às concentrações de fator de crescimento tumoral β (TGF- β), IL-10 e gangliosídeos que podem ser tóxicos aos linfócitos T (Irani et al., 1996, Strle et al., 2001).

No sistema nervoso central, a microglia e os astrócitos são os principais responsáveis por iniciar a resposta a estímulos nocivos. A resposta a um patógeno, ou a algum dano, inicia com o reconhecimento de alguma característica estrutural do patógeno, ou alguma substância liberada pelo dano (Kawai e Akira, 2010, Kufer e Sansonetti, 2011), que ativa a via do TLR, que por sua vez ativa a via do NF- κ B, resultando na transcrição de genes da família das citocinas IL-1 β (O'Neill, 2004).

Alguns peptídeos permanecem sem serem clivados até a ativação da via da caspase-1, quando há liberação de IL1- β ativa (Martinon e Tschopp, 2004).

A ativação da via da caspase-1 é iniciada pela sinalização de um outro grupo de receptores das células da imunidade inata, os receptores NLRs (*nucleotide-binding-domain leucine-rich repeat-containing receptors*) (Stutz et al., 2009). A inter-relação entre a sinalização do TLR e do NLR protege contra danos, e as duas famílias de receptores são expressas em células que participam da imunidade inata no sistema nervoso central. A microglia expressa todos os tipos de TLRs, enquanto os astrócitos expressam alguns tipos (Downes e Crack, 2010, Gorina et al., 2009).

Uma vez ativada, a microglia secreta citocinas por meio da ativação da via do NLR, como IL1- β e IL-18 que, por sua vez, estimulam a produção de uma via de sinalização pró-inflamatória tanto na microglia quanto em astrócitos (Chakraborty et al., 2010, Halle et al., 2008, Salminen et al., 2008). Por exemplo, a IL1- β pode induzir a expressão de TNF- α e IL-6. Essas citocinas pró-inflamatórias podem alterar a função da barreira hematoencefálica e favorecer o recrutamento de leucócitos presentes no sangue. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias podem estimular tanto o recrutamento quanto a proliferação das células da imunidade inata do sistema nervoso central (Blamire et al., 2000). A infiltração de células do sistema imunológico periférico é importante para a defesa contra infecção e para reparar danos após trauma ou isquemia no SNC. Entretanto, é necessário que a inflamação gerada a partir do recrutamento de células periféricas seja contida para evitar os possíveis danos de uma resposta inflamatória excessiva ou inapropriada (Trifilo e Lane, 2004, Chen et al., 2001).

Alguns trabalhos indicam que determinadas vias inflamatórias estão mais ativadas no hipotálamo durante a obesidade. Um estudo mostrou aumento da expressão de TNF- α , IL1- β e IL-6, entre outros marcadores inflamatórios, no hipotálamo de camundongos tratados com uma dieta hiperlipídica, quando comparados aos seus controles (De Souza et al., 2005). Além disso, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica mostraram aumento da apoptose no hipotálamo (Moraes et al., 2009). Em outro estudo, em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, a ativação específica de IKK β encefálica resultou em aumento do consumo alimentar e ganho de peso, com resistência hipotalâmica significativa à insulina e à leptina (Zhang et al., 2008). No entanto, a inibição da sinalização de IKK β no encéfalo restaurou a sensibilidade à insulina e à leptina e preveniu o ganho de peso dos animais, resultando em melhora da homeostase da glicose. Mais evidências

apoiam a ideia de que a neuroinflamação pode exercer importante papel na resistência à insulina induzida pela obesidade. A via TLR, do sistema imune inato, está envolvida em reconhecer patógenos e iniciar a resposta imune apropriada. Sabe-se que, durante tratamento com dieta hiperlipídica, ácidos graxos saturados podem ativar, sozinhos, a via de sinalização TLR (Milanski et al., 2009). Além disso, a deleção da proteína de diferenciação mielóide 88 (Myd88) encefálica, que é uma molécula da via de sinalização TLR, reforçou a sinalização de leptina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparados aos controles. A recuperação da sinalização de leptina foi acompanhada por um decréscimo do consumo de alimentos e por diminuição do ganho de peso, com consequente melhora da homeostase da glicose (Kleinridders et al., 2009).

Os resultados relatados até aqui revelam que as vias inflamatórias do sistema nervoso central na obesidade podem ser as principais envolvidas no prejuízo à homeostasia metabólica sistêmica, contribuindo para a inibição da sinalização da insulina e da leptina e impedindo a regulação do consumo de alimentos, do peso corporal e do metabolismo sistêmico.

Pesquisas recentes indicam que o peso corporal excessivo e a obesidade podem ser facilitadores e preditores de doenças neurodegenerativas (Cai, 2013, Gupta et al., 2012). Embora os mecanismos patogênicos que expliquem essa correlação ainda não estejam bem elucidados, estudos epidemiológicos e clínicos têm associado fatores inflamatórios, como proteína C-reativa (Anty et al., 2006, Mohamed-Ali et al., 1997), TNF- α (Hotamisligil e Spiegelman, 1994), IL-6 (Mohamed-Ali et al., 1997, Heinrich et al., 1990) e moléculas de adesão (Kressel et al., 2009) a disfunções neurológicas subsequentes a desordens metabólicas.

Além disso, há a participação de células gliais, como microglia e astrócitos, na inflamação central induzida pela alimentação em excesso. A alimentação com uma dieta hiperlipídica levou a uma produção excessiva de IL-6 pela microglia ativada (Tapia-Gonzalez et al., 2011) e ativação de astrócitos por vários estímulos, tais como citocinas próinflamatórias (Belanger et al., 2011) e ácidos graxos saturados (Gupta et al., 2012), o que, por sua vez, estimulou a liberação de mais citocinas próinflamatórias, como TNF- α e IL-6, que podem contribuir com a metainflamação central.

O envelhecimento é caracterizado por uma deterioração progressiva nas funções fisiológicas e nos processos metabólicos (Jacob et al., 2011), o que, por sua vez, diminui a adaptação do indivíduo ao meio ambiente. Além disso, esse é o momento da vida em que o dano cerebral acumulado ao longo da vida se manifesta

(Pisarska et al., 2000), aumentando sua vulnerabilidade aos processos patológicos. Mais de 35% dos indivíduos com mais de 65 anos são obesos nos Estados Unidos e a previsão é que, em 2030, a obesidade atinja metade da população de idosos (Wang et al., 2007). Esses dados são preocupantes, em virtude dos prejuízos que estão associados à obesidade, como doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Além disso, os dados citados chamam atenção das autoridades para esse grupo específico da população, que se torna mais vulnerável, acarretando problemas econômicos e dos sistemas de saúde (Hubert et al., 1983).

Há várias evidências de que a obesidade tem efeitos deletérios nas funções cerebrais e cognitivas em indivíduos idosos (Gustafson et al., 2007, Beydoun et al., 2008). Numa coorte muito conhecida, o estudo de Framingham, a razão cintura/quadril elevada foi associada a significativo declínio cognitivo na idade avançada (Wolf et al., 2007). Além disso, a obesidade também está associada com prejuízo cognitivo e também com o aumento da incidência da doença de Alzheimer (Gorelick et al., 2011, Luchsinger, 2008). Esse transtorno é caracterizado por prejuízo da função cognitiva e da interação social, associado à perda de memória e alterações emocionais (Grammas, 2011, Stefani e Liguri, 2009). Morfologicamente, a doença se caracteriza por acúmulo do peptídeo β -amilóide no espaço extracelular (originando as placas senis) (Querfurth e LaFerla, 2010). Adicionalmente, a formação dos emaranhados neurofibrilares, a partir da intensa fosforilação da proteína tau, também faz parte da fisiopatologia da doença de Alzheimer (Querfurth e LaFerla, 2010).

Tanto a formação de placas senis quanto a formação dos emaranhados neurofibrilares, são acompanhadas de ativação microglial e astrocitária e da elevação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios no sistema nervoso central (Lee et al., 2010, Lue et al., 2001, Verkhratsky et al., 2010). Em longo prazo, este estado inflamatório causa ativação glial e dano neuronal, o que, por sua vez, dá continuidade a um ciclo de neuroinflamação e neurodegeneração. Contudo, ainda não está claro se a neuroinflamação é causa ou consequência da doença de Alzheimer. Porém, sabe-se que há correlação entre os níveis periféricos elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), e o maior risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (Tan et al., 2007).

Sugere-se que a ativação das vias inflamatórias contribua para os prejuízos das funções cognitivas relacionados à obesidade (Pistell et al., 2010), e que, embora os mecanismos pelos quais a obesidade promova a neuroinflamação ainda sejam pouco entendidos, os dados obtidos até então sugerem que a idade avançada exerce

efeito sinérgico com a obesidade. Ainda não há estudos que tenham como objetivo investigar os mecanismos específicos, relacionados ao envelhecimento, que exacerbam a neuroinflamação induzida pela obesidade, no entanto há evidências de que mecanismos envolvidos na regulação da integridade da barreira hematoencefálica estejam envolvidos tanto na instalação quanto no desenvolvimento do declínio cognitivo e da doença de Alzheimer (Zlokovic, 2011, Tucsek et al., 2013).

Estudos com animais indicam que a obesidade está relacionada tanto com dano oxidativo no sistema nervoso central, quanto com a neuroinflamação (Farr et al., 2006, Pan et al., 2008, Lavin et al., 2011). Em camundongos machos obesos, por exemplo, alterações metabólicas são seguidas de prejuízo do aprendizado e diminuição da plasticidade sináptica hipocampal (Hwang et al., 2010). Isso porque várias adipocinas são citocinas proinflamatórias capazes de cruzar a barreira hematoencefálica (Kastin e Pan, 2003, Pan et al., 2007) e várias dessas são indutoras de astrogliose e microgliose reativa. Já se observou astrogliose reativa em camundongos obesos em algumas regiões do hipotálamo, do hipocampo e do córtex cerebral (Pan et al., 2008, Hsuchou et al., 2009, Ouchi et al., 2011). Entretanto, ainda não se sabe exatamente quais os fatores metabólicos que podem estar relacionados à gliose reativa nesses animais obesos.

A astrogliose é caracterizada pela síntese aumentada de proteína ácida fibrilar (GFAP), um filamento intermediário encontrado em astrócitos maduros, que modula a morfologia e a atividade astrocitária promovendo a estabilidade nesses filamentos (Eng et al., 1971, Eng et al., 2000). Além da indução da secreção de várias citocinas durante a neuroinflamação, a astrogliose reativa também é um marcador de dano encefálico e, como já descrito, dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas são sabidamente indutoras de dano ao sistema nervoso central (Hoane et al., 2011, Langdon et al., 2011).

Embora os astrócitos sejam as células mais abundantes no encéfalo, a microglia mostra uma rápida resposta a desafios inflamatórios e traumáticos (Streit, 2002, Zhang et al., 2010), com mudanças em marcadores comuns de leucócitos, particularmente CD11b, CD45 e CD68.

A atividade proinflamatória durante a obesidade está associada a inúmeros prejuízos à homeostase. Por outro lado, as modificações fisiológicas que acontecem em decorrência do envelhecimento culminam em uma incapacidade de manutenção do equilíbrio homeostático, diminuindo a capacidade de adaptação do indivíduo ao ambiente, com maior vulnerabilidade aos processos patológicos (Balcombe e Sinclair,

2001). Dessa forma, as doenças potencializadas pela obesidade parecem ser ainda mais prejudiciais em idosos (Souza et al., 2007, Teixeira e Guariento, 2010). Indivíduos obesos tendem a apresentar inflamação sustentada, principalmente pela liberação de moléculas próinflamatórias, especialmente pelo tecido adiposo. Esse fator pode aumentar a suscetibilidade desses indivíduos obesos ao desenvolvimento de doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, por exemplo (Ouchi et al., 2011). Por isso, é importante que seja investigado de que forma a obesidade pode alterar a homeostase do sistema nervoso central em indivíduos de diferentes idades.

Hipótese

A hipótese do presente trabalho é que a obesidade induzida por dieta de cafeteria aumenta a síntese e liberação de moléculas pró-inflamatórias, tanto no sangue quanto em estruturas associadas à cognição, como o hipocampo e o córtex cerebral, no sistema nervoso central, e provoca hiperfosforilação da proteína tau de modo diferente, de acordo com a idade.

Objetivo geral

Avaliar a participação da obesidade, induzida por dieta de cafeteria, na indução do estado pró-inflamatório no sistema nervoso central e verificar a diferença de suscetibilidade a essas alterações devido à idade dos indivíduos.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito da obesidade e comparar os grupos de diferentes idades em relação aos seguintes fatores:

- Ganho de peso semanal e consumo alimentar de animais tratados com dieta de cafeteria e animais tratados com dieta de biotério, nas diferentes idades;
- Perfil lipídico, glicemia de jejum e níveis séricos de insulina, leptina, adiponectina, IL-10 e IL-1 β ;
- Concentração de IL-1 β no córtex e no hipocampo;
- Ativação microglial por marcação com CD68, e ativação astrocitária por marcação com GFAP no córtex cerebral e no hipocampo.
- Fosforilação da proteína tau no córtex cerebral e no hipocampo.

Material e métodos

1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar adultas, com 3 e 18 meses de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram separados em grupos de, no máximo, cinco por caixa, com livre acesso à dieta e à água, e permaneceram em ambiente com temperatura controlada entre $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 6 às 18h). Os animais foram divididos em quatro grupos e tratados durante 12 semanas: Controle 6 meses: animais de 3 meses, no início do experimento, que receberam ração padrão e água; dieta 6 meses: animais de 3 meses, no início do experimento, que receberam dieta de cafeteria com refrigerante e água; controle 21 meses animais com 18 meses, no experimento, que receberam dieta padrão e água; dieta 21 meses: animais de 18 meses, no início do experimento, que receberam dieta de cafeteria com refrigerante e água (Figura 1). O desenho experimental está representado na Figura 2. Esse projeto foi aprovado no CEP da UFRGS sob número 21962.

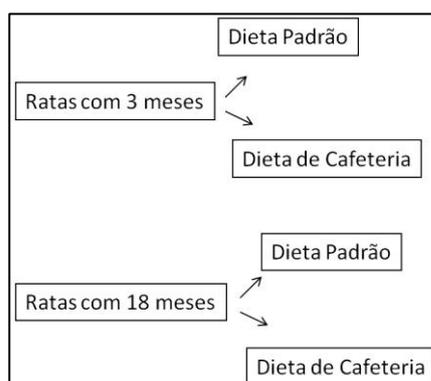


Figura 1. Grupos experimentais.

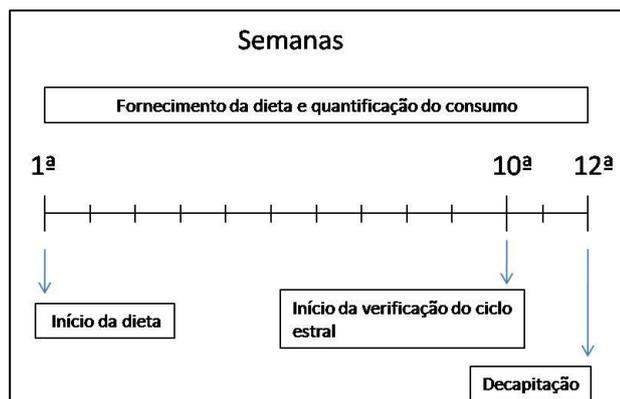


Figura 2. Desenho experimental

2. Dieta

A dieta de cafeteria constitui um modelo de estudo de obesidade exógena, e é caracterizada pelo estímulo à ingestão de alguns alimentos que, normalmente, fazem parte dos hábitos alimentares dos países ocidentais. Muitos itens alimentares empregados neste modelo são ricos em carboidratos simples e gorduras, resultando em alimentação hipercalórica, quando comparada à ração padrão de biotério. A oferta destes alimentos resulta em aumento da ingestão calórica, obesidade, resistência à insulina, entre outros (Prada et al., 2005).

Este tipo de dieta tem sido empregado em ratos 7 dias após o parto (Weisberg et al., 2003), a partir do desmame (21 dias de vida) (Prats et al., 1989), ou mesmo em ratos adultos (Rothwell e Stock, 1979). Em geral, a dieta é administrada por 3 a 8 semanas, mas já foram realizados estudos com um período maior do que 5 meses (De Schepper et al., 1998). A quantidade de itens de consumo disponíveis aos animais varia de 2 a 40, sendo que alguns autores descrevem o emprego de 2 itens alimentares diferentes a cada dia, dentro de uma relação de 10 itens (Flatt et al., 1984), enquanto outros oferecem 12 itens diariamente, sem variação (Prats et al., 1989).

A dieta padrão oferecida aos animais nesse estudo foi a ração de biotério (NUVILAB CR-1), que possui 2,95 kcal/g, sendo 55% de carboidratos, 22% de proteínas e 4,5% de lipídeos.

A dieta experimental escolhida foi uma dieta palatável hiperlipídica e hipercalórica, composta de aproximadamente 16% de proteínas, 40% de gordura e 44% de carboidratos, adaptada de uma dieta hiperlipídica conhecida como dieta de cafeteria ou dieta ocidental (Estadella et al., 2004), seguindo-se os padrões utilizados por Goularte (Goularte et al., 2012). A dieta de cafeteria foi disponibilizada à vontade,

todos os dias, aos animais do grupo dieta, e foi composta de acordo com a tabela 1. Os alimentos foram agrupados de acordo com a Tabela 2 e cada grupo de alimentos foi oferecido em dias alternados.

