

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**A neuroimunomodulação na Síndrome Metabólica: a participação dos  
receptores do tipo Toll 4**

**Nathalie Vieira Rosa de Souza Obadia Pereira**

**Orientadores: Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida e Dr. Eduardo  
Tibiriçá**

**Rio de Janeiro**

**2019**

Vieira Rosa de Souza Obadia Pereira, Nathalie .

A neuroimunomodulação na Síndrome Metabólica: a participação dos receptores do tipo Toll 4 / Nathalie Vieira Rosa de Souza Obadia Pereira. - Rio de Janeiro, 2019.

104 f.

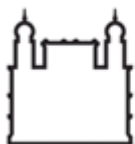
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Vanessa Estato de Freitas Almeida.

Co-orientadora: Eduardo Vera Tibiriçá.

Bibliografia: f. 81-89

1. Neuroimunomodulação. 2. Síndrome metabólica. 3. Receptores do tipo toll 4. 4. microcirculação cerebral. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***NATHALIE VIEIRA ROSA DE SOUZA OBADIA PEREIRA***

#### **A neuroimunomodulação na Síndrome Metabólica: a participação dos receptores do tipo *Toll 4***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular

**Orientadores: Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida e Dr. Eduardo Tibiriçá**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)"

Código de Financiamento 001

**Rio de Janeiro**

**2019**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Autora: Nathalie Vieira Rosa De Souza Obadia Pereira**

### **A neuroimunomodulação na Síndrome Metabólica: a participação dos receptores do tipo *Toll* 4**

Orientadores: Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida e Dr. Eduardo Tibiriçá

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### **EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Vinícius Frias de Carvalho - Presidente – IOC

Prof. Dr. Cláudio Serfaty - UFF

Profa. Dra. Thereza Quírico - UFF

Suplente - Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso - IOC

Suplente – Dra. Monique Trugilho – IOC

Revisor – Dr. Vinicius Cotta de Almeida - IOC

Rio de Janeiro

2019

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, meu Pai, por me revelar mais do Seu amor todos os dias e me fazer entender que Seus propósitos são sempre maiores que os meus.

A minha Orientadora Dra. Vanessa Estato, que me acompanhou desde os primeiros passos na carreira científica até este momento, agradeço pela sua amizade e pelos seus ensinamentos teóricos e práticos, os levarei para vida! Obrigada por sempre ser tão presente em todos os momentos.

Agradeço ao Dr. Eduardo Tibiriçá pelas oportunidades concedidas e por sua orientação ao longo deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Hugo Caire por me receber em seu laboratório e por suas contribuições sempre muito relevantes, tornando este trabalho melhor.

Agradeço as alunas de iniciação científica Carolina Souza, Giulia Andrade e Letícia Albuquerque pela ajuda em diferentes fases deste trabalho.

Agradeço ao Dr. André Salles e a equipe do biotério do pavilhão Ozório de Almeida, pelo auxílio quanto ao manuseio e cuidado com os animais.

Ao Dr. Pedro Paulo Manso pelo apoio e a Giulia Seiblitz por toda colaboração na obtenção das imagens no microscópio confocal, na plataforma de microscopia do IOC.

Agradeço a Dra. Flávia Lima pelas contribuições e a Celina Garcia pela colaboração na realização dos experimentos de Imunohistoquímica, no Laboratório de Biologia de Células Gliais da UFRJ.

Agradeço ao Dr. Júlio Beltrame por permitir a realização dos exames de DEXA no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional, UERJ e ao técnico Jonathan Pereira pelo apoio.

Agradeço em especial ao meu marido Jonas Obadia, por sempre acreditar que posso ir além. Obrigada pelo seu amor e carinho incondicional. E ao meu filho Samuel por ser a minha razão de querer seguir adiante e conquistar lugares altos, dedico este trabalho a vocês!

Agradeço aos meus pais Eraldo e Maeli por toda ajuda, sem ela a realização deste trabalho também não seria possível.

Há duas formas para viver a vida.  
Uma é acreditar que não existe  
milagre. A outra é acreditar que  
todas as coisas são um milagre.

Albert Einstein

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.2 Receptores do tipo <i>Toll</i> e a Síndrome Metabólica	4
1.3 Síndrome Metabólica e a Neurodegeneração	8
1.4 A unidade Neurovascular	9
1.4.1 Microglia	12
<b>2. HIPÓTESE E OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1 Hipótese	13
2.2 Objetivo Geral	13
2.3 Objetivos específicos	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Animais	14
3.2 Dieta controle e dieta hiperlipídica	14
3.3 Delineamento experimental	15
3.4 Medidas de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca	16
3.5 Teste do labirinto aquático	17
3.6 Teste do medo condicionado - <i>Freezing</i>	18
3.7 Quantificação de gordura abdominal e percentual de gordura total	19
3.8 Procedimento cirúrgico para realização da janela craniana para análise da microcirculação cerebral	21
3.9 Fluxometria microcirculatória a laser (Laser Speckle Contrast Imaging)	21
3.10 Microscopia intravital cerebral por epi-iluminação e fluorescência	21
3.11 Eutanásia	22
3.12 Coleta de sangue	23
3.13 Coletas de tecidos	23
3.14 Imunohistoquímica	23
3.15 Colocalização	25
3.16 AngioTool	25
3.17 Microglias	25
3.18 Dosagem de Colesterol, Triglicerídeos, insulina de jejum e HOMA-IR	26
3.19 Análise de expressão proteica por Western blot	26
3.20 Análise estatística	27

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>1º Bloco – Modelo da SM em camundongos C57BL/6</b>	<b>28</b>
4.1 Dieta hiperlipídica induz alterações na composição corporal, perfil lipídico, glicemia e parâmetros hemodinâmicos, após 24 semanas.	28
4.2 Dieta hiperlipídica acarreta hiperinsulinemia e resistência à insulina após 24 semanas	29
4.3 Dieta hiperlipídica leva a disfunção microvascular cerebral após 24 semanas	30
4.3.1 Densidade Capilar Funcional cerebral	30
4.3.2 Fluxo sanguíneo cerebral	31
4.3.3 Função endotelial vascular cerebral	32
4.3.4 Rolamento e Adesão de Leucócitos em vênulas cerebrais	33
<b>2º Bloco – Modelo de SM em camundongos mutantes para o TLR4</b>	<b>35</b>
4.4 Investigação do papel do TLR4 na evolução da SM sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e glicemia de jejum	35
4.5 Envolvimento do TLR4 na evolução da SM, sobre a insulina de jejum e HOMA-IR	36
4.6 Envolvimento do TLR4 na evolução da SM, sobre os parâmetros microcirculatórios	37
<b>3º Bloco – Efeitos da gordura abdominal versus dieta hiperlipídica nos parâmetros metabólicos, microcirculatórios e inflamatórios</b>	<b>42</b>
4.7 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica diminui a massa corporal e a pressão arterial sistólica de animais WT	42
4.8 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica não interfere nos parâmetros microcirculatórios cerebrais	44
4.9 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica promove diminuição no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais em animais de animais WT	45
4.10 Ingestão da dieta hiperlipídica por uma semana não altera a composição corporal e microcirculação cerebral em ambos os grupos WT e TLR4-mut	46
<b>4º Bloco: Investigação do papel do TLR4 na SM</b>	<b>48</b>
4.11 Envolvimento do TLR4 sobre a composição corporal, perfil lipídico, insulina de jejum, glicemia de jejum e parâmetros hemodinâmicos no modelo de SM	48
4.12 Efeitos do TLR4 sobre a quantidade e área dos adipócitos no modelo de SM	50
4.13 Envolvimento do TLR4 sobre os parâmetros microcirculatórios no modelo de SM	53
4.13.1 Fluxo sanguíneo cerebral	53
4.13.2 Densidade capilar funcional	53
4.13.3 Função endotelial vascular cerebral	53
4.13.4 Rolamento e adesão de leucócitos na parede vascular cerebral	56



<b>4.14 Envolvimento do TLR4 sobre a resposta cognitiva no modelo de SM</b>	<b>58</b>
4.14.1 Labirinto aquático de Morris	58
4.14.2 Teste do medo condicionado	60
<b>4.15 Papel do TLR4 sobre a expressão proteica de marcadores inflamatórios no cérebro no modelo de SM</b>	<b>62</b>
<b>4.16 Efeitos do TLR4 sobre os vasos cerebrais no modelo de SM</b>	<b>66</b>
<b>4.17 Efeitos do TLR4 sobre as microglias no modelo de SM</b>	<b>73</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>78</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Receptores do tipo toll (TLRs) e seus ligantes .....	5
Figura 2 Via de sinalização do TLR4 .....	7
Figura 3 Localização e composição da unidade neurovascular .....	10
Figura 4 Sistema de medida de pressão.....	16
Figura 5 Caixa d'água utilizada no experimento de natação forçada.....	18
Figura 6 Equipamento utilizado no ensaio de freezing.....	19
Figura 7 Insulina e HOMA-IR.....	30
Figura 8 Densidade capilar funcional cerebral e fotomicrografias representativas da videomicroscopia intravital da microcirculação cerebral.....	31
Figura 9 Fluxo sanguíneo cerebral.....	32
Figura 10 Resposta vasodilatadora à acetilcolina .....	33
Figura 11 Rolamento, Adesão de Leucócitos e fotomicrografias representativas da videomicroscopia intravital de vênulas pós-capilares da microcirculação cerebral..	34
Figura 12 Insulina e HOMA-IR.....	37
Figura 13 Densidade capilar funcional cerebral, fluxo sanguíneo cerebral e resposta vasodilatadora a acetilcolina de camundongos TLR4-mut alimentados com dieta hiperlipídica. ....	38
Figura 14 Rolamento e Adesão de Leucócitos. ....	39
Figura 15 Fluxo Sanguíneo Cerebral e Densidade Capilar Funcional Cerebral de camundongos C57BL/6 (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) .....	44
Figura 16 Rolamento e Adesão de leucócitos em vênulas cerebrais de camundongos C57BL/6 (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut).....	45
Figura 17 Massa corporal e gordura abdominal total de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut).....	46
Figura 18 Densidade capilar funcional e fluxo sanguíneo cerebral de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut).....	47
Figura 19 Rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut).....	47
Figura 20 Quantificação e morfologia dos adipócitos. Área, número de adipócitos epididimais e fotomicrografias representativas .....	52
Figura 21 Análises da microcirculação cerebral .....	55
Figura 22 Rolamento e Adesão de Leucócitos. ....	57
Figura 23 Curva de aprendizado e latência no teste Water Maze.. ....	59
Figura 24 Teste do medo condicionado. ....	61
Figura 25 Níveis de proteína da molécula de adesão intercelular-1/CD54 (ICAM-1).....	63
Figura 26 Níveis da proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1).....	64
Figura 27 Níveis proteicos do receptor do tipo toll (TLR4).....	65
Figura 28 Rede vascular no córtex cerebral.....	67
Figura 29 Rede vascular no hipocampo .....	69
Figura 30 Colocalização de astrócitos com vaso no hipocampo. ....	71
Figura 31 Análise de microglias no córtex.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica .....	2
Tabela 2 Composição das Rações .....	15
Tabela 3 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos do modelo de SM em camundongos C57BL/6.....	29
Tabela 4 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos do modelo de SM em camundongos TLR4-mut .....	36
Tabela 5 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos após substituição da dieta HFD pela DN.....	43
Tabela 6 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos de camundongos WT e TLR4- mut no modelo de SM .....	50



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**A neuroimunomodulação na Síndrome Metabólica: a participação dos receptores do tipo *Toll 4***

**RESUMO**  
**TESE DE DOUTORADO**

**Nathalie Vieira Rosa de Souza Obadia Pereira**

A síndrome metabólica (SM) é definida como um estado pró-inflamatório de baixo grau, no qual fatores metabólicos e cardiovasculares anormais aumentam o risco de desenvolver doença cardiovascular e neuroinflamação. Eventos como o acúmulo de tecido adiposo visceral, aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, hipóxia tecidual e hiperatividade simpática na SM, podem contribuir para a ativação direta ou indireta dos receptores do tipo Toll (TLR), especificamente o TLR-4, considerado como um receptor envolvido em todos os componentes desta síndrome. A ativação da resposta imune inata, via TLR4 pode contribuir para este estado de inflamação crônica e pode estar relacionada com a neuroinflamação e neurodegeneração observadas na SM. Neste estudo, investigamos o papel dos receptores TLR4 na microcirculação cerebral e no desempenho cognitivo de camundongos com SM induzida por dieta hiperlipídica (HFD). O modelo de SM induzido por HFD em camundongos acarreta em alterações metabólicas, hemodinâmicas e microcirculatórias evidenciadas pela rarefação capilar, aumento do rolamento e adesão de leucócitos em vênulas pós-capilares e disfunção endotelial, que estão diretamente relacionadas ao declínio cognitivo e neuroinflamação. O mesmo modelo de SM reproduzido em camundongos que possuem uma mutação genética, que os torna deficientes para o TLR4, não gera tais alterações. Também demonstramos que a substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica é capaz de reverter as alterações inflamatórias na microcirculação cerebral e este efeito, possivelmente, está relacionado a menor ativação do TLR4. Ainda verificamos que a ingestão de HFD por uma semana não é capaz de induzir alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais nos animais controles e mutantes para o TLR4-HFD. Portanto, nossos resultados demonstram que o TLR4 está envolvido na disfunção microvascular e neuroinflamação associada à SM induzida por HFD e, possivelmente, desempenham um papel causal no desenvolvimento do declínio cognitivo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**ABSTRACT**  
**TESE DE DOUTORADO**

**Nathalie Vieira Rosa de Souza Obadia Pereira**

Metabolic syndrome (MS) is defined as a low-grade pro-inflammatory state in which abnormal metabolic and cardiovascular factors increase the risk of developing cardiovascular disease and neuroinflammation. Events such as the accumulation of visceral adipose tissue, increased plasma concentrations of free fatty acids, tissue hypoxia and sympathetic hyperactivity in SM may contribute to the direct or indirect activation of Toll-like receptors (TLR), specifically TLR-4, considered as a receptor involved in all components of this syndrome. Activation of the innate immune response via TLR4 may contribute to this state of chronic inflammation and may be related to neuroinflammation and neurodegeneration observed in MS. In this study, we investigated the role of TLR4 receptors in the brain microcirculation and in the cognitive performance of high fat diet (HFD)-induced MS mice. The HFD-induced MS model leads to metabolic, hemodynamic and microcirculatory alterations evidenced by capillary rarefaction, increased rolling and leukocyte adhesion in post-capillary venules and endothelial dysfunction, which are directly related to cognitive decline and neuroinflammation. The same model of MS reproduced in mice that have a genetic mutation, which makes them deficient for TLR4, does not generate such changes. We also demonstrated that the replacement of the HFD by the normolipid diet is able to reveal the inflammatory changes in the cerebral microcirculation and this effect is possibly related to the lower activation of the TLR4. We also observed that the ingestion of HFD for one week is not able to induce cerebral microcirculatory and inflammatory changes in the control and TLR4 mutant animals. Therefore, our results demonstrate that TLR4 is involved in microvascular dysfunction and neuroinflammation associated with HFD-induced MS and possibly play a causal role in the development of cognitive decline.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 20-HETE... Ácido 20-hidroxeicosatetraenóico
- Ach... Acetilcolina
- AGL... Ácidos Graxos Livres
- ANOVA... Análise de Variância – *Analysis of Variance*
- ATP... Adenosina trifosfato
- BCA... Ensaio de ácido bicinconínico - *Bicinchoninic acid assay*
- BDNF... Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - *Brain-derived neurotrophic factor*
- BHE... Barreira hemato-encefálica
- CD... Cluster de diferenciação
- CECAL... Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA... Comissão de ética no uso animal
- DAMPS... Padrões moleculares associados a danos - *Damage-associated molecular pattern*
- DCF... Densidade Capilar Funcional
- DCV... Doença Cardiovascular
- DEXA... Densitometria por dupla emissão de raios-X
- DN... Dieta normal
- DNA... Ácido Desoxirribonucleico – *Deoxyribonucleic acid*
- EO... Estresse Oxidativo
- EPM... Erro padrão da média
- FC... Frequência Cardíaca
- FITC... Fluoresceína-isotiocianato
- FSC... Fluxo Sanguíneo Cerebral
- GFAP... Proteína ácida fibrilar glial - *Glial fibrillary acidic protein*
- HDL... Lipoproteína de alta densidade – *High density lipoprotein*
- HFD... Dieta hiperlipídica – *High fat diet*
- HMGB-1... Proteína de alta mobilidade do grupo 1 - *High mobility group box 1*
- HOMA- IR... Modelo de avaliação da homeostase – *Homeostasis model assessment*

HSP... Proteína de choque térmico - *Heat shock protein*

ICAM... Molécula de Adesão Intercelular – *Intercellular Adhesion Molecule*

IgG...Imunoglobulina G

IKK... Inibidor do fator nuclear kappa - *Inhibitor of nuclear factor kappa*

IL... Interleucina

INF...Interferon

IRAK...Receptor associado a interleucina 1 - *Interleukin-1 receptor-associated*

LDL...Lipoproteína de baixa densidade – *Low density liprotein*

LPS... Lipopolissacarídeo

LSCI... *Laser Speckle Contrast Imaging*

MAP... Proteína ativada por mitógenos - *Mitogen Activated Protein*

MCP1... Proteína quimioatrativa de monócitos - *Monocyte chemoattractant protein-1*

MyD88... Proteína de diferenciação mielóide-88 - *Myeloid differentiation protein-88*

NCEP ATP III... Programa Nacional de Educação do Colesterol – *National Cholesterol Program Education – Adult Panel III.*

NF-k...Fator nuclear kappa - *Nuclear factor kappa*

NO... Óxido Nítrico – *Nitric Oxide*

NOD... Receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos - *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NOS... Óxido Nítrico Sintase – *Nitric Oxide Sintase*

PAMP... Padrões moleculares associados a patógeno – *Pathogen-associated molecular pattern*

PAS... Pressão Arterial Sistólica

PBS...Tampão fosfato-salino - *Phosphate buffered saline*

PFA...Paraformaldeído

PGE...Prostagalndina E

pH...Potencial hidrogeniônico

RAGE...Receptor dos produtos finais de glicação avançada – *Receptor Advanced Glycation end Products*

RI... Resistência à Insulina

RNA... Ácido ribonucleico – *Ribonucleic acid*

SM... Síndrome Metabólica

SNC... Sistema nervoso central

TIR... Receptor toll-IL/1 – *Toll IL-1 receptor*

TIRAP... Proteína adaptadora contendo domínio TIR – *TIR adaptor protein*

TLR... Receptor do tipo *Toll* – *Toll like receptor*

TNF... Fator de necrose tumoral - *Tumor Necrosis Factor*

UAP... Unidade arbitrárias de perfusão

UNV... Unidade neurovascular

VEGF... Fator endotelial de crescimento vascular- *Vascular endotelial grow factor*

WT... Animais selvagens – *Wild type*



## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a expectativa média de vida dos indivíduos em todo o mundo aumentou consideravelmente; isto pode ser atribuído aos avanços no conhecimento das doenças e a sua aplicação nos sistemas de saúde. No entanto, o aumento da longevidade não está necessariamente relacionado ao aumento na qualidade de vida do indivíduo. Na verdade, geralmente é acompanhada por uma maior prevalência de doenças crônicas, como doenças metabólicas, incluindo obesidade e diabetes mellitus. Nas últimas décadas, observou-se que o diabetes e obesidade podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (1).

A obesidade é considerada uma pandemia, segundo a Organização Mundial de Saúde em 2014, 39% dos adultos com 18 anos ou mais (38% dos homens e 40% das mulheres) apresentavam excesso de peso. No entanto, a prevalência mundial de obesidade quase dobrou entre 1980 e 2014. Assim, mais de meio bilhão de adultos em todo o mundo são classificados como obesos (2).

É de fundamental importância a compreensão da fisiopatologia e dos fatores de risco de uma série de doenças crônicas com o conceito precursor da inflamação, entre elas a obesidade e a diabetes *mellitus*. Neste contexto também está inserida a síndrome metabólica (SM) que juntas têm sido considerada as maiores causas de morbimortalidade em todo mundo. Todas as alterações que envolvem o diagnóstico da SM evidenciam as consequências do estilo de vida moderno, com aumento de sua prevalência em diferentes idades e com proporções epidêmicas e pandêmicas nos últimos anos (3-5).

### 1.1 A Síndrome Metabólica

A SM é definida como um conjunto de fatores de risco para doença cardiovascular (DCV), diabetes e doenças neurodegenerativas e está associada à resistência à insulina (RI), hiperglicemia, distribuição central da gordura corporal, dislipidemia e hipertensão arterial. As alterações metabólicas

que caracterizam a SM são multifatoriais e complexas, incluindo influências ambientais e genéticas (6, 7). A SM tornou-se comum, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento e hoje já é vista como uma síndrome endêmica, comum a ambos os sexos e a todos os grupos étnicos, porém sua prevalência está relacionada à idade, sendo esta maior em idosos (8). Indivíduos com SM apresentam 2 a 3 vezes maior morbimortalidade cardiovascular que indivíduos sem a síndrome (9).

Atualmente, o critério mais comumente aceito para o diagnóstico da SM é o do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), que inclui os critérios relacionados na tabela 1, tendo a obesidade abdominal como um componente chave (mas não necessário). A presença de três ou mais destes componentes alterados constitui um diagnóstico clínico.

**Tabela 1 Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica**

<b>Medidas</b>	<b>Pontos de corte</b>
Circunferência abdominal aumentada	≥ 102 cm em homens ≥ 88 cm em mulheres
Triglicérides elevados	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/L)
Níveis reduzidos de HDL-Colesterol	≤ 40 mg/dl (1.0 mmol/L) em homens e ≤ 50 mg/dl (1.3 mmol/L) em mulheres
Pressão arterial elevada	Sistólica ≥130 e/ou diastólica ≥ 85 mmHg
Glicemia de Jejum elevada	≥ 100 mg/dl

Apesar de não fazerem parte dos critérios diagnósticos da SM, várias outras condições estão frequentemente a ela associadas, tais como: estado pró-inflamatório, disfunção endotelial e estresse oxidativo (10).

A inflamação é um estado inerente à obesidade. Embora alguns autores defendam que a obesidade seja resultado da doença inflamatória (11), evidências sugerem que o processo inflamatório pode ser consequência de alterações provenientes da obesidade (12). A possível relação entre SM e inflamação é a RI, pois uma vez presente, favorece também a manutenção do estado inflamatório crônico. Independente do agente iniciante, a relação entre RI

e processo inflamatório é bidirecional, ou seja, um processo inflamatório crônico induz a RI, e esta, por sua vez acentua o processo inflamatório (13). Embora a busca por estes estímulos inflamatórios estivesse centrado em infecções, as evidências atuais mostram que hábitos alimentares podem ser a fonte mais importante na geração destes estímulos. (12).

A obesidade é caracterizada pelo aumento do tecido adiposo visceral, que requer maior demanda de oxigênio, porém o aumento na perfusão sanguínea não é suficiente para suprir a necessidade metabólica destas células. Com isso, ocorre a hipóxia e conseqüentemente a inflamação tecidual (14). Esta resposta inflamatória contínua culmina em uma desregulação neuroimunoendócrina que é responsável pelas anormalidades metabólicas e morbidades observadas na SM (15, 16). Nesse caso, o fator desencadeante é o excesso de nutrientes (17) o qual se manifesta primariamente com aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) seguida do aumento do seu número (hiperplasia) (18).

Essa adipogênese implica na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, os quais secretam adipocinas (19), que podem ter efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (20). Sendo assim, o estado inflamatório que acomete indivíduos obesos é denominado inflamação metabólica ou metainflamação (21). Todo esse processo altera a fisiologia do tecido adiposo tornando-o um tecido disfuncional. Dentre as características dessa disfunção, a massa adiposa vai apresentar mudanças na sua composição celular como, por exemplo, aumento na quantidade de células inflamatórias, principalmente os macrófagos, tal recrutamento ocorre principalmente através da sinalização quimiotática, via MCP-1 e IL-8, que é liberado pelos adipócitos. Uma vez infiltrados no tecido adiposo, nos estágios avançados da obesidade, os macrófagos participam do evento inflamatório produzindo mais citocinas, perpetuando o estado inflamatório na SM (22).

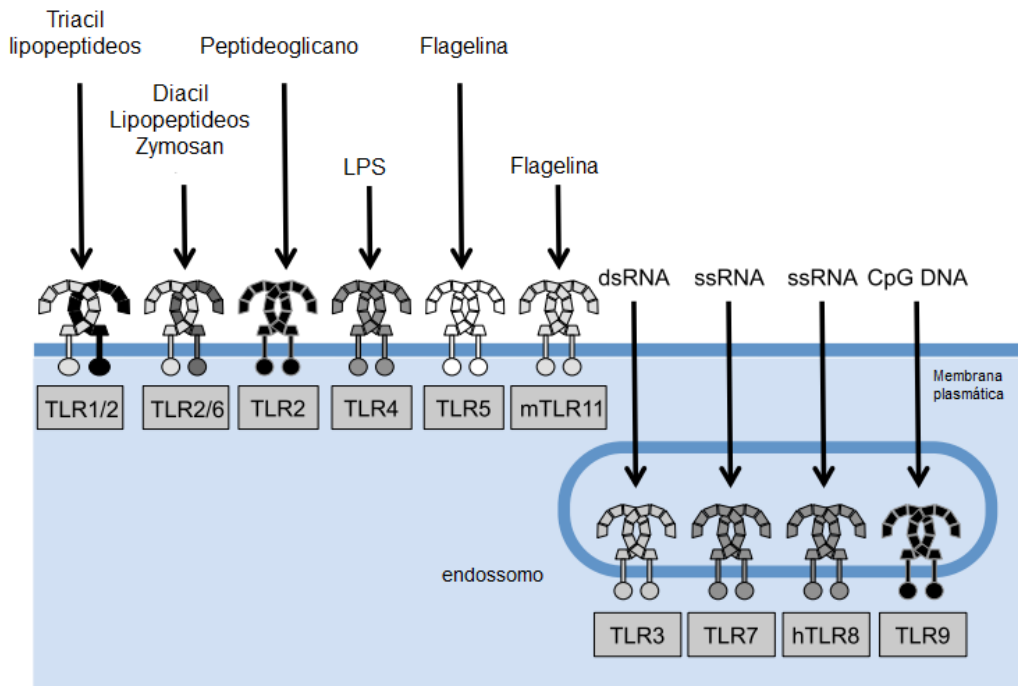
Este estado inflamatório crônico, porém de baixa intensidade, associado a outros eventos presentes na SM, como o aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, hipóxia tecidual e hiperatividade simpática, podem contribuir para a ativação direta ou indireta da resposta imune inata. Os

receptores do tipo *Toll* (TLR), especificamente o TLR-4, são considerados como receptores envolvidos em todos os componentes desta síndrome (23).

## **1.2 Receptores do tipo *Toll* e a Síndrome Metabólica**

Os TLRs são receptores que desempenham um papel fundamental no sistema imune inativo e adaptativo (24, 25). Eles são homólogos do *Toll*, um receptor encontrado em insetos, envolvidos tanto no estabelecimento da polaridade dorsoventral durante a embriogênese quanto na resposta imune contra infecções fúngicas (26). Já foram descritos mais de 10 membros da família dos TLRs em mamíferos (11 em humanos e 13 em camundongos). A maioria dos TLRs está localizada na superfície celular, com exceção de TLR 3, 7, 8 e 9, que se apresentam principalmente nos endossomos (27).

Embora seja expresso principalmente em células imunes, também foram identificados TLRs em diferentes tipos celulares, incluindo o cardiomiócitos, neurônios e células endoteliais. Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (“Pathogen-Associated Molecular Patterns”, PAMPs) e a danos teciduais (“Damage-Associated Molecular Patterns”, DAMPs) em vez de epítopos moleculares específicos. Como ilustrado na Figura 1.



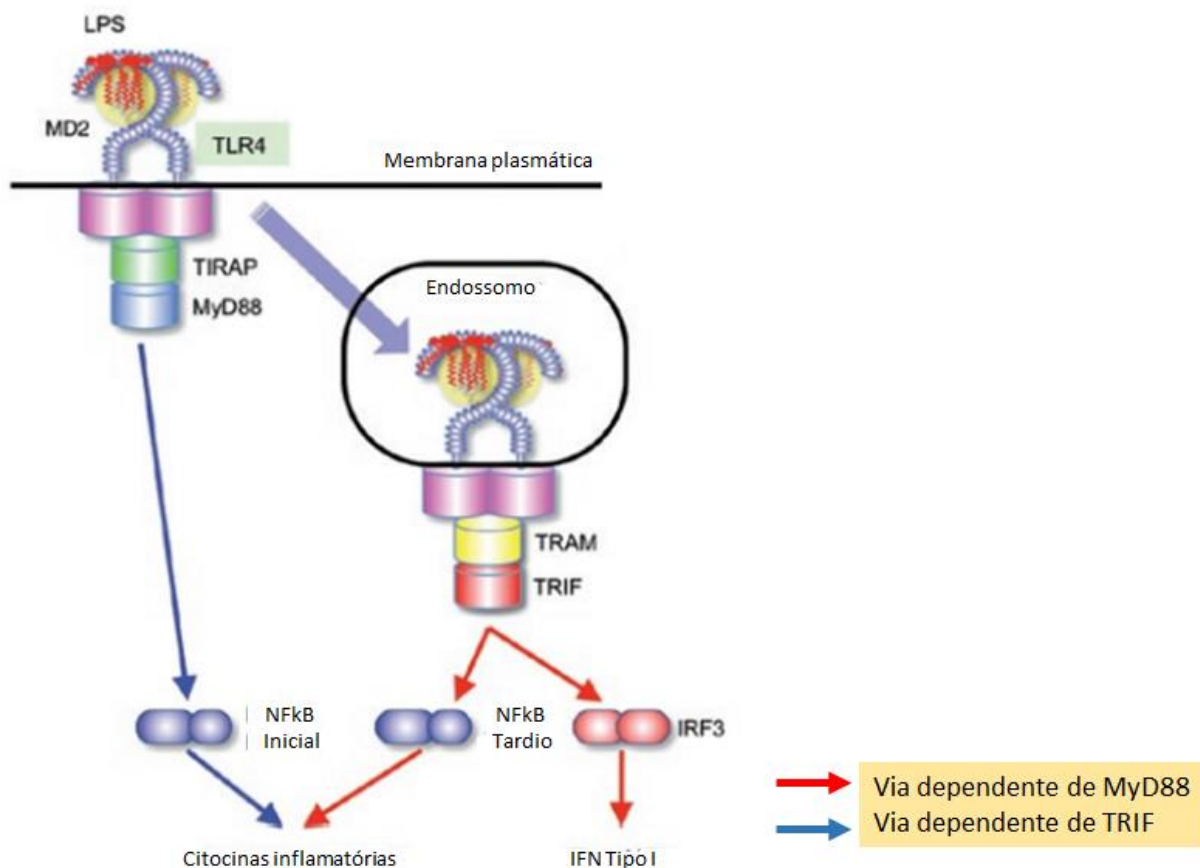
**Figura 1 Receptores do tipo toll (TLRs) e seus ligantes** Os TLRs 1, 2, 4–6 e 11 localizam-se na superfície celular e os TLRs 3 e 7–9 em células endossômicas (TLRs intracelulares). Os TLRs da superfície celular respondem a produtos da membrana microbiana, como lipídios, lipoproteínas e proteínas, enquanto TLRs intracelulares reconhecem ácidos nucleicos derivados de bactérias e vírus. Adaptado de Goulopoulou e colaboradores, 2016 (25).

Diversas proteínas transmembranares desempenham papel de co-receptores na sinalização dos TLRs e a capacidade desses receptores de cooperarem com proteínas acessórias aumenta a gama de ligantes que estes receptores são capazes de reconhecer (25). O cluster de diferenciação (CD) 14 e o antígeno linfocitário MD2 são co-receptores de TLR4 e desempenham um papel no reconhecimento dos lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas, que constituem o principal ligante, mas não o único do TLR4 (27).

Diferentes TLRs desencadeiam respostas biológicas específicas. Por exemplo, TLR3 e TLR4 geram respostas com a produção de interferon tipo I e citocinas inflamatórias, enquanto TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 e TLR5 induzem principalmente a produção de citocinas inflamatórias. Essas diferenças ocorrem pela presença de moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR, incluindo MyD88, TIRAP (Mal), TRIF e TRAM, que são recrutados por TLRs distintos e ativam diferentes vias de sinalização (28).

Cada TLR tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas. Quando algum PAMP ou DAMP é reconhecido por algum TLR específico, a proteína MyD88 recruta as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento  $\beta$  associado à cinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) e por uma subunidade regulatória (NEMO/ IKK $\gamma$ ). Este complexo promove a fosforilação do I $\kappa$ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias, das moléculas de adesão e das moléculas coestimulatórias (25, 27, 28).

O TLR4 é o único TLR que usa as quatro proteínas adaptadoras e ativa os caminhos dependentes de MyD88 e TRIF (Figura 2). O TLR4 inicialmente recruta o TIRAP na membrana plasmática e, subsequentemente, facilita o recrutamento de MyD88 para desencadear a ativação inicial de NF- $\kappa$ B e MAPK (29). O TLR4 sofre endocitose e é levado para o endossomo, onde forma um complexo de sinalização com TRAM e TRIF, em vez de TIRAP e MyD88, para iniciar a via TRIF-dependente que leva à ativação de IRF3, bem como a ativação de fase tardia de NF- $\kappa$ B e MAPK (29, 30). Assim, o TLR4 ativa a via dependente de MyD88 antes da via dependente de TRIF (28).



**Figura 2 Via de sinalização do TLR4** O TLR4 forma um complexo com MD2 para reconhecer o LPS. Cinco das seis cadeias lipídicas do LPS se ligam ao MD2 e a cadeia lipídica restante associa-se ao TLR4. A formação de um receptor multímero composto por duas cópias do complexo TLR4-MD2-LPS, transmite os sinais para a ativação da fase inicial do NF-κB recrutando os adaptadores contendo o domínio TIR TIRAP (Mal) e MyD88 (via dependente de MyD88). O TLR4-MD2-LPS complexo é então internalizado e retido no endossomo, onde desencadeia a transdução de sinal recrutando TRAM e TRIF, que leva à ativação de IRF3 e NF-κB de fase tardia para a indução de interferon tipo I (via TRIF-dependente). A ativação de fase inicial e final do NF-κB é necessária para a indução de citocinas inflamatórias.

O TLR4 tem sido apontado como um elo celular entre a inflamação e a resistência à insulina (31). Além do LPS, o TLR4 pode ser ativado por ácidos graxos livres saturados durante o estado hiperlipidêmico associado à obesidade e secundário à ingestão prolongada de uma dieta rica em gordura (32). Ainda, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, a proteína de alta mobilidade do grupo 1 (HMGB1), a proteína de choque térmico 60 (HSP) e a fibronectina também já foram descritas como ativadores do TLR4 (24).

Na SM também ocorre o aumento da permeabilidade intestinal com translocação bacteriana e o extravasamento de LPS, promovendo a endotoxemia metabólica e conseqüentemente um estado de inflamação de baixa intensidade, resultante da interação entre as bactérias luminiais e o sistema imunológico do hospedeiro, este fato ocorre principalmente pelo reconhecimento dos antígenos bacterianos por TLR4, NOD1 e CD14 em células dendríticas intestinais (33). A interação entre estes receptores e o LPS ativa a inflamação da mucosa e favorece a translocação bacteriana (34), através da ativação da via do NF-KB, perpetuando o ciclo inflamatório no indivíduo.

### **1.3 Síndrome Metabólica e a Neurodegeneração**

A desregulação do tecido adiposo parece ter um papel crucial na iniciação e manutenção dos eventos inflamatórios na SM (35). A ativação da resposta imune inata através dos TLRs pode contribuir para o estado de inflamação crônica; no entanto, a correlação desta ativação com a neuroinflamação e neurodegeneração observadas na SM ainda não está bem caracterizada. Embora vários mecanismos tenham sido propostos para vincular a SM e seus fatores abrangentes ao declínio cognitivo (36), pouco se sabe sobre as alterações cerebrais que ocorrem em pessoas com SM e que afetam negativamente a cognição, além do envelhecimento normal.

Os fatores que incluem a SM são conhecidos como fatores de risco cerebrovasculares e têm sido relacionados a reduções no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) (37, 38). A integridade estrutural e funcional do cérebro depende de um fornecimento vascular contínuo de oxigênio e glicose e, se o FSC for interrompido, os neurônios deixam de funcionar e morrem rapidamente. A exposição regular a altas cargas lipídicas, mesmo antes do início da obesidade, leva a respostas inflamatórias que são acompanhadas de disfunção microvascular (39, 40).

A microcirculação regula o suprimento de oxigênio e nutrientes, determinando o fluxo sanguíneo para o tecido através da regulação da resistência vascular ao nível arteriolar (41). O aumento do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias observados na SM leva a mudanças no equilíbrio



vasomotor, acarretando no aumento de expressão de moléculas de adesão no endotélio e, portanto, o leito microvascular pode servir como ponto de entrada para as células inflamatórias nos tecidos, contribuindo para o agravamento de lesões teciduais em órgãos-alvo (16, 40).

Evidências propõem que a disfunção microvascular cerebral poderia preceder as alterações neurodegenerativas na SM, este fato seria relacionado principalmente devido à ação vascular da insulina que está associada à densidade capilar estrutural e vasodilatação dependente do endotélio, (42, 43). A insulina pode, de fato, induzir recrutamento capilar e redirecionar o fluxo de sangue para leitos capilares não perfundidos, (42, 44, 45). Portanto, a resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina também pode perpetuar o estado inflamatório na SM além de contribuir para a rarefação microvascular e conseqüentemente redução do FSC (43, 46-48).

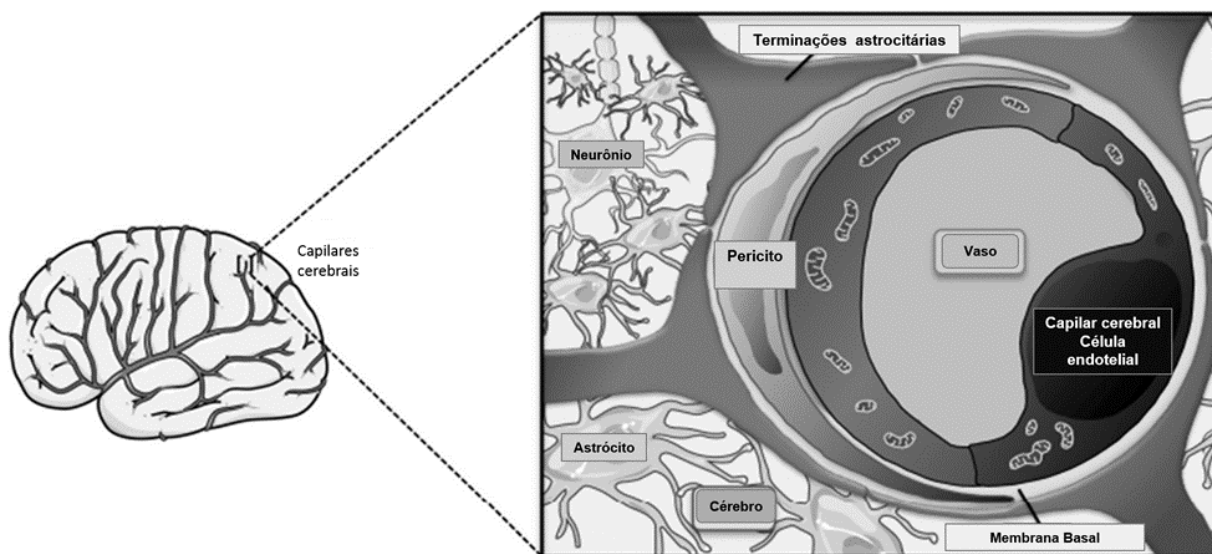
O acometimento do sistema nervoso central (SNC) na SM se dá por diversas vias de ativação que incluem a ativação do sistema imune inato, nos quais estão presentes o TLR4 (25, 31, 49, 50). O aumento da expressão desses receptores, em regiões cerebrais, como o hipocampo e neocórtex (51), contribuem para o aumento da neuroinflamação, com ativação de microglia, astrogliose e neurotoxicidade por ativação glutamatérgica e processos oxidativos, que levam a um processo crônico e gradativo de morte neuronal e neurodegeneração (51-53).

#### **1.4 A unidade Neurovascular**

A regulação neural da microcirculação cerebral é feita pela unidade neurovascular (UNV), que é composta por neurônios, interneurônios, astrócitos, vasos sanguíneos e pericitos (figura 3). Cada componente está íntima e reciprocamente ligado entre si, estabelecendo uma relação anatômica e funcional, o que resulta em um sistema altamente eficiente de regulação do fluxo sanguíneo cerebral (54).

Os neurônios detectam variações muito pequenas no suprimento de nutrientes e oxigênio e transformam esses sinais em mensagens elétricas e

químicas para interneurônios ou astrócitos adjacentes. Em resposta a esses sinais, os mecanismos de ajuste necessários são ativados (55). Quando necessário, um neurônio se comunica com os vasos através dos astrócitos, diretamente ou através de um interneurônio, influenciando, assim, o tônus vascular e, conseqüentemente, o suprimento de sangue para a área ao seu redor (54).



**Figura 3 Localização e composição da unidade neurovascular (UNV).** O leito vascular é composto por células endoteliais dos capilares cerebrais, que apresentam o fenótipo da barreira hematoencefálica (BHE). Os pericitos estão localizados na mesma membrana basal das células endoteliais e ambos os tipos de células são envolvidos pelas extremidades astrocitárias. Os astrócitos constituem o elo entre os componentes vascular e nervoso da UNV, pois estão envolvidos tanto na função neuronal quanto no surgimento e manutenção do fenótipo da BHE. Adaptado de: Fabien Gosselet e colaboradores, 2013. (56)

Os astrócitos tem um papel fundamental na formação da barreira hematoencefálica, controlando a regulação da entrada de substratos e saída de produtos residuais bem como a regulação da microcirculação local (54). Alguns estudos têm apontado o papel crucial dos astrócitos no controle dinâmico da microcirculação cerebral e sugerem um papel fisiológico na vasodilatação cerebral como resposta ao aumento da atividade neural (57-59). Os processos astrogliais e as terminações astrocitárias ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais formam um dos elementos-chave da barreira hematoencefálica e de fundamental importância para a comunicação neurovascular (60). Sua

localização estratégica entre capilares e neurônios têm um papel especial na homeostase iônica, aminoácidos, neurotransmissores e água do cérebro (61).

Portanto, os astrócitos constituem o elemento central da UNV através da sua interação com os demais componentes, principalmente através de funções sinérgicas envolvendo os diferentes tipos celulares. Os transmissores e moduladores liberados por neurônios, astrócitos e o endotélio permitem a sinalização complexa entre células da UNV, e muitas características do fenótipo da BHE estão sujeitas a modulação em condições fisiológicas ou patológicas. Por exemplo, a abertura das junções oclusivas da BHE pode ocorrer em condições normais para permitir a passagem de fatores de crescimento e anticorpos para o cérebro e na inflamação pode contribuir para o edema cerebral (61).

Os astrócitos juntamente com as microglias participam da gênese da resposta imune inata no SNC (62). A localização destas células na barreira hematoencefálica, ou próxima a ela, provavelmente as tornam sentinelas no parênquima cerebral (63, 64). Diferentes tipos de TLRs já foram identificados em microglia e astrócitos e ambos os tipos gliais são responsivos a vários ligantes de TLRs, implicando seu papel no reconhecimento dos PAMPs (65). Além disso, evidências relacionam os TLRs a lesões do SNC, presumivelmente através do reconhecimento de “sinais de perigo” endógenos DAMPs, já que os ligantes clássicos de TLR microbianos não estariam presentes (66).

A expressão dos TLRs no SNC e seu papel como receptores para DAMPs sugere que os TLRs podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da neuroinflamação no tecido cerebral em estados inflamatórios crônicos como a SM (66). Como a UNV é uma estrutura vital na homeostase cerebral, o mau funcionamento de um ou mais de seus componentes pode ter consequências sérias (67). Fatores de risco genéticos, além de condições vasculares, como hipertensão, diabetes, infarto, aterosclerose e hiper-homocisteinemia. Foram descritos como fatores que levam a alterações na UNV.

### 1.4.1 Microglia

A microglia, descrita inicialmente em 1932 por Pío Del Río Hortega (68), tem como principal função a defesa imune do SNC, sendo, em geral, recrutada após infecções, lesões ou doenças degenerativas do sistema nervoso. Quando ativada, a microglia sofre mudanças morfológicas, tornando-se capaz de proliferar intensamente e realizar fagocitose. A ativação dessas células têm importantes consequências fisiopatológicas em doenças infecciosas e neurodegenerativas (69). O TLR4 é altamente expresso em microglias, e sua via de sinalização está implicada em fenótipos microgliais ativados, que são responsáveis pelos efeitos adversos da obesidade no hipocampo e em outras regiões cerebrais (70).

Em condições fisiológicas normais, a microglia desempenha um papel importante no aumento das taxas de sobrevivência neuronal, liberando neurotrofinas (71). As microglias também mantêm os terminais sinápticos e regulam circuitos neuronais por meio da poda sináptica (72).

A microglia pode ser classificada em dois diferentes fenótipos. Um é o fenótipo inflamatório (fenótipo M1), que é chamado de “estado de ativação clássico”. O outro é o fenótipo anti-inflamatório (fenótipo M2), denominado “estado de ativação alternativo” (73, 74). A microglia com fenótipo M1 pode ser ativada por LPS e citocinas inflamatórias, como: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (75-77). Em contraste, a microglia com fenótipo M2 pode ser ativada por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (78). Também já foi descrito que o fenótipo M1 é caracterizado por uma morfologia ameboide, com processos curtos e espessos e um grande soma. Já o fenótipo M2 tem a sua morfologia mais ramificada com processos complexos longos e finos e um pequeno soma (79).

## **2. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótese**

A hipótese deste trabalho é que ao longo do estabelecimento da SM, a ativação da resposta inata através dos receptores do tipo toll 4 gere um sistema de retroalimentação positiva, que contribua para a progressão de diversos aspectos fisiopatológicos, relacionados à neurodegeneração e ao comprometimento cognitivo.

### **2.2 Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho é investigar a participação do TLR4 nas alterações microvasculares cerebrais e a relação da ativação desses receptores com a neurodegeneração em um modelo animal de síndrome metabólica induzido por dieta hiperlipídica.

### **2.3 Objetivos específicos**

Objetivo 1: Avaliar os efeitos da evolução da SM induzida por dieta hiperlipídica (HFD), sobre a composição corporal, peso corporal, resistência à insulina, perfil lipídico e parâmetros hemodinâmicos.

Objetivo 2: Avaliar as alterações do fluxo sanguíneo e de parâmetros funcionais, estruturais e inflamatórios da microcirculação cerebral, antes e durante a evolução da SM.

Objetivo 3: Investigar a participação do TLR4 em todos os parâmetros citados acima em camundongos C3H/HeJ, geneticamente deficientes para o TLR4 (TLR4-mut-HFD)

Objetivo 4: Avaliar o impacto da evolução da SM induzida por dieta hiperlipídica da neuroinflamação e ativação astrocitária, bem como, investigar a participação do TLR4 neste processo.

### **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Os experimentos foram realizados em camundongos isogênicos machos da linhagem C57Bl/6 e camundongos C3H/He e C3H/HeJ provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ, ambos com 8 semanas de vida. Estes animais foram mantidos em sala com temperatura controlada entre 23-25°C, e livre acesso à ração e água. Os camundongos C3H/HeJ são usados em diversas áreas da pesquisa incluindo câncer, imunologia e inflamação, biologia sensorial e cardiovascular; eles possuem uma mutação no terceiro éxon do TLR4, o que compromete a sinalização do TLR4 (80, 81). Todos os procedimentos experimentais envolvendo o uso de animais realizados nesta tese foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ) L-038/2015.

#### **3.2 Dieta controle e dieta hiperlipídica**

Os animais foram alimentados com dieta controle ou hiperlipídica que foram manipuladas pela empresa Prag soluções (Jaú, São Paulo – Brasil). A SM foi induzida através da alimentação com ração hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. O grupo controle recebeu durante o mesmo período dieta normolipídica (AIN93 M). Buscando um resultado mais fidedigno e o balanceamento energético ideal das dietas controle e hiperlipídica, foram utilizadas as rações desenvolvidas de forma a suprir as necessidades energéticas dos animais, visando evitar a carência nutricional decorrente do excesso de lipídios na alimentação.

Para elaboração da dieta controle foram utilizados: amido de milho, caseína (14%), amido dextrinizado, sacarose, óleo de soja (4%), celulose microcristalina, Mix Mineral AIN 93 M (Sódio, Ferro, Manganês, Zinco, Iodo, Cobre, Selênio, Cobalto e Flúor) Mix Vit AIN 93 (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6; vitamina B12; bitartarato de colina; vitamina D3; vitamina E; vitamina KE; niacina; biotina e ácido fólico), Lisina, Metionina, L-

cistina, bitartarato de colina e BHT (tertibutilhidroquinona). Para a elaboração da dieta hiperlipídica, foram utilizados os mesmo componentes da ração controle, mas com alterações nas quantidades de caseína (19%), acréscimo de gordura animal suína (32%) e cloreto de sódio (0,5%).

**Tabela 2 Composição das Rações**

<b>Constituintes</b>	<b>Controle (%Kcal)</b>	<b>Hiperlipídica (%Kcal)</b>
Amido de milho	48,38	10,26
Amido Dextrinizado	16,10	7,04
Sacarose	10,39	7,04
Caseína	14,55	13,38
Óleo de Soja	9,35	2,82
Banha de porco	--	50,70
Celulose	0	7,92
Mistura salínica	0	0
Mistura vitamínica	1,04	0,70
L-Cistina	0,19	0,13

### 3.3 Delineamento experimental

Para a avaliação dos efeitos do TLR4 frente à dieta hiperlipídica ou dieta normolipídica, os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais:

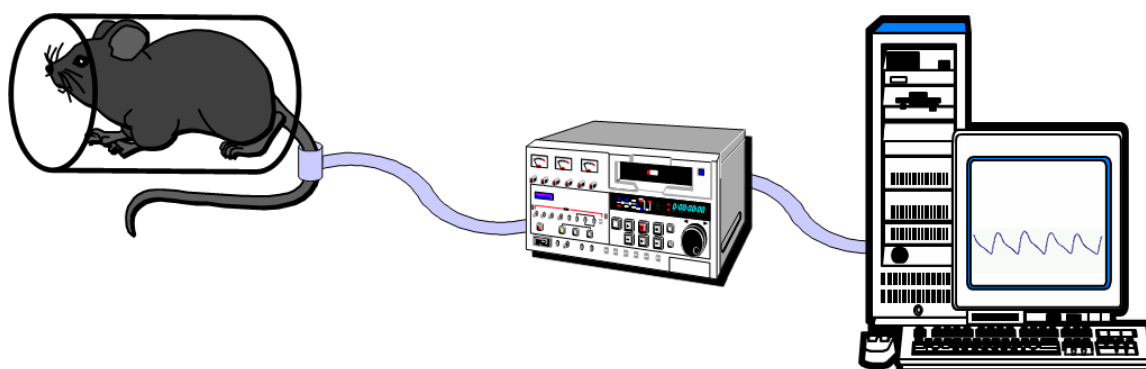
- 1) Animais C57Bl/6 que foram alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas.
- 2) Animais C3H/HeJ (TLR4-mut) que foram alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas.
- 3) Animais C3H/He (WT) e C3H/HeJ que foram alimentados com dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica por 24 semanas.
- 4) Animais C57BL/6 e C3H/HeJ que foram alimentados com dieta hiperlipídica por 20 semanas tendo a substituição da dieta

hiperlipídica pela dieta normolipídica nas 4 últimas semanas, totalizando 24 semanas de dieta.