Tabela 1: Alimentos oferecidos na dieta de cafeteria. Adaptada de Goularte et al. 2012

Alimento	Qtd(g)*	kcal*	CHO(g)*	PTN(g)*	LIP(g)*	Na⁺(mg)*
Ração Padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	2,7
Salame (Majestade, Brasil)	1	3,38	0	0,32	0,24	12,48
Bisnaga Seven Boys	1	2,95	0,53	0,09	0,04	4,7
Yokitos Bolinha Sabor Queijo (Yoki, Brasil)	1	4,8	0,6	0,06	0,24	11,04
Deliket Jelly Bean	1	3,8	0,95	0	0	0,2
Lingüiça (Perdigão, Brasil)	1	3,18	0,01	0,18	0,32	15,73
Bolo de Chocolate (Nutrella, Brasil)	1	3,25	0,5	0,05	0,12	6,18
Bolacha Maisena	1	4,3	0,73	0,07	0,12	4,33
Marshmallow	1	3,3	0,8	0,04	0	0,31
Presunto gordo com capa de gordura (Sadia, Brasil)	1	1,55	0	0,17	0,09	8,33
Salgadinho Fritello	1	5,08	0,52	0,08	0,29	6,4
Biscoito Waffer de chocolate (Bauducco, Brasil)	1	5,2	0,63	0,05	0,27	1,13
Bala de Goma Dori Gomets	1	3,6	0,9	0	0	0,5
Coca-Cola (Coca-Cola, Brasil)	1	0,43	0,11	0	0	0,05

* Qtd= quantidade; kcal= kilocalorias; CHO= carboidratos; PTN= proteínas, LIP= lipídeos, Na+= sódio.

Tabela 2: Grupos de alimentos oferecidos em dias alternados. Adaptada de Goularte et al. 2012

	item 1	item 2	item 3	item 4	item 5
A	Ração Padrão	Salame	Salgadinho Yokitos	Bisnaguinha	Jelly Bean
B	Ração Padrão	Lingüiça	Bolo de Chocolate	Biscoito Maisena	Marshmallow Bala de
C	Ração Padrão	Presunto	Wafer	Salgadinho Fritello	Goma

3. Consumo alimentar

Os alimentos foram pesados antes de serem fornecidos aos animais. Vinte e quatro horas após o fornecimento, realizava-se a pesagem dos alimentos restantes. A medida do consumo foi calculada pelo peso dos alimentos fornecidos menos o peso dos alimentos restantes. A partir da quantidade de alimento consumida, fez-se o cálculo do consumo de cada nutriente, com uso das informações nutricionais dos alimentos oferecidos, assumindo-se o valor calórico de 4 kcal/g de carboidrato, 4 kcal/g de proteína e 9 kcal/g de lipídeos.

Os animais foram pesados, individualmente, uma vez por semana e também no dia da decapitação, para posteriores cálculos de variação de peso e índice adiposo (quantidade de gordura abdominal em gramas/peso corporal em gramas).

4. Acompanhamento das fases do ciclo estral

Após 10 semanas de dieta, o lavado vaginal de cada animal foi analisado diariamente. A coleta foi realizada com auxílio de uma pipeta plástica contendo soro fisiológico, introduzida no canal vaginal da fêmea, onde se fazia o lavado. O líquido era depositado sobre uma lâmina e analisado a fresco no microscópio óptico. Pela análise da composição celular do esfregaço, inferiu-se em qual fase do ciclo estral o animal se encontrava. O ciclo estral de ratas *Wistar* é dividido em 4 fases: proestro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais; estro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais cornificadas; metaestro, quando o lavado é composto de células epiteliais corneificadas e leucócitos, e diestro, quando o lavado é composto principalmente por leucócitos (Jacobs et al., 2014).

5. Coleta de tecidos

A fim de garantir menor influência dos hormônios sexuais sobre os parâmetros analisados, todas as coletas foram realizadas na fase do diestro do ciclo estral. Ao final de 12 semanas do início do experimento, foram retirados os alimentos e os refrigerantes das caixas às 7h da manhã. Às 13h, quando totalizavam 6 horas de jejum, realizou-se a decapitação e foram coletadas as estruturas de interesse. As frações de gordura visceral, perigonadal e retroperitoneal (que juntas constituem a gordura abdominal) foram retiradas e pesadas.

Fez-se a dissecação do encéfalo e a secção sagital do mesmo em superfície gelada. O hemisfério esquerdo foi imediatamente mergulhado em solução fixadora de

zinco (ver a seção de imuno-histoquímica). O córtex e o hipocampo do hemisfério direito foram dissecados e congelados para posteriores análises pelos métodos de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e *Western blotting*.

O sangue troncular foi coletado em tubos de ensaio contendo gel separador Vacuette® Ref.455071. Após período de coagulação, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 1000xg. O soro foi coletado, separado em alíquotas, e estocado a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

6. Dosagens séricas

Realizaram-se as dosagens séricas de insulina (Millipore® Rat/Mouse Insulin Cat. #EZRMI-13K), leptina (Invitrogen® Rat Leptin Cat.#KRC2281), adiponectina (Millipore® Rat adiponectin Cat.#EZRADP-62K), Interleucina 10 e Interleucina 1 β (eBioscience®, Rat IL-10 Cat.88-6010-22 e eBioscience® Rat IL-1 β Cat.E093071637) pela técnica Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), de acordo com as orientações dos fabricantes.

Realizaram-se, além das dosagens descritas acima, a dosagem sérica de glicose (In Vitro®, Ref. 10261), triacilgliceróis (Labtest® Ref.87), colesterol total (Labtest® Ref.76-2/100) e fração HDL (Labtest®Ref1350), por testes enzimáticos colorimétricos, de acordo com as orientações dos fabricantes.

A fim de mensurar a possível resistência à insulina dos animais, fez-se o cálculo do índice do HOMA (modelo de avaliação da homeostase) proposto por Matthews (Matthews et al., 1985), a partir dos valores de glicose e de insulina séricos ([glicemia em mmol/L x insulinemia em mU/L] / 22,5).

7. Dosagem de citocinas no encéfalo

A interleucina 1 β foi dosada nos homogeneizados (ver seção de homogeneização de tecidos) de córtex e hipocampo, pelo método de ELISA (kit

comercial eBioscience Cat E09307-1637), e os resultados foram normalizados para a quantidade de proteína no tecido.

8. Imuno-histoquímica

8.1 Fixação

Logo após as estruturas serem retiradas dos animais, os hemisférios esquerdos foram colocados em tubos individuais, contendo fixador de zinco no volume de 10 vezes o volume da peça, por 48 horas. O fixador de zinco contém, por litro, 0,5 g de acetato de cálcio, 5 g de cloreto de zinco, 5 g de acetato de zinco e o restante do volume de solução de Tris-HCl 0,1M, pH=7,6. Após a fixação com solução de zinco, as peças foram transferidas para solução de álcool 70%, onde permaneceram por, no máximo, uma semana.

8.2 Emblocamento em parafina

A fim de preservar a estrutura anatômica das peças, fez-se o emblocamento em parafina. Após as peças serem retiradas da solução de álcool 70%, passou-se à solução de álcool 80% por uma hora, depois realizaram-se dois banhos, de uma hora cada, em álcool 100%, seguidos por dois banhos, de uma hora cada, em álcool isopropílico, dois banhos, de uma hora cada, em xilol histológico, finalizando com dois banhos, de uma hora cada, em parafina, na estufa, à temperatura de derretimento (aproximadamente 60°C). Por fim, fez-se o emblocamento em parafina, com o cuidado de evitar a formação de bolhas, em formas plásticas específicas para histologia.

8.3 Imuno-histoquímica

Foram realizados cortes coronais em micrótomo, com lâmina metálica, na espessura de 8 µm cada e intervalo de 80 µm entre os cortes. Os cortes eram depositados, um a um, em água destilada à temperatura de 37°C, e posicionados em lâmina histológica coberta com solução de gelatina a 10%. A montagem de cada lâmina foi realizada incluindo um corte de cada grupo experimental.

Para a realização da imuno-histoquímica, inicialmente fazia-se a seleção das lâminas histológicas, que deveriam conter, pelo menos 3 secções de cada animal analisado, que pudessem fazer a representação ântero-posterior do encéfalo.

Primeiramente, fazia-se a desparafinização da lâmina, sempre na capela de exaustão, durante 7 minutos, sendo um minuto em cada solução: xilol, novamente xilol, álcool 100%, novamente álcool 100%, álcool 95%, álcool 90% e água destilada.

Após a desparafinização, fez-se o bloqueio da peroxidase. As lâminas foram mergulhadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e metanol a 10% em PBS (tampão fosfato salino), em incubação durante 30 minutos. Após a incubação, os cortes foram lavados duas vezes, quinze minutos cada, com solução de triton 0,2% em PBS.

Após a lavagem, realizou-se a incubação para bloqueio de sítios inespecíficos em solução de soro normal de cabra a 3% em solução de lavagem (triton + PBS), por 30 minutos. Somente após este último bloqueio, as bordas dos cortes foram suavemente enxugadas, e se fez o contorno com caneta hidrofóbica, a fim de limitar o escoamento da solução de anticorpos que seria aplicada em seguida.

Os anticorpos foram diluídos (CD68- Millipore® lote NG1869834, na proporção de 1:75, GFAP Millipore® lote LV1786434 na proporção de 1:750) em solução de bloqueio (soro normal de cabra + solução de lavagem). Depois, pipetou-se 50 µL da solução de anticorpo sobre cada corte. A seguir, as lâminas foram incubadas durante 48 horas a 4°C.

Após a incubação, os cortes foram lavados 2 vezes, com triton 0,2% em PBS por 10 minutos. Procedeu-se então a incubação com solução de anticorpo secundário IgG *antimouse* Santa Cruz® conjugado a peroxidase, na proporção de 1:500 em PBS. Após, eram realizadas duas lavagens de 5 minutos com PBS.

A revelação da imuno-histoquímica foi realizada com solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,06% em PBS, mais solução de peróxido de hidrogênio a 10% em água, na proporção de 1 µL da solução de peróxido de hidrogênio para cada 1 mL da solução de DAB. As lâminas foram mergulhadas na solução por 10 minutos, e depois realizou-se lavagem com PBS por um minuto. Após, as lâminas foram mergulhadas em solução de hematoxilina de Meyer por 30 segundos, e colocava-se em água corrente por 20 minutos.

Para finalizar, montou-se as lâminas, começando com a desidratação das mesmas, com dois banhos em álcool 96% por um minuto cada, dois banhos em álcool 100% por um minuto cada, e dois banhos em xilol histológico de um minuto cada. As lâminas foram montadas com uma gota de bálsamo do Canadá e lamínula histológica.

A visualização dos cortes histológicos foi realizada em microscópio óptico Nikon® modelo Eclipse E600 e, a captura das imagens, pelo sistema de captura de imagens Motic Images Plus® 2.0, no aumento de 200x. A análise das imagens capturadas foi realizada com o *software* ImageJ®.

9. Homogeneização

Realizou-se homogeneização de tecido do córtex cerebral e do hipocampo das amostras destinadas às técnicas de ELISA e *Western blotting*.

A homogeneização das estruturas foi realizada com tampão de lise (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, NP 40 10% e PMSF 1 mM, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 g em centrífuga refrigerada a 4°C. Após, foi feita a quantificação de proteínas do sobrenadante pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

10. *Western blotting*

Para a quantificação da expressão da proteína tau fosforilada (p-tau) em hipocampo e córtex, utilizou-se a técnica de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). O homogeneizado, composto por 60 µg de proteínas totais, foi colocado em cada poço do gel com tampão de carga e o padrão de peso molecular correu no mesmo gel. As amostras foram aquecidas a 100°C por 2 minutos antes de aplicadas ao gel.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, usando um sistema de transferência (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell), a 110 V por 1h30min. As membranas foram incubadas com leite em pó 8% em tampão Tris salino contendo 0,1% de tween 20 (TTBS) por 60 minutos, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas.

Após 3 lavagens com água destilada, as membranas foram incubadas por 16 a 18 horas (a 4°C) com o anticorpo primário anti-human phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 monoclonal antibody da Thermo Scientific® diluído em TTBS na proporção 1:1000. As incubações com os anticorpos secundários iniciaram após 3

lavagens com TTBS e duraram 2 horas a temperatura ambiente. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. Antes de proceder à revelação por quimioluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos com TBS (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A reação de quimioluminescência ocorreu com uso de um sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, com exposição das membranas ao filme autorradiográfico Hyperfilm (Amersham) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada pelo software Image J®.

Os resultados de cada membrana foram relativizados aos valores encontrados com a incubação das mesmas com o anticorpo primário anti-gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) na concentração de 1:1000. As amostras de todos os grupos experimentais foram processadas em paralelo.

11. Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas ou ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, quando indicado. Os resultados foram analisados com auxílio do software SPSS® versão 17.0, e os gráficos foram construídos com auxílio do software GraphPad Prism ® versão 5.0. O nível de significância admitido foi de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

1. Consumo alimentar

Os resultados de consumo alimentar foram analisados pelo teste ANOVA de medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni, representados pela média de cada grupo experimental. Para os valores de consumo alimentar em quilocalorias (kcal), não houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(33,66)}=1,09$; $p=0,3746$ para $n=6$ a 12 animais). Houve efeito estatisticamente significativo do tipo de dieta ($F_{(33,66)}=14,03$; $p=0,0040$ para $n=6$ a 12), mas não houve efeito significativo em relação ao tempo de tratamento ($F_{(11,66)}=1,71$; $p=0,09$ para $n=6$ a 12) (Figura 3A).

Para os valores encontrados de consumo de carboidratos em gramas por dia (g/dia), não houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(33,66)}=1,09$; $p=0,346$ para $n=6$ a 12); houve efeito estatisticamente significativo do tipo de dieta ($F_{(3,66)}=5,37$; $p=0,0390$ para $n=6$ a 12), mas não houve efeito do tempo de tratamento ($F_{(11,66)}=0,88$; $p=0,5614$ para $n=6$ a 12) (Figura 3B).

Para os valores de consumo de proteínas em gramas por dia (g/dia), não foi encontrada interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(33,66)}=0,84$; $p=0,7096$ para $n=6$ a 12). Houve efeito significativo do tipo de dieta ($F_{(3,66)}=82,51$; $p<0,0001$ para $n=6$ a 12), embora não tenha sido encontrado efeito do tempo de tratamento ($F_{(11,66)}=0,92$; $p=0,5279$ para $n=6$ a 12) (Figura 3C).

Para os valores de ingestão de gorduras totais diárias em gramas (g/dia), verificou-se interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(33,66)}=3,62$; $p<0,0001$ para $n=6$ a 12). Também observou-se efeito significativo do tipo de dieta

($F_{(3,66)}=96,02$; $p<0,0001$ para $n=6$ a 12) e do tempo de tratamento ($F_{(6,66)}=6,63$; $p<0,0001$ para $n=6$ a 12) (Figura 3D).

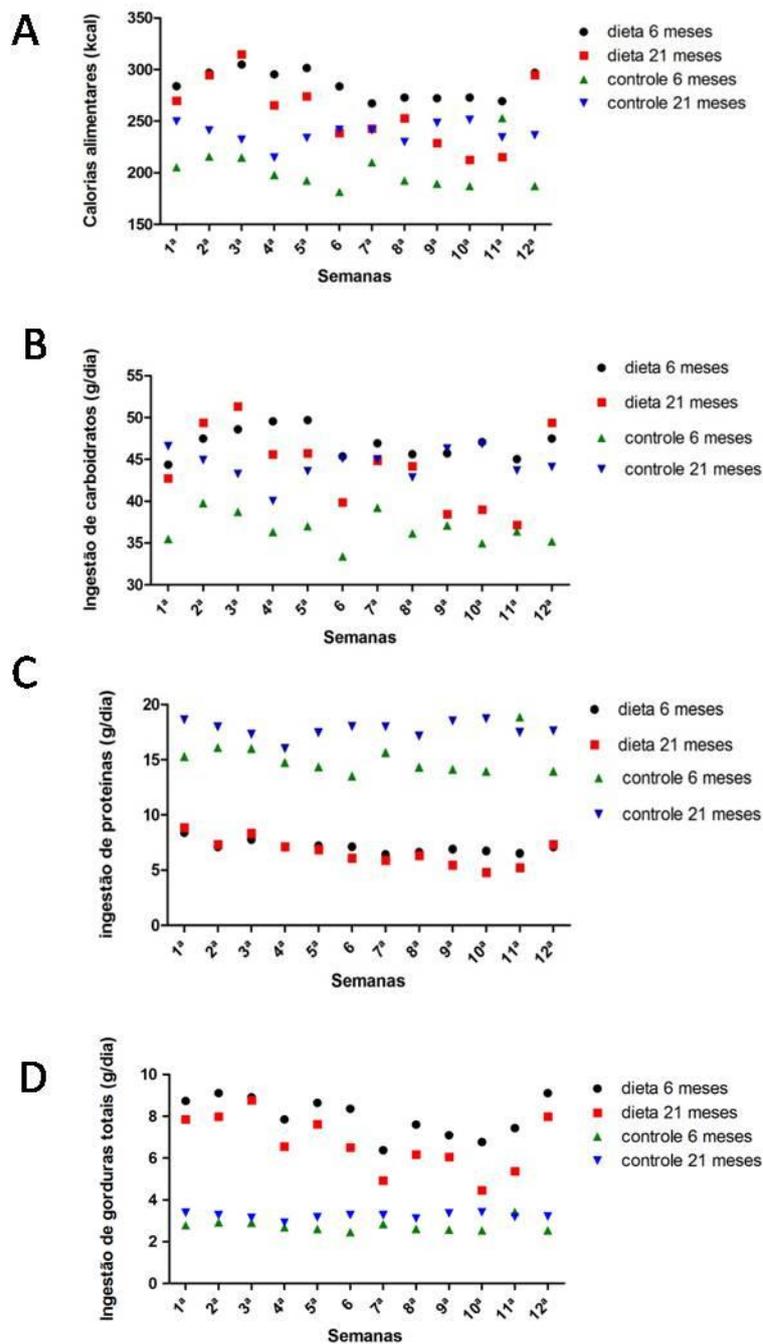


Figura 3. Dados analisados por ANOVA de medidas repetidas, representados como média. **A) Consumo alimentar em quilocalorias:** não houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento, nem efeito do tempo de tratamento, mas houve efeito significativo do tipo de dieta ($F_{(33,66)}=14,03$; $p=0,004$; $n=6$ a 12). **B) Consumo de carboidratos em gramas por dia:** não houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento, nem efeito do tempo de tratamento, mas houve efeito significativo do tipo de dieta ($F_{(3,66)}=5,37$; $p=0,0390$; $n=6$ a 12). **C) Consumo de proteínas em gramas por dia:** não houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento, nem efeito do tempo de tratamento, mas houve efeito significativo da dieta ($F_{(3,66)}=82,51$; $p<0,0001$; $n=6$ a 12). **D) Consumo de gorduras totais em gramas por dia:** houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(33,66)}=3,62$; $p<0,0001$; $n=6$ a 12), houve efeito significativo do tipo de dieta ($F_{(3,66)}=96,02$; $p<0,0001$; $n=6$ a 12) e do tempo de tratamento ($F_{(11,66)}=9,01$; $p<0,0001$; $n=6$ a 12).

2. Perfil lipídico

Os resultados das dosagens de colesterol total, fração HDL do colesterol e triacilgliceróis, em miligramas por decilitro de soro (mg/dL), foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, quando indicado. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos valores de colesterol total. Para os valores de fração HDL de colesterol, encontramos efeito significativo da idade, com $F_{(1,36)}=8,57$ e $p=0,0059$. Para os valores de triacilgliceróis séricos, encontramos interação dos fatores dieta e idade, com $F_{(1,36)}=10,53$ e $p=0,0025$. Na Tabela 3 estão as médias obtidas para cada resultado.

Tabela 3. Perfil lipídico.

Parâmetro (mg/dL)	Controle 6 meses	Controle 21 meses	Dieta 6 meses	Dieta 21 meses	Significância
Col.	70,937 \pm 7,201	102,329 \pm 16,993	92,714 \pm 22,99	62,128 \pm 6,237	ns
HDL-col.	42,909 \pm 1,776	36,036 \pm 2,183	45,853 \pm 3,882	35,307 \pm 1,878	b
Triacilgliceróis	62,297 \pm 7,966	113,079 \pm 29,372	118,297 \pm 15,481	76,760 \pm 14,433	c

A letra “b” significa efeito da idade, a letra “c” significa interação e “ns” significa “não significativo”.

3. Peso corporal

Os valores de ganho de peso corporal foram analisados com ANOVA de medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni e estão representados como média. Há interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(36,432)}=2,52$; $p<0,0001$, $n=6$ a 12). Também há efeito estatisticamente significativo da dieta ($F_{(3,36)}=4,60$; $p=0,0080$, $n=6$ a 12) e do tempo de tratamento ($F_{(12,432)}=10,96$; $p<0,0001$; $n=6$ a 12) (Figura 4 A).

Para avaliar o ganho de peso corporal, fez-se o cálculo do peso final menos peso inicial (variação do peso). Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, e estão representados como média \pm EPM. Não há interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,36)}=0,53$; $p=0,4701$; $n=6$ a 12), mas há efeito

significativo da dieta ($F_{(1,36)}=6,93$; $p=0,0124$; $n=6$ a 12) e da idade ($F_{(1,36)}=4,94$; $p=0,0326$; $n=6$ a 12). (Figura 4B)

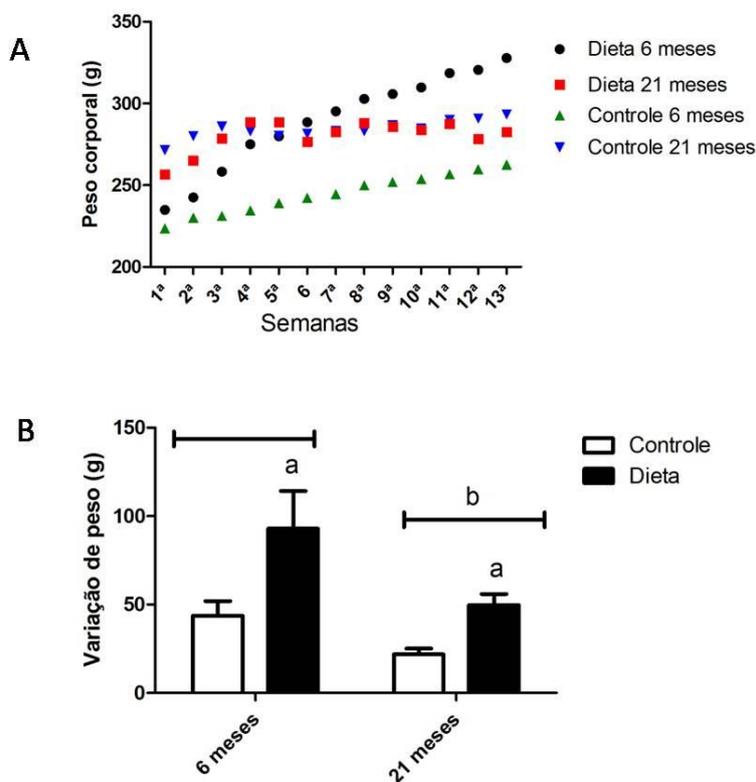


Figura 4. Peso corporal. **A) Ganho de peso corporal ao longo do tratamento.** Dados analisados com ANOVA de medidas repetidas. Houve interação dos fatores dieta e tempo de tratamento ($F_{(36,432)}=2,52$; $p<0,001$), efeito da dieta ($F_{(3,36)}=4,60$; $p=0,0080$) e do tempo de tratamento ($F_{(12,432)}=10,96$; $p<0,001$). **B) Variação de peso corporal.** Dados analisados com ANOVA de duas vias. Não houve interação dos fatores dieta e da idade, mas houve efeito significativo da dieta ($F_{(1,36)}=6,93$; $p=0,0124$) e da idade ($F_{(1,36)}=4,94$; $p=0,0326$). “a” significa efeito da dieta, “b” significa efeito da idade.

4. Tecido adiposo

Os resultados de peso de gordura abdominal e também os de índice adiposo (peso da gordura abdominal/peso corporal total) foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Os resultados de peso de gordura abdominal apresentaram interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,36)}=4,98$; $p=0,0319$; $n=6$ a 12) e efeito significativo da dieta

($F_{(1,36)}=6,68$; $p=0,0140$; $n=6$ a 12), embora não tenham apresentado efeito significativo da idade ($F_{(1,36)}=1,99$; $p=0,1664$; $n=6$ a 12) (Figura 5A).

Os resultados de índice adiposo, da mesma forma, apresentaram interação dos fatores idade e dieta ($F_{(1,36)}=4,87$; $p=0,0337$; $n=6$ a 12) e efeito significativo da dieta ($F_{(1,36)}=8,58$; $p=0,0056$; $n=6$ a 12), embora não tenham apresentado efeito significativo da idade ($F_{(1,36)}=2,51$; $p=12,17$; $n=6$ a 12) (Figura 5B).

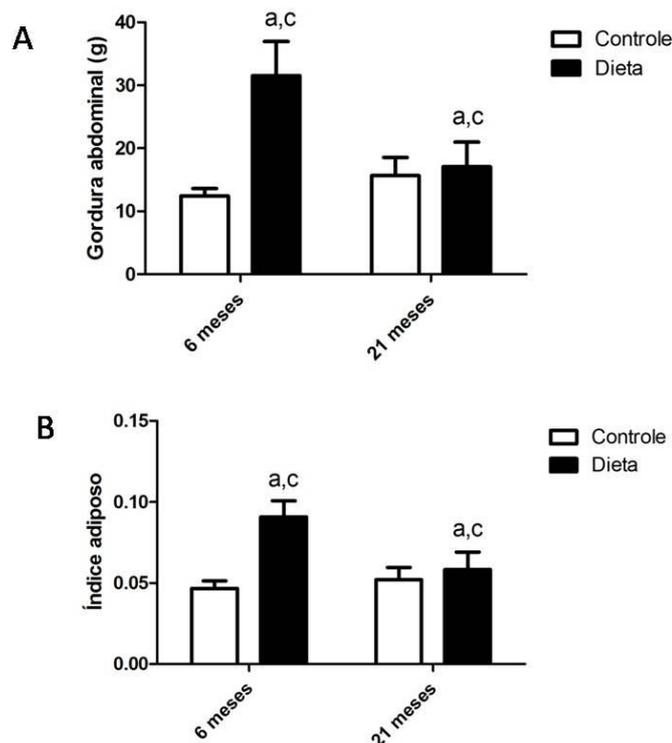


Figura 5. Tecido adiposo. **A) Peso da gordura abdominal.** Houve interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,36)}=4,98$; $p=0,0319$; $n=6$ a 12) e efeito da dieta ($F_{(1,36)}=6,69$; $p=0,0140$), mas não houve efeito significativo da idade. **B) Índice adiposo.** Há interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,36)}=4,87$; $p=0,0337$, $n=6$ a 12) e efeito da dieta ($F_{(1,36)}=8,68$; $p=0,0056$), mas não houve efeito da idade. “a” significa efeito da dieta, “c” significa interação dos fatores dieta e idade.

5. Homeostase da glicose

Para verificar a situação da homeostase da glicose nos animais, foi realizada a dosagem de glicose sérica, de insulina, e também o cálculo HOMA (modelo de avaliação da homeostase). Os resultados foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Não houve diferenças estatisticamente significativas de glicemia entre os grupos (Figura 6A). Os resultados de insulina não apresentaram interação dos fatores idade e dieta ($F_{(1,36)}=1,87$; $p=0,1794$; $n=6$ a 12), nem efeito da idade ($F_{(1,36)}=1,76$;

$p=0,1924$; $n=6$ a 12), mas apresentaram efeito significativo da dieta ($F_{(1,36)}=6,94$; $p=0,0123$; $n=6$ a 12) (Figura 6B).

Em relação ao índice HOMA, não houve interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,36)}=2,38$; $p=0,1318$; $n=6$ a 12), nem efeito significativo da idade ($F_{(1,36)}=2,34$; $p=0,1348$; $n=6$ a 12), mas houve efeito significativo da dieta ($F_{(1,36)}=6,32$; $p=0,0165$; $n=6$ a 12) (Figura 6C).

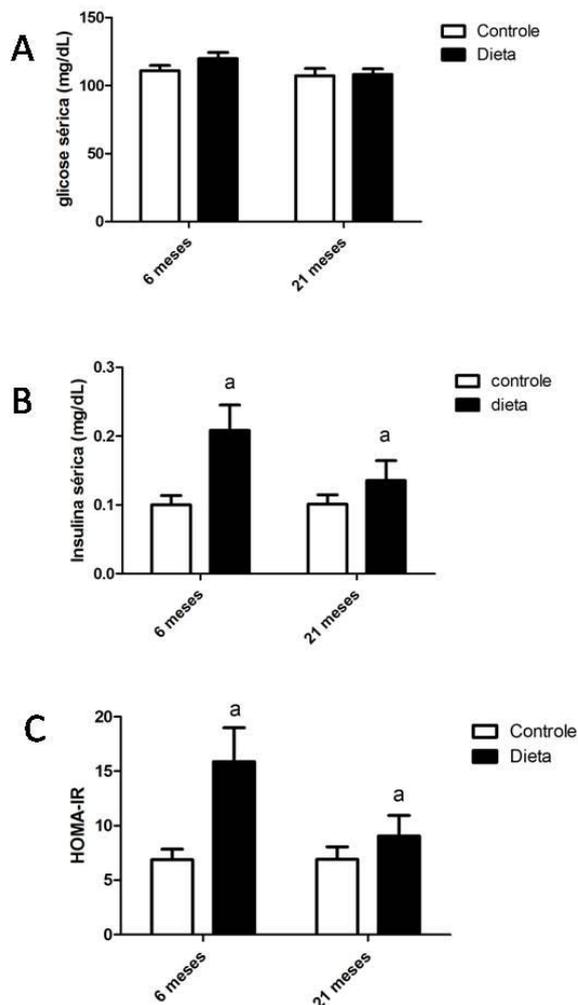


Figura 6. Homeostase da glicose. **A) Glicemia.** Não houve diferença significativa entre os grupos. **B) Insulina sérica.** Não há interação dos fatores dieta e idade, nem efeito do fator idade, mas há efeito significativo do fator dieta ($F_{(1,36)}=6,94$; $p=0,0123$; $n=6$ a 12). **C) Índice HOMA.** Não há interação dos efeitos dieta e idade, nem efeito significativo do fator idade, mas há efeito significativo da dieta ($F_{(1,36)}=6,32$; $p=0,0165$; $n=6$ a 12). “a” significa efeito da dieta.

6. Adipocinas

Os resultados das dosagens séricas de adiponectina e de leptina, em mg/dL, foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni quando indicado, e estão expressos como média \pm EPM. Não há diferenças significativas da concentração de adiponectina entre os grupos (Figura 7A). Para os resultados de leptina, não foi encontrada interação dos fatores idade e dieta ($F_{(1,35)}=2,43$; $p=0,1280$; $n=6$ a 12), mas observa-se efeito significativo da dieta ($F_{(1,35)}=4,35$; $p=0,0444$; $n=6$ a 12) e da idade ($F_{(1,35)}=4,13$; $p=0,0499$; $n=6$ a 12) (Figura 7B).

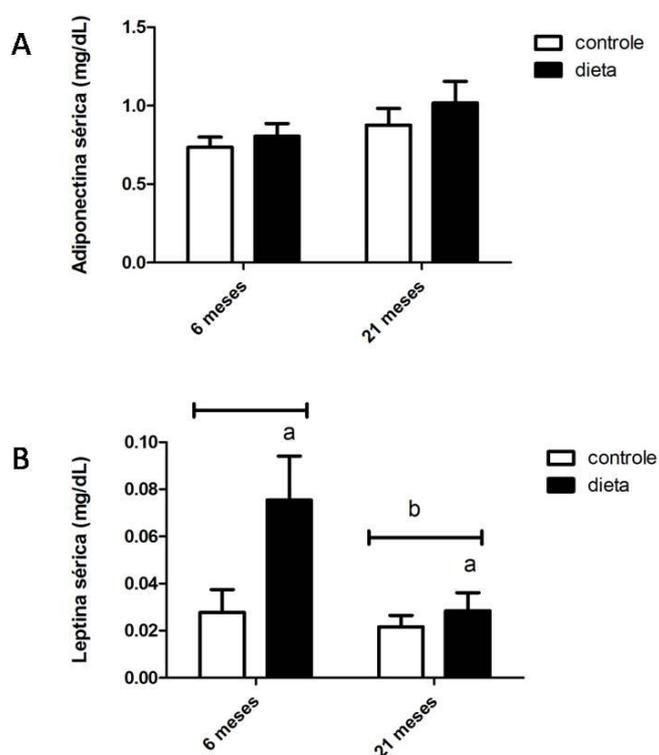


Figura 7. Adipocinas. **A)Adiponectina.** Não houve diferenças significativas entre os grupos; $n=6$ a 12. **B)Leptina.** Não houve interação dos fatores dieta e idade, mas houve efeito da dieta ($F_{(1,35)}=4,35$; $p=0,0444$; $n=6$ a 12) e da idade ($F_{(1,35)}=4,13$; $p=0,0499$). “a” significa efeito da dieta e “b” significa efeito da idade.

7. Citocinas

Fez-se dosagem sérica da citocina antiinflamatória IL-10, e também da citocina proinflamatória IL1- β . Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias. Para IL-10, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 8).

Devido à quantidade reduzida de amostras obtidas, não foram realizadas dosagens de IL-10 no córtex cerebral nem no hipocampo dos animais. Já os valores para IL1- β , no soro, ficaram todos abaixo de 39 pg/mL, que é o limite detectável do kit comercial utilizado.