- 5) Animais C3H/He e C3H/HeJ que foram alimentados com dieta normolipídica ou dieta hiperlipídica por uma semana.

### 3.4 Medidas de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

Durante o período da dieta, foram feitas as medidas de pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda. É importante ressaltar que na semana anterior à medida, os animais foram adaptados ao sistema. As variáveis hemodinâmicas foram avaliadas para verificar se os tratamentos modificam ou não a pressão arterial. As medidas de PAS foram obtidas através do método de esfigmomanômetro de cauda, onde o camundongo é colocado na caixa contensora (Figura 4), a qual é aquecida para promover a vasodilatação na cauda do mesmo. O esfigmomanômetro adaptado para camundongos é colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal, sendo a obstrução do fluxo diminuída lentamente, até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica.



**Figura 4 Sistema de medida de pressão** - Esquema simplificado do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos. Um manguito específico para cauda de camundongo é colocado na região proximal da cauda, permitindo a oclusão da artéria caudal quando insuflado. A presença de um transdutor de pressão junto ao manguito permite a detecção da pressão caudal quando o manguito é desinflado. Os sinais captados são processados em sistema específico para esta finalidade.



Os valores de PAS foram captados pelo *Sistema BP-2000 series II*, que consiste de um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador, que repassa o sinal para um conversor analógico- digital, registrando, assim, os valores em tempo real no microcomputador. Os valores obtidos foram analisados pelo programa *BP-2000 Blood Pressure Analysis*. Para a determinação da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso foram consideradas as médias aritméticas de dez registros bons realizados em um mesmo dia, para cada animal.

### **3.5 Teste do labirinto aquático**

Os animais foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris Water Maze que avalia o aprendizado e a memória dependente do hipocampo. Os animais utilizados nesse ensaio não foram submetidos anteriormente a nenhum ensaio comportamental. Os animais foram colocados na piscina (caixa d'água, como podemos observar na figura 5) por 4 dias consecutivos, e dentro da piscina havia uma plataforma submersa colocada sempre no mesmo quadrante (Morris, 1984). A temperatura da água foi mantida a mesma do ambiente, em torno de 24 °C. A piscina apresentava pontos de referência com figuras geométricas distintas em 3 lados da piscina. Em todos os dias os animais foram colocados uma vez na piscina, mantendo sempre o mesmo ponto de partida e contamos o tempo que o animal demorava para encontrar a plataforma (tempo de latência a plataforma). No primeiro dia, se o animal não encontrasse a plataforma nós direcionávamos gentilmente para plataforma. O tempo máximo para o animal encontrar a plataforma era de 1 minuto. Não foi realizada a contagem do tempo que o animal permanecia na plataforma. No quinto e último dia de teste, a plataforma foi retirada e foi anotado o tempo gasto pelos camundongos no quadrante em que se encontrava a plataforma durante 60 segundos. No final do teste foi realizada a curva de aprendizado.



**Figura 5 Caixa d'água utilizada no experimento de natação forçada.** As dimensões da caixa d'água são: 0,84 metros de altura, 1,14 de diâmetro da base, 1,54 de diâmetro superior, comportando 1000 litros de volume.

### **3.6 Teste do medo condicionado - *Freezing***

O teste do medo condicionado foi realizado na 23<sup>a</sup> semana de dieta, em animais que não foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. Este teste visa avaliar danos na capacidade cognitiva associada a memória aversiva. No ensaio, os animais passaram por um treino na caixa que contém uma plataforma com 200 mm x 75 mm, chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5 mm. Imediatamente após serem colocados no interior da caixa, foi contabilizado o tempo de 3 minutos. Ao término deste tempo, os animais receberam uma descarga elétrica de 0,6 mA, por 3,0 segundos e o estímulo aversivo foi reforçado trinta segundos após. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram novamente transportados para o interior da caixa e o tempo de retenção (congelamento) do animal foi registrado.



**Figura 6 Equipamento utilizado no ensaio de freezing.** A caixa consiste de uma plataforma de 2,5 cm de altura x 7,0 cm de largura x 25,0 cm de comprimento, localizada no lado direito de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25 cm. O piso da caixa é formado por uma grade com uma série de barras paralelas de aço inoxidável (0,1 cm de diâmetro) espaçadas a cada 1,0 cm.

### **3.7 Quantificação de gordura abdominal e percentual de gordura total**

Foi realizada a pesagem da gordura abdominal através da coleta do conteúdo de gordura visceral e epididimal dos animais no período basal, na 12<sup>a</sup> e na 24<sup>a</sup> semana, dependendo do protocolo experimental, os depósitos de gordura visceral foram dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,01g (A&D, GR-200, Japão). Foi considerada visceral a gordura aderida à parede abdominal posterior, ao redor dos rins e na parte abdominal do ureter. Para a histopatologia, uma parte da gordura que foi pesada de cada grupo e submetidas a uma bateria de desidratação, onde passaram por sucessivos banhos com concentrações crescentes de etanol (Isofar) e, por fim, xilol (Isofar). Inicialmente, a gordura foi acondicionada em cassetes para a histologia 44 (Histossete- ATH490-2) que foram mergulhados por 20 minutos em soluções de etanol à 30%, 40%, 50%, 60%, e então, foram mergulhados em etanol 70%, 80% e 90%, por mais 40 minutos em cada uma das respectivas soluções. Para finalizar, as gorduras foram mergulhados em etanol absoluto por 2 horas e logo após, em xilol por 12 horas. Terminada a desidratação, o material foi incluído em parafina, passando por 3 banhos de parafina (Isofar), com duração de 1 hora cada um, em estufa a 60°C. Em seguida os cassetes foram apoiados em fôrmas de chumbo e preenchidos

com parafina. Após esta etapa, as fôrmas foram retiradas da estufa e depois de resfriados os blocos foram retirados das fôrmas. Para a análise histopatológica, os blocos foram cortados em micrótomo (Leica RM 2025), de forma seriada com 5µm de espessura, acomodados em lâminas tratadas com polilisina (Immunoslide – Easypath) e, posteriormente, foram corados com Hematoxilina – Eosina (HE). Para a coloração com HE, as lâminas foram submetidas a uma bateria de desparafinização composta por xilol, etanol 100%, etanol 90%, etanol, 70% e água destilada, onde permaneceram por 5 minutos em cada banho, e mergulhadas em hematoxilina de Harris (Merck) por 45 segundos. Após serem coradas com a hematoxilina, as lâminas foram mergulhadas por 2 minutos em uma solução 0,2 M de sulfato de magnésio anidro (Isofar) e 0,1 M de bicarbonato de sódio (Merck), para a eliminação de resíduos do corante. Em seguida foram lavadas durante 3 minutos em água destilada, e então, coradas com eosina alcoólica (Merck) por 1 minuto e 30 segundos. Depois de finalizada a etapa da coloração, as lâminas foram submetidas a uma bateria de desidratação composta por etanol 70%, etanol, 90%, etanol 100% e xilol, 45 respectivamente, por 5 minutos em cada banho. Terminada a desidratação, as lâminas foram então seladas com entelan (Cytosel) e lamínulas 24mm X 60mm (Deck-glaser, Objettragger). Os adipócitos foram observados em microscópio invertido Nikon Eclipse TE300, equipado com câmera digital (CoolSNAP-Procf color, ROPER SCIENTIFIC™ Photometrics) acoplada a um computador com o software Image Pro Express.

A composição corporal foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional do Instituto de Nutrição/UERJ, através do DEXA utilizando uma densitometria acoplada (Lunar Piximus, GE Medical Systems Madison, WI). Este sistema emprega uma fonte de raios-X de feixe cônico gerando energias de 35 e 80 keV e um detector plano de 100 x 80 mm com pixel individual dimensões de 0,18 x 0,18 mm. Os camundongos foram anestesiados com uma solução de quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), para garantir uma boa imobilização e posicionamento durante uma aquisição de cinco minutos (82). As análises foram feitas no período basal, na 12ª e ao final da 24ª semana de dieta e os resultados foram expressos em percentual de gordura corporal.

### **3.8 Procedimento cirúrgico para realização da janela craniana para análise da microcirculação cerebral**

Para o início dos procedimentos cirúrgicos, os camundongos foram anestesiados com uma associação de quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Para a visualização da microcirculação cerebral foi realizada uma craniotomia no osso parietal esquerdo com o auxílio de um micromotor de baixa rotação acoplado a uma broca permitindo a exposição da superfície cerebral (79). Além do fragmento de 0,5cm<sup>2</sup> da calota craniana, as meninges *dura-máter* e aracnoide também foram delicadamente retiradas, deixando a membrana *pia-máter* intacta.

### **3.9 Fluxometria microcirculatória a laser (Laser Speckle Contrast Imaging)**

O fluxo sanguíneo cerebral foi analisado no período basal, na 12<sup>a</sup> e na 24<sup>a</sup> semana, através do aparelho de Laser Speckle Contrast Imaging (PeriCam PSI System, Perimed, Suécia) que consiste numa técnica óptica de luz laser com contraste de imagem com comprimento de onda de 785 nm para medida contínua da perfusão sanguínea tecidual em tempo real expressa em unidade de perfusão arbitrária (UPA)(83).

Para a realização desta análise, após a realização da craniotomia os animais foram mantidos em uma superfície estável, em uma sala com temperatura estável a 25°C e colocados sob o feixe de luz laser, respeitando a distância de 10 cm entre a cabeça do laser e o crânio do animal, como recomendada pelo fabricante. Foram feitas 16 imagens/seg. e as imagens foram analisadas utilizando o software do fabricante e expressas em unidades arbitrárias.

### **3.10 Microscopia intravital cerebral por epi-iluminação e fluorescência**

Utilizando a mesma janela craniana descrita anteriormente, os animais foram colocados debaixo do feixe de luz do microscópio de fluorescência

(Zeiss modelo AXIO SCOPE A1, Obercochen, Alemanha). As imagens da microcirculação foram adquiridas através do software Zen blue (Zeiss, Obercochen, Alemanha).

Avaliação da densidade capilar funcional: Após a administração i.v. de fluoresceína dextran (FITC-dextran 150KDa), foi possível a observação dos vasos sanguíneos da rede microvascular (25) e a avaliação da densidade capilar funcional foi calculada por número de capilares por  $\text{mm}^2$ . Foram considerados capilares perfundidos apenas os vasos que permitissem o fluxo contínuo e unitário de hemácias pelo vaso. Além disso, a cada ramificação capilar, eram considerados como sendo novos capilares. O valor total de capilares contados foi considerado a densidade capilar funcional cerebral (84).

Avaliação da interação leucócito-endotélio: Após a administração i.v. de rodamina 6G (0,3 mg/kg), a interação dos leucócitos marcados com o endotélio vascular cerebral foi avaliada através da microscopia descrita acima, com objetivas de 20X. Foram considerados leucócitos aderidos aqueles que permaneceram estáticos ao longo de 100  $\mu\text{m}$  da parede venular por um período de 30 segundos e como leucócitos rolantes, aqueles que se moviam dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes, os valores foram expressos em número de células/min. Foram analisados vasos da superfície cerebral com diâmetros variando de 50 a 120  $\mu\text{m}$ , e expressos em número de células/min/100  $\mu\text{m}$  (85).

Avaliação da função endotelial vascular: A resposta vasodilatadora a um agente vasodilatador dependente de endotélio, a acetilcolina, foi avaliada pela porcentagem de variação (%) dos diâmetros internos de arteríolas cerebrais após a administração tópica de uma solução de acetilcolina de 1  $\mu\text{M}$ , após as análises de densidade capilar funcional e da interação leucócito-endotélio vascular (86).

### **3.11 Eutanásia**

Ao final de cada período de dieta os animais foram eutanasiados por dose letal de quetamina (180 mg/Kg), xilazina (20 mg/Kg).

### **3.12 Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada através da punção cardíaca nos camundongos previamente anestesiados. Em seguida, foi separado o soro através do método de centrifugação a 3000 rpm, por 10 min a 4 °C. As alíquotas de soro foram armazenadas no congelador à temperatura de -80 °C, para posterior análise de parâmetros bioquímicos.

### **3.13 Coletas de tecidos**

Foram realizadas as perfusões com solução salina estéril através da punção do ventrículo direito, coletando-se em seguida o cérebro e congelados em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de -80 °C. Foram realizados posteriormente no tecido cerebral coletado, ensaios de detecção proteica para ICAM-1, TLR4, HMGB-1 através da técnica de *western blotting*. Para coleta de cérebros para realização de imunohistoquímica novos grupos de animais foram submetidos ao mesmo protocolo de perfusão sendo ainda perfundidos com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% tamponado (tampão fosfato, pH 6,8-7,2, 0,1 M).

### **3.14 Imunohistoquímica**

Terminada a dissecação, os cérebros permaneceram em solução de PFA 4% por até, no máximo 48 horas à 4°C, a fim de garantir a fixação completa do tecido. Em seguida, os cérebros foram lavados com PBS e mantidos nesta solução à 4°C durante um período mínimo de 12 horas. Foram realizados os cortes seriados no plano coronal com espessura de 50 µm em vibrátomo (The New vibratome 3000 sectioning plus - Leica)

Para a realização das marcações, os cortes feitos em vibrátomo (The New vibratome 3000 sectioning plus – Leica), foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços (Corning) e lavados 3 vezes, por 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,4. Em seguida, foram incubados com uma solução de bloqueio, feita com

PBS, 10% de soro normal de cabra (NGS, Gibco) e 0,3% triton X100 (Vetec) por 90 minutos, para a saturação de ligações inespecíficas e também para permeabilização das células. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpos policlonal anti-GFAP (coelho - Dako – Z033401 1:400) e isolectina B4 (IB4 Vector Labs – B-1205 1:100) diluídos em PBS 0,3% triton 10% NGS. A incubação com os anticorpos primários e com IB4 foi feita em câmara úmida por 12 h a 4°C. Após este período, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, cada lavagem com duração de 5 minutos para retirar os resíduos do anticorpo primário e da IB4, em seguida, foram incubados por 2 h à temperatura ambiente e sob agitação constante em agitador orbital (Fanem 255b), com: anticorpo secundário de coelho marcado com Cy3 (Sigma) produzido em cabra, na diluição 1:800; anticorpo de camundongo produzido em cabra Alexa 488 (Molecular Probes) na diluição 1:400, e anticorpo monoclonal de camundongo produzido em cabra marcado com Cy3 (Sigma) na diluição 1:800. Para a marcação com IB4, foi utilizado streptavidina conjugada com Cy3 (Sigma) na proporção 1:400, diluídos em PBS triton 0,3%, NGS 10%. Os controles receberam apenas a solução diluente, sem anticorpo primário, seguida de anticorpo secundário diluído da mesma maneira para as marcações imunofluorescentes. Ao término do período de 2 horas, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, cada lavagem com duração de 5 minutos e incubados com 20 mg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate, Sigma) diluído em água destilada por 3 minutos. Eles foram então lavados mais uma vez com PBS, montados em lâminas com VECTASHIELD (HardSet Mounting Medium VECTOR Laboratories) e mantidos à -20°C. As lâminas foram fotografadas em Microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss) acoplado a um computador equipado com o software ZENBlack. Observações: Os cortes em vibrátomo são acomodados nos poços da placa de 24 poços, de modo que o material fique imerso nas soluções, inclusive na solução contendo anticorpo, para garantir que o mesmo penetre de forma homogênea. Este tipo de Imunofluorescência é conhecido como imunofluorescência flutuante (free floating imunofluorescence).



### **3.15 Colocalização**

O grau de colocalização do marcador de astrócitos, o GFAP com o marcador de vasos cerebrais o IB4 foi analisado pelo programa ImageJ, com a ferramenta “colocalization” que utiliza como os coeficientes M1 de Mander, que mostra a fração da intensidade em cada canal que coincide com alguma intensidade no outro canal. Assim, os coeficientes M1 representam a porcentagem de pixels no canal verde (GFAP+) que se cruzam com algum sinal no canal vermelho (IB4). Todos os dados foram coletados e plotados em planilhas do Excel (87, 88).

### **3.16 AngioTool**

Para a análise da angioarquitetura da rede microvascular cerebral, utilizamos o programa AngioTool (disponível no domínio público em <https://ccrod.cancer.gov/confluence/display/ROB2/Downloads>), que é uma fonte validada para medição de redes vasculares (89). O uso do AngioTool já foi descrito em análises da angiogênese em cérebros e retinas de murinos (90, 91). O comprimento total do capilares cerebrais foi calculada em cada imagem obtida na microscopia confocal com o programa AngioTool. A lacunaridade descreve a distribuição dos tamanhos de lacunas ao redor dos vasos. O AngioTool também fornece uma medida do número de junções de vasos, calculando o “índice de ramificação” (pontos de ramificação / área de unidade) da rede vascular analisada.

### **3.17 Microglias**

Para a análise da morfologia das microglias marcadas com anticorpo IB4, utilizamos a ferramenta de «Sholl analysis » do Programa ImageJ. A análise de Sholl é um método de análise quantitativa criado para estudos em neurônios para analisar as características morfológicas da imagem de um neurônio. Mas pode ser utilizado igualmente para avaliar a morfologia e o perfil de processos de astrócitos e micróglias.

Utilizando a análise de Sholl, um algoritmo matemático (índice de ramificação) é utilizado para analisar a morfologia microglial. Este índice compara a diferença no número de interseções feitas em círculos consecutivos da análise de Sholl em relação à distância do soma neuronal. Neste estudo as análises foram feitas em microglias e os processos microgliais foram quantificados como número de interseções de 2 até 40 µm a partir do soma e número total de interseções com os círculos da análise, representando a ramificação total das microglias

### **3.18 Dosagem de Colesterol, Triglicerídeos, insulina de jejum e HOMA-IR**

Foram dosados no soro dos animais: insulina de jejum por ELISA, utilizando kit comercial (Enzyme-linked Immunosorbent assay – Milipore. USA, colesterol total e triglicerídeos reações colorimétricas (Labtest Diagnóstica S.A, BH, Brasil). O sangue dos animais foi coletado para análise da glicemia de jejum (12 h), medida através de glicosímetro automático (One Touch Ultra 2 Jhonson & Jhonson Medical SA, Argentina). A resistência à insulina foi avaliada pelo cálculo do HOMA, onde:  $HOMA-IR = [insulina (\mu U/mL) \times glicose (mMol/l)] / 22,5$ .

### **3.19 Análise de expressão proteica por Western blot**

Após a perfusão dos animais com solução salina, os cérebros foram removidos e macerados na presença de 700 µl de tampão RIPA com inibidores de protease e fosfatase (Tris-HCl 50mM, pH 7,4; NP-40 1%; Deoxicolato de sódio 0,25%; NaCl 15 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1mM; Aprotinina 5 µg/ml; Pepstatina 5 µg/ml; Leupeptina 5 µg/ml; NaF 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). As amostras foram congeladas em gelo seco e em seguida descongeladas e centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos. Após este procedimento, o sobrenadante das amostras foi coletado e quantificamos as proteínas usando o Kit do BCA, 100 µg de proteína foram aplicados em cada poço do gel de eletroforese (12%). Após a corrida do gel, transferimos as proteínas para a

membrana de PVDA. Após a transferência, incubamos a membrana com solução de bloqueio (TBS 1X + 5% de soro de albumina bovina + 0,05% de tween) por uma hora. Então a membrana foi incubada com anticorpos específicos, anti-ICAM 1 (Abcam – Ab124760), anti-HMGB1 (Abcam – Ab18256) e anti-TLR4 (Abcam – Ab83444) diluído em solução de bloqueio, por 24 horas. Foram utilizados os anticorpos secundários conjugados com IRDye 680 RD (Li-cor - 926-68170) ou IRDye 800cw (Li-cor - 824-08365). A membrana foi scaneada no Odyssey e a intensidade das bandas foi analisada no software Image Studio™ da marca Li-cor.

### **3.20 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os gráficos e as estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism GraphPad Software Inc. (San Diego CA, EUA). A comparação entre todos os grupos foi feita com análise de variância (ANOVA one-way) com pós teste de Bonferroni e o teste t de Student para comparação entre dois grupos experimentais, tais análises foram utilizadas para localizar diferenças quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1º Bloco – Modelo da SM em camundongos C57BL/6

#### **4.1 Dieta hiperlipídica induz alterações na composição corporal, perfil lipídico, glicemia e parâmetros hemodinâmicos, após 24 semanas.**

Durante o período de dieta os animais apresentaram aumento significativo do peso corporal a partir da 12ª semana de dieta hiperlipídica, este aumento se manteve ao final das 24 semanas de dieta, comparados ao período basal.

Em relação a gordura abdominal, observou-se um aumento significativo após a 24ª semana de dieta quando comparados ao período basal e 12ª semanas de dieta, este resultado corrobora com os valores do percentual de gordura corporal total através da análise da densitometria por dupla emissão de raios-X (DEXA), onde também é possível observar um aumento do percentual de gordura corporal total nos animais quando comparados ao período basal e o período de 12 semanas de dieta hiperlipídica.

Foi possível observar um aumento significativo dos valores de pressão arterial sistólica após 24 semanas de dieta hiperlipídica quando comparadas ao período basal. Em relação à frequência cardíaca, não foi observada nenhuma diferença significativa nos diferentes tempos de dieta.

Houve um aumento significativo nos valores de glicemia de jejum e triglicerídeos séricos após as 24 semanas de dieta, quando comparados aos períodos basal e 12 semanas de dieta. Em relação aos valores de colesterol sérico, não foi observada nenhuma diferença significativa nos diferentes tempos de dieta, conforme descrito na tabela 3.

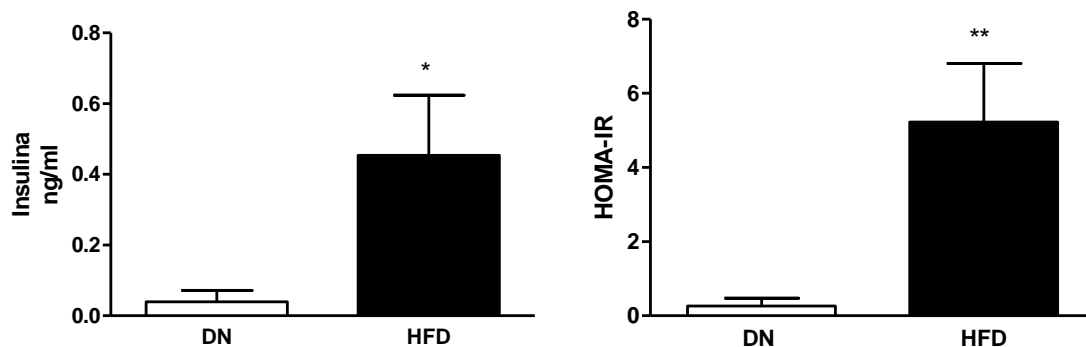
**Tabela 3 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos do modelo de SM em camundongos C57BL/6**

Parâmetros	Semanas		
	Basal	12	24
<b>Massa corporal (g)</b>	22,8±0,4	30,3 ± 1,6***	35,3 ± 2,3***
<b>Gordura Abdominal Total (g)</b>	0,68±0,1	1,8±0,2	2,9±0,3***
<b>Gordura Corporal total (%)</b>	36,7±3,5	35,3±3,4	54,3±3,5*
<b>PAS (mmHg)</b>	109±3,1	102±3	146±17*
<b>FC (bpm)</b>	516±16	599±25	612±20
<b>Glicemia de Jejum (mg/dl)</b>	106,6±1,4	103,0±3,2	137,3±10,4*
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	159±1,4	165±1,6	164±4,1
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	88,3±3,6	104,5±4,9	116,8±11,9*

PAS – Pressão Arterial Sistólica, FC – Frequência Cardíaca. Valores representam a média±EPM, n= 12 a 15, \*\*\*p<0,001 *versus* basal e 12 semanas e \* p<0,05 *versus* basal.

#### **4.2 Dieta hiperlipídica acarreta hiperinsulinemia e resistência à insulina após 24 semanas**

Foi possível observar que após 24 semanas de dieta hiperlipídica houve um aumento significativo dos níveis de insulina de jejum (0,45±0,9 ng/ml p<0,05) e do índice de resistência à insulina avaliado através do HOMA-IR (5,2 ±1,5 p<0,05) quando comparados aos animais alimentados com a dieta normolipídica (0,04±0,03 ng/ml e 0,26 ±0,2, respectivamente), conforme figura 7. Devido a questões orçamentárias não foi possível realizar as análises nos tempos basal e 12 semanas.