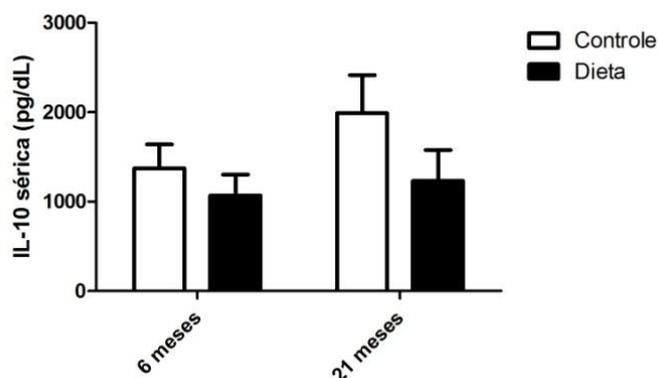


Figura 8. Interleucina 10 no soro. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (n=6 a 12; $p>0,05$).

Realizou-se a dosagem de citocina pró-inflamatória IL-1 β em homogeneizado de córtex cerebral e também de hipocampo, relativizados pela quantidade de proteína dessas mesmas estruturas. Os resultados foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni. Para os dados de IL1- β no córtex cerebral, houve interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1, 26)}=7,18$; $p=0,0126$; n=6 a 12), mas não houve efeito significativo da dieta ($F_{(1,26)}=3,15$; $p=0,078$; n=6 a 12) nem da idade ($F_{(1,26)}=0,41$; $p=0,5262$; n=6 a 12) (Figura 9A).

Para os dados de IL1- β no hipocampo, há interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,27)}=8,40$; $p=0,0074$; n=6 a 12), e efeito estatisticamente significativo da dieta ($F_{(1,27)}=11,52$; $p=0,0021$; n=6 a 12) e da idade ($F_{(1,27)}=12,42$; $p=0,0014$; n=6 a 12) (Figura 9B).

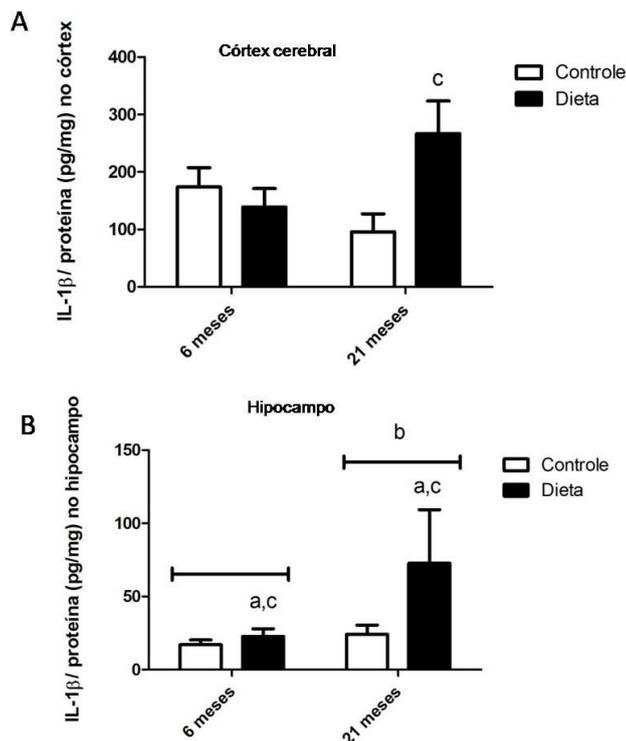


Figura 9. IL-1 β no córtex e no hipocampo. **A) IL1- β no córtex.** Há interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,26)}=7,18$; $p=0,0126$; $n=6$ a 12), mas não há efeito significativo da dieta ou da idade. **B) IL1- β no hipocampo.** Há interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,27)}=8,40$; $p=0,0074$; $n=6$ a 12), e efeito significativo da dieta ($F_{(1,27)}=11,52$; $p=0,0021$) e da idade ($F_{(1,27)}=12,42$; $p=0,0015$). “a” significa efeito da dieta, “b” significa efeito da idade e “c” significa interação dos fatores dieta e idade.

09. Ativação microglial e astrocitária

Foi realizada imuno-histoquímica para CD68 no córtex cerebral, e GFAP no córtex e no hipocampo. CD68 é um marcador de monócitos, macrófagos e microglia, sendo a microglia o alvo da marcação no presente estudo. GFAP é um marcador de astrócitos. Os resultados foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, e estão expressos como média do número de células por corte, para cada grupo (03 cortes ou mais de cada animal) \pm EPM.

Para os resultados de marcação com CD68 no córtex, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$; $n=4$) (Figura 10 A e Figura 11). Para os resultados de marcação com GFAP no córtex, observou-se que não houve interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1, 17)}=0,81$; $p=0,3803$; $n=5$ a 6), nem efeito significativo da idade ($F_{(1,17)}=0$; $p=0,9475$; $n=5$ a 6), mas observou-se efeito significativo da dieta ($F_{(1,17)}=5,27$; $p=0,0347$; $n=5$ a 6) (Figura 10B e Figura 12).

Para marcação com GFAP no hipocampo, não houve interação dos fatores dieta e idade ($F_{(1,11)}=1,27$; $p=0,2839$; $n=4$ a 5), nem da dieta ($F_{(1,11)}=3,99$; $p=0,0711$; $n=4$ a 5), mas observou-se efeito estatisticamente significativo da idade ($F_{(1,11)}=5,75$; $p=0,0353$; $n=4$ a 5) (Figura 10C e Figura 13).

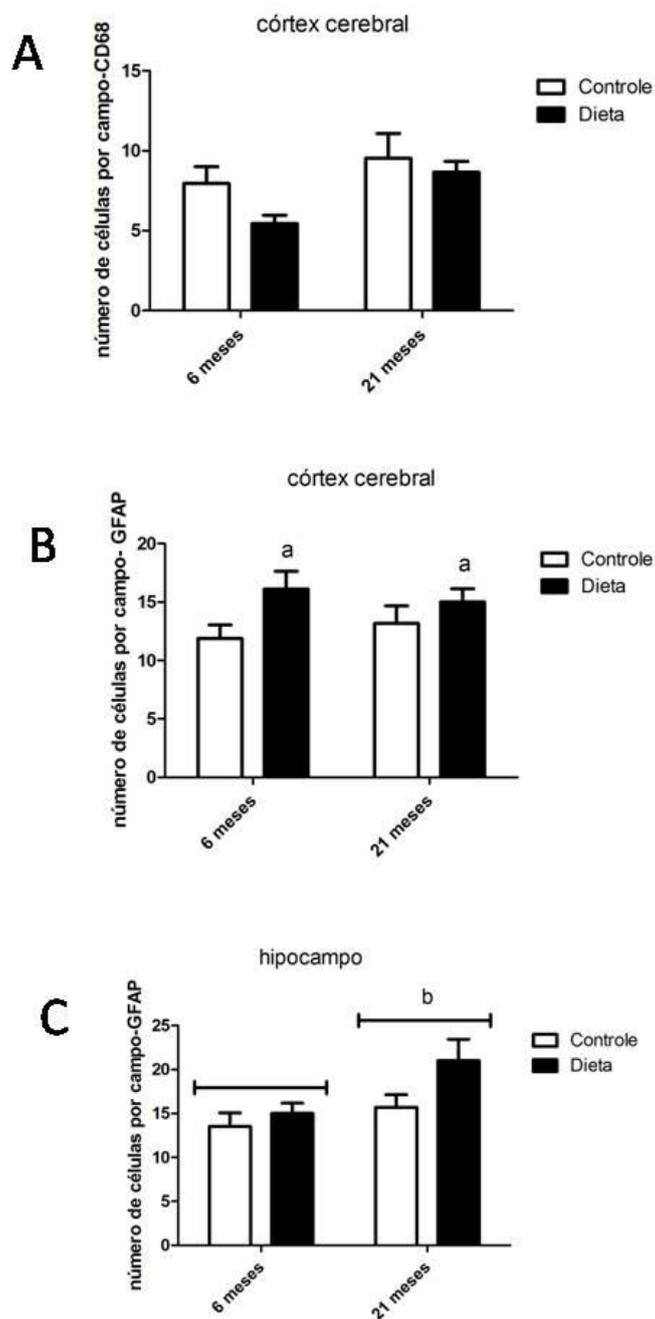


Figura 10. Ativação microglial e astrocitária. **A) CD68 no córtex cerebral.** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$; $n=4$). **B) GFAP no córtex cerebral.** Não houve interação dos fatores dieta e idade, nem efeito significativo da idade, mas houve efeito da dieta ($F_{(1,17)}=5,27$; $p=0,00347$; $n=5$ a 6). **C) GFAP no hipocampo.** Não houve interação dos fatores dieta e idade, nem efeito significativo da dieta, mas houve efeito da idade ($F_{(1,11)}=5,75$; $p=0,0353$; $n=4$ a 5). A letra “a” significa efeito da dieta e a letra “b” significa efeito da idade.

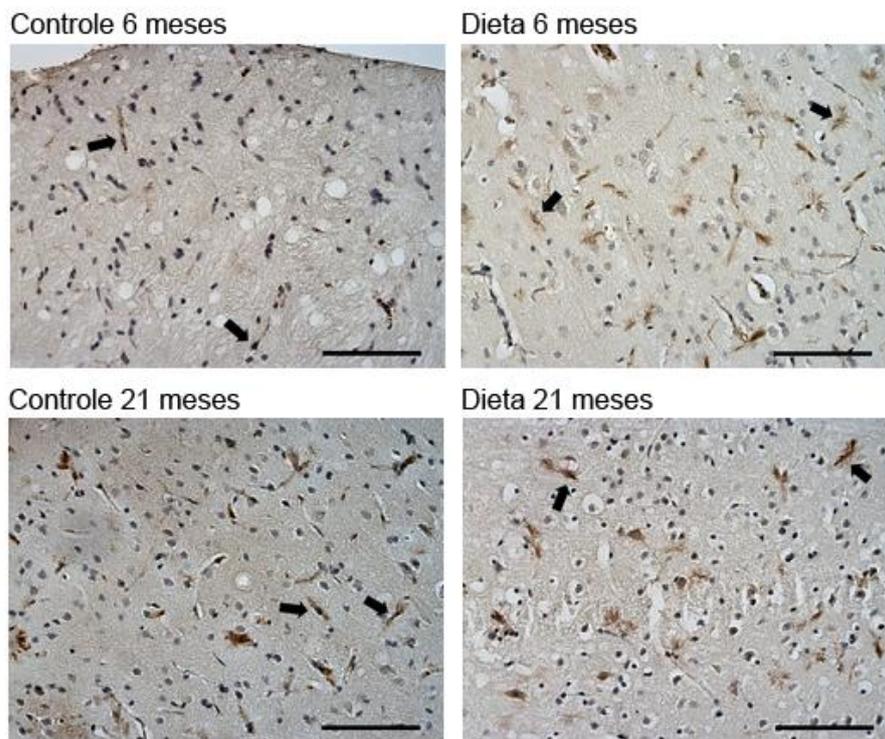


Figura 11. Fotomicrografia mostrando a marcação de CD68 no córtex cerebral. Barra=100 μ m

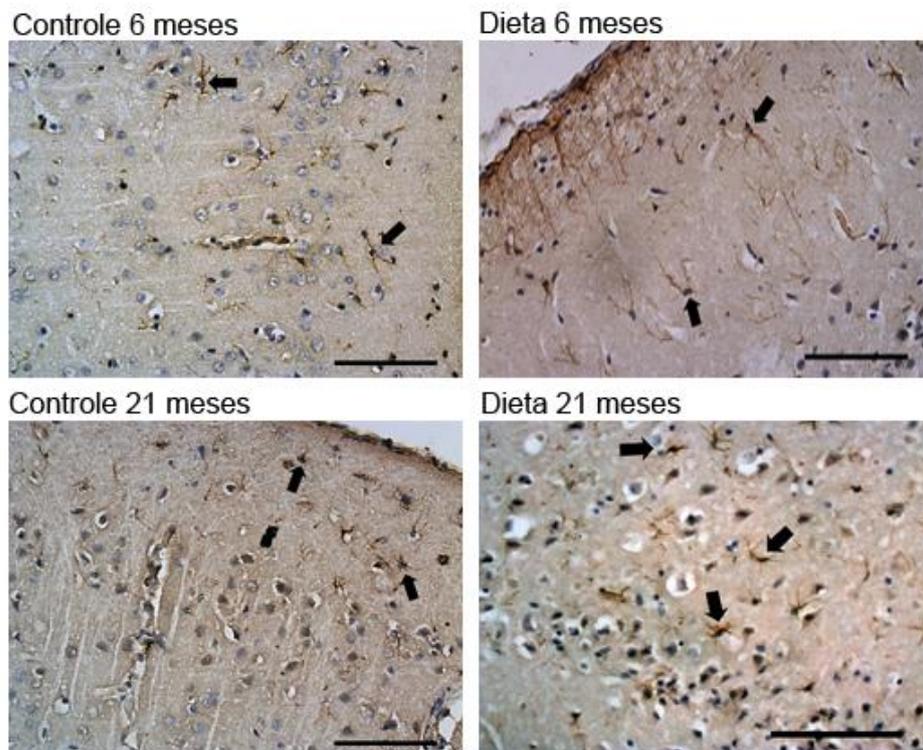


Figura 12. Fotomicrografia mostrando marcação com GFAP no córtex cerebral. Barra=100 μ m

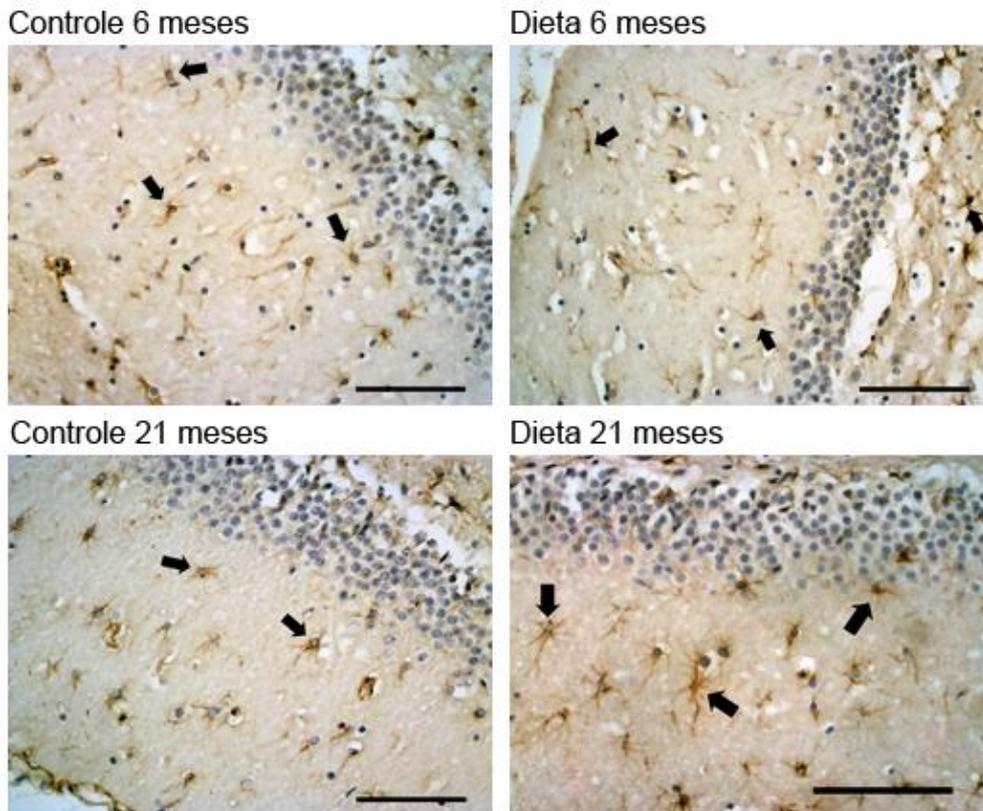


Figura 13. Fotomicrografia mostrando marcação com GFAP no hipocampo. Barra=100 μ m

10. Proteína *tau* fosforilada

Os resultados da análise da expressão da proteína *tau* fosforilada, verificada por *Western blotting* no homogeneizado de córtex cerebral e hipocampo, relativizados pela expressão de GAPDH, foram analisados por ANOVA de duas vias. Não houve diferenças estatisticamente significativas nem em córtex nem em hipocampo entre os grupos (n=6 a 8; $p>0,05$) (Figura 14).

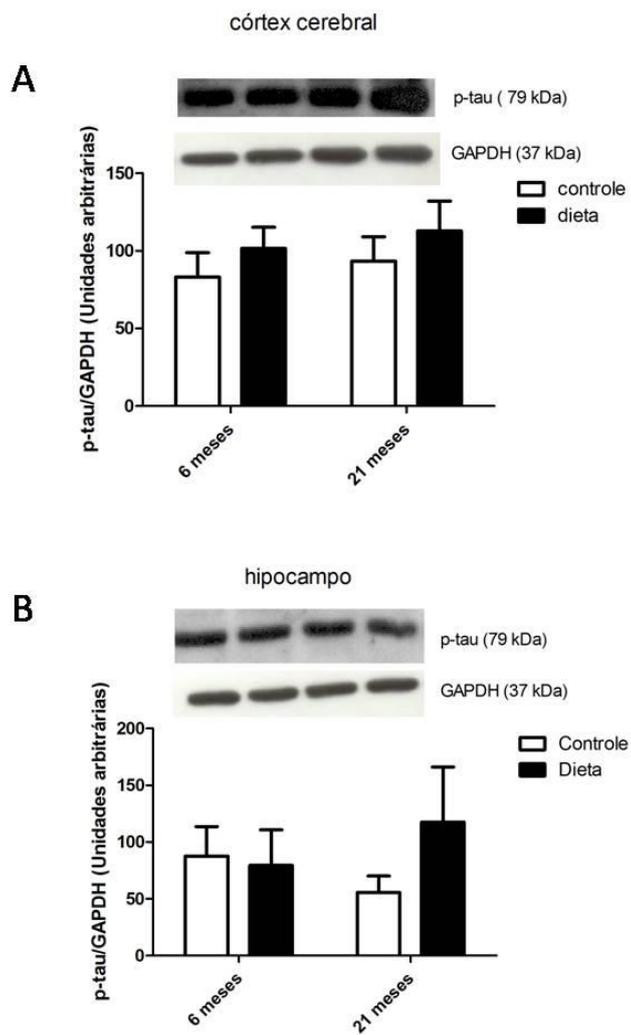


Figura 14. Proteína tau fosforilada no córtex e no hipocampo. **A) Proteína tau fosforilada no córtex.** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$; $n = 6$ a 8). **B) Proteína tau fosforilada no hipocampo.** Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$; $n = 6$ a 8).

Discussão

Este estudo mostra que, embora a dieta de cafeteria não seja capaz de induzir um quadro completo de dislipidemia em 12 semanas, em animais submetidos à dieta aos 3 e aos 18 meses de idade, esse tipo de dieta é suficiente para induzir resistência à insulina nesse período de tempo relativamente curto. Além disso, a dieta de cafeteria contribuiu para a deposição de tecido adiposo visceral, que é associado a vários prejuízos à saúde, tanto de indivíduos jovens, como de idosos, bem como para a manifestação de sinais de inflamação em estruturas relacionadas à cognição, como o córtex cerebral e o hipocampo.

Como se pode observar na seção de resultados, os animais que receberam dieta de cafeteria ingeriram uma dieta com mais calorias, carboidratos e gorduras totais e menos proteínas do que os animais que receberam dieta controle, caracterizando esta dieta de cafeteria como hipercalórica e hiperlipídica. Adicionalmente, a dieta de cafeteria apresenta alta palatabilidade para humanos e parece ser palatável também para roedores. Dessa forma, associando maior ingestão calórica e alta palatabilidade, espera-se que os animais que recebem dieta de cafeteria apresentem elevação do peso corporal em pouco tempo. Neste estudo, todos os animais que receberam dieta de cafeteria apresentaram aumento do consumo energético e do peso corporal.

Estudos realizados em humanos mostram que, durante o envelhecimento, há um declínio gradual da quantidade de alimento ingerido (Hauser e Neumann, 2005, Morley e Silver, 1988). Além disso, o envelhecimento está associado a importantes alterações da percepção do alimento, como diminuição do olfato e do paladar, bem como diminuição da capacidade de percepção de texturas, o que também contribui para a diminuição da ingestão alimentar (Morley, 2001). Neste estudo, com ratos *Wistar* tratados por 12 semanas, não verificamos diminuição da quantidade de alimento ingerido pelos ratos mais velhos, contrariando os estudos citados. Outros estudos realizados neste laboratório também não mostraram diminuição do consumo alimentar pelos animais mais velhos (dados não publicados).

Embora todos os grupos que receberam dieta de cafeteria tenham ganho de peso corporal significativo ao longo do experimento, o grupo dieta 21 meses apresentou um ganho de peso cerca de 43% menor do que o grupo dieta 6 meses. Além disso, os resultados de ganho de peso dependem da idade, ou seja, os dois grupos de 21 meses (controle e dieta) apresentaram menor ganho de peso corporal ao

longo do experimento do que os animais de 6 meses. Uma possível explicação para a redução do ganho de peso nos indivíduos com mais idade é que a digestão e a absorção de nutrientes podem estar prejudicadas. Sabe-se que, em mamíferos com idade avançada, há hiposecreção de pepsina e de ácido clorídrico no estômago, além de redução da secreção de suco pancreático, bem como de lipase pancreática e de sais biliares, reduzindo a velocidade e a eficácia do processo de absorção de proteínas, vitaminas, minerais, de carboidratos e de lipídeos (Holt e Balint, 1993, Woudstra e Thomson, 2002). Então, apesar dos animais de 21 meses terem ingerido quantidades de alimento semelhantes aos animais de 6 meses, podemos sugerir que tenha havido diminuição da absorção dos nutrientes que compõem os alimentos, dificultando o ganho de peso.

Por outro lado, o aumento de gordura abdominal foi significativo em ambos os grupos que receberam a dieta de cafeteria, mas também houve interação entre os fatores dieta e idade. O grupo dieta 21 meses apresentou peso da gordura abdominal cerca de 45% menor do que o grupo dieta 6 meses. Uma vez que sugerimos que os animais do grupo 21 meses possam estar absorvendo menos nutrientes, é esperado que haja menos deposição de gordura nos compartimentos corporais. Esse resultado contrariou estudos que mostram que o envelhecimento fisiológico está associado a um aumento progressivo da massa adiposa, que pode ser independente do ganho de peso, com concomitante perda de massa muscular (Prentice e Jebb, 2001, Fantin et al., 2007). Em pacientes obesos, o tipo de distribuição de gordura parece ser um fator contribuinte para a condição de morbidade ou de melhor qualidade de vida (Lee et al., 2008a, Sun et al., 2009), principalmente porque o aumento da gordura visceral está associado com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Fox et al., 2007, Oka et al., 2010). Além disso sabe-se que os adipócitos presentes na gordura visceral são capazes de produzir muitos mediadores pró-inflamatórios, o que favorece a instalação do perfil pró-inflamatório da obesidade (Lafontan e Girard, 2008). No presente estudo, houve acúmulo de gordura nos grupos que receberam dieta de cafeteria, independente da idade, mas nos grupos mais velhos esse acúmulo foi menor. Além de os animais dos grupos que receberam dieta apresentarem maior acúmulo de gordura abdominal, também houve aumento do índice adiposo nesses animais. Embora haja interação entre os fatores idade e dieta nestes dados, podemos perceber que os animais do grupo dieta, independente da idade, apresentaram aumento do índice adiposo, o que mostra aumento da proporção de tecido adiposo em relação ao peso corporal. Novamente, a dieta de cafeteria se mostrou eficaz para indução da obesidade no período de 12 semanas.

Apesar do ganho de peso significativo nos animais que receberam dieta de cafeteria em comparação com os que não receberam, não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de colesterol total entre os grupos. Os resultados referentes ao HDL mostraram um efeito da idade e não da dieta, ou seja, os animais dos grupos 21 meses apresentaram menores níveis de HDL do que os animais dos grupos 6 meses. Esse resultado está de acordo com estudos prévios realizados tanto em humanos (Taddei et al., 1997) quanto em ratos (Zagayko et al., 2013). Ainda não se sabe exatamente quais os mecanismos envolvidos na redução do HDL em indivíduos mais velhos. Possivelmente, essa redução seja responsável pelo maior risco de apresentar doenças cardiovasculares que ocorre em pessoas de mais idade (Taddei et al., 1997, Cho, 2009, Ruiz Cantero, 2011). Quanto aos triglicerídeos, houve uma interação dos fatores dieta e idade, de modo que a alteração dos níveis séricos de triglicerídeos relacionou-se tanto com a idade quanto com a dieta administrada e não apenas desses fatores independentemente. Já foi descrito que os níveis séricos de triglicerídeos em resposta a uma dieta hipercalórica dependem da idade dos ratos (Chuffa e Seiva, 2013).

A função endócrina dos adipócitos parece estar relacionada com o envelhecimento celular. Estudos realizados *in vitro* compararam adipócitos maduros de animais jovens e velhos, e verificaram que há uma diminuição da expressão gênica tanto de leptina quanto de adiponectina e aumento progressivo da resistência à insulina nos adipócitos mais velhos (Yu e Zhu, 2004). Apesar de no presente estudo não termos verificado diferenças significativas na concentração plasmática de adiponectina, as concentrações séricas de leptina foram mais baixas nos animais mais velhos (21 meses). Outros estudos, com humanos, também verificaram decréscimo da concentração de leptina sérica ou plasmática no envelhecimento e esse achado foi associado à diminuição da qualidade e da expectativa de vida (Arai et al., 2011, Gulcelik et al., 2013, Koenig et al., 2014). Por outro lado, a dieta de cafeteria favoreceu aumento das concentrações plasmáticas de leptina, concordando com outros estudos que indicam que a obesidade estimula o aumento da produção de leptina, que pode resultar em resistência à leptina (Maury e Brichard, 2010, Guerre-Millo, 2004, Ouchi et al., 2011).

A dieta de cafeteria foi responsável, no estudo apresentado aqui, pelo estado de hiperinsulinemia de jejum de 6 horas, apesar de os animais não apresentarem hiperglicemia. Provavelmente, a glicemia estava dentro dos níveis normais, devido a uma hiperinsulinemia compensatória. A hiperinsulinemia compensatória ocorre quando há uma secreção aumentada de insulina, pelas células β pancreáticas, a fim de manter

os níveis plasmáticos de glicose adequados, e costuma anteceder a resistência à insulina (Reaven, 2005). A análise do *HOMA-IR* confirmou que os animais que receberam dieta de cafeteria apresentaram resistência à insulina.

Dietas ocidentais, devido ao alto teor de gorduras e de carboidratos, estão associadas à resistência à insulina, principalmente por causa dos ácidos graxos saturados e das gorduras trans (Bray et al., 2002). Esse tipo de ácido graxo da dieta parece favorecer o desenvolvimento de resistência à insulina a longo prazo, via alterações da composição de lipídeos das membranas das células-alvo da insulina. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa mantêm a fluidez da membrana e garantem a eficácia da sinalização celular, influenciando também a expressão gênica de efetores da sinalização (Sampath e Ntambi, 2004). Uma vez que a dieta de cafeteria é pobre em ácidos graxos poliinsaturados e rica em ácidos graxos saturados, pode haver alteração da composição dos lipídeos das membranas das células-alvo da insulina, prejudicando ainda mais a sinalização desse hormônio.

A contribuição dos carboidratos para a secreção de insulina é variável, e depende do tipo e da forma física, bem como do índice glicêmico dos carboidratos consumidos. O índice glicêmico de um alimento diz respeito ao tempo que determinado alimento demora para ser absorvido e convertido em glicose. O índice glicêmico é mais baixo quando a absorção e/ou a conversão em glicose demora mais para ocorrer. A taxa de secreção da insulina tende a ser mais baixa quando são consumidos carboidratos de baixo índice glicêmico (Wolever, 2000). O tratamento crônico de roedores com dietas ricas em carboidratos de altos índices glicêmicos, como a dieta de cafeteria empregada neste estudo, são associadas ao aumento de tecido adiposo visceral, que está fortemente associado à resistência à insulina (Toida et al., 1996).

A ingestão de fibras alimentares tem efeito indireto sobre a secreção e a ação da insulina. Sabe-se que a dieta de cafeteria contém pouca quantidade de fibras alimentares, o que prejudica ainda mais o perfil homeostático da insulina. As fibras alimentares estão associadas à diminuição da glicemia pós-prandial e da secreção de insulina, melhorando a resposta e a sensibilidade do organismo à insulina, diminuindo os níveis de triglicerídeos e de HDL, aumentando a saciedade e diminuindo o acúmulo de gordura (Higgins, 2004). Os animais alimentados com a dieta de cafeteria não ingerem quantidades suficientes de fibra alimentar, nem de outros polissacarídeos resistentes, o que impede que os benefícios proporcionados por essa classe de nutrientes se manifestem.

Em 1996, o excesso de tecido adiposo, especialmente na região abdominal, foi associado com diabetes e doenças vasculares (Vague, 1996). Desde então, a resistência à insulina foi associada positivamente ao aumento do índice de massa corporal, circunferência abdominal e em particular ao índice cintura/quadril em humanos (Aronne e Segal, 2002), o que reflete aumento da adiposidade, principalmente visceral. O tecido adiposo visceral é responsável pela produção de mais adipocinas pró-inflamatórias do que anti-inflamatórias, o que prejudica a ação da insulina por causa da inflamação. Como comentado anteriormente, nos anos 90, a descrição da expressão aumentada de TNF- α pelo tecido adiposo de roedores obesos fez a primeira ligação entre a obesidade e a resistência à insulina, uma vez que o TNF- α é capaz de bloquear o receptor para insulina, prejudicando a via de sinalização do hormônio (Hotamisligil e Spiegelman, 1994). Por isso, mais uma vez, chama-se a atenção para o perfil pró-inflamatório verificado no estado obeso, como um possível causador da resistência à insulina nesses animais que receberam dieta de cafeteria.

Por outro lado, sabe-se que a resistência à insulina é um fator predisponente para doenças neurológicas (Ferreira et al., 2014). A resistência à insulina periférica está associada a déficit cognitivo e atividade espontânea cortical reduzida em humanos obesos (Baker et al., 2011). Além disso, o índice HOMA é inversamente relacionado à conectividade funcional na região inferior direita do giro frontal em pacientes com diabetes do tipo 2, o que resulta em dificuldade de aprendizado (Musen et al., 2012).

Uma vez que a resistência à insulina secundária à obesidade está associada a disfunções do sistema nervoso central, incluindo aumento da resposta inflamatória, foi realizada a dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β no córtex e no hipocampo dos animais estudados. As citocinas foram inicialmente descritas como mediadores inflamatórios atuantes na periferia, mas, atualmente, já se sabe que essas substâncias são expressas também dentro do sistema nervoso central e atuam na modulação de várias funções neurológicas (Block et al., 2007). A via de sinalização da IL-1 β parece estar envolvida no declínio cognitivo, no prejuízo da memória e na demência associados à idade avançada (Lynch, 2010) além de estar envolvida em várias condições neurodegenerativas (Allan et al., 2005).

No presente estudo, há interação significativa dos fatores dieta e idade nos resultados de concentração de IL-1 β no córtex. Ou seja, os grupos 6 e 21 meses responderam de forma diferente à dieta. O grupo 21 meses que recebeu dieta de cafeteria apresenta as maiores concentrações de IL-1 β entre todos os grupos, sugerindo que há participação tanto da dieta quanto da idade atuando de forma a

umentar a concentração dessa citocina proinflamatória. Alguns trabalhos também relataram aumento de citocinas proinflamatórias, principalmente IL-1 β em estruturas do encéfalo, obtidos tanto de roedores quanto de humanos mais velhos (O'Donnell et al., 2000, Terao et al., 2002, Lu et al., 2004, Lukiw, 2004).

Além das concentrações de IL-1 β estarem mais elevadas no hipocampo dos animais do grupo 21 meses que receberam dieta, os animais do grupo controle 21 meses possuem concentrações mais elevadas de IL-1 β do que o grupo controle 6 meses. Esses achados concordam com outros autores que sugerem que exista uma situação de inflamação crônica relacionada ao envelhecimento, caracterizada por produção contínua de citocinas e quimiocinas proinflamatórias e diminuição da produção de citocinas antiinflamatórias, favorecendo, dessa forma que os níveis basais dos mediadores proinflamatórios estejam aumentados em todo o organismo (Franceschi et al., 2000, Vasto et al., 2007). Da mesma forma que no córtex, no hipocampo os animais das diferentes idades responderam de forma diferente ao tratamento. Esse resultado também sugere que a dieta se soma à idade para produzir uma característica proinflamatória. Infelizmente, neste trabalho não foi possível avaliar as concentrações séricas da citocina proinflamatória IL-1 β , uma vez que o kit comercial utilizado não foi suficiente sensível, e não se pode afirmar se esse aumento no encéfalo da interleucina -1 é proveniente da periferia ou se a citocina está sendo produzida em excesso apenas no sistema nervoso central.

Sugere-se que a IL-1 β aumentada nas estruturas encefálicas do grupo 21 meses sejam provenientes da periferia, produzidas pelo tecido adiposo aumentado e inflamado. Essas citocinas produzidas em excesso danificariam a estrutura da barreira hematoencefálica e poderiam vir a estimular a proliferação de astrócitos em reação ao dano da barreira e à possível entrada de substâncias potencialmente neurotóxicas. Porém, devido a problemas técnicos, não foi possível avaliar a estrutura da barreira hematoencefálica desses animais. A avaliação da barreira hematoencefálica permitiria um conhecimento maior sobre a origem da situação inflamatória do encéfalo, uma vez que as citocinas periféricas poderiam atuar prejudicando a estrutura dessa barreira e exacerbando o perfil proinflamatório. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas das concentrações séricas da citocina antiinflamatória IL-10, sugerindo que, uma vez que não há produção aumentada dessa citocina anti-inflamatória em nenhum dos grupos, não há um direcionamento para um perfil anti-inflamatório em nenhum dos grupos. Devido à quantidade reduzida de amostras, não foi possível realizar a quantificação da citocina anti-inflamatória IL-10 nem no córtex cerebral e nem no encéfalo dos animais em estudo.