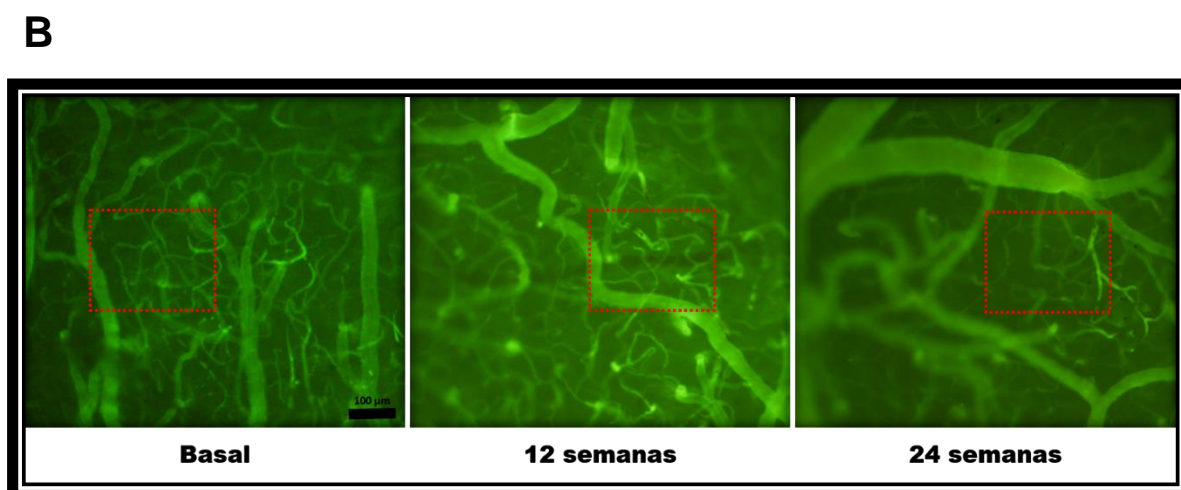
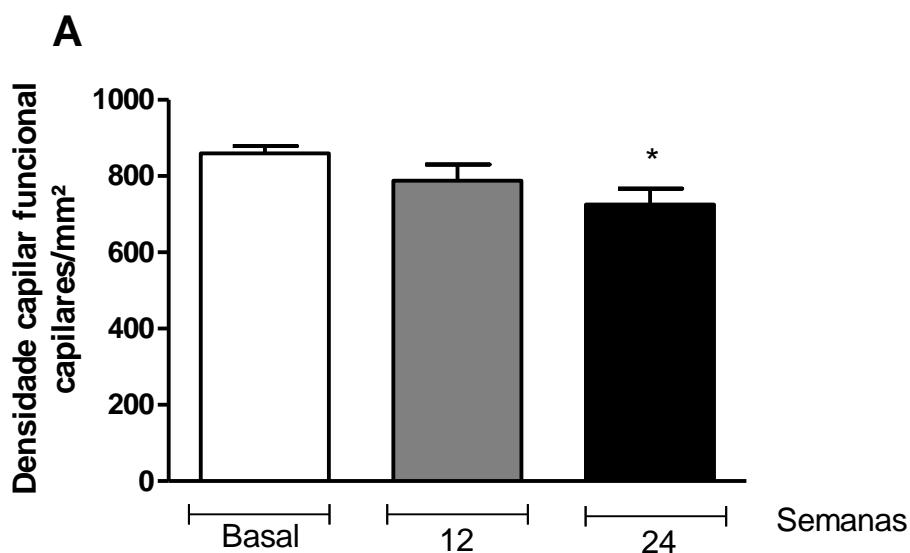


**Figura 7 Insulina e HOMA-IR.** Valores de insulina e HOMA-IR em camundongos C57BL/6 alimentados por 24 semanas com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD). Resultados expressam a média±EPM, N= 10 \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,01$  versus DN.

### 4.3 Dieta hiperlipídica leva a disfunção microvascular cerebral após 24 semanas

#### 4.3.1 Densidade Capilar Funcional cerebral

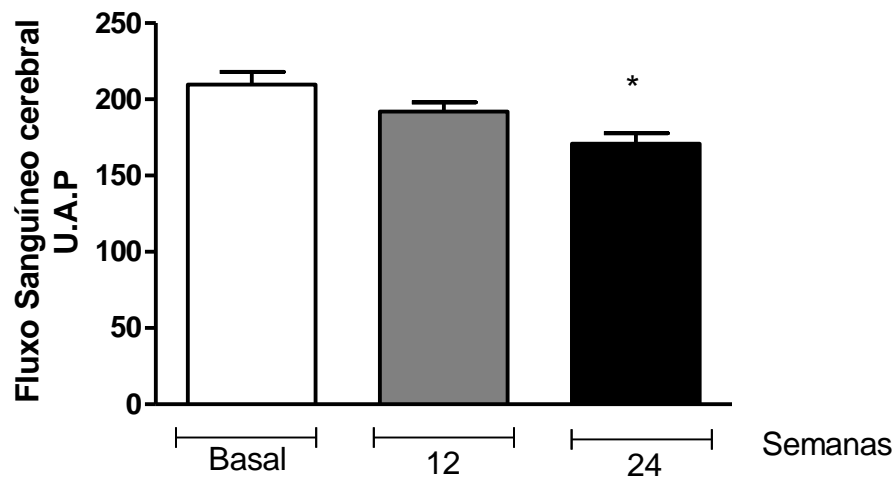
Através da videomicroscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência, foi possível a visualização da rede de capilares no tecido cerebral. Uma redução significativa do número de capilares cerebrais espontaneamente perfundidos foi evidenciada (rarefação capilar funcional) após a 24<sup>a</sup> semana de dieta ( $725\pm41$  capilares/mm<sup>2</sup>  $p<0,05$ ) quando comparados ao período basal ( $859\pm19$  capilares/mm<sup>2</sup>).



**Figura 8** Densidade capilar funcional cerebral (A) e fotomicrografias representativas da videomicroscopia intravital da microcirculação cerebral (B) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. As áreas destacadas em vermelho representam a área de 1  $\mu\text{m}^2$ , onde são realizadas as contagens dos capilares espontaneamente perfundidos. As colunas representam os períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. Valores expressam a média $\pm$ EPM, N= 8. Aumento= 100 x, Barra=100 $\mu\text{m}$  \*  $p < 0,05$  versus o período basal.

#### 4.3.2 Fluxo sanguíneo cerebral

A medida do fluxo sanguíneo cerebral, através de fluxometria a laser com contraste de imagem, mostrou que somente após 24 semanas de dieta hiperlipídica os animais apresentaram uma redução significativa do fluxo sanguíneo cerebral ( $170,9 \pm 6,9$  U.A.P  $p < 0,05$ ) quando comparados ao período basal ( $209,6 \pm 8,3$  U.A.P), conforme demonstrado na figura 9.

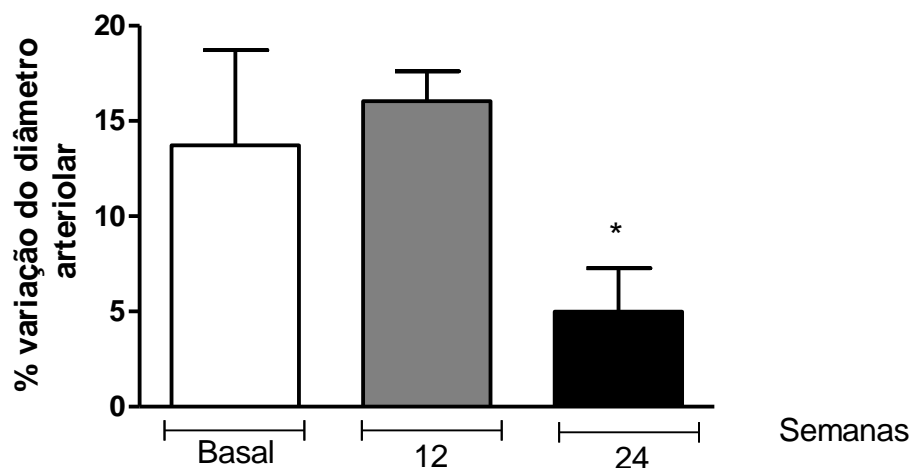


**Figura 9 Fluxo sanguíneo cerebral.** Valores de fluxo sanguíneo cerebral medidos por fluxometria a laser com contraste de imagem em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica; as colunas representam os períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. Valores expressam a média±EPM, U.A.P. Unidade Arbitrária de Perfusão N= 9. \* p<0,05 versus o período basal.

#### 4.3.3 Função endotelial vascular cerebral

A resposta vasodilatadora à acetilcolina foi avaliada em arteríolas da superfície cerebral através de microscopia intravital. A avaliação da função endotelial vascular mostrou que, após a 24<sup>a</sup> semana de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram menor dilatação arteriolar ( $4,9 \pm 2,2$  % \*p<0,005), redução de 30%, comparada ao período basal ( $13,7 \pm 5,1$  %) e 12 semanas ( $16,5 \pm 1,5$  %).

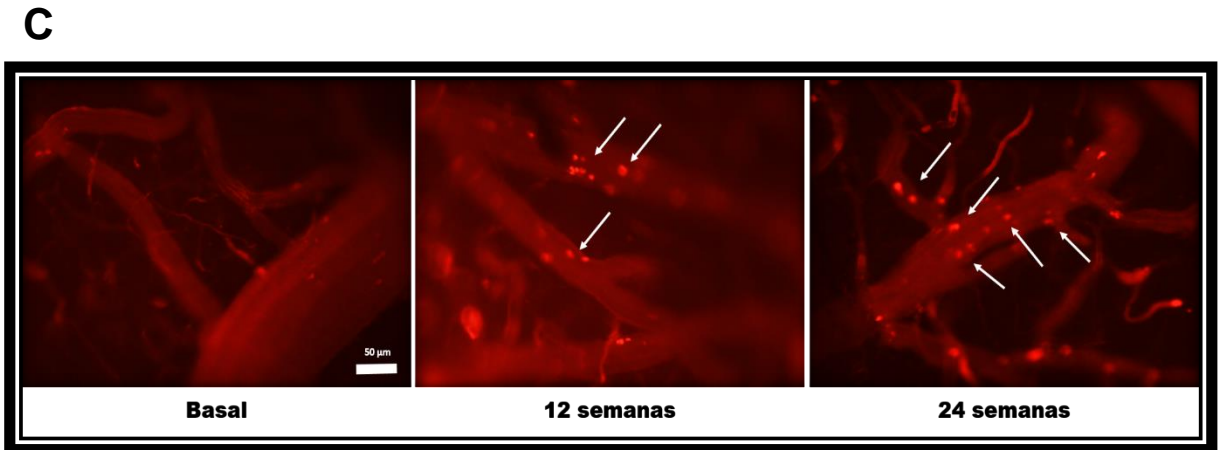
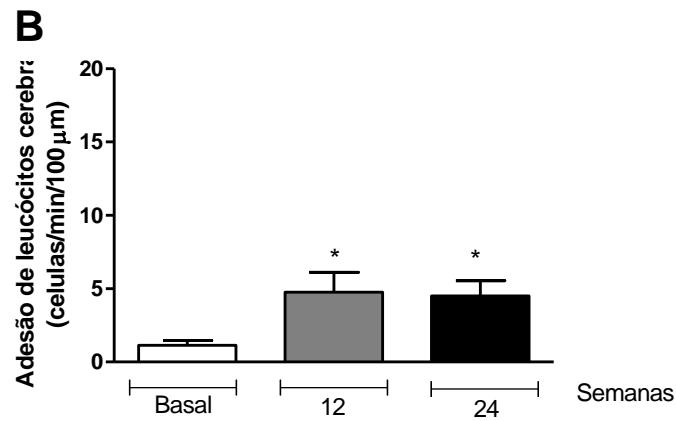
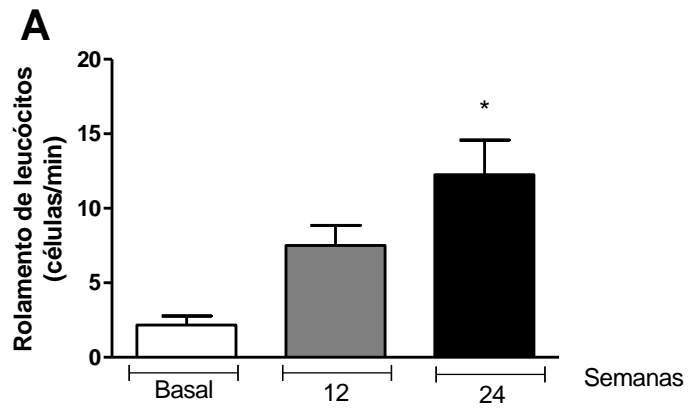




**Figura 10** Resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh, 1  $\mu$ M) em arteríolas cerebrais de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. As colunas representam os períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. Valores expressam a média $\pm$ EPM, N= 10 \*  $p < 0,05$  versus o período basal.

#### 4.3.4 Rolamento e Adesão de Leucócitos em vênulas cerebrais

Utilizando a videomicroscopia intravital para análise da interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação cerebral, foi possível observar que houve um aumento significativo do rolamento de leucócitos após a 24ª semana de dieta ( $12,2 \pm 2,3$  células/min; \* $p < 0,05$ ), quando comparadas ao período basal ( $2,1 \pm 0,6$  células/min) e ao período de 12 semanas ( $7,5 \pm 1,3$  células/min). A análise da adesão de leucócitos mostrou que a partir da 12ª semana de dieta os animais já apresentaram aumento significativo da adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares ( $4,7 \pm 1,3$  células/min; \* $p < 0,005$ ) e este aumento se manteve após a 24ª semana de dieta ( $4,5 \pm 1,3$  células/min; \* $p < 0,005$ ), comparados ao período basal ( $1,4 \pm 0,3$  células/min).



**Figura 11 Rolamento (A), Adesão (B) de Leucócitos e fotomicrografias representativas (C) da videomicroscopia intravital de vênulas pós-capilares da microcirculação cerebral** Valores de leucócitos rolantes e aderidos a parede de vênulas pós-capilares do cérebro de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica; as colunas representam os períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. As setas indicam leucócitos rolando ou aderidos. Valores expressam a média±EPM, N= 7 Aumento= 200 x, Barra=50μm. \*  $p < 0,05$  versus o período basal.

## 2º Bloco – Modelo de SM em camundongos mutantes para o TLR4

Nós avaliamos o efeito da dieta hiperlipídica sobre o fenótipo metabólico e sobre a microcirculação cerebral de camundongos C3H/HeJ (TLR4-mut). Os camundongos C3H/HeJ possuem uma mutação do tipo *missense* no domínio citoplasmático do TLR4 (27, 81) que o torna disfuncional e, portanto, têm sido amplamente utilizados para investigar o papel do TLR4 na regulação da imunidade inata.

### **4.4 Investigação do papel do TLR4 na evolução da SM sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e glicemia de jejum**

Durante o período de dieta, os animais TLR4-mut apresentaram aumento significativo da massa corporal, gordura abdominal total e percentual de gordura corporal a partir da 12ª semana de dieta hiperlipídica; este aumento se manteve ao final das 24 semanas de dieta, comparados ao período basal.

Embora estes animais tenham apresentado aumento na massa corporal e na gordura abdominal a partir da 12ª semana de dieta, este aumento não acarretou nenhum impacto na pressão arterial sistólica, frequência cardíaca e glicemia de jejum. Assim, foi possível observar que a dieta hiperlipídica não alterou esses parâmetros hemodinâmicos e metabólico em nenhum dos tempos analisados.

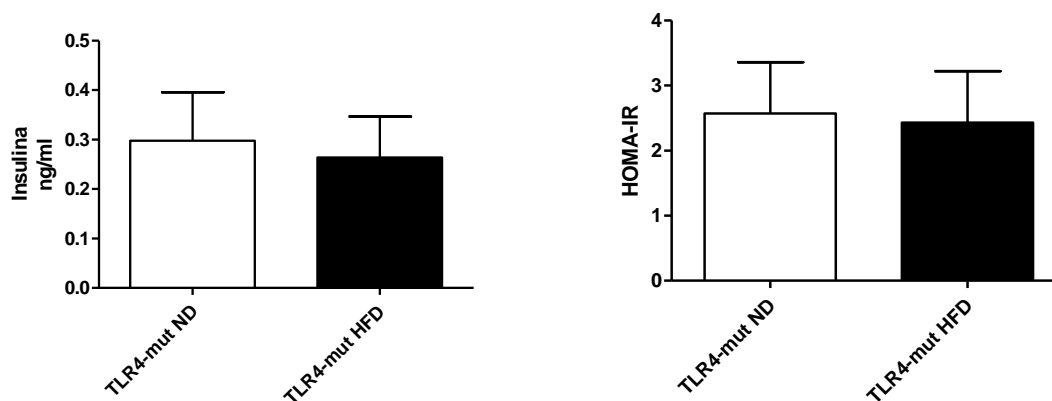
**Tabela 4 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos do modelo de SM em camundongos TLR4-mut**

Parâmetros em animais TLR4-mut	Semanas		
	Basal	12	24
<b>Massa corporal (g)</b>	22,5±1,2	35,5 ± 1,2***	37,8 ± 1,7***
<b>Gordura Abdominal Total (g)</b>	0,53±0,1	1,8±0,1*	1,8±0,3*
<b>Gordura Corporal total (%)</b>	34,7±3,2	58,6±5,4*	62,2±5,9*
<b>PAS (mmHg)</b>	108,3±1,9	101,3±5,3	101,7±5,4
<b>FC (bpm)</b>	579±28	589±24	578±18
<b>Glicemia de Jejum (mg/dl)</b>	111,2±2,3	127,3±5,9	131,8±7,5

PAS – Pressão Arterial Sistólica, FC – Frequência Cardíaca. Valores representam a média±EPM, n= 12 a 15, \*\*\*p<0,001, *versus* basal e 12 semanas e \* p<0,05 *versus* basal.

#### **4.5 Envolvimento do TLR4 na evolução da SM, sobre a insulina de jejum e HOMA-IR**

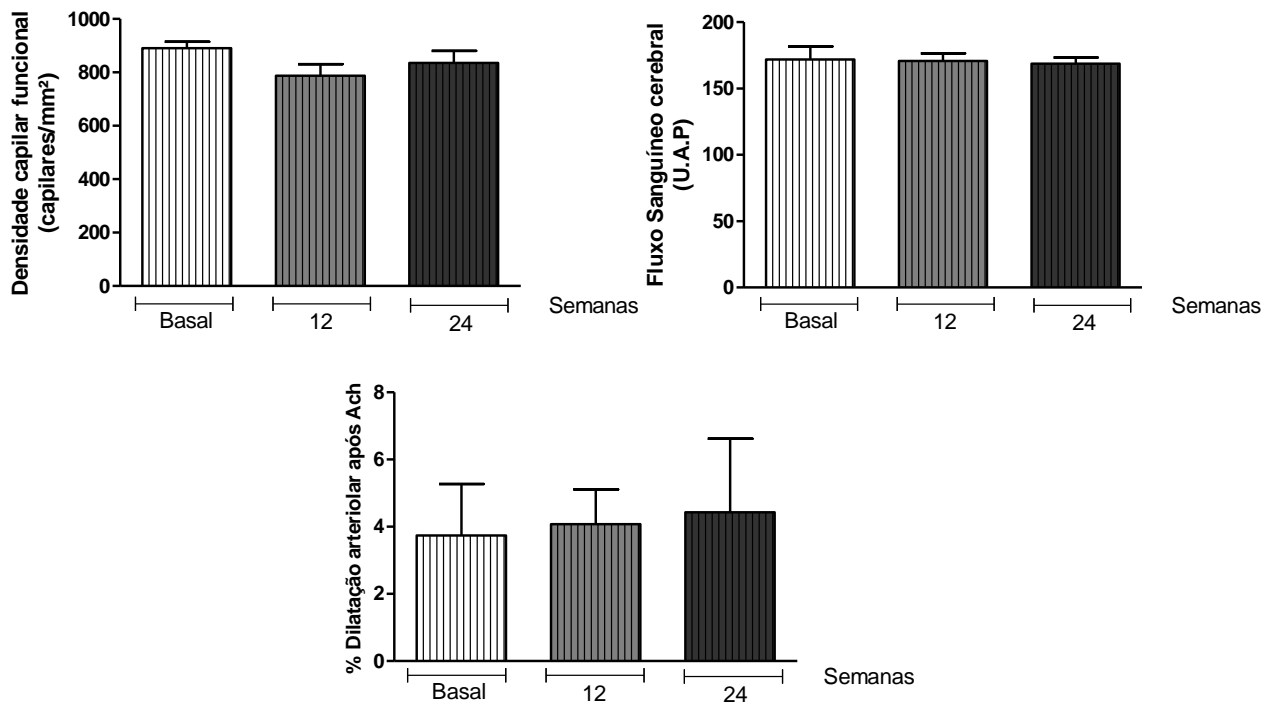
Os camundongos TLR4-mut alimentados com a dieta hiperlipídica por 24 semanas não apresentaram diferença nos níveis de insulina e do índice de resistência à insulina HOMA-IR, quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta normolipídica por 24 semanas. Também por questões orçamentárias, não foi possível realizar as análises nos tempos basal e 12 semanas.



**Figura 12 Insulina e HOMA-IR.** Valores de insulina e HOMA-IR em camundongos TL4-mut alimentados por 24 semanas com dieta normolipídica (ND) ou hiperlipídica (HFD). Resultados expressam a média±EPM, N= 6.

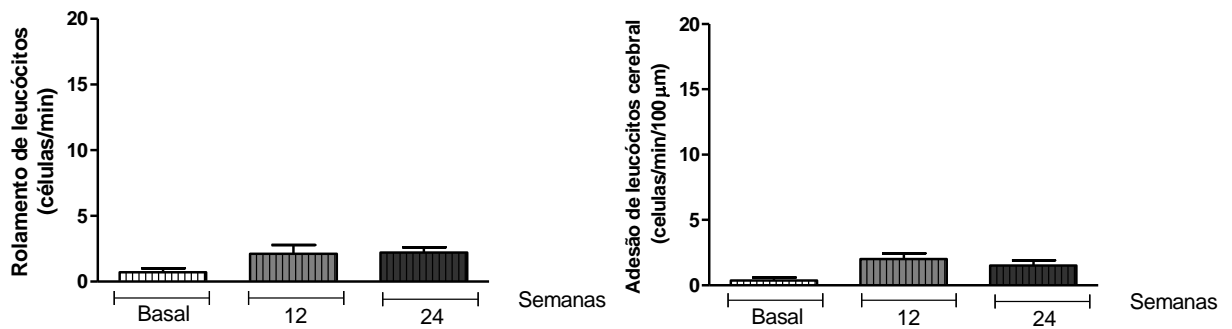
#### 4.6 Envolvimento do TLR4 na evolução da SM, sobre os parâmetros microcirculatórios

Foi possível observar que durante as 24 semanas de dieta os animais TLR4-mut não apresentaram qualquer alteração significativa nos parâmetros microcirculatórios observados: densidade capilar funcional, fluxo sanguíneo cerebral e resposta vasodilatadora a acetilcolina, quando comparados ao período basal.



**Figura 13 Densidade capilar funcional cerebral, fluxo sanguíneo cerebral e resposta vasodilatadora a acetilcolina de camundongos TLR4-mut alimentados com dieta hiperlipídica.** As colunas representam os valores dos parâmetros hemodinâmicos nos seguintes períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. Valores expressam a média±EPM, N= 7.

Observamos que durante as 24 semanas de dieta também não houve qualquer diferença significativa no perfil do rolamento e da adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares cerebrais dos camundongos TLR4-mut, quando comparadas ao período basal. A análise dos números referentes aos parâmetros analisados mostram que os valores continuam muito baixos.



**Figura 14 Rolamento e Adesão de Leucócitos.** Números de leucócitos rolantes ou aderidos à parede de vênulas pós-capilares do cérebro de camundongos TL4-mut alimentados com dieta hiperlipídica; as colunas representam os períodos: basal, após 12 e 24 semanas de dieta. Valores expressam a média±EPM, N= 6.

Com base nos resultados apresentados, foi possível observar que o curso da evolução da SM é diferente nos animais C57BL/6 e nos animais TLR4-mut, indicando a possível participação do TLR4 nas alterações decorrentes da SM. A ingestão de uma dieta hiperlipídica nos animais C57BL/6 levou ao aumento no peso corporal, glicemia de jejum, gordura abdominal, hiperinsulinemia e resistência à insulina, evidenciada pelo aumento do HOMA-IR, que são características da síndrome metabólica também observadas em pacientes (92). No entanto, nos animais TLR4-mut, a dieta hiperlipídica acarretou somente aumento do peso corporal e níveis de gordura (abdominal e total) a partir da 12<sup>a</sup> semana de dieta. De fato, a adiposidade visceral parece desempenhar um papel chave no desenvolvimento da SM humana e está associada a todos os critérios da SM (93).

A inflamação crônica é uma característica comum da SM e é resultado predominantemente da disfunção do tecido adiposo causado pelo ganho de peso (94, 95). O excesso de ingestão de nutrientes leva à expansão do tecido adiposo acomodando o aumento do influxo de nutrientes, um processo que depende do armazenamento de energia mediada por insulina (95). A expansão do tecido adiposo ocorre principalmente através de hipertrofia em vez de hiperplasia de adipócitos, e esses fatores promovem a ativação de um estado crônico e pró-inflamatório no tecido adiposo (95, 96). Esse estresse persistente e inflamação no tecido adiposo podem levar à apoptose e à liberação de mediadores

quimiotáticos, resultando em infiltração inflamatória de leucócitos (97). Após a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, estes induzem a liberação de ácidos graxos saturados pelos adipócitos, via lipólise que atuam como adipocinas pró-inflamatórias locais. No entanto, estudos têm demonstrado que a administração exógena de ácidos graxos saturados exerce efeitos pró-inflamatórios em certos tipos celulares através da ativação de receptores do tipo *Toll*, que parece participar ativamente no estado inflamatório crônico observado na obesidade e síndrome metabólica (24, 80). Acreditamos que a fonte de ácidos graxos provenientes da dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo pode ser um fator pró-inflamatório importante na evolução dos danos acarretados na SM. Dentre os ácidos graxos, destacam-se os não esterificados que são capazes de ativar o TLR4 (50, 98).

Ao longo das últimas décadas, o declínio cognitivo vem sendo cada vez mais relacionado com a presença da SM em pacientes e em modelos experimentais (1, 36, 99). Já foi observado que a redução no fluxo sanguíneo cerebral é responsável por menor desempenho cognitivo, decorrente de lesão neuronal em regiões cerebrais relacionadas ao aprendizado e memória (38, 100).

Em um estudo anterior do nosso grupo, foi possível verificar que ratos com SM e submetidos à isquemia e reperfusão cerebral apresentaram rarefação microvascular e redução do fluxo sanguíneo microvascular cerebral mais pronunciados que nos animais alimentados com a dieta normolipídica e submetidos à isquemia e reperfusão cerebral (101). No presente estudo, o modelo de SM foi reproduzido em camundongos C57BL/6 e também foi observado que nesses animais houve uma redução significativa no fluxo sanguíneo cerebral e na densidade capilar funcional somente após a 24ª semana de ingestão de dieta hiperlipídica, o que não foi observado nos animais TLR4-mut. Esses dados sugerem novamente a participação do TLR4 nas alterações microcirculatórias acarretadas pela ingestão da dieta hiperlipídica.

A disfunção endotelial é um dos principais componentes da SM e é causada pelo desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO), e substâncias vasoconstritoras, como a endotelina e fatores pró-trombóticos, como o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (102). A diminuição



dos níveis de NO em indivíduos com SM já é bem estabelecida (103). No estado fisiológico, a insulina estimula a produção de NO pelas células endoteliais através de um aumento na atividade de eNOS. Esta ação é diminuída ou revertida no caso de resistência à insulina, que está presente na SM (104). Esta diminuição nos níveis de NO pode ser devido a uma série de fatores como diminuição da produção de eNOS, a inibição dos co-fatores necessários para a síntese de eNOS e a degradação ou inativação excessiva de NO por espécies reativas de oxigênio (105).

No presente estudo, a resposta vasodilatadora à acetilcolina, avaliada em arteríolas da superfície do córtex cerebral, foi comprometida após 24 semanas de dieta hiperlipídica nos animais C57BL/6, mas não nos animais TLR4-mut. Logo, os dados sugerem a participação dos TLR4 na disfunção endotelial cerebral na SM. No entanto, estudos já demonstraram que 12 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica já são suficientes para induzir a disfunção endotelial no leito microvascular cerebral (106). Evidências apontam o envolvimento dos TLR4s na disfunção endotelial, demonstrando o aumento expressivo desses receptores nas três camadas das paredes de artérias e em cultura de músculo liso vascular de ratos hipertensos, mas não de normotensos (107).

Já foi demonstrada uma atenuação da inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade em camundongos C3H/HeJ, quando comparados aos seus controles após ingestão de dieta hiperlipídica. A disfunção do TLR4 nesses animais sugere um papel fundamental para esse receptor na resposta inflamatória induzida pela dieta hiperlipídica (102), corroborando com os resultados encontrados neste estudo onde a ingestão da dieta hiperlipídica não teve qualquer impacto na interação leucócito-endotélio vascular cerebral, durante a evolução da SM nos animais TLR4-mut. No entanto, nos animais C57BL/6, esta resposta foi diferente, pois apresentaram um aumento da adesão de leucócitos na parede vascular a partir da 12<sup>a</sup> semana de dieta e na 24<sup>a</sup> semana, quando foi observado também aumento significativo do rolamento de leucócitos na parede vascular.

Portanto, foi possível observar que as alterações metabólicas e microcirculatórias são mais evidentes na 24<sup>a</sup> semana de ingestão de dieta

hiperlipídica nos animais C57BL/6, mas não nos animais TLR4-mut, sugerindo novamente a participação deste receptor nestas complicações.

### 3º Bloco – Efeitos da gordura abdominal versus dieta hiperlipídica nos parâmetros metabólicos, microcirculatórios e inflamatórios

Estratégias nutricionais que atuam na melhora das alterações acarretadas pela SM fornecem uma importante oportunidade para a prevenção e tratamento (108). A obesidade e inatividade física são as causas mais frequentes de resistência à insulina em indivíduos geneticamente predispostos. Estudos mostraram que a perda de peso reduz a resistência à insulina e, portanto, é recomendada como tratamento de primeira linha da SM (109).

Case e colegas, descreveram em seu estudo original que a perda de peso está associada à mudanças positivas em cada um dos componentes da síndrome metabólica (110). Estes achados suportam a hipótese de que a adiposidade excessiva desempenha um papel fundamental na fisiopatologia de todas as facetas da SM.

Portanto, como parte dos objetivos do estudo foi questionado se após o estabelecimento da SM, a substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica poderia reverter as alterações metabólicas, inflamatórias e microvasculares estabelecidas.

#### **4.7 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica diminui a massa corporal e a pressão arterial sistólica de animais WT**

Foi possível observar que a substituição da HFD pela DN acarretou uma diminuição significativa nos valores do peso corporal e da gordura abdominal nos animais WT, mas não nos animais TLR4-mut. Em relação aos outros parâmetros avaliados, como a PAS e a glicemia de jejum, a substituição da HFD pela DN não acarretou qualquer diminuição em ambos os grupos.

**Tabela 5 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos após substituição da dieta HFD pela DN**

Parâmetros	WT			TLR4-mut		
	DN	HFD	Sub-DN	DN	HFD	Sub-DN
<b>Massa corporal (g)</b>	30,5± 1,6	38,6±2,3	30,7±0,4 *	32,5± 1,1	35,1±2	33,1±1
<b>Gordura Abdominal Total (g)</b>	1,36± 0,1	2,9±0,6	1,22±0,1 *	1,63± 0,3	1,3±0,1	1,2±0,1
<b>PAS (mmHg)</b>	107±4,8	119,4±5,8	104,1±5,1	91±7	91,8±7	91,2±3,7
<b>Glicemia de Jejum (mg/dl)</b>	95±8,4	137,3±10	138,5±19	113,5±5,4	120,8±7	91,2±3,7

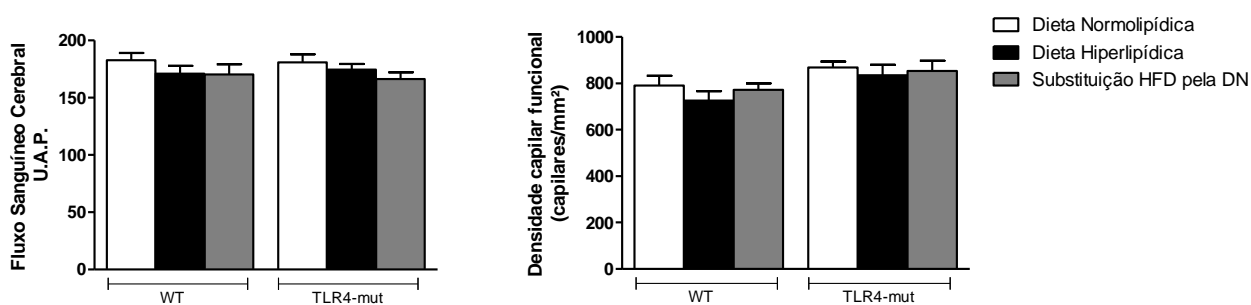
PAS – Pressão arterial sistólica.

O modelo de obesidade induzida por dieta obesogênica e com baixo teor de fibras, como é a dieta hiperlipídica, é um modelo amplamente utilizado por induzir resistência à insulina e intolerância à glicose, que coincide com a obesidade em roedores. Os mecanismos que sustentam a intolerância à glicose durante os estágios iniciais da alimentação com dieta hiperlipídica são diferentes daqueles que governam a intolerância crônica à glicose durante a obesidade prolongada induzida por dieta. Por exemplo, o acúmulo ectópico de lipídios no músculo esquelético e no fígado está associado à intolerância à glicose após os primeiros dias de alimentação com HFD, enquanto a inflamação do tecido desempenha um papel proeminente na propagação da intolerância à glicose após meses de alimentação com HFD (111). Além disso, a microbiota intestinal pode contribuir para o balanço energético do hospedeiro e a deposição lipídica por meio de estímulo hormonal (112). No entanto, ainda não está claro se mudanças na microbiota intestinal induzidas pela dieta contribuem para os

mecanismos que sustentam a resistência à insulina e a intolerância à glicose na fase inicial ou crônica da SM.

#### 4.8 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica não interfere nos parâmetros microcirculatórios cerebrais

Através da análise do fluxo sanguíneo cerebral, avaliada pela fluxometria a laser com contraste de imagem e da densidade capilar funcional cerebral, mostrou-se que a substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica não alterou nenhum dos parâmetros em ambos os grupos, e, portanto, não foi capaz de reverter as alterações microcirculatórias estabelecidas, conforme visto nos resultados descritos acima.

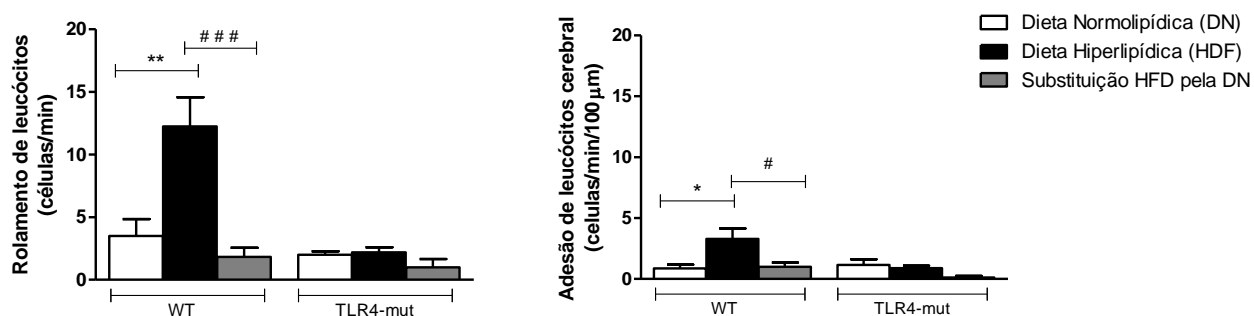


**Figura 15 Fluxo Sanguíneo Cerebral e Densidade Capilar Funcional Cerebral de camundongos C57BL/6 (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (colunas brancas) dieta hiperlipídica por 24 semanas (colunas pretas) e dieta normolipídica por 4 semanas em substituição a dieta hiperlipídica por 20 semanas (colunas cinzas). Valores expressam a média±EPM, N= 5.**

Uma vez que a substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica não foi capaz de reduzir os níveis elevados de glicemia de jejum, acreditamos que este seja o principal motivo pelo qual as alterações microcirculatórias não foram melhoradas com a substituição da dieta em ambos os grupos. De fato, conforme mencionado anteriormente, a resistência à insulina e a hiperglicemia são fatores diretamente relacionados à doença microvascular cerebral e as alterações da barreira hematoencefálica (113).

#### 4.9 Substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica promove diminuição no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais em animais de animais WT

Com as análises de microscopia intravital, foi possível observar que a substituição da dieta hiperlipídica pela dieta normolipídica acarretou uma diminuição significativa do rolamento e da adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares cerebrais dos animais WT, quando comparados aos animais WT alimentados com HFD, contribuindo para a diminuição da inflamação cerebral. No entanto, no grupo TLR4-mut, a substituição pela dieta normolipídica não acarretou em qualquer diferença estatisticamente significativa no rolamento e adesão de leucócitos quando comparado aos animais alimentados com a HFD e com a DN.



**Figura 16 Rolamento e Adesão de leucócitos em vênulas cerebrais de camundongos C57BL/6 (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (colunas brancas), com dieta hiperlipídica por 24 semanas (colunas pretas) e dieta normolipídica por 4 semanas em substituição a dieta hiperlipídica por 20 semanas (colunas cinzas). Valores expressam a média±EPM, N= 5. \*p<0,05 e \*\* p<0,01 versus WT-DN; # p<0,05 e ### p<0,001 versus WT-HFD.**

Sabe-se que o aumento da gordura visceral exerce um papel chave na geração e manutenção do estado inflamatório crônico de baixa intensidade na SM (93, 114). Da mesma forma, também já foi descrito o potencial inflamatório da dieta hiperlipídica através dos seus componentes lipídicos (115). No entanto, o que não se sabe é se este estímulo inflamatório que acontece na SM é decorrente apenas da obesidade abdominal ou se a ingestão de uma dieta hiperlipídica também contribui para a retroalimentação destes estímulos

inflamatórios ou, ainda, se ambos os estímulos, dieta hiperlipídica e aumento da gordura abdominal, exercem um efeito sinérgico na inflamação tecidual.

Portanto, para elucidar esta questão, perguntamos se somente o estímulo inflamatório da ingestão de dieta hiperlipídica seria capaz de promover alterações microcirculatórias, independente da presença de obesidade abdominal. Para tal, analisamos o efeito da dieta hiperlipídica na microcirculação cerebral após o breve período de uma semana, onde não haveria tempo para induzir o aumento de depósitos de gordura visceral como observado no protocolo de 24 semanas. Ao final deste período foram realizadas as análises de composição corporal e de microscopia intravital no cérebro dos animais.

#### 4.10 Ingestão da dieta hiperlipídica por uma semana não altera a composição corporal e microcirculação cerebral em ambos os grupos WT e TLR4-mut

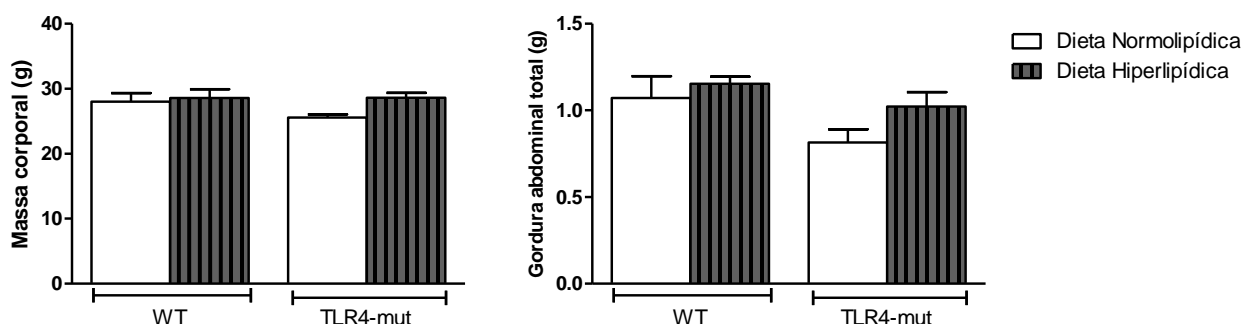
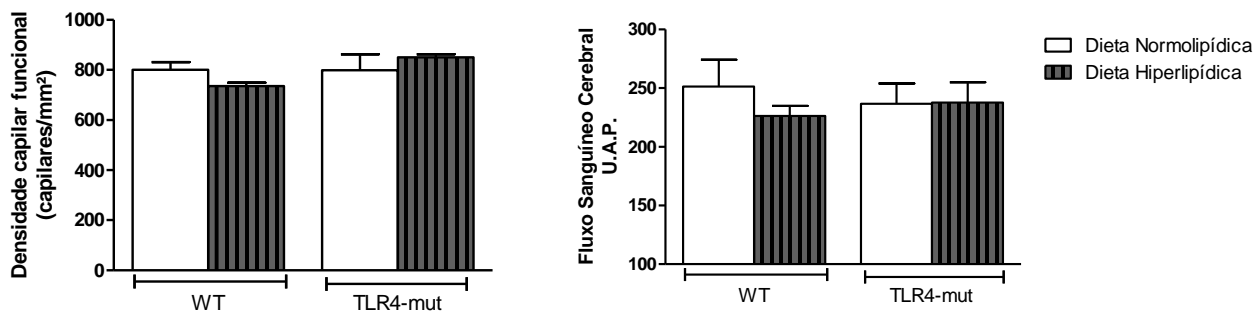


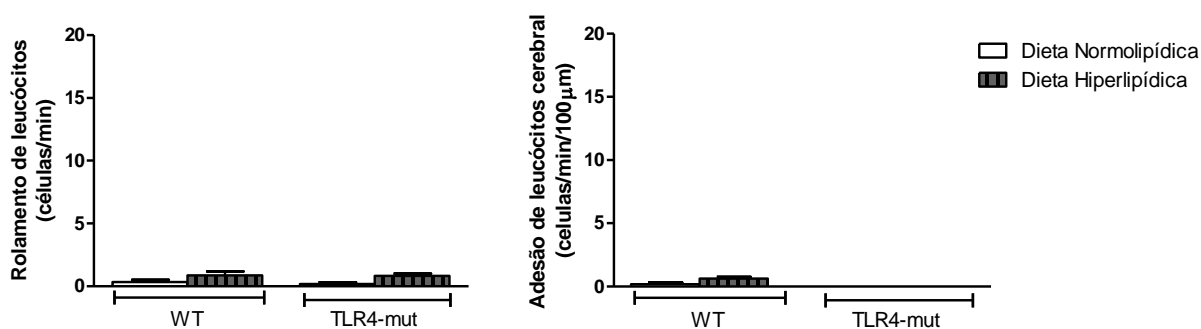
Figura 17 Massa corporal e gordura abdominal total de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica por 1 semana. Valores expressam a média±EPM, N= 5

De forma semelhante, a ingestão da HFD por uma semana também não acarretou em diferenças na densidade capilar funcional e no fluxo sanguíneo cerebral tanto no grupo WT como no grupo TLR4-mut. Embora este parâmetro tenha sido 10% menor no grupo WT-HFD, comparado ao WT-ND, este resultado não apresentou diferença estatística.



**Figura 18** Densidade capilar funcional e fluxo sanguíneo cerebral de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica por 1 semana. Valores expressam a média±EPM, N= 5

Em relação ao rolamento e à adesão de leucócitos, ambos os grupos WT e TLR4-mut alimentados com HFD sugerem um aumento da interação leucócito-endotélio, quando comparados aos seus controles. Porém, este aumento não é significativo, evidenciando que a ingestão de dieta hiperlipídica por uma semana não foi capaz de promover eventos inflamatórios de adesão à microvasculatura cerebral.



**Figura 19** Rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica por 1 semana. Valores expressam a média±EPM, N= 5

Rijnsburger e colaboradores (2017) demonstraram que ratos alimentados com HFD por uma semana têm a ingestão calórica aumentada, mas não apresentaram diferença na massa corporal, quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle. esses autores verificaram ainda que a ingestão

da HFD por uma semana não acarretou diferença na permeabilidade da BHE comparado ao grupo alimentado com dieta controle (116). Estes resultados demonstram que a ingestão de dieta hiperlipídica por uma semana não foi capaz de promover alterações na massa corporal, gordura abdominal, na microcirculação cerebral e na interação leucócito-endotélio nas vênulas cerebrais, sugerindo que o acúmulo de tecido adiposo visceral e a ativação da resposta imune inata, gerando uma inflamação crônica de baixa intensidade ao longo das 24 semanas, têm papel fundamental no comprometimento funcional da UNV e das funções cognitivas observados na SM.

#### 4º Bloco: Investigação do papel do TLR4 na SM

Como o objetivo do trabalho visa avaliar as alterações neuroimunes no modelo do SM e sua relação com o TLR4, focamos as demais análises na 24ª semana de dieta hiperlipídica, a fim de avaliar mais especificamente a participação do TLR4 na neuroinflamação e neurodegeneração na SM, ativação de micróglia, a relação de astrócitos com capilares cerebrais, função cognitiva e marcadores inflamatórios.

#### **4.11 Envolvimento do TLR4 sobre a composição corporal, perfil lipídico, insulina de jejum, glicemia de jejum e parâmetros hemodinâmicos no modelo de SM**

Após 24 semanas de dieta, os resultados da avaliação da massa corporal entre os grupos controle (WT) e TLR4-mut, ambos alimentados com dieta hiperlipídica ou normolipídica, não foram diferentes estatisticamente; isso se deve ao fato de o ganho de peso nem sempre estar relacionado à deposição de gordura central. Este modelo experimental de SM induzido por dieta hiperlipídica apresenta aumento da adiposidade visceral e epididimal; tal aumento foi observado nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e foi independente do aumento de massa corporal (117). Este fato também foi demonstrado em um estudo onde ratos wistar que receberam ração



hiperlipídica por 7 semanas apresentaram peso corporal total e ganho de peso similar aos animais que receberam ração controle (118).

Em relação à gordura abdominal e percentual de gordura corporal, observamos um aumento significativo no grupo WT-HFD, quando comparados ao grupo WT-ND, mas não no grupo TLR4-mut-HFD, quando comparados ao grupo TLR4-mut-ND. Vale ressaltar que os valores de gordura abdominal e percentual de gordura corporal são significativamente menores no grupo TLR4-mut-HFD, quando comparados com o grupo WT-HFD.

As dietas ricas em gordura são reconhecidas como um método para gerar um modelo válido de SM em animais (119, 120) mesmo que dietas com diferentes composições de lipídeos apresentem resultados diferentes em relação aos seus efeitos metabólicos. Em geral os modelos de SM induzidos por dietas ricas em gordura em roedores são caracterizados por obesidade central, RI e alterações nos perfis de lipídeos no plasma (117). A SM em humanos é causada, em grande parte, por fatores referentes ao estilo de vida, incluindo a ingestão calórica excessiva e inatividade física. O modelo animal que mais reflete essa situação é o modelo baseado em uma dieta hiperlipídica (119).

Foi possível observar um aumento estatisticamente significativo dos valores de pressão arterial sistólica, glicemia de jejum, insulina, HOMA-IR e colesterol no grupo WT-HFD, quando comparados ao grupo WT-ND. Cabe salientar que tais parâmetros apresentaram valores estatisticamente menores nos animais TLR4-mut-HDF quando comparados ao grupo WT-HDF.

Algumas características adicionais e importantes do modelo experimental utilizado no presente estudo são as alterações cardiovasculares. Um modelo de SM com aumento da adiposidade visceral associada a alterações metabólicas, incluindo dislipidemia, hiperglicemia e resistência insulínica sugere o papel destas alterações no desenvolvimento da hipertensão moderada (121). O aumento da ingestão de sal em nosso modelo experimental certamente contribuiu para as elevações da pressão arterial.

**Tabela 6 Composição corporal, parâmetros hemodinâmicos e metabólicos de camundongos WT e TLR4- mut no modelo de SM**

Parâmetros	WT		TLR4-mut	
	ND	HFD	ND	HFD
<b>Massa corporal (g)</b>	38±1	41±0,8	36±0,7	39±0,6
<b>Gordura Abdominal Total (g)</b>	1,53±0,1	2,47±0,2 **	1,7±0,1	1,9±0,1 #
<b>Gordura Corporal total (%)</b>	35,6±1,4	47,2±1,5 **	37,5±2,9	43,3±1,2
<b>PAS (mmHg)</b>	94,5±1,3	151,4±2,4 *	94,1±2,5	98,7±2,9 #
<b>Glicemia de Jejum (mg/dl)</b>	101,3±13,5	170,9±10,7**	122,7±8,2	129,6±7,5 #
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,21±0,1	0,67±0,3 *	0,29±0,7	0,26±0,7 #
<b>HOMA-IR</b>	1,51±0,7	7,82±3,7 *	2,57±0,7	2,43±0,7 #
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	120,1±18,1	180,2±12,2 *	140,4±15,6	149,9±6,3 #

PAS – Pressão Arterial Sistólica, FC – Frequência Cardíaca, HOMA-IR - *Homeostatic model assessment*. Valores representam a média±EPM, n= 8 a 15, \*p<0,05, \*\*p<0,01 versus WT-ND e #p<0,05 versus WT-HFD.

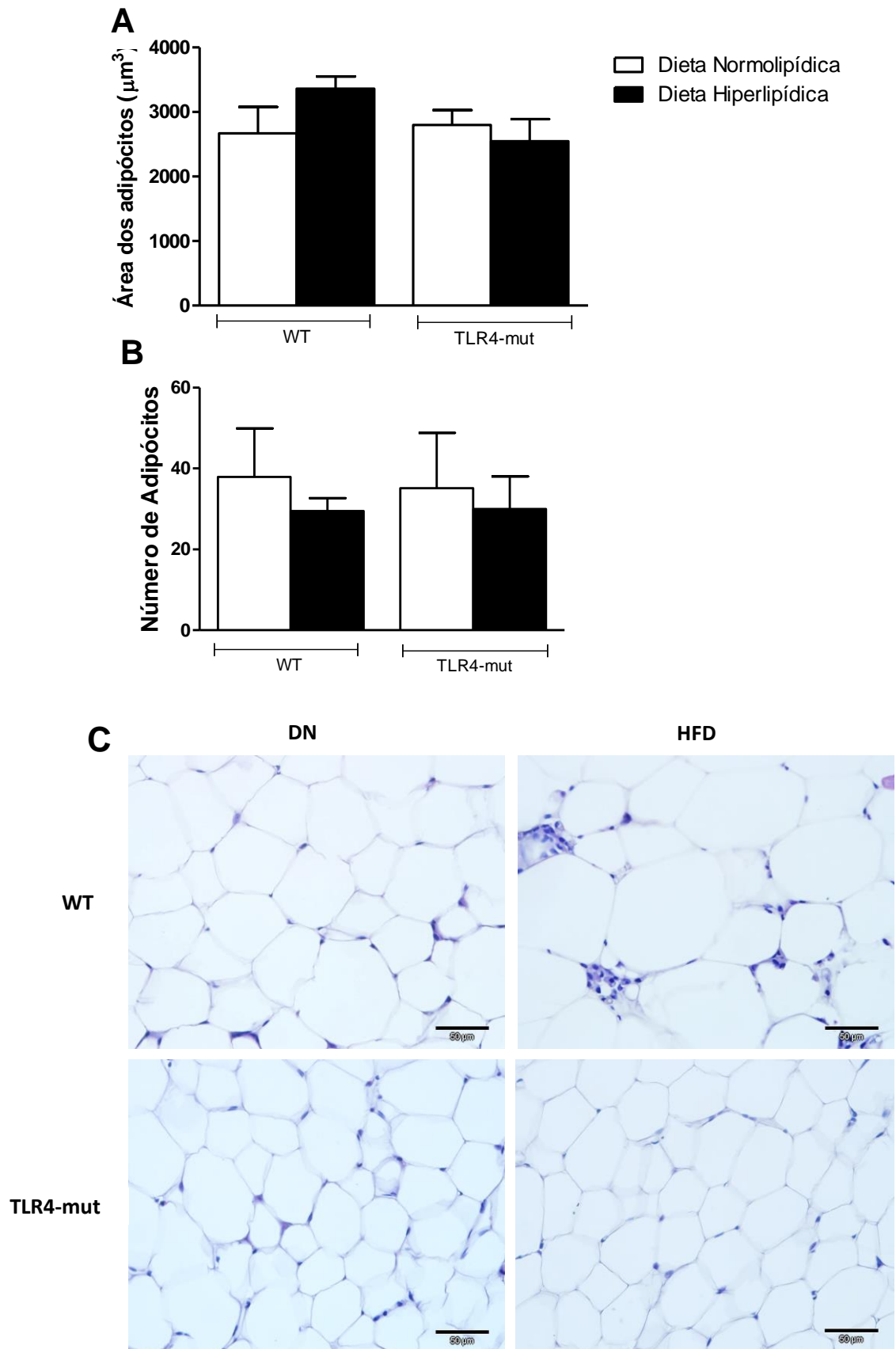
#### **4.12 Efeitos do TLR4 sobre a quantidade e área dos adipócitos no modelo de SM**

O ganho de massa corporal acarreta, no tecido adiposo, em aumento de volume (hipertrofia) ou número (hiperplasia) de adipócitos (114). A desregulação do tecido adiposo influencia significativamente na sua fisiologia. Os animais WT-HFD apresentaram aumento, embora não estatisticamente significativo, da área dos adipócitos epididimais, quando comparados ao grupo WT-ND. Esse aumento deve-se possivelmente à hipertrofia e não à hiperplasia

dos adipócitos. Os grupos TLR4-mut não apresentaram qualquer diferença na quantidade ou na área dos adipócitos.