A obesidade é capaz de danificar a barreira hematoencefálica no hipocampo e no córtex cerebral em ratos, por meio da diminuição da expressão de mRNA de proteínas de junção apertada, principalmente de Claudina-5 e Claudina-12 no plexo coróide (Kanoski et al., 2010) e também pode expor o tecido encefálico a fatores circulantes potencialmente neurotóxicos que normalmente não entram em contato com as células do encéfalo. A ingestão crônica de dieta rica em lipídeos também pode levar a mudanças inflamatórias no córtex cerebral, como evidenciado pela presença de níveis aumentados de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, gerando espécies reativas de oxigênio e ativando a via do NF- κ B (Zhang et al., 2005).

O hipocampo é uma estrutura vital para a cognição, processamento das memórias a curto e longo prazo, aprendizado, orientação espacial e emoções, cuja função deve ser preservada através de contínua neurogênese na vida adulta. O córtex cerebral, por sua vez, também é essencial para a cognição, locomoção, controle de humor, processamento da memória a curto e longo prazo, entre outros. Obesidade e condições associadas à obesidade, como diabetes, hipertensão, doença cardiovascular, doença obstrutiva do sono, deficiência de vitamina B12, fibrilação atrial e distúrbios do humor são conhecidos por influenciar prejudicialmente o tamanho do hipocampo e do córtex cerebral (Fotuhi et al., 2012). Já foi demonstrado o aumento da expressão hipocampal de TNF- α e a ativação da microglia no hipocampo e no córtex de camundongos tratados com dieta hiperlipídica (Jeon et al., 2012). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica mostraram aumento da peroxidação lipídica no hipocampo (Moroz et al., 2008). Dietas hiperlipídicas e hipercalóricas podem induzir sinalização proapoptótica local, por meio do aumento da expressão de caspase-3 e gliose relativa no hipocampo, particularmente no giro denteado (Rivera et al., 2013). Além disso, inflamação local e dano celular podem levar à perda de tecido hipocampal e cortical. As evidências, relacionadas ao tamanho reduzido do hipocampo e do córtex na obesidade, poderiam acelerar a perda cognitiva que ocorre no envelhecimento de indivíduos obesos (Ho et al., 2010, Jagust et al., 2005, Raji et al., 2009). Outros estudos também têm mostrado que o aumento da expressão de TNF- α e ativação de macrófagos ou da microglia podem ser induzidos, tanto no tecido adiposo quanto no encéfalo de animais alimentados com dieta hiperlipídica (Puig et al., 2012, Lee et al., 2008b).

No presente estudo, foi realizada a avaliação da ativação microglial pela marcação de cortes histológicos do encéfalo com CD68. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando foi feita a marcação com CD68, embora tenha sido verificado aumento da concentração de IL-1 β no homogeneizado

de córtex, que sugere atividade inflamatória. Esse resultado nos sugere que, embora a dieta de cafeteria associada à obesidade seja capaz de induzir o aumento da secreção de uma citocina pró-inflamatória, ela talvez não seja suficiente para induzir todo o perfil pró-inflamatório verificado em doenças inflamatórias neurológicas. Os resultados encontrados neste estudo não concordam com Griffin e colaboradores, que encontraram aumento da ativação microglial, associada à neuroinflamação e à disfunção cognitiva que ocorre no envelhecimento em ratos velhos de até 27 meses de idade (Griffin et al., 2006).

Sob condições fisiológicas, a microglia apresenta um fenótipo inativo, que é associado com a produção de fatores anti-inflamatórios e de fatores neurotróficos (Streit, 2002). Em resposta à invasão de algum patógeno ou a algum dano tecidual, a microglia é capaz de mudar para o fenótipo ativado, que promove uma resposta inflamatória que serve para ativar o sistema imune e iniciar a reparação tecidual. Dietas hipercalóricas podem atuar como estímulos causadores de inflamação sustentada, resultando em disfunção tecidual. Embora alguns estímulos inflamatórios sejam benéficos e a inflamação esteja relacionada aos processos de reparo tecidual, a inflamação não controlada pode resultar na produção de fatores neurotóxicos que amplificam o estado ativado da microglia (Streit, 2002).

Quando há presença de patógenos, lesões neuronais agudas ou mesmo perda neuronal, há ativação das células microgliais no SNC. Uma vez apresentadas ao antígeno e ativadas, as células da microglia fagocitam proteínas e restos neuronais, apresentam os antígenos neuronais na sua superfície e produzem citocinas pró-inflamatórias entre outras substâncias tóxicas, a fim de iniciar a resolução da infecção ou do dano (Gonzalez-Scarano e Baltuch, 1999). Ao contrário da resposta rápida da microglia, a resposta dos astrócitos demora um pouco mais a acontecer, sugerindo que a secreção de citocinas pela microglia sinaliza para que ocorra ativação subsequente de astrócitos. Embora a astrogliose seja utilizada como marcador de lesão neuronal por estar associada a danos no tecido nervoso, os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não estão completamente elucidados (O'Callaghan e Jensen, 1992). A ativação da microglia, bem como dos astrócitos, e a elaboração de mediadores pró-inflamatórios, ocorre em pacientes com diversas doenças do sistema nervoso central, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, entre outros e, mais recentemente, vem sendo relacionada à obesidade (Shefer et al., 2013, Block et al., 2007).

No presente trabalho, quando a astrogliose foi avaliada por marcação com GFAP, verificou-se que houve efeito da dieta sobre a quantidade de astrócitos observada no córtex, embora não tenhamos observado efeito direto da idade ou interação entre os efeitos da dieta com a idade. Esse resultado nos sugere que não havia astrogliose nos indivíduos mais velhos, apenas após a administração da dieta de cafeteria. Mais uma vez, sugerimos que os fatores proinflamatórios produzidos pelo aumento do tecido adiposo nos animais que receberam dieta de cafeteria poderiam estar danificando a estrutura da barreira hematoencefálica, expondo o tecido nervoso a substâncias potencialmente nocivas que, por sua vez, estimulariam a astrogliose no córtex dos animais que receberam dieta de cafeteria.

Por outro lado, quando avaliamos a astrocitose pela marcação com GFAP no hipocampo, percebemos que o efeito é apenas da idade. Isso nos sugere que, devido às características morfológicas e funcionais diferentes do hipocampo, há um aumento do número de astrócitos nos indivíduos mais velhos (21 meses). Assim, concordando com resultados obtidos em outros trabalhos que verificaram aumento da gliose reativa no hipocampo em camundongos mais velhos de até 49 semanas (Balcombe e Sinclair, 2001, Benedict et al., 2012, Ferreira et al., 2014) e com o estudo de Haykawa e colaboradores que observou astrogliose na região CA1 do hipocampo de camundongos a partir de 40 até 59 semanas de idade (Hayakawa et al., 2007).

Os astrócitos são classicamente identificados como células que expressam o filamento intermediário glial, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Embora tenham sido definidos inicialmente como fundamentais para sustentar a atividade neuronal, muitas outras funções são executadas pelos astrócitos, incluindo a remoção de neurotransmissores e íons das fendas sinápticas (Malarkey e Parpura, 2008, Bergami et al., 2008, Bogen et al., 2008). Em várias disfunções do SNC, os astrócitos podem reagir prontamente aos danos, levando à ativação da astroglia, a qual é chamada de astrogliose (Eng e Ghirnikar, 1994). A astrogliose acontece secundariamente à ativação da microglia e é caracterizada pelo aumento da síntese de filamentos intermediários, acompanhada de hipertrofia celular e aumento anormal do número de astrócitos. O aumento da síntese de proteínas filamentosas, particularmente GFAP, portanto, é o principal marcador de astrogliose. A GFAP é a principal proteína do filamento intermediário nos astrócitos maduros e faz parte do citoesqueleto dos astrócitos, e sua síntese aumentada foi descrita em inúmeros modelos experimentais envolvendo astrogliose (Eng e Ghirnikar, 1994, Reinhard et al., 1988, Zhang et al., 2007).

Após a ativação da microglia, os astrócitos ativados secretam um enorme número de moléculas a fim de regularem diversos processos celulares. Trauma, isquemia, infecção, doenças neurológicas e a obesidade (Shefer et al., 2013, Malhotra et al., 1997, Wakasa et al., 2009, Okamoto et al., 2005) são distúrbios conhecidos por induzir astrogliose. No tecido nervoso que sofreu dano, os astrócitos reativos podem produzir citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas que são potencialmente lesivas para os neurônios e outras células da glia, o que, por sua vez, pode induzir a ativação de outras vias, culminando com a produção de espécies reativas de oxigênio e TNF- α (Oleszak et al., 1998).

A citocina IL1 é indicada como potencial fator-chave na patogênese da doença de Alzheimer (Griffin e Mrak, 2002), tendo em vista a participação dessa citocina na ativação glial que precede o dano neuronal e a hiperfosforilação da proteína tau (Akiyama et al., 2000). Além disso, sabendo-se da associação entre a resistência à insulina e lesões neuropatológicas, fez-se a quantificação da expressão da proteína tau-fosforilada (p-tau). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da p-tau entre os grupos, concordando em parte com o trabalho de Moroz e colaboradores, de 2008. Esse estudo relatou que, em camundongos que desenvolveram obesidade em resposta à dieta hiperlipídica, observaram-se lesões neuropatológicas junto a um significativo enfraquecimento da ligação da insulina a seu receptor na região do lobo temporal. A dieta hiperlipídica causou resistência à insulina no encéfalo, o que foi manifestado pela redução da capacidade máxima de ligação (Bmax) do receptor de insulina, e aumento da expressão do gene encefálico de insulina. Entretanto, da mesma forma que em nosso estudo, os ratos alimentados com dieta hiperlipídica não apresentaram aumento dos marcadores encefálicos de doença de Alzheimer, como a proteína tau hiperfosforilada. Esse mesmo estudo concluiu que, embora a obesidade e o diabetes *mellitus* do tipo 2 causem atrofia cerebral com resistência encefálica à insulina, bem como estresse oxidativo e degradação do citoesqueleto neuronal, na ausência de características típicas da doença de Alzheimer, a obesidade e o diabetes tipo 2 devem contribuir, mas não são suficientes para causar doença de Alzheimer (Moroz et al., 2008).

Apesar de não observarmos diferenças significativas na hiperfosforilação da proteína *tau* entre os grupos, não é possível afirmar que não houve dano no encéfalo, uma vez que há muitas outras proteínas que não foram estudadas e que poderiam estar sendo alteradas, como a proteína β -amiloide, proteínas envolvidas em vias da apoptose, entre outras. Além disso, também não foram realizados estudos avaliando a

memória e outros parâmetros comportamentais nesses animais, o que nos informaria sobre a integridade funcional do sistema nervoso central.

No presente trabalho, foi administrada dieta de cafeteria a ratas fêmeas a partir de 3 e 18 meses, a fim de verificar se os animais de diferentes idades responderiam de forma diferente ao tratamento, imaginando que os animais mais velhos sofreriam mais com os prejuízos causados pela obesidade. Embora nem todos os resultados tenham apresentado interação entre os efeitos da idade e da dieta, pode-se perceber que em vários aspectos, como deposição de gordura visceral, índice adiposo, astrocitose no sistema nervoso central, entre outros, os animais do grupo 21 meses apresentaram respostas diferentes dos animais do grupo 6 meses, mas que não necessariamente representam um pior desempenho fisiológico. Este estudo, somado ao fato de que há relativamente poucos trabalhos que abordam as respostas fisiológicas associadas ao envelhecimento, sugere que mais investigações sejam realizadas, a fim de esclarecer os mecanismos que estão envolvidos na fisiologia do envelhecimento e nas respostas adaptativas dos indivíduos mais velhos ao seu ambiente.

Conclusão

Diante dos resultados apresentados e da discussão elaborada, este estudo permite concluir que a dieta de cafeteria, quando administrada por 12 semanas a ratas *Wistar* de 6 e 21 meses:

- Induziu resistência à insulina;
- Induziu aumento do consumo energético diário dos animais;
- Induziu aumento do ganho de peso corporal, com participação do efeito do fator idade;
- Induziu o acúmulo de gordura abdominal, com participação do efeito do fator idade;
- Induziu o aumento do índice adiposo, com participação do efeito do fator idade
- Atuou, juntamente com a idade, na alteração dos níveis séricos de triacilgliceróis;
- Atuou juntamente, com a idade, na elevação da concentração da citocina proinflamatória IL1- β no córtex e no hipocampo dos animais estudados;
- Aumentou o número de astrócitos observados no córtex dos animais analisados;

Por outro lado, observou-se que a idade de 21 meses, quando comparada à idade de 6 meses:

- Induziu decréscimo da concentração sérica de HDL;
- Induziu decréscimo da concentração sérica de leptina;
- Promoveu o aumento da concentração de citocina proinflamatória IL1- β no hipocampo;
- Promoveu o aumento do número de astrócitos observados no hipocampo dos animais analisados.

Em suma, estes resultados sugerem que a maioria das respostas metabólicas encontradas ao longo do tratamento são causadas pela dieta de cafeteria e, na maioria das vezes, os efeitos potencialmente prejudiciais não são exacerbados pela idade avançada. Por outro lado, a dieta de cafeteria atuou em conjunto com a idade na manifestação de características inflamatórias no sistema nervoso central, como no aumento da concentração de IL-1 β no hipocampo e no córtex, e na indução da astrogliose no córtex. Para poder compreender melhor de que forma a dieta de cafeteria está interagindo com a idade para gerar um perfil proinflamatório, entre as

perspectivas para esse estudo estão a avaliação mais minuciosa da microglia, com quantificação da microglia ativada por outros marcadores além do CD68, quantificação de outras citocinas pró-inflamatórias circulantes, avaliação da integridade da barreira hematoencefálica e a realização de testes cognitivos.

Referências

- AHIMA, R. S. 2008. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J Clin Invest*, 118, 2380-3.
- AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S., BRADT, B., BAUER, J., COLE, G. M., COOPER, N. R., EIKELBOOM, P., EMMERLING, M., FIEBICH, B. L., FINCH, C. E., FRAUTSCHY, S., GRIFFIN, W. S., HAMPEL, H., HULL, M., LANDRETH, G., LUE, L., MRAK, R., MACKENZIE, I. R., MCGEER, P. L., O'BANION, M. K., PACHTER, J., PASINETTI, G., PLATA-SALAMAN, C., ROGERS, J., RYDEL, R., SHEN, Y., STREIT, W., STROHMEYER, R., TOOYOMA, I., VAN MUISWINKEL, F. L., VEERHUIS, R., WALKER, D., WEBSTER, S., WEGRZYNIAK, B., WENK, G. & WYSS-CORAY, T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21, 383-421.
- ALLAN, S. M., TYRRELL, P. J. & ROTHWELL, N. J. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*, 5, 629-40.
- ANTY, R., BEKRI, S., LUCIANI, N., SAINT-PAUL, M. C., DAHMAN, M., IANNELLI, A., AMOR, I. B., STACCINI-MYX, A., HUET, P. M., GUGENHEIM, J., SADOUL, J. L., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., TRAN, A. & GUAL, P. 2006. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol*, 101, 1824-33.
- ARAI, Y., TAKAYAMA, M., ABE, Y. & HIROSE, N. 2011. Adipokines and aging. *J Atheroscler Thromb*, 18, 545-50.
- ARONNE, L. J. & SEGAL, K. R. 2002. Adiposity and fat distribution outcome measures: assessment and clinical implications. *Obes Res*, 10 Suppl 1, 14S-21S.
- BADMAN, M. K. & FLIER, J. S. 2007. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology*, 132, 2103-15.
- BAHTIYAR, G., SHIN, J. J., AYTAMAN, A., SOWERS, J. R. & MCFARLANE, S. I. 2004. Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Curr Diab Rep*, 4, 194-8.
- BAKER, L. D., CROSS, D. J., MINOSHIMA, S., BELONGIA, D., WATSON, G. S. & CRAFT, S. 2011. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol*, 68, 51-7.
- BALCOMBE, N. R. & SINCLAIR, A. 2001. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15, 835-849.
- BANERJEE, S. & BHAT, M. A. 2007. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci*, 30, 235-58.
- BECKER, D. J., ONGEMBA, L. N., BRICHARD, V., HENQUIN, J. C. & BRICHARD, S. M. 1995. Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. *FEBS Lett*, 371, 324-8.
- BELANGER, M., ALLAMAN, I. & MAGISTRETTI, P. J. 2011. Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes. *J Neurochem*, 116, 564-76.
- BENEDICT, C., BROOKS, S. J., KULLBERG, J., BURGOS, J., KEMPTON, M. J., NORDENSKJOLD, R., NYLANDER, R., KILANDER, L., CRAFT, S., LARSSON, E. M., JOHANSSON, L., AHLSTROM, H., LIND, L. & SCHIOTH, H. B. 2012. Impaired insulin sensitivity as indexed by the HOMA score is associated with deficits in verbal fluency and temporal lobe gray matter volume in the elderly. *Diabetes Care*, 35, 488-94.
- BERG, A. H. & SCHERER, P. E. 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*, 96, 939-49.