A hipertrofia de adipócitos é considerada um evento chave na resistência insulínica na obesidade e SM, pois não apenas eleva os níveis de citocinas pró-inflamatórias, mas também leva à resistência à leptina (122-124), e pode ser o resultado de uma baixa capacidade intrínseca de adipogênese (125). Em contrapartida, uma maior taxa de geração de adipócitos tem mostrado levar à hiperplasia de adipócitos (126).

No entanto, o número total de adipócitos é determinado na infância e adolescência, independentemente da massa corporal, sugerindo que a hipertrofia dos adipócitos representa o mecanismo mais importante para a expansão da adiposidade tecidual no ganho de peso (114).



**Figura 20** Quantificação e morfologia dos adipócitos. Área (A), número de adipócitos (B) epididimais e Fotomicrografias representativas (C) de camundongos controles (WT) e TLR4-mut alimentados com dieta normolipídica (ND) ou dieta hiperlipídica (HFD) durante e 24 semanas. Valores expressam a média±EPM, N=5 Aumento=40x, Barra=50µm.

## **4.13 Envolvimento do TLR4 sobre os parâmetros microcirculatórios no modelo de SM**

### **4.13.1 Fluxo sanguíneo cerebral**

A medida do fluxo sanguíneo cerebral, através de fluxometria a laser com contraste de imagem, mostrou que os animais do grupo WT-HFD apresentaram uma redução significativa do fluxo sanguíneo cerebral ( $173,6 \pm 5,1$  U.A.P.  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo WT-DN ( $197,6 \pm 5,1$  U.A.P.). O animais dos grupos TLR4-mut não apresentaram diferenças neste parâmetro, conforme figura 16 A

### **4.13.2 Densidade capilar funcional**

Através da videomicroscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência, foi possível a visualização da rede de capilares no tecido cerebral. Uma redução significativa do número de capilares cerebrais espontaneamente perfundidos, densidade capilar funcional (DCF) foi evidenciada (rarefação capilar funcional) na superfície cerebral do grupo WT-HFD ( $348,6 \pm 32,8$  capilares/mm<sup>2</sup>  $p < 0,05$ ), quando comparados aos animais controles (WT-DN  $480,1 \pm 27,1$  capilares/mm<sup>2</sup>); não houve diferença entre os grupos TLR4-mut alimentados com DN e HFD, conforme é possível visualizar na figura 16 B, os valores da DCF do grupo TLR4-mut-HFD foram significativamente maiores ( $409,3 \pm 26,6$  capilares/mm<sup>2</sup>  $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo WT-HFD.

### **4.13.3 Função endotelial vascular cerebral**

O estado inflamatório crônico na SM causa desregulação nas ações endócrinas e parácrinas dos fatores derivados de adipócitos, como exemplo as adipocinas, que alteram a homeostase vascular e contribuem para a disfunção endotelial. A inflamação do tecido adiposo, a diminuição da biodisponibilidade do NO, a resistência à insulina e níveis aumentados de

lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) são os principais fatores que participam da disfunção endotelial na SM (127, 128). A avaliação da função endotelial vascular mostrou que o grupo WT-HFD após estímulo com acetilcolina apresentou resposta dilatadora abolida, caracterizada pela presença de vasoconstrição causada pela ativação de receptores muscarínicos no músculo liso arteriolar ( $-3,8 \pm 2,7$  %  $p < 0,005$ ), quando comparado ao grupo WT-DN ( $5,3 \pm 0,8$  %), conforme figura 16 C.

Kim e colaboradores, (98) demonstraram que o TLR4 atua mediando a inflamação vascular e a resistência à insulina na obesidade induzida pela dieta. De forma semelhante, observamos no presente estudo que os grupos TLR4-mut não apresentaram diferenças na resposta vasodilatadora à acetilcolina, sugerindo a participação do TLR4 na disfunção endotelial.

A presença de hiperglicemia crônica tem sido associada à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (129) e citocinas pró-inflamatórias (130) que geram estresse oxidativo e alterações inflamatórias que têm sido associadas a alterações da função do endotélio vascular na SM (131, 132). Portanto, há uma forte correlação entre hiperglicemia e doença microvascular cerebral, alterações da barreira hematoencefálica, lesão neuronal e perda de tecido cerebral (133, 134).

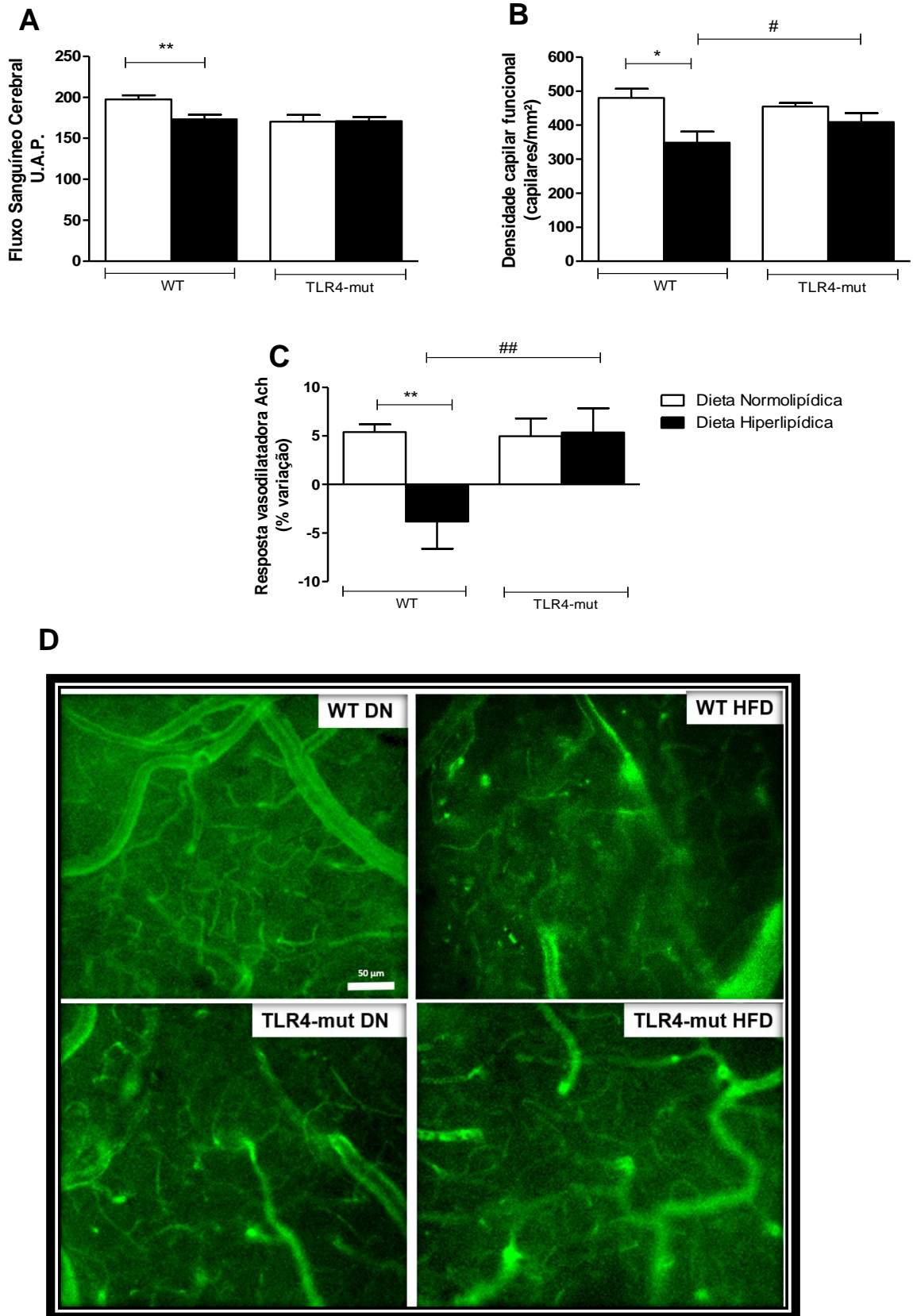


Figura 21 Análises da microcirculação cerebral Densidade capilar funcional cerebral (A), Fluxo sanguíneo cerebral (B) e Resposta vasodilatadora a acetilcolina (C) e Fotomicrografias representativas da videomicroscopia intravital da microcirculação cerebral (D) de camundongos controles (WT) e TLR4-mut alimentados com dieta

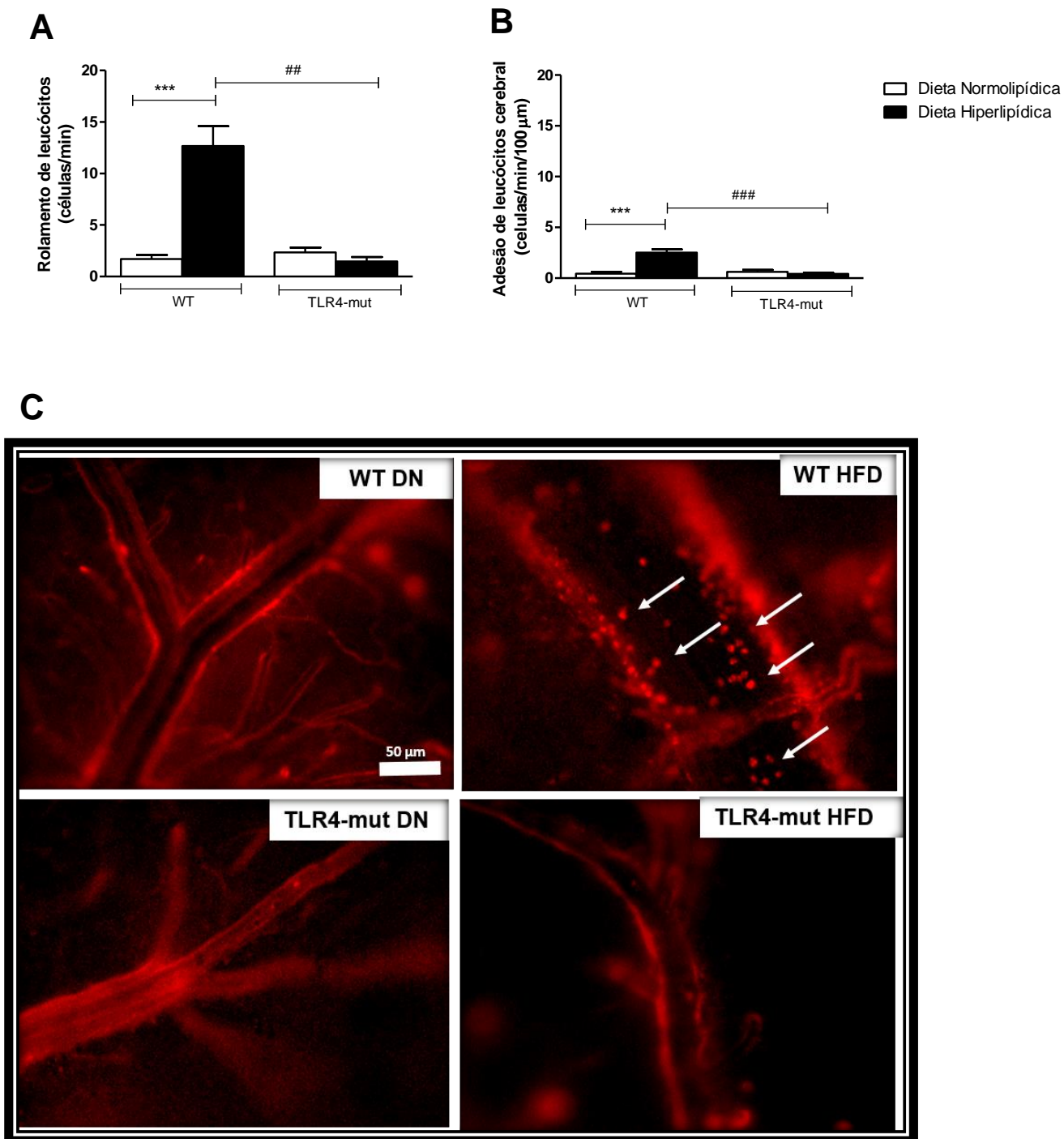
**normolipídica (DN) ou dieta hiperlipídica (HFD) durante e 24 semanas.** Valores expressam a média±EPM, N= 8-13 \*p<0,05, \*\*p<0,01 *versus* WT-ND e #p<0,05, ## p<0,01 *versus* WT-HFD, Aumento=100x, Barra=50µm

#### **4.13.4 Rolamento e adesão de leucócitos na parede vascular cerebral**

A análise da interação leucócito-endotélio de vênulas pós-capilares na microcirculação cerebral demonstrou que os animais do grupo WT-HFD apresentaram um número significativamente maior de leucócitos rolando e aderindo na parede venular ( $12,6 \pm 1,9$  céls/min e  $2,5 \pm 0,3$  céls/min/100µm, respectivamente,  $p < 0,001$ ) quando comparados aos seus controles WT-DN ( $1,7 \pm 0,3$  céls/min e  $0,4 \pm 0,1$  céls/min/100µm, respectivamente).

No entanto, o grupo TRL4-mut-DN não apresentou aumento dos valores relativos aos parâmetros de rolamento e adesão de leucócitos, quando comparado ao grupo WT-HFD, e nenhuma diferença foi observada no grupo TLR4-mut-HFD em relação aos controles com dieta normolipídica.





**Figura 22 Rolamento e Adesão de Leucócitos.** Valores de leucócitos rolantes e aderidos a parede de vênulas pós-capilares do cérebro (A, B) e fotomicrografias representativas (C) da videomicroscopia intravital de vênulas pós-capilares da microcirculação cerebral, contendo leucócitos aderidos ou rolando (setas) de camundongos controles (WT) e TLR4-mut alimentados com dieta normolipídica (DN) ou dieta hiperlipídica (HFD) durante e 24 semanas. Valores expressam a média±EPM, N= 13-16 \*\*\*p<0,001 versus WT-ND e ### p<0,001, ## p<0,01 versus WT-HFD. Aumento=200x, Barra=50µm

Nossos resultados sugerem que o TLR4 exerce papel fundamental na resposta inflamatória induzida por dieta hiperlipídica, corroborando relato prévio de atenuação da inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade em camundongos TLR4-mut, quando comparados aos seus controles após ingestão de dieta hiperlipídica. Portanto, a ativação do TLR4 parece exercer um papel importante, principalmente nos eventos inflamatórios microvasculares cerebrais, na disfunção endotelial cerebral e rarefação microvascular observadas no modelo animal de SM induzida por dieta hiperlipídica.

#### **4.14 Envolvimento do TLR4 sobre a resposta cognitiva no modelo de SM**

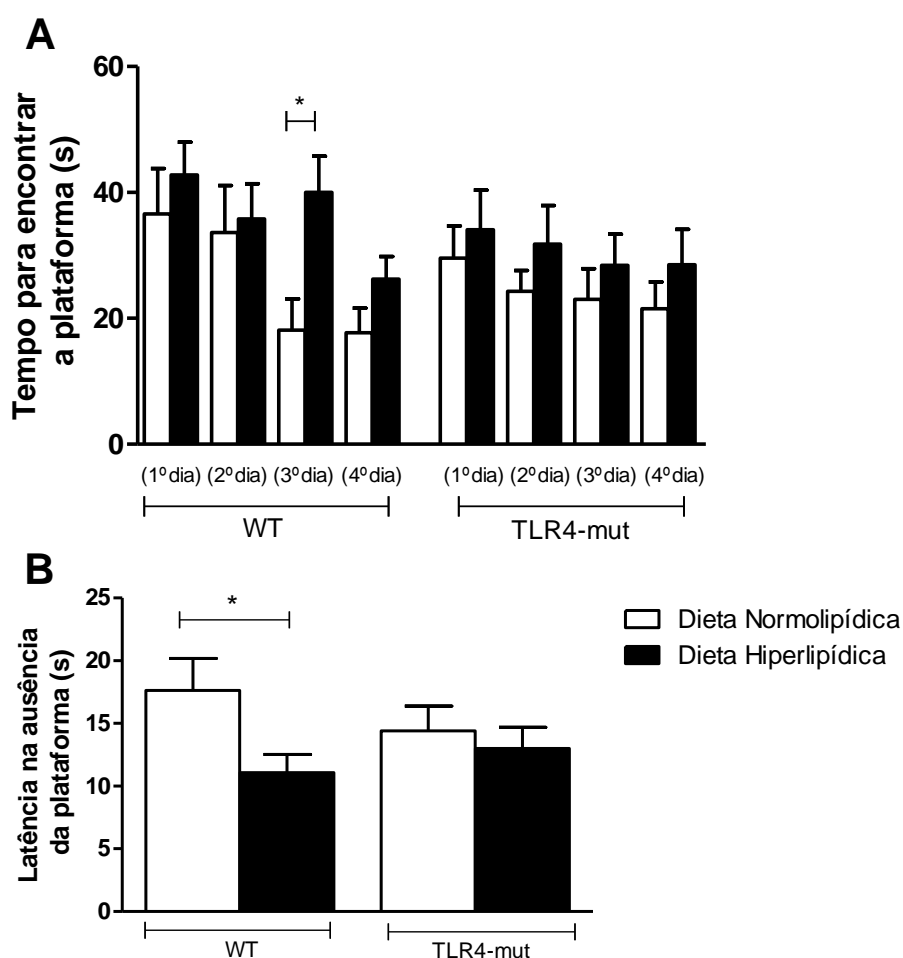
##### **4.14.1 Labirinto aquático de Morris**

O labirinto aquático de Morris (LM) é um teste muito utilizado para analisar bioquimicamente a formação de memórias espaciais e o aprendizado. Em ratos e camundongos, a aquisição da memória de longa duração para esta tarefa requer funcionalidade do hipocampo dorsal. Após a 23<sup>a</sup> semana de dieta, os animais foram submetidos ao teste de Morris Water Maze que avalia a memória contextual.

A natação forçada aumenta a motivação do animal para aprender e formar a memória, fazendo com que ele escape de forma mais rápida da piscina ao subir na plataforma submersa (135). Os animais não flutuaram durante o teste, indicando que não houve nenhum viés de adaptação ao teste. O resultado observado na figura 18, sugere que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentam comprometimento do aprendizado e da memória espacial, quando comparados aos animais alimentados com a dieta normolipídica. Os animais alimentados com a dieta normolipídica aprendem a encontrar a plataforma no terceiro dia do teste, porém, esta redução é estatisticamente significativa no quarto dia em relação ao primeiro dia do teste. Já os animais alimentados com a dieta hiperlipídica não aprendem no quarto dia, pois o tempo para encontrar a plataforma não foi diferente estatisticamente em relação ao primeiro dia do teste. Nos animais TLR4-mut não houve

diferença entre os animais alimentados com a dieta HFD e a dieta DN, quanto a curva de aprendizado e na retirada da plataforma.

Algumas doenças neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade e estresse crônico, podem alterar a resposta dos animais na natação forçada (136). Estudos experimentais indicam os efeitos deletérios da SM no cérebro e como uma intervenção dietética poderia modular esse impacto negativo. Os mecanismos pelos quais os distúrbios metabólicos no cérebro podem impactar a plasticidade sináptica e a cognição são de grande interesse. Agrawal e Gomez-Pinilla (2012) descreveram que ratos alimentados com uma dieta deficiente em ômega-3 apresentaram déficits de memória no teste Barnes Maze e que este déficit foi exacerbado pela administração de frutose (137).



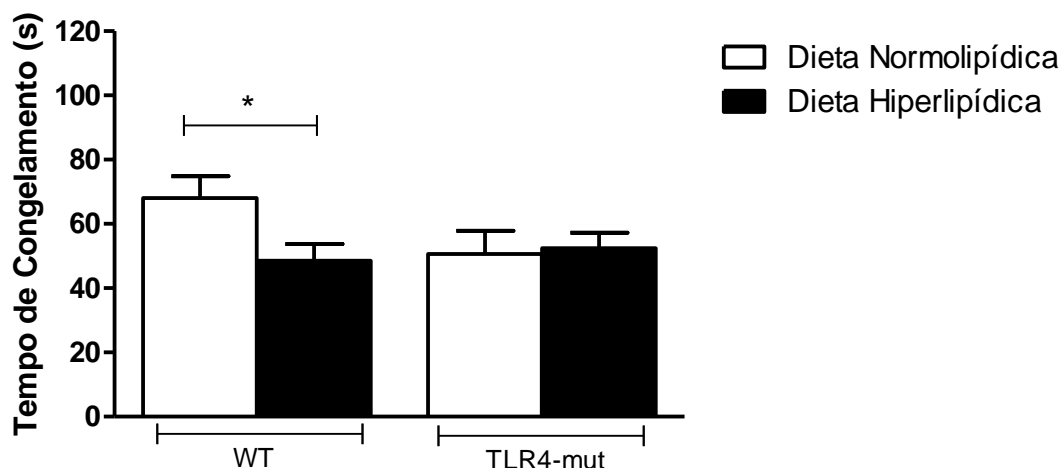
**Figura 23** Curva de aprendizado e latência no teste Water Maze. Os animais foram alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 23 semanas e então foram submetidos à natação forçada por 4 dias consecutivos (com tempo de teste de 1 minuto). Realizamos a contagem do tempo que os animais levavam para encontrar a plataforma submersa nos quatro dias, e os dados foram plotados em forma de curva de aprendizado (A). No quinto dia os animais foram colocados dentro da piscina por um

minuto e foi contabilizado o tempo que os animais permaneciam no quadrante onde a plataforma se encontrava submersa na piscina e os dados plotados como tempo de latência na ausência da plataforma (B). Valores expressam a média±EPM, N= 12-15 \*p<0,05 representa diferença estatística em relação ao 1º dia do teste, na figura 18 A. \*p<0,05 versus WT-DN, figura 18 B.

#### 4.14.2 Teste do medo condicionado

Após a 23ª semana de dieta, um grupo de animais que não foi submetido ao teste de Moris Water Maze, realizou o teste do medo condicionado “freezing”. Este teste visa avaliar danos na capacidade cognitiva associada a memória aversiva. No grupo WT, é possível observar que os animais alimentados com a dieta normolipídica apresentam maior tempo de congelamento (WT-ND: 68,6±6 segundos), quando comparados aos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (WT-HFD 48,5±5 segundos p<0,05). Esse tempo de congelamento significativamente menor indica que os animais em dieta hiperlipídica permaneceram imóveis por menos tempo, possivelmente por danos à memória aversiva ao estímulo que receberam.

Os grupos TLR4-mut-ND e TLR4-mut-HFD não apresentaram diferenças significativas no teste (50,6±7 segundos e 52,4±5 segundos, respectivamente). No entanto, observamos que, embora não tenha apresentado diferenças entre si, os animais TLR4-mut-ND e TLR4-mut-HFD apresentaram valores similares ao do grupo WT-HFD (48,5±5 segundos), o que poderia indicar um comprometimento cognitivo no grupo TLR4-mut. É relevante ressaltar também que já foi descrito na literatura que camundongos C3H/HeJ possuem uma mutação genética homozigótica que leva à degeneração da retina, acarretando cegueira em idade de desmame (138). Portanto, acreditamos que este fato esteja relacionado ao menor desempenho do teste do medo condicionado. Dessa forma, faz-se imperativo a avaliação da função cognitiva por outro teste como o de open-field com exploração do ambiente, que envolva outros sentidos, como o olfato, para elucidar essa questão.



**Figura 24** Teste do medo condicionado Os animais foram alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 23 semanas e então foram submetidos ao teste do medo condicionado. No dia treino os animais foram colocados na caixa por 180 segundos seguida uma descarga elétrica de 0,6 mA, por 3,0 segundos e o estímulo aversivo foi reforçado trinta segundos após. Após 24 horas do treino os animais retornaram a caixa e foi contabilizado durante 180 segundos o tempo que o animal permanecera imóvel. Os dados foram descritos como tempo latência em segundos. Valores expressam a média±EPM, N= 10-13 \* $p < 0,05$  versus DN.

Níveis elevados de glicose ou resistência à insulina estão ligados a um risco elevado de comprometimento cognitivo. A insulina desempenha um papel crucial na homeostase da glicose ao governar o equilíbrio entre a produção de glicose pelo fígado e a captação de glicose pelos tecidos-alvo (113). Sendo assim, acreditamos que a condição de resistência à insulina e hiperglicemia em que se encontram os animais WT-HFD deve estar contribuindo sobremaneira no desbalanço da homeostasia entre as células da UNV em regiões responsáveis pela consolidação da memória.

O cérebro é um órgão de consumo de alta energia; assim, os receptores de insulina são extensivamente expressos neste órgão, particularmente em áreas relacionadas a registro de memória, como o córtex cerebral, o hipocampo, o hipotálamo e a amígdala. Além disso, os neurônios exibem uma expressão mais densa do receptor de insulina do que as células da glia, e essa expressão é particularmente alta nas regiões pós-sinápticas (139). A sinalização de insulina defeituosa no cérebro causada pela expressão reduzida do substrato do receptor de insulina e a glicação das proteínas funcionais e estruturais vitais (140)

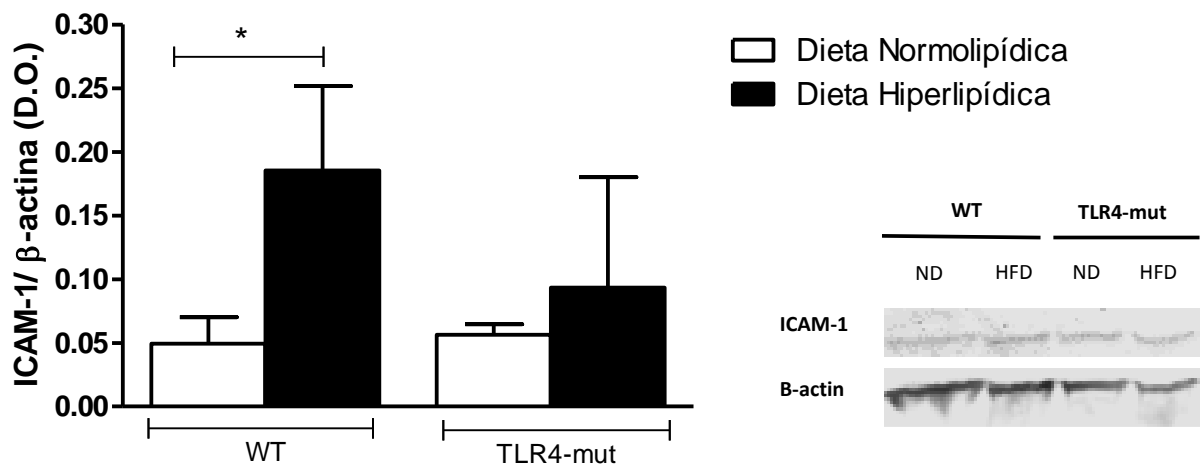
promove a disfunção dos neurônios, pois estes são altamente suscetíveis ao estresse metabólico (141, 142).

Portanto, as alterações na sinalização da insulina, também observadas neste estudo, podem estar relacionadas às alterações cognitivas na SM. No entanto, os animais TLR4-mut-HFD não apresentaram alterações nos níveis de insulina, HOMA-IR e testes cognitivos, reforçando o entendimento da participação do TLR4 nas alterações da via de sinalização da insulina e consequentemente no dano cognitivo.

#### **4.15 Papel do TLR4 sobre a expressão proteica de marcadores inflamatórios no cérebro no modelo de SM**

A SM apresenta uma correlação positiva com concentrações aumentadas de adipocinas e a maioria dos marcadores pró-inflamatórios (128). A molécula de adesão intercelular-1/CD54 (ICAM-1) é um membro da superfamília das imunoglobulinas (143) e é expressa em uma ampla variedade de células constitutivamente ou em condições de inflamação (144). Uma função bem documentada de um receptor de adesão leucocitária sendo tipicamente expresso na superfície células endoteliais, onde medeia a transmigração de leucócitos para tecidos (145). A ICAM-1 está envolvida principalmente na firme adesão leucocitária em pequenos vasos e seu aumento pode estar associado à obstrução da microcirculação por células inflamatórias, como observado em alguns segmentos venulares da microcirculação cerebral, levando a uma drenagem microvascular prejudicada (146, 147).

Nos ensaios de western blot, foi possível observar um aumento significativo da expressão proteica desta molécula de adesão no grupo WT-HFD, quando comparados ao grupo WT-ND, enquanto nos grupos TLR4-mut não houve nenhuma diferença nos valores dessa molécula. Esses dados são consistentes com os relatos em humanos, onde já foi demonstrado o aumento dos níveis de ICAM-1 solúvel, e tal aumento está diretamente relacionado a diversas condições patológicas, incluindo obesidade e transtornos relacionados à obesidade (145, 148).

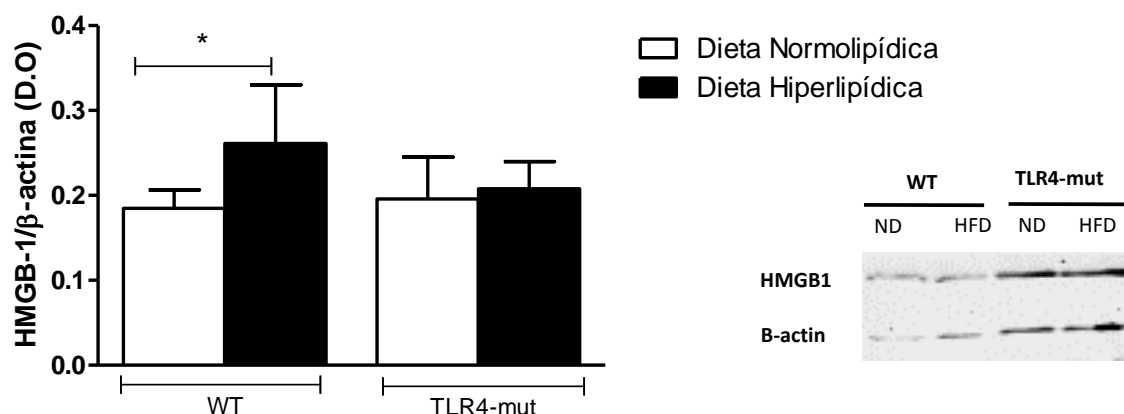


**Figura 25** Níveis de proteína da molécula de adesão intercelular-1/CD54 (ICAM-1) em amostras do tecido cerebral de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. Os dados são representativos de dois experimentos (n = 3 a 4 por grupo em cada experimento). \* p<0,05 versus WT-DN. D.O. Densidade óptica.

Também foi possível observar um aumento significativo na expressão da proteína alta mobilidade box 1 (HMGB1) no grupo WT-HFD, quando comparados ao grupo WT-DN; já no grupo TLR4-mut não houve diferença entre os grupos alimentados com a DN e a HFD.

A HMGB1 é uma proteína secretada por macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, tumores, e também é liberada com o processo de necrose. Duas classes de receptores já foram descritas estar relacionadas com a sinalização da HMGB1: RAGE e TLRs. A HMGB1 é uma molécula multifuncional que pode também atuar como um gatilho extracelular e modulador de processos celulares críticos, como inflamação, proliferação, migração e sobrevivência (149). Já foi descrito também que a HMGB1 atua como mediador na neuroinflamação e ativação microglial no núcleo isquêmico após isquemia cerebral focal (150). Além de seus efeitos tradicionais sobre a inflamação, a HMGB1 desempenha um papel importante na vasculatura (151), e o aumento dos níveis séricos de HMGB1 estão associados com doenças cardiovasculares (152). A sinalização de HMGB1 também está relacionada com ativação

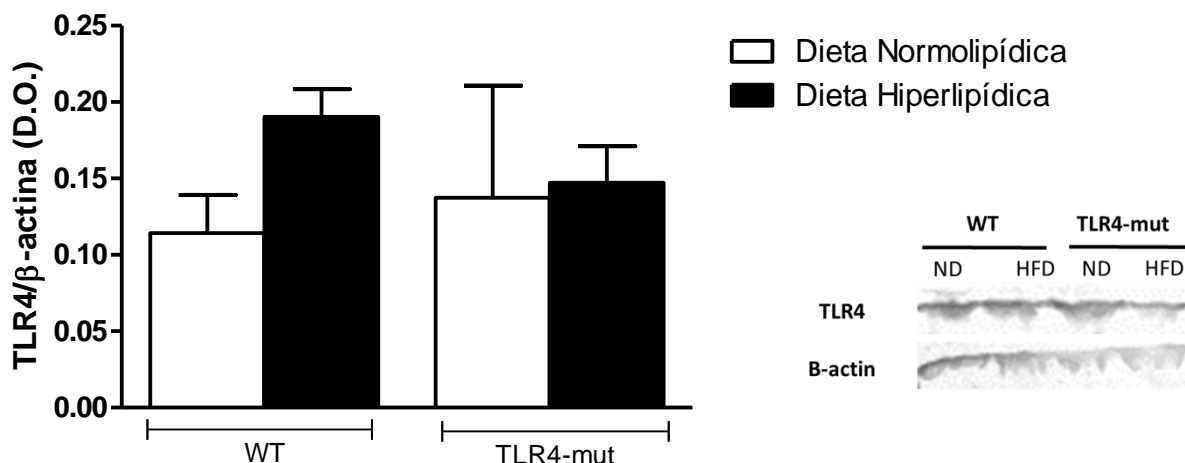
endotelial, pois também pode ser liberada por células endoteliais no processo de apoptose característico da rarefação capilar (153). Quando o fenômeno de rarefação funcional capilar, ou seja a redução do número de capilares perfundidos, se mantém de forma crônica, se inicia a rarefação capilar estrutural, onde há redução do número de capilares existentes no tecido cerebral (154).



**Figura 26** Níveis da proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1) em amostras do tecido cerebral de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. Os dados são representativos de dois experimentos (n = 3 a 4 por grupo em cada experimento). \* p<0,05 versus WT-DN. D.O. Densidade óptica.

Em relação à expressão proteica do TLR4 no tecido cerebral, o grupo WT-HFD apresentou aumento, embora não significativo, desses receptores quando comparado ao grupo WT-DN. Como já era esperado, os grupos TLR4-mut-ND e TLR4-mut-HFD apresentaram valores semelhantes ao grupo WT-ND, pois, embora haja a mutação para o receptor nos animais do grupo TLR4-mut, este ainda é expresso constitutivamente.





**Figura 27 Níveis proteicos do receptor do tipo toll (TLR4) em amostras do tecido cerebral de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas.** Os dados são representativos de dois experimentos (n = 3 a 4 por grupo em cada experimento). D.O. Densidade óptica.

Diversos estudos já demonstraram que o aumento da expressão de TLR4 está relacionada aos componentes da SM. Song e colaboradores (2006) demonstraram o aumento da expressão de RNAm de TLR4 no tecido adiposo de camundongos obesos db/db, sugerindo uma ligação da sinalização de TLR4 na obesidade e inflamação (155). Poggi e colaboradores (2007) observaram ainda redução da adiposidade e aumento da sinalização de insulina no tecido adiposo em camundongos C3H/HeJ alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparados aos seus controles selvagens alimentados com dieta hiperlipídica (80).

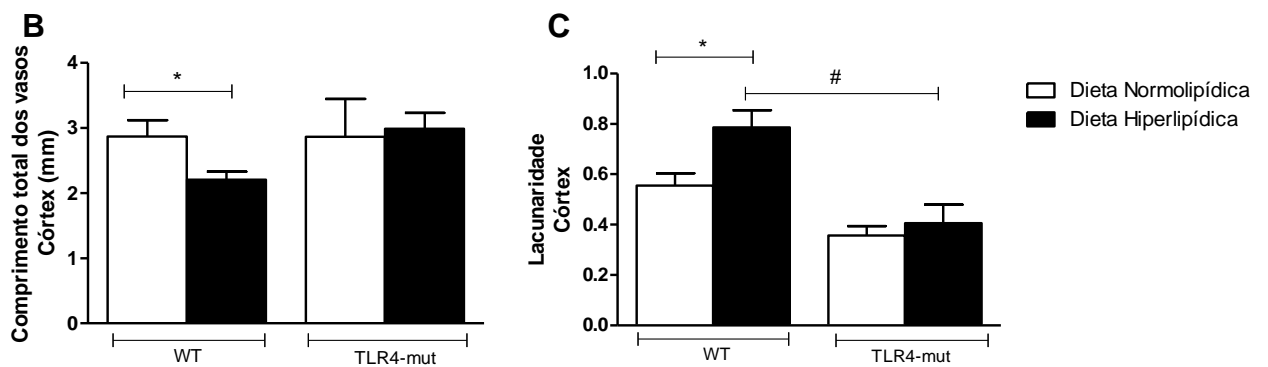
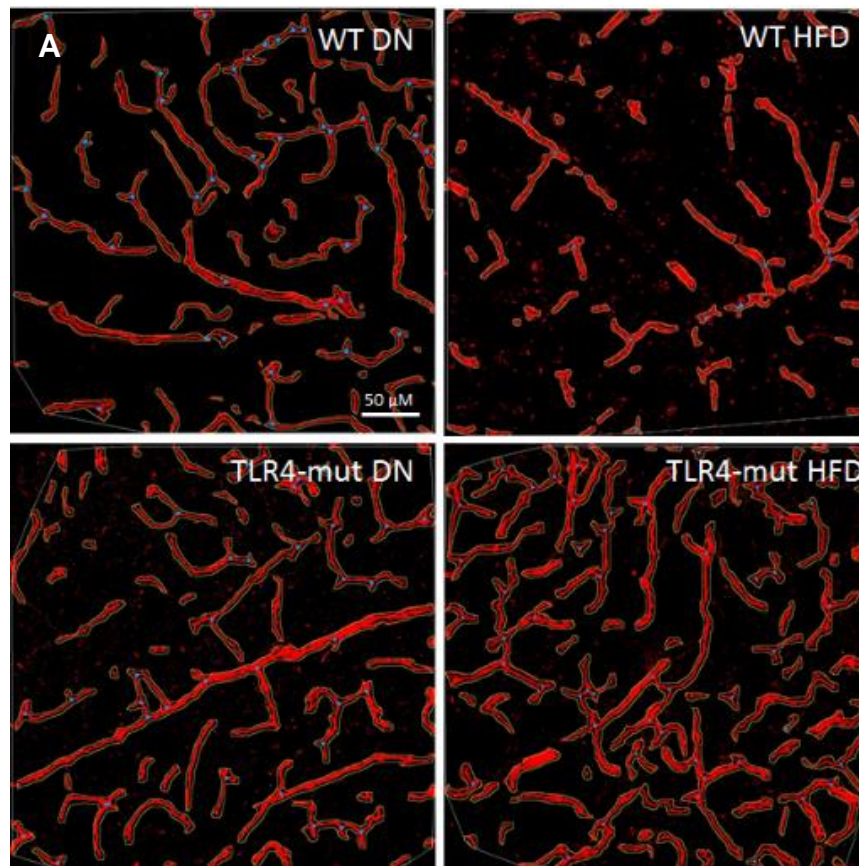
Outros grupos também mostraram que a inativação de TLR4 resultou em diminuição da resistência insulínica e inflamação tecidual em modelos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (156, 157). Tais dados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, onde verificamos o aumento da expressão proteica nos animais WT-HFD, quando comparados aos seus controles WT-DN; nos animais TLR4-mut HFD e TLR4-mut DN não houve diferença entre os grupos, apresentando valores semelhantes ao grupo controle WT-DN.

#### **4.16 Efeitos do TLR4 sobre os vasos cerebrais no modelo de SM**

A densidade capilar estrutural do córtex e hipocampo foram avaliadas através do programa AngioTool, onde foi possível calcular parâmetros morfológicos dos vasos, incluindo o número e comprimento de vasos, a densidade vascular e lacunaridade. Essa ferramenta é extremamente útil para analisar quantitativamente as redes vasculares em condições fisiológicas, patológicas e avaliação da resposta farmacológica (89).

O grupo WT-HFD apresentou diminuição significativa do comprimento total dos vasos no córtex ( $2,2 \pm 0,1$  mm \* $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo WT-DN ( $2,8 \pm 0,2$  mm); no grupo TLR4-mut não houve diferença entre os animais alimentados com DN e HFD.

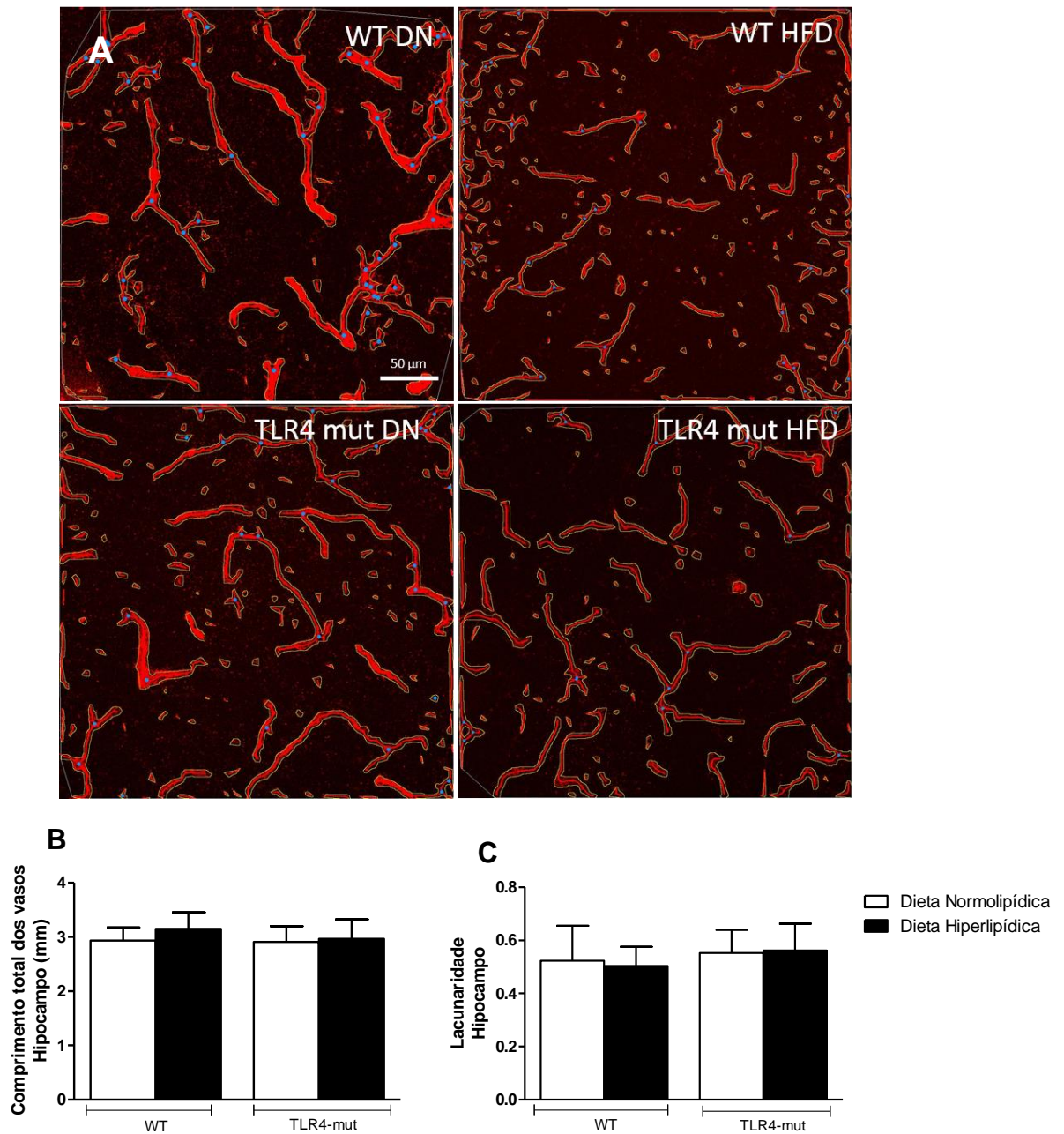
Este resultado corrobora os dados da análise da lacunaridade, que representa o espaço entre os vasos, sendo diretamente relacionado à rarefação vascular estrutural. O grupo WT-HFD apresentou aumento significativo da lacunaridade no córtex ( $0,78 \pm 0,06$  \* $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos WT-DN ( $0,55 \pm 0,04$ ) e TLR4-mut-HFD ( $0,4 \pm 0,07$ ). Já no grupo TLR4-mut, não houve diferença entre os animais alimentados com DN e HFD.



**Figura 28 Rede vascular no córtex cerebral** Imagens representativas após análise pelo AngioTool (A) e representação gráfica (B, C) da análise realizada em 3 cortes do córtex de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. \* $p < 0,05$  versus WT-DN e #  $p < 0,05$  versus WT-HFD.

Já no hipocampo, não houve diferença no comprimento total dos vasos e na lacunaridade de ambos os grupos WT e TLR4-mut, conforme demonstrado na figura 24. Estes resultados sugerem que a disfunção microvascular não aconteça ao nível do hipocampo, ou que esta rarefação seja mais funcional que estrutural no modelo de SM e que provavelmente o TLR4 não teria influência neste processo.

O hipocampo está localizado no lobo temporal e está relacionado à memória, emoções e aprendizado. É vascularizado pelas artérias hipocampais que penetram pelo giro denteado, sulco fimbrio-denteado e pelo sulco hipocampal. As artérias hipocampais dividem-se em 3 grandes troncos (158): artéria hipocampal anterior, média e inferior.

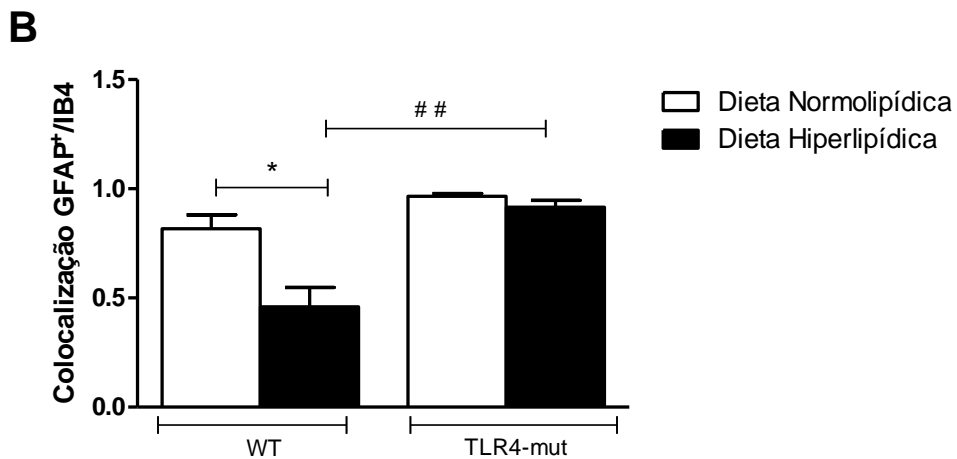
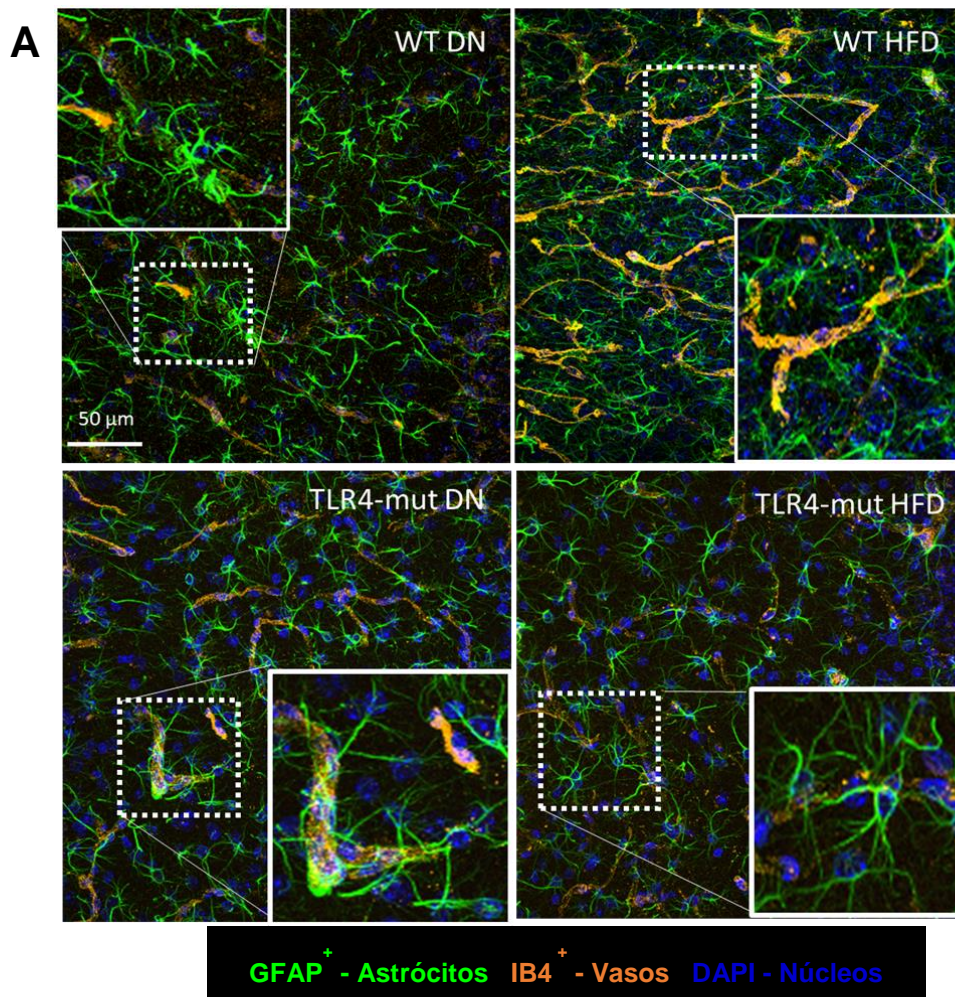


**Figura 29 Rede vascular no hipocampo.** Imagens representativas após análise pelo AngioTool (A) e representação gráfica (B, C) da análise realizada em 3 cortes do hipocampo de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas.

Uma vez que não foram observadas alterações na rede vascular do hipocampo nos animais com SM, embora tenham apresentado uma redução do fluxo microvascular no córtex cerebral, perguntamos como estaria a relação entre os astrócitos e os vasos cerebrais na região do hipocampo.

Sabe-se que as terminações astrocitárias estão intimamente ligadas à parede vascular e esta interação é extremamente importante na fisiologia da unidade neurovascular. Além disso, uma vez alterada, essa conexão pode levar à desregulação do fluxo sanguíneo cerebral, transporte de glicose e metabolismo, e comprometimento da BHE (159).

O grupo WT-HFD apresentou menor colocalização ( $0,45 \pm 0,08$  GFAP<sup>+</sup>/IB4) dos astrócitos nos vasos do hipocampo quando comparado ao grupo WT-DN ( $0,81 \pm 0,06$  GFAP<sup>+</sup>/IB4 \* $p < 0,05$ ) e TLR4-mut-HFD ( $0,91 \pm 0,03$  GFAP<sup>+</sup>/IB4 ## $p < 0,01$ ). O grupo TLR4-mut não apresentou diferença entre os animais alimentados com DN e HFD. Portanto, sugerimos que o TLR4 parece estar envolvido nas alterações astrocitárias no modelo de SM.