- BERGAMI, M., SANTI, S., FORMAGGIO, E., CAGNOLI, C., VERDERIO, C., BLUM, R., BERNINGER, B., MATTEOLI, M. & CANOSSA, M. 2008. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J Cell Biol*, 183, 213-21.
- BEYDOUN, M. A., BEYDOUN, H. A. & WANG, Y. 2008. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 9, 204-18.
- BLAMIRE, A. M., ANTHONY, D. C., RAJAGOPALAN, B., SIBSON, N. R., PERRY, V. H. & STYLES, P. 2000. Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci*, 20, 8153-9.
- BLOCK, M. L., ZECCA, L. & HONG, J. S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 57-69.
- BOGEN, I. L., RISA, O., HAUG, K. H., SONNEWALD, U., FONNUM, F. & WALAAS, S. I. 2008. Distinct changes in neuronal and astrocytic amino acid neurotransmitter metabolism in mice with reduced numbers of synaptic vesicles. *J Neurochem*, 105, 2524-34.
- BOURA-HALFON, S. & ZICK, Y. 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296, E581-91.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAY, G. A., LOVEJOY, J. C., SMITH, S. R., DELANY, J. P., LEFEVRE, M., HWANG, D., RYAN, D. H. & YORK, D. A. 2002. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr*, 132, 2488-91.
- BRICHARD, S. M., DELPORTE, M. L. & LAMBERT, M. 2003. Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm Metab Res*, 35, 337-42.
- BRUUN, J. M., LIHN, A. S., VERDICH, C., PEDERSEN, S. B., TOUBRO, S., ASTRUP, A. & RICHELSEN, B. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, E527-33.
- CAI, D. 2013. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab*, 24, 40-7.
- CAI, D., YUAN, M., FRANTZ, D. F., MELENDEZ, P. A., HANSEN, L., LEE, J. & SHOELSON, S. E. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*, 11, 183-90.
- CAPEAU, J. 2007. The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. *J Hepatol*, 47, 736-8.
- CAVAILLON, J. M. 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47, 695-702.
- CETIN, D. C. & NASR, G. 2014. Obesity in the elderly: more complicated than you think. *Cleve Clin J Med*, 81, 51-61.
- CHAKRABORTY, S., KAUSHIK, D. K., GUPTA, M. & BASU, A. 2010. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. *J Neurosci Res*, 88, 1615-31.
- CHEN, B. P., KUZIEL, W. A. & LANE, T. E. 2001. Lack of CCR2 results in increased mortality and impaired leukocyte activation and trafficking following infection of the central nervous system with a neurotropic coronavirus. *J Immunol*, 167, 4585-92.
- CHO, K. H. 2009. Biomedical implications of high-density lipoprotein: its composition, structure, functions, and clinical applications. *BMB Rep*, 42, 393-400.
- CHUFFA, L. G. & SEIVA, F. R. 2013. Combined effects of age and diet-induced obesity on biochemical parameters and cardiac energy metabolism in rats. *Indian J Biochem Biophys*, 50, 40-7.
- CLOWES, G. H., JR., MARTIN, H., WALJI, S., HIRSCH, E., GAZITUA, R. & GOODFELLOW, R. 1978. Blood insulin responses to blood glucose levels in high output sepsis and septic shock. *Am J Surg*, 135, 577-83.

- DE SCHEPPER, J., ZHOU, X., DE BOCK, S., SMITZ, J., LOUIS, O., HOOGHE-PETERS, E. & VANDENPLAS, Y. 1998. Study of Serum Leptin in Cafeteria-Diet-Overfed Rats. *Hormone Research in Paediatrics*, 50, 271-275.
- DE SOUZA, C. T., ARAUJO, E. P., BORDIN, S., ASHIMINE, R., ZOLLNER, R. L., BOSCHERO, A. C., SAAD, M. J. & VELLOSO, L. A. 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146, 4192-9.
- DELPORTE, M. L., FUNAHASHI, T., TAKAHASHI, M., MATSUZAWA, Y. & BRICHARD, S. M. 2002. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J*, 367, 677-85.
- DESALVO, M. K., MAYER, N., MAYER, F. & BAINTON, R. J. 2011. Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of *Drosophila*. *Glia*, 59, 1322-40.
- DOWNES, C. E. & CRACK, P. J. 2010. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? *Br J Pharmacol*, 160, 1872-88.
- EHSES, J. A., PERREN, A., EPPLER, E., RIBAU, P., POSPISILIK, J. A., MAOR-CAHN, R., GUERPEL, X., ELLINGSGAARD, H., SCHNEIDER, M. K., BIOLLAZ, G., FONTANA, A., REINECKE, M., HOMO-DELARCHE, F. & DONATH, M. Y. 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, 56, 2356-70.
- ENG, L. F. & GHIRNIKAR, R. S. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, 4, 229-37.
- ENG, L. F., GHIRNIKAR, R. S. & LEE, Y. L. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, 25, 1439-51.
- ENG, L. F., VANDERHAEGHEN, J. J., BIGNAMI, A. & GERSTL, B. 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28, 351-4.
- ENGELMAN, J. A., BERG, A. H., LEWIS, R. Y., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. 2000. Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 14, 1557-69.
- ESTADELLA, D., OYAMA, L. M., DAMASO, A. R., RIBEIRO, E. B. & OLLER DO NASCIMENTO, C. M. 2004. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20, 218-24.
- FAIN, J. N., BAHOUTH, S. W. & MADAN, A. K. 2004. TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 616-22.
- FANTIN, F., DI FRANCESCO, V., FONTANA, G., ZIVELONGHI, A., BISSOLI, L., ZOICO, E., ROSSI, A., MICCIOLO, R., BOSELLO, O. & ZAMBONI, M. 2007. Longitudinal body composition changes in old men and women: interrelationships with worsening disability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62, 1375-81.
- FARR, S. A., BANKS, W. A. & MORLEY, J. E. 2006. Effects of leptin on memory processing. *Peptides*, 27, 1420-5.
- FEARNLEY, G. R., VINCENT, C. T. & CHAKRABARTI, R. 1959. Reduction of blood fibrinolytic activity in diabetes mellitus by insulin. *Lancet*, 2, 1067.
- FERREIRA, S. T., CLARKE, J. R., BOMFIM, T. R. & DE FELICE, F. G. 2014. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 10, S76-S83.
- FEUERER, M., HERRERO, L., CIPOLLETTA, D., NAAZ, A., WONG, J., NAYER, A., LEE, J., GOLDFINE, A. B., BENOIST, C., SHOELSON, S. & MATHIS, D. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, 15, 930-9.
- FLATT, P. R., BAILEY, C. J., KWASOWSKI, P., PAGE, T. & MARKS, V. 1984. Plasma immunoreactive gastric inhibitory polypeptide in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice. *Journal of Endocrinology*, 101, 249-256.
- FOTUHI, M., DO, D. & JACK, C. 2012. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nat Rev Neurol*, 8, 189-202.

- FOX, C. S., MASSARO, J. M., HOFFMANN, U., POU, K. M., MAUROVICH-HORVAT, P., LIU, C. Y., VASAN, R. S., MURABITO, J. M., MEIGS, J. B., CUPPLES, L. A., D'AGOSTINO, R. B., SR. & O'DONNELL, C. J. 2007. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 116, 39-48.
- FRANCESCHI, C., BONAFE, M., VALENSIN, S., OLIVIERI, F., DE LUCA, M., OTTAVIANI, E. & DE BENEDICTIS, G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908, 244-54.
- FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., IWAKI, M., YAMADA, Y., NAKAJIMA, Y., NAKAYAMA, O., MAKISHIMA, M., MATSUDA, M. & SHIMOMURA, I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114, 1752-61.
- GONZALEZ-SCARANO, F. & BALTUCH, G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*, 22, 219-40.
- GORELICK, P. B., SCUTERI, A., BLACK, S. E., DECARLI, C., GREENBERG, S. M., IADECOLA, C., LAUNER, L. J., LAURENT, S., LOPEZ, O. L., NYENHUIS, D., PETERSEN, R. C., SCHNEIDER, J. A., TZOURIO, C., ARNETT, D. K., BENNETT, D. A., CHUI, H. C., HIGASHIDA, R. T., LINDQUIST, R., NILSSON, P. M., ROMAN, G. C., SELLKE, F. W. & SESHADRI, S. 2011. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*, 42, 2672-713.
- GORINA, R., SANTALUCIA, T., PETEGNIEF, V., EJARQUE-ORTIZ, A., SAURA, J. & PLANAS, A. M. 2009. Astrocytes are very sensitive to develop innate immune responses to lipid-carried short interfering RNA. *Glia*, 57, 93-107.
- GOULARTE, J. F., FERREIRA, M. B. & SANVITTO, G. L. 2012. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr*, 108, 1511-8.
- GRAMMAS, P. 2011. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 8, 26.
- GREGOR, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, 415-45.
- GRIFFIN, R., NALLY, R., NOLAN, Y., MCCARTNEY, Y., LINDEN, J. & LYNCH, M. A. 2006. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *J Neurochem*, 99, 1263-72.
- GRIFFIN, W. S. & MRAK, R. E. 2002. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*, 72, 233-8.
- GUERRE-MILLO, M. 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab*, 30, 13-9.
- GULCELIK, N. E., HALIL, M., ARIOGUL, S. & USMAN, A. 2013. Adipocytokines and aging: adiponectin and leptin. *Minerva Endocrinol*, 38, 203-10.
- GUPTA, S., KNIGHT, A. G., GUPTA, S., KELLER, J. N. & BRUCE-KELLER, A. J. 2012. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*, 120, 1060-71.
- GUSTAFSON, D. R., KARLSSON, C., SKOOG, I., ROSENGREN, L., LISSNER, L. & BLENNOW, K. 2007. Mid-life adiposity factors relate to blood-brain barrier integrity in late life. *J Intern Med*, 262, 643-50.
- HALLE, A., HORNUNG, V., PETZOLD, G. C., STEWART, C. R., MONKS, B. G., REINHECKEL, T., FITZGERALD, K. A., LATZ, E., MOORE, K. J. & GOLENBOCK, D. T. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 9, 857-65.
- HALLEUX, C. M., TAKAHASHI, M., DELPORTE, M. L., DETRY, R., FUNAHASHI, T., MATSUZAWA, Y. & BRICHARD, S. M. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene

- expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 1102-7.
- HAUSER, G. & NEUMANN, M. 2005. Aging with quality of life--a challenge for society. *J Physiol Pharmacol*, 56 Suppl 2, 35-48.
- HAYAKAWA, N., KATO, H. & ARAKI, T. 2007. Age-related changes of astrocytes, oligodendrocytes and microglia in the mouse hippocampal CA1 sector. *Mech Ageing Dev*, 128, 311-6.
- HEINRICH, P. C., CASTELL, J. V. & ANDUS, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 265, 621-36.
- HIGGINS, J. A. 2004. Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *J AOAC Int*, 87, 761-8.
- HIMSWORTH, H. P. 1936. MANAGEMENT OF DIABETES MELLITUS. *Br Med J*, 2, 188-90.
- HO, A. J., STEIN, J. L., HUA, X., LEE, S., HIBAR, D. P., LEOW, A. D., DINOVI, I. D., TOGA, A. W., SAYKIN, A. J., SHEN, L., FOROUD, T., PANKRATZ, N., HUENTELMAN, M. J., CRAIG, D. W., GERBER, J. D., ALLEN, A. N., CORNEVEAUX, J. J., STEPHAN, D. A., DECARLI, C. S., DECHAIRO, B. M., POTKIN, S. G., JACK, C. R., JR., WEINER, M. W., RAJI, C. A., LOPEZ, O. L., BECKER, J. T., CARMICHAEL, O. T. & THOMPSON, P. M. 2010. A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8404-9.
- HOANE, M. R., SWAN, A. A. & HECK, S. E. 2011. The effects of a high-fat sucrose diet on functional outcome following cortical contusion injury in the rat. *Behav Brain Res*, 223, 119-24.
- HOLT, P. R. & BALINT, J. A. 1993. Effects of aging on intestinal lipid absorption. *Am J Physiol*, 264, G1-6.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L. & SPIEGELMAN, B. M. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95, 2409-15.
- HOTAMISLIGIL, G. S., PERALDI, P., BUDAVARI, A., ELLIS, R., WHITE, M. F. & SPIEGELMAN, B. M. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271, 665-8.
- HOTAMISLIGIL, G. S. & SPIEGELMAN, B. M. 1994. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 43, 1271-8.
- HSUCHOU, H., HE, Y., KASTIN, A. J., TU, H., MARKADAKIS, E. N., ROGERS, R. C., FOSSIER, P. B. & PAN, W. 2009. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain*, 132, 889-902.
- HUBERT, H. B., FEINLEIB, M., MCNAMARA, P. M. & CASTELLI, W. P. 1983. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 67, 968-77.
- HWANG, L. L., WANG, C. H., LI, T. L., CHANG, S. D., LIN, L. C., CHEN, C. P., CHEN, C. T., LIANG, K. C., HO, I. K., YANG, W. S. & CHIOU, L. C. 2010. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring)*, 18, 463-9.
- IRANI, D. N., LIN, K. I. & GRIFFIN, D. E. 1996. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol*, 157, 4333-40.
- ITO, A., SUGANAMI, T., YAMAUCHI, A., DEGAWA-YAMAUCHI, M., TANAKA, M., KOUYAMA, R., KOBAYASHI, Y., NITTA, N., YASUDA, K., HIRATA, Y., KUZIEL, W. A., TAKEYA, M., KANEGASAKI, S., KAMEI, Y. & OGAWA, Y. 2008. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J Biol Chem*, 283, 35715-23.
- JACOB, M. H. V. M., JANNER, D. D. R., ARAÚJO, A. S. D. R., JAHN, M. P., KUCHARSKI, L. C. R., MORAES, T. B., DUTRA FILHO, C. S., RIBEIRO, M. F. M. & BELLÓ-KLEIN, A. 2011.

- Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant reserve and stimulates Akt signaling in young and old rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 331-336.
- JACOBS, S., TEIXEIRA, D. S., GUILHERME, C., DA ROCHA, C. F., ARANDA, B. C., REIS, A. R., DE SOUZA, M. A., FRANCI, C. R. & SANVITTO, G. L. 2014. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiol Behav*, 129, 280-6.
- JAGUST, W., HARVEY, D., MUNGAS, D. & HAAN, M. 2005. Central obesity and the aging brain. *Arch Neurol*, 62, 1545-8.
- JEON, B. T., JEONG, E. A., SHIN, H. J., LEE, Y., LEE, D. H., KIM, H. J., KANG, S. S., CHO, G. J., CHOI, W. S. & ROH, G. S. 2012. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*, 61, 1444-54.
- KANASAKI, K. & KOYA, D. 2011. Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- KANOSKI, S. E., ZHANG, Y., ZHENG, W. & DAVIDSON, T. L. 2010. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimers Dis*, 21, 207-19.
- KASTIN, A. J. & PAN, W. 2003. Feeding peptides interact in several ways with the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 9, 789-94.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- KLEIN, S., ALLISON, D. B., HEYMSFIELD, S. B., KELLEY, D. E., LEIBEL, R. L., NONAS, C. & KAHN, R. 2007. Waist Circumference and Cardiometabolic Risk: a Consensus Statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 1061-7.
- KLEINRIDDER, A., SCHENTEN, D., KONNER, A. C., BELGARDT, B. F., MAUER, J., OKAMURA, T., WUNDERLICH, F. T., MEDZHITOV, R. & BRUNING, J. C. 2009. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab*, 10, 249-59.
- KOENIG, S., LUHESHI, G. N., WENZ, T., GERSTBERGER, R., ROTH, J. & RUMMEL, C. 2014. Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun*, 36, 128-38.
- KRESSEL, G., TRUNZ, B., BUB, A., HULSMANN, O., WOLTERS, M., LICHTINGHAGEN, R., STICHTENOTH, D. O. & HAHN, A. 2009. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. *Atherosclerosis*, 202, 263-71.
- KUFER, T. A. & SANSONETTI, P. J. 2011. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol*, 12, 121-8.
- LAFONTAN, M. & GIRARD, J. 2008. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*, 34, 317-27.
- LANGDON, K. D., CLARKE, J. & CORBETT, D. 2011. Long-term exposure to high fat diet is bad for your brain: exacerbation of focal ischemic brain injury. *Neuroscience*, 182, 82-7.
- LAVIN, D. N., JOESTING, J. J., CHIU, G. S., MOON, M. L., MENG, J., DILGER, R. N. & FREUND, G. G. 2011. Fasting induces an anti-inflammatory effect on the neuroimmune system which a high-fat diet prevents. *Obesity (Silver Spring)*, 19, 1586-94.
- LEE, C. M., HUXLEY, R. R., WILDMAN, R. P. & WOODWARD, M. 2008a. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol*, 61, 646-53.

- LEE, Y.-J., HAN, S. B., NAM, S.-Y., OH, K.-W. & HONG, J. T. 2010. Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacol Research*, 33, 1539-1556.
- LEE, Y. H., THARP, W. G., MAPLE, R. L., NAIR, S., PERMANA, P. A. & PRATLEY, R. E. 2008b. Amyloid precursor protein expression is upregulated in adipocytes in obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1493-500.
- LIU, J., DIVOUX, A., SUN, J., ZHANG, J., CLEMENT, K., GLICKMAN, J. N., SUKHOVA, G. K., WOLTERS, P. J., DU, J., GORGUN, C. Z., DORIA, A., LIBBY, P., BLUMBERG, R. S., KAHN, B. B., HOTAMISLIGIL, G. S. & SHI, G. P. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*, 15, 940-5.
- LU, T., PAN, Y., KAO, S. Y., LI, C., KOHANE, I., CHAN, J. & YANKNER, B. A. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429, 883-91.
- LUCHSINGER, J. A. 2008. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol*, 585, 119-29.
- LUE, L. F., WALKER, D. G. & ROGERS, J. 2001. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol Aging*, 22, 945-56.
- LUKIW, W. J. 2004. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. *Neurochem Res*, 29, 1287-97.
- LYNCH, M. A. 2010. Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Front Aging Neurosci*, 1, 6.
- MAEDA, K., OKUBO, K., SHIMOMURA, I., FUNAHASHI, T., MATSUZAWA, Y. & MATSUBARA, K. 2012. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochem Biophys Res Commun*, 425, 556-9.
- MALARKEY, E. B. & PARPURA, V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*, 52, 142-54.
- MALHOTRA, S. K., LUONG, L. T., BHATNAGAR, R. & SHNITKA, T. K. 1997. Up-regulation of reactive astrogliosis in the rat glioma 9L cell line by combined mechanical and chemical injuries. *Cytobios*, 89, 115-34.
- MARTINON, F. & TSCHOPP, J. 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 117, 561-74.
- MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F. & TURNER, R. C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-9.
- MAURY, E. & BRICHARD, S. M. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314, 1-16.
- MAURY, E., NOEL, L., DETRY, R. & BRICHARD, S. M. 2009. In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 1393-400.
- MILANSKI, M., DEGASPERI, G., COOPE, A., MORARI, J., DENIS, R., CINTRA, D. E., TSUKUMO, D. M., ANHE, G., AMARAL, M. E., TAKAHASHI, H. K., CURI, R., OLIVEIRA, H. C., CARVALHEIRA, J. B., BORDIN, S., SAAD, M. J. & VELLOSO, L. A. 2009. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*, 29, 359-70.
- MOHAMED-ALI, V., GOODRICK, S., RAWESH, A., KATZ, D. R., MILES, J. M., YUDKIN, J. S., KLEIN, S. & COPPACK, S. W. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 4196-200.
- MONTAGUE, C. T., PRINS, J. B., SANDERS, L., ZHANG, J., SEWTER, C. P., DIGBY, J., BYRNE, C. D. & O'RAHILLY, S. 1998. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, 47, 1384-91.

- MORAES, J. C., COOPE, A., MORARI, J., CINTRA, D. E., ROMAN, E. A., PAULI, J. R., ROMANATTO, T., CARVALHEIRA, J. B., OLIVEIRA, A. L., SAAD, M. J. & VELLOSO, L. A. 2009. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*, 4, e5045.
- MORLEY, J. E. 2001. Decreased food intake with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56 Spec No 2, 81-8.
- MORLEY, J. E. & SILVER, A. J. 1988. Anorexia in the elderly. *Neurobiol Aging*, 9, 9-16.
- MOROZ, N., TONG, M., LONGATO, L., XU, H. & DE LA MONTE, S. M. 2008. Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Alzheimers Dis*, 15, 29-44.
- MUSEN, G., JACOBSON, A. M., BOLO, N. R., SIMONSON, D. C., SHENTON, M. E., MCCARTNEY, R. L., FLORES, V. L. & HOOGENBOOM, W. S. 2012. Resting-state brain functional connectivity is altered in type 2 diabetes. *Diabetes*, 61, 2375-9.
- NAKAMURA, T., FURUHASHI, M., LI, P., CAO, H., TUNCMAN, G., SONENBERG, N., GORGUN, C. Z. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2010. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, 140, 338-48.
- NISHIMURA, S., MANABE, I., NAGASAKI, M., ETO, K., YAMASHITA, H., OHSUGI, M., OTSU, M., HARA, K., UEKI, K., SUGIURA, S., YOSHIMURA, K., KADOWAKI, T. & NAGAI, R. 2009. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*, 15, 914-20.
- O'CALLAGHAN, J. P. & JENSEN, K. F. 1992. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 13, 113-22.
- O'DONNELL, E., VEREKER, E. & LYNCH, M. A. 2000. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci*, 12, 345-52.
- O'NEILL, L. A. 2004. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol*, 25, 687-93.
- OBICI, S. & ROSSETTI, L. 2003. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology*, 144, 5172-8.
- OBICI, S., ZHANG, B. B., KARKANIAS, G. & ROSSETTI, L. 2002. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*, 8, 1376-82.
- OGSTON, D. & MCANDREW, G. M. 1964. FIBRINOLYSIS IN OBESITY. *Lancet*, 2, 1205-7.
- OHMURA, K., ISHIMORI, N., OHMURA, Y., TOKUHARA, S., NOZAWA, A., HORII, S., ANDOH, Y., FUJII, S., IWABUCHI, K., ONOE, K. & TSUTSUI, H. 2010. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 193-9.
- OKA, R., KOBAYASHI, J., INAZU, A., YAGI, K., MIYAMOTO, S., SAKURAI, M., NAKAMURA, K., MIURA, K., NAKAGAWA, H. & YAMAGISHI, M. 2010. Contribution of visceral adiposity and insulin resistance to metabolic risk factors in Japanese men. *Metabolism*, 59, 748-54.
- OKAMOTO, M., WANG, X. & BABA, M. 2005. HIV-1-infected macrophages induce astrogliosis by SDF-1 α and matrix metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 336, 1214-20.
- OLEFSKY, J. M. & GLASS, C. K. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*, 72, 219-46.
- OLESZAK, E. L., ZACZYNSKA, E., BHATTACHARJEE, M., BUTUNOI, C., LEGIDO, A. & KATSETOS, C. D. 1998. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 438-45.
- OUCHI, N., PARKER, J. L., LUGUS, J. J. & WALSH, K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 85-97.
- OUCHI, N. & WALSH, K. 2007. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta*, 380, 24-30.

- PAN, W., HSUCHOU, H., HE, Y., SAKHARKAR, A., CAIN, C., YU, C. & KASTIN, A. J. 2008. Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology*, 149, 2798-806.
- PAN, W., TU, H., HSUCHOU, H., DANIEL, J. & KASTIN, A. J. 2007. Unexpected amplification of leptin-induced Stat3 signaling by urocortin: implications for obesity. *J Mol Neurosci*, 33, 232-8.
- PATSOURIS, D., LI, P. P., THAPAR, D., CHAPMAN, J., OLEFSKY, J. M. & NEELS, J. G. 2008. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*, 8, 301-9.
- PISARSKA, M., MULCHAHEY, J. J., WELGE, J. A., GERACIOTI JR, T. D. & KASCKOW, J. W. 2000. Age-related alterations in emotional behaviors and amygdalar corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in aged Fischer 344 rats. *Brain Research*, 877, 184-190.
- PISTELL, P. J., MORRISON, C. D., GUPTA, S., KNIGHT, A. G., KELLER, J. N., INGRAM, D. K. & BRUCE-KELLER, A. J. 2010. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 219, 25-32.
- PRADA, P. O., ZECCHIN, H. G., GASPARETTI, A. L., TORSONI, M. A., UENO, M., HIRATA, A. E., COREZOLA DO AMARAL, M. E., HÖER, N. F., BOSCHERO, A. C. & SAAD, M. J. A. 2005. Western Diet Modulates Insulin Signaling, c-Jun N-Terminal Kinase Activity, and Insulin Receptor Substrate-1ser307 Phosphorylation in a Tissue-Specific Fashion. *Endocrinology*, 146, 1576-1587.
- PRATS, E., MONFAR, M., CASTELLÀ, J., IGLESIAS, R. & ALEMANY, M. 1989. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiology & Behavior*, 45, 263-272.
- PRENTICE, A. M. & JEBB, S. A. 2001. Beyond body mass index. *Obes Rev*, 2, 141-7.
- PUIG, K. L., FLODEN, A. M., ADHIKARI, R., GOLOVKO, M. Y. & COMBS, C. K. 2012. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*, 7, e30378.
- QUERFURTH, H. W. & LAFERLA, F. M. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 362, 329-44.
- RAJI, C. A., LOPEZ, O. L., KULLER, L. H., CARMICHAEL, O. T. & BECKER, J. T. 2009. Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology*, 73, 1899-905.
- REAVEN, G. M. 2005. Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 34, 49-62.
- REINHARD, J. F., JR., MILLER, D. B. & O'CALLAGHAN, J. P. 1988. The neurotoxicant MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) increases glial fibrillary acidic protein and decreases dopamine levels of the mouse striatum: evidence for glial response to injury. *Neurosci Lett*, 95, 246-51.
- RIVERA, P., PEREZ-MARTIN, M., PAVON, F. J., SERRANO, A., CRESPILO, A., CIFUENTES, M., LOPEZ-AVALOS, M. D., GRONDONA, J. M., VIDA, M., FERNANDEZ-LLEBREZ, P., DE FONSECA, F. R. & SUAREZ, J. 2013. Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One*, 8, e64750.
- ROTHWELL, N. J. & STOCK, M. J. 1979. Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology; Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 1024-1034.
- RUIZ CANTERO, A. 2011. [Control of cardiovascular risk in the elderly]. *Rev Clin Esp*, 211 Suppl 1, 2-7.
- SAGHIZADEH, M., ONG, J. M., GARVEY, W. T., HENRY, R. R. & KERN, P. A. 1996. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*, 97, 1111-6.

- SALMINEN, A., OJALA, J., SUURONEN, T., KAARNIRANTA, K. & KAUPPINEN, A. 2008. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *J Cell Mol Med*, 12, 2255-62.
- SAMPATH, H. & NTAMBI, J. M. 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev*, 62, 333-9.
- SHEFER, G., MARCUS, Y. & STERN, N. 2013. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev*, 37, 2489-503.
- SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116, 1793-801.
- SIDIROPOULOS, P. I., KARVOUNARIS, S. A. & BOUMPAS, D. T. 2008. Metabolic syndrome in rheumatic diseases: epidemiology, pathophysiology, and clinical implications. *Arthritis Res Ther*, 10, 207.
- SOLINAS, G. & KARIN, M. 2010. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*, 24, 2596-611.
- SOUZA, F. R., SCHROEDER, P. O. & LIBERALI, L. 2007. Obesidade e Envelhecimento. . *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.*, 1, 24-35.
- STEFANI, M. & LIGURI, G. 2009. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr Alzheimer Res*, 6, 15-29.
- STEPHENS, J. M., LEE, J. & PILCH, P. F. 1997. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 272, 971-6.
- STREIT, W. J. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40, 133-9.
- STRISSEL, K. J., STANCHEVA, Z., MIYOSHI, H., PERFIELD, J. W., 2ND, DEFURIA, J., JICK, Z., GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. 2007. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, 56, 2910-8.
- STRLE, K., ZHOU, J. H., SHEN, W. H., BROUSSARD, S. R., JOHNSON, R. W., FREUND, G. G., DANTZER, R. & KELLEY, K. W. 2001. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*, 21, 427-49.
- STUTZ, A., GOLENBOCK, D. T. & LATZ, E. 2009. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest*, 119, 3502-11.
- SUN, Q., TOWNSEND, M. K., OKEREKE, O. I., FRANCO, O. H., HU, F. B. & GRODSTEIN, F. 2009. Adiposity and weight change in mid-life in relation to healthy survival after age 70 in women: prospective cohort study. *BMJ*, 339, b3796.
- TADDEI, C. F. G., RAMOS, L. R., MORAES, J. C. D., WAJNGARTEN, M., LIBBERMAN, A., SANTOS, S. C., SAVIOLI, F., DIOGUARDI, G. & FRANKEN, R. 1997. Estudo multicêntrico de idosos atendidos em ambulatórios de cardiologia e geriatria de instituições brasileiras. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 69, 327-333.
- TAN, Z. S., BEISER, A. S., VASAN, R. S., ROUBENOFF, R., DINARELLO, C. A., HARRIS, T. B., BENJAMIN, E. J., AU, R., KIEL, D. P., WOLF, P. A. & SESHADRI, S. 2007. Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology*, 68, 1902-8.
- TAPIA-GONZALEZ, S., GARCIA-SEGURA, L. M., TENA-SEMPERE, M., FRAGO, L. M., CASTELLANO, J. M., FUENTE-MARTIN, E., GARCIA-CACERES, C., ARGENTE, J. & CHOWEN, J. A. 2011. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. *J Neuroendocrinol*, 23, 365-70.
- TEIXEIRA, I. N. & GUARIENTO, M. E. 2010. [Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives]. *Cien Saude Colet*, 15, 2845-57.
- TERAO, A., APTE-DESHPANDE, A., DOUSMAN, L., MORAIRTY, S., EYNON, B. P., KILDUFF, T. S. & FREUND, Y. R. 2002. Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J Neuroimmunol*, 132, 99-112.

- TOIDA, S., TAKAHASHI, M., SHIMIZU, H., SATO, N., SHIMOMURA, Y. & KOBAYASHI, I. 1996. Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male Wistar rat. *Obes Res*, 4, 561-8.
- TRIFILO, M. J. & LANE, T. E. 2004. The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology*, 327, 8-15.
- TUCSEK, Z., TOTH, P., SOSNOWSKA, D., GAUTAM, T., MITSCHELEN, M., KOLLER, A., SZALAI, G., SONNTAG, W. E., UNGVARI, Z. & CSISZAR, A. 2013. Obesity in Aging Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in the Mouse Hippocampus: Effects on Expression of Genes Involved in Beta-Amyloid Generation and Alzheimer's Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- UYVAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-4.
- VAGUE, J. 1996. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. 1956. *Obes Res*, 4, 204-12.
- VASTO, S., CANDORE, G., BALISTRERI, C. R., CARUSO, M., COLONNA-ROMANO, G., GRIMALDI, M. P., LISTI, F., NUZZO, D., LIO, D. & CARUSO, C. 2007. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev*, 128, 83-91.
- VERKHRATSKY, A., OLABARRIA, M., NORISTANI, H. N., YEH, C. Y. & RODRIGUEZ, J. J. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 7, 399-412.
- WAKASA, S., SHIYA, N., TACHIBANA, T., OOKA, T. & MATSUI, Y. 2009. A semiquantitative analysis of reactive astrogliosis demonstrates its correlation with the number of intact motor neurons after transient spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 137, 983-90.
- WANG, Y. C., COLDITZ, G. A. & KUNTZ, K. M. 2007. Forecasting the obesity epidemic in the aging U.S. population. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 2855-65.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1796-1808.
- WICHTERMAN, K. A., CHAUDRY, I. H. & BAUE, A. E. 1979. Studies of peripheral glucose uptake during sepsis. *Arch Surg*, 114, 740-5.
- WOLEVER, T. M. 2000. Dietary carbohydrates and insulin action in humans. *Br J Nutr*, 83 Suppl 1, S97-102.
- WOLF, P. A., BEISER, A., ELIAS, M. F., AU, R., VASAN, R. S. & SESHADRI, S. 2007. Relation of obesity to cognitive function: importance of central obesity and synergistic influence of concomitant hypertension. The Framingham Heart Study. *Curr Alzheimer Res*, 4, 111-6.
- WOUDSTRA, T. & THOMSON, A. B. 2002. Nutrient absorption and intestinal adaptation with ageing. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16, 1-15.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112, 1821-30.
- YALOW, R. S., GLICK, S. M., ROTH, J. & BERSON, S. A. 1965. Plasma insulin and growth hormone levels in obesity and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 131, 357-73.
- YAMAUCHI, T., NIO, Y., MAKI, T., KOBAYASHI, M., TAKAZAWA, T., IWABU, M., OKADA-IWABU, M., KAWAMOTO, S., KUBOTA, N., KUBOTA, T., ITO, Y., KAMON, J., TSUCHIDA, A., KUMAGAI, K., KOZONO, H., HADA, Y., OGATA, H., TOKUYAMA, K., TSUNODA, M., IDE, T., MURAKAMI, K., AWAZAWA, M., TAKAMOTO, I., FROGUEL, P., HARA, K., TOBE, K., NAGAI, R., UEKI, K. & KADOWAKI, T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and

- AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 13, 332-9.
- YU, Y. H. & ZHU, H. 2004. Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E402-10.
- ZAGAYKO, A. L., KRAVCHENKO, G. B., KRASILNIKOVA, O. A. & OGAI, Y. O. 2013. Grape polyphenols increase the activity of HDL enzymes in old and obese rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 593761.
- ZHANG, D., HU, X., QIAN, L., O'CALLAGHAN, J. P. & HONG, J. S. 2010. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol*, 41, 232-41.
- ZHANG, L., ZHANG, W. P., CHEN, K. D., QIAN, X. D., FANG, S. H. & WEI, E. Q. 2007. Caffeic acid attenuates neuronal damage, astrogliosis and glial scar formation in mouse brain with cryoinjury. *Life Sci*, 80, 530-7.
- ZHANG, X., DONG, F., REN, J., DRISCOLL, M. J. & CULVER, B. 2005. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*, 191, 318-25.
- ZHANG, X., ZHANG, G., ZHANG, H., KARIN, M., BAI, H. & CAI, D. 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, 135, 61-73.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.
- ZLOKOVIC, B. V. 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 12, 723-38.

Site consultado

Organização Mundial da Saúde: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/. Disponível em março de 2014.