**Figura 30 Colocalização de astrócitos com vaso no hipocampo** (A) Imagens de microscopia confocal de cortes do hipocampo marcadas com anti-IB4 para endotélio (laranja), anti-GFAP (verde) para astrócitos e DAPI (azul) de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. As imagens ampliadas indicam exemplos de contato entre os processos astrocitários imunorreativos e o IB4 do vaso. Magnificação 40x, escala 50 $\mu$ m (B) Representação gráfica da colocalização GFAP/IB4 \* $p < 0,05$  versus WT-DN ##  $p < 0,01$  versus TLR4-mut-HFD.

Os astrócitos estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e do acoplamento neurovascular, bem como no auxílio na defesa imune por meio da síntese e secreção de diversas citocinas envolvidas nos eventos inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF e TGF- $\beta$  (160). Além disso, essas células têm grande impacto no controle energético cerebral, em razão do fornecimento de energia e metabólitos (69). A atividade neuronal resulta em aumento do fluxo sanguíneo no cérebro, uma resposta denominada hiperemia funcional. Os astrócitos desempenham um papel importante na mediação dessa resposta. As terminações astrocitárias ficam em contato íntimo com a lâmina basal que é um componente da parede do vaso (61). Neurotransmissores liberados de neurônios ativados induzem o aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> nos astrócitos, levando à liberação de metabólitos vasoativos do ácido araquidônico nas terminações de astrócitos nos vasos sanguíneos. A síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e ácidos epoxieicosatrienóico (EETs) dilatam os vasos sanguíneos, enquanto o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico (20-HETE) contrai os vasos. A liberação de K<sup>+</sup> de endófitos de astrócitos também pode contribuir para a vasodilatação. Os astrócitos também contribuem para a geração de tônus vascular. A liberação de 20-HETE e ATP pelos astrócitos contrai as células musculares lisas vasculares, modulando o tônus vascular.

Portanto, qualquer ruptura das terminações dos astrócitos com os micro vasos cerebrais pode acarretar alterações sobre a integridade da BHE, com o consequente desenvolvimento de distúrbios cerebrais (87).

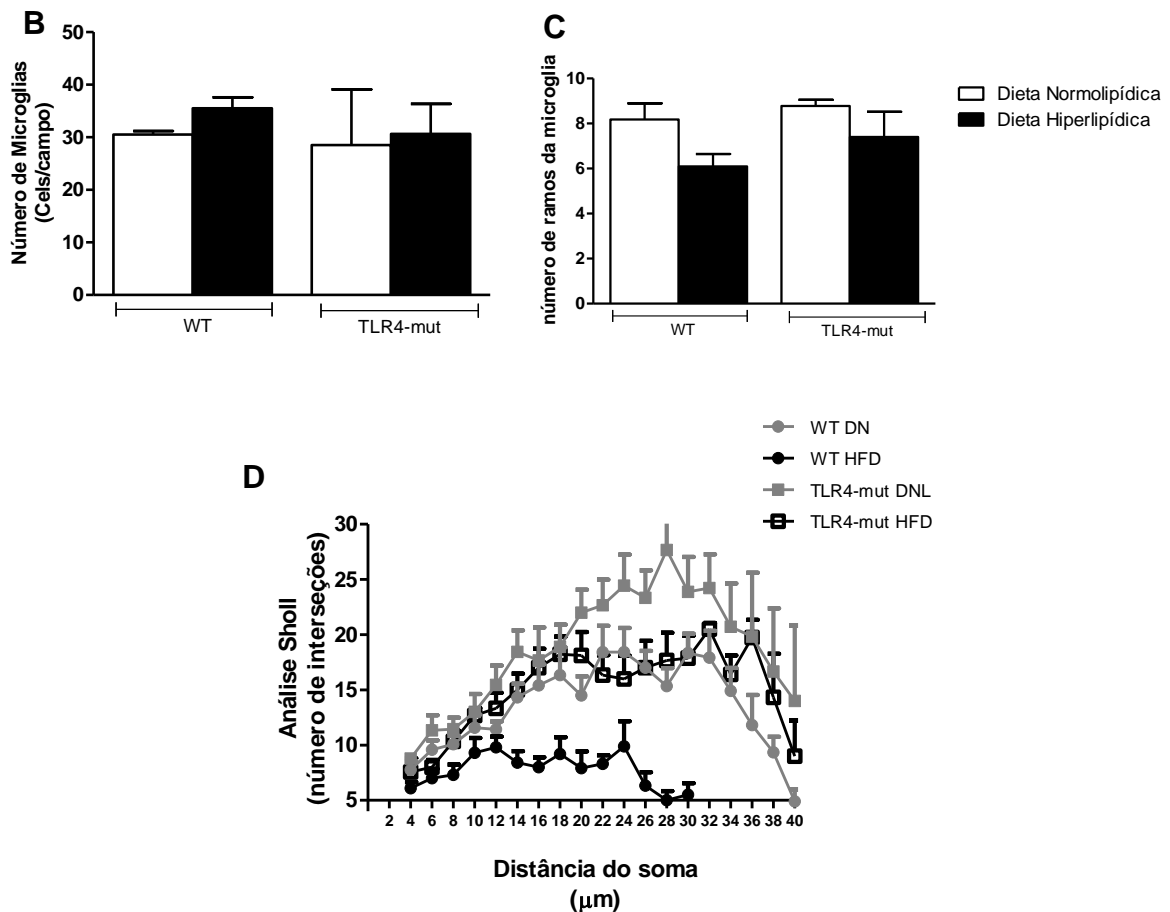
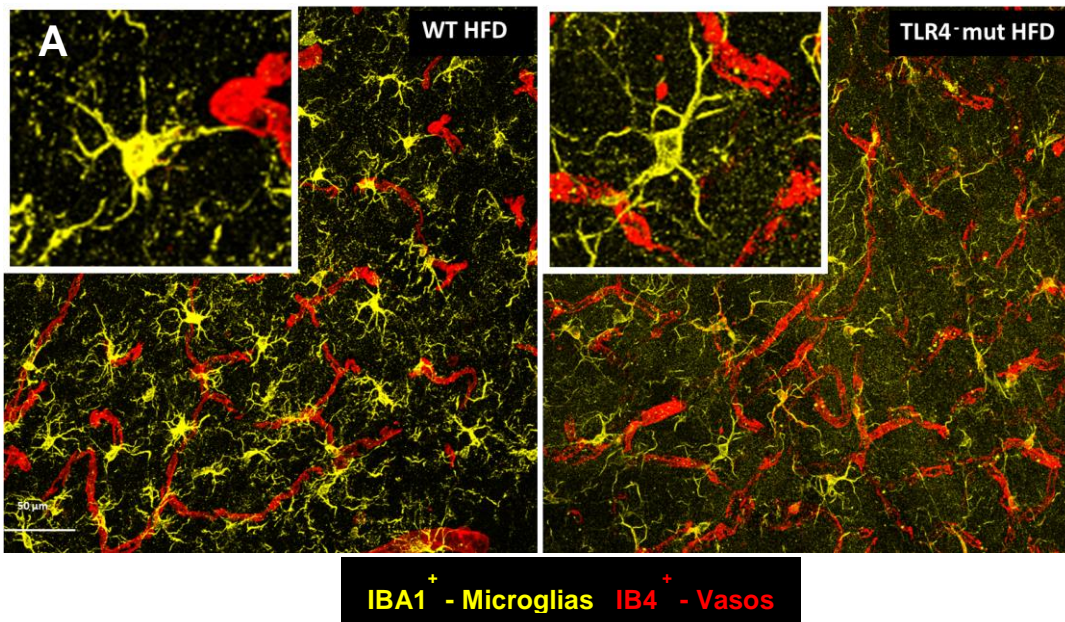
Em condições patológicas, incluindo a doença de Alzheimer e a retinopatia diabética, o rompimento da fisiologia astrocitária normal pode comprometer a regulação do fluxo sanguíneo. Já foi descrita uma redução da cobertura das terminações astrocitárias nos vasos cerebrais de pacientes com transtornos depressivos (159). De forma semelhante também já foi descrita uma redução da proteína GFAP em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica no hipotálamo, mas não no hipocampo e córtex (161).



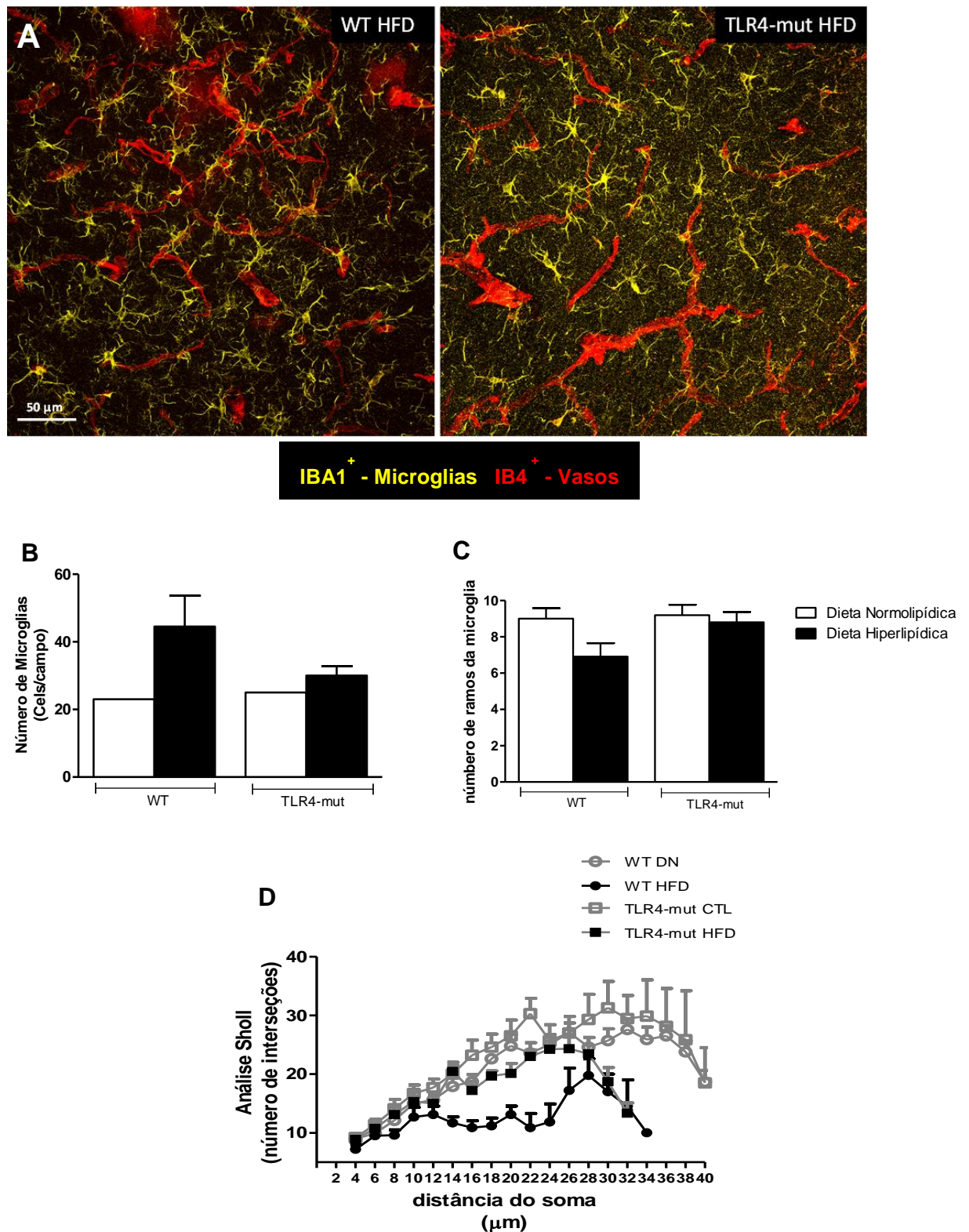
#### **4.17 Efeitos do TLR4 sobre as microglias no modelo de SM**

A microglia, linhagem de macrófagos do SNC, pode ser ativada por diversos fatores pró-inflamatórios, citocinas ou hormônios metabólicos, tais como a leptina, que estimulam a produção de genes inflamatórios, os quais podem exacerbar o processo inflamatório cerebral (64, 78, 162).

Observamos que os animais TLR4-mut-HFD apresentaram microglias mais ramificadas, tanto no córtex quanto no hipocampo, e menor número de células por campo quando comparadas às células dos animais WT-HFD. Desta forma, sugerimos que o TLR4 possa estar atenuando a organização estrutural e, possivelmente, a ativação da microglia no modelo de SM, tanto no córtex como no hipocampo.



**Figura 31 Análise de microglia no córtex.** (A) Imagens de microscopia confocal de cortes do córtex marcadas com anti-IB1 para microglia (amarela) e anti-IB4 (vermelho) para vasos de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. Magnificação 40x, escala 50µm. (B) Gráficos do número de microglia/campo e (C, D) sholl análises (ImageJ) de 20 microglia por grupo (Iba-1+).



**Figura 27 Análise de microglias no hipocampo.** (A) Imagens de microscopia confocal de cortes do hipocampo marcadas com anti-IBA1 para microglia (amarela) e anti-IB4 (vermelho) para vasos de camundongos C3H/He (WT) e C3H/HeJ (TLR4-mut) alimentados com dieta normolipídica (DN) ou hiperlipídica (HFD) por 24 semanas. Magnificação 40x, escala 50μm. (B)

Gráficos do número de microglias/campo e (C, D) sholl análises (ImageJ) de 20 microglias por grupo (Iba-1<sup>+</sup>).

Existem evidências que demonstram o papel da microglia no dano cognitivo, incluindo excessiva poda sináptica, no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (72) e neuroinflamação na obesidade (163)

Também já foi demonstrado que os produtos da obesidade, como ácidos graxos livres e citocinas pró-inflamatórias, poderiam atravessar a barreira hematoencefálica e finalmente levar a uma alteração na função microglial (164, 165). Por exemplo, a exposição de células gliais (microglia e astrócitos) de uma cultura primária, ao soro de ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica, que continha leptina e proteína C-reativa, resultou no aumento da marcação de CD11b e GFAP, marcadores de microglia e astrócitos, respectivamente. Estes dados sugerem que a obesidade induzida por dieta aumenta a inflamação sistêmica e pode acarretar no aumento da permeabilidade da BHE, com consequente aumento da exposição da microglia a sinais ativadores, como citocinas inflamatórias, LPS e IgG, resultando finalmente na sua ativação. (165).

Bocarsly e colaboradores (2015) descreveram que camundongos alimentados com HFD apresentaram aumento das ramificações das microglias, demonstrado por um aumento no comprimento dos processos microgliais, em vez de um aumento na microglia do tipo ameboide, que são representados como ramos microgliais curtos (163). Estes dados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, onde observou-se aumento das ramificações das microglias no grupo WT-HFD, tanto no córtex como no hipocampo, quando comparadas ao grupo TLR4-mut-HFD. Sugerimos que este aumento no número de microgliais pode ser um mecanismo de compensação para as microglias disfuncionais. De fato, esse aumento, pode explicar a maior vulnerabilidade às funções cognitivas e memória observadas nos animais com WT-HFD.

Outro estudo demonstrou que o tratamento com um inibidor da sinalização de TLR4 em animais alimentados com HFD acarretou em um efeito protetor das consequências neurais da obesidade, e esse efeito foi relacionado principalmente à menor ativação microglial (166).

Portanto, é provável que a ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica afete a integridade e funcionalidade da BHE. Nossos resultados mostram uma resposta inflamatória e disfunção microvascular no cérebro de camundongos com SM. Atualmente, pouco se sabe sobre os mecanismos que ligam a SM com a funcionalidade da BHE. Nós sugerimos que a maior ativação da resposta imune, via TLR4 na SM poderia desempenhar um papel importante neste processo degenerativo.

Algumas limitações deste estudo necessitam ser consideradas pois ainda serão realizadas como: avaliação da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro, o BDNF que tem um papel central no desenvolvimento, fisiologia e patologia do sistema nervoso; como também em processos relacionados à plasticidade cerebral como a memória e o aprendizado, além da avaliação da viabilidade neuronal através da imunohistoquímica.

O estudo sobre a relação da SM e a neurodegeneração ainda tem muitas questões a serem elucidadas. Sabemos que a inflamação é uma questão inerente a SM, desta forma entender se existe um componente da dieta responsável pela indução da inflamação ou se o perfil inflamatório do tecido adiposo visceral seria um potente deflagrador deste processo ainda necessita ser esclarecido. Em contra partida avaliar se a modulação do TLR4 de forma local, via drogas com ação seletiva nestes receptores no sistema nervoso central, poderia diminuir a neuroinflamação e conseqüentemente a neurodegeneração ainda são questões fundamentais que necessitam de entendimento.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que:

- Os camundongos C57BL6 alimentados com a dieta hiperlipídica apresentam aumento de peso e gordura, a partir da 12ª semana de ingestão dessa dieta, e as alterações na pressão arterial sistólica, frequência cardíaca, triglicerídeos, colesterol e insulina são mais evidentes na 24ª semana de dieta. As alterações microcirculatórias, como a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, rarefação microvascular, aumento do rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais e a disfunção endotelial arteriolar também são observadas na 24ª semana de dieta hiperlipídica.
- Os camundongos C3H/HeJ alimentados com a dieta hiperlipídica não desenvolvem a síndrome metabólica, pois não apresentam alteração nos níveis de glicemia, pressão arterial e perfil lipídico. De forma semelhante, também não observamos alterações microcirculatórias e inflamatórias nestes animais. Portanto, concluímos que o TLR4 parece estar envolvido nas alterações relacionadas ao processo inflamatório crônico da SM e portanto, nas consequências microvasculares cerebrais e metabólicas desta síndrome.
- Após 24 semanas de dieta, os animais selvagens alimentados com dieta hiperlipídica apresentam uma disfunção microvascular relevante, com maior ativação de microglias e menor interação de astrócitos com os vasos cerebrais. Esses achados estão diretamente correlacionados ao declínio cognitivo e, além disso, essas alterações não foram observadas nos animais TLR4 mutantes alimentados com dieta hiperlipídica.
- A substituição da dieta hiperlipídica após o estabelecimento da SM pela dieta normolipídica, promoveu redução da massa corporal e gordura abdominal nos animais selvagens, e este efeito pode estar diretamente relacionado à menor inflamação vascular cerebral, evidenciada pela diminuição no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas cerebrais, possivelmente decorrente da menor ativação do TLR4. Nos animais que apresentam a mutação para o TLR4 a substituição da dieta não acarretou em nenhuma diferença nos parâmetros avaliados.

- A ingestão de dieta hiperlipídica por uma semana não foi capaz de induzir alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais nos animais selvagens e mutantes para o TLR4, sugerindo que a ingestão da dieta hiperlipídica por curto período não é suficiente para induzir as consequências de um processo inflamatório crônico observado após 24 meses. Além disso, com uma semana de dieta os animais não tiveram aumento da gordura visceral, outro fator que contribui para a inflamação crônica de baixa intensidade na SM.

Portanto, os resultados deste estudo demonstram que a ativação do TLR4 parece exercer um papel importante principalmente na disfunção microvascular e neuroinflamação associada à síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e, possivelmente, desempenham um papel causal no desenvolvimento do declínio cognitivo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campos-Pena V, Toral-Rios D, Becerril-Perez F, Sanchez-Torres C, Delgado-Namorado Y, Torres-Ossorio E, et al. Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: Is Abeta a Crucial Factor in Both Pathologies? *Antioxidants & redox signaling*. 2017;26(10):542-60.
2. Organization WH. Global status report on noncommunicable diseases 2014. World Health Organization, 2014.
3. Rankinen T, Sarzynski MA, Ghosh S, Bouchard C. Are There Genetic Paths Common to Obesity, Cardiovascular Disease Outcomes, and Cardiovascular Risk Factors? *Circ Res*. 2015;116(5):909-22.
4. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev*. 2005;13(6):322-7.
5. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1769-78.
6. Villa JK, Silva AR, Santos TS, Ribeiro AQ, Sant'Ana LF. [Metabolic syndrome risk assessment in children: use of a single score.]. *Rev Paul Pediatr*. 2015.
7. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
8. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes*. 2010;2(3):180-93.
9. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24(4):683-9.
10. Bloomgarden ZT. Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*. 2004;27(3):824-30.
11. Byung-Cheol Lee JL. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1842:446-62.
12. Ducan BB, Ducan, M. S., Schmidt, M. I. Subclinical Inflammation, Obesity, Diabetes and Related Diseases. *Rev HCPA*. 2005;25 (3):5-16.
13. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2007;99(4A):15B-26B.
14. van Rooy MJ, Pretorius E. Metabolic syndrome, platelet activation and the development of transient ischemic attack or thromboembolic stroke. *Thromb Res*. 2015;135(3):434-42.
15. Espinola-Klein C, Gori T, Blankenberg S, Munzel T. Inflammatory markers and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2011;16:1663-74.
16. Goodwill AG, Frisbee JC. Oxidant stress and skeletal muscle microvasculopathy in the metabolic syndrome. *Vascular pharmacology*. 2012;57(5-6):150-9.
17. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*. 2011;29(1):415-45.
18. Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*. 2011;158(6):369-84.



19. Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in immunology*. 2007;28(9):393-9.
20. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11:85.
21. van Greevenbroek M, Schalkwijk C, Stehouwer C. Dysfunctional adipose tissue and low-grade inflammation in the management of the metabolic syndrome: current practices and future advances [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*. 2016;5(2515).
22. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;88(1):33-9.
23. Poulain-Godefroy O, Le Bacquer O, Plancq P, Lecoœur C, Pattou F, Fruhbeck G, et al. Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:823486.
24. Jialal I, Kaur H, Devaraj S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(1):39-48.
25. Goulopoulou S, McCarthy CG, Webb RC. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacological reviews*. 2016;68(1):142-67.
26. Trotta T, Porro C, Calvello R, Panaro MA. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of neuroimmunology*. 2014;268(1-2):1-12.
27. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*. 2004;4(7):499.
28. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
29. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2006;125(5):943-55.
30. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology*. 2008;9(4):361-8.
31. Jackson EE, Rendina-Ruedy E, Smith BJ, Lacombe VA. Loss of Toll-Like Receptor 4 Function Partially Protects against Peripheral and Cardiac Glucose Metabolic Derangements During a Long-Term High-Fat Diet. *PloS one*. 2015;10(11):e0142077.
32. Holland WL, Bikman BT, Wang L-P, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(5):1858-70.
33. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2010;299(2):G440-8.
34. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudez-Humaran LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO molecular medicine*. 2011;3(9):559-72.
35. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;105(2):141-50.
36. Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, Capurso C, Santamato A, Sancarlo D, et al. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*. 2010;9(4):399-417.
37. Muller M, van der Graaf Y, Visseren FL, Mali WP, Geerlings MI. Hypertension and longitudinal changes in cerebral blood flow: the SMART-MR study. *Ann Neurol*. 2012;71(6):825-33.

38. Birdsill AC, Carlsson CM, Willette AA, Okonkwo OC, Johnson SC, Xu G, et al. Low cerebral blood flow is associated with lower memory function in metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2013;21(7):1313-20.
39. Scalia R. The microcirculation in adipose tissue inflammation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(1):69-76.
40. Muris DM, Houben AJ, Schram MT, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: an emerging pathway in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(1):29-38.
41. Laughlin MH, Davis MJ, Secher NH, van Lieshout JJ, Arce-Esquivel AA, Simmons GH, et al. Peripheral circulation. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(1):321-447.
42. Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, ter Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD. Capillary recruitment is impaired in essential hypertension and relates to insulin's metabolic and vascular actions. *Cardiovasc Res*. 2001;49(1):161-8.
43. Nazzaro P, Schirosi G, Mezzapesa D, Petruzzellis M, Pascazio L, Serio G, et al. Effect of clustering of metabolic syndrome factors on capillary and cerebrovascular impairment. *Eur J Intern Med*. 2013;24(2):183-8.
44. Cleland SJ, Petrie JR, Ueda S, Elliott HL, Connell JM. Insulin-mediated vasodilation and glucose uptake are functionally linked in humans. *Hypertension*. 1999;33(1 Pt 2):554-8.
45. Lockhart CJ, Hamilton PK, Quinn CE, McVeigh GE. End-organ dysfunction and cardiovascular outcomes: the role of the microcirculation. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(3):175-90.
46. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(1):56-74.
47. de la Torre JC, Mussivand T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? *Neurol Res*. 1993;15(3):146-53.
48. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 2010;120(3):287-96.
49. Echem C, Bomfim GF, Ceravolo GS, Oliveira MA, Santos-Eichler RA, Bechara LR, et al. Anti-toll like receptor 4 (TLR4) therapy diminishes cardiac remodeling regardless of changes in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *International journal of cardiology*. 2015;187:243-5.
50. Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(2):113-22.
51. Gupta S, Knight AG, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(6):1060-71.
52. Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;31(6):761-77.
53. Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, et al. Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:8.
54. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2014;210(4):790-8.
55. Figley CR, Stroman PW. The role (s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33(4):577-88.
56. Gosselet F, Saint-Pol J, Candela P, Fenart L. Amyloid-beta peptides, Alzheimer's disease and the blood-brain barrier. *Current Alzheimer research*. 2013;10(10):1015-33.
57. Filosa JA, Iddings JA. Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;305(5):H609-19.

58. Filosa JA, Morrison HW, Iddings JA, Du W, Kim KJ. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience*. 2016;323:96-109.
59. MacVicar BA, Newman EA. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(5).
60. Marina N, Turovsky E, Christie IN, Hosford PS, Hadjihambi A, Korsak A, et al. Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. *Glia*. 2018;66(6):1185-99.
61. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*. 2006;9(2):260-7.
62. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*. 2007;28(3):138-45.
63. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001;36(2):180-90.
64. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002;40(2):140-55.
65. Carpentier PA, D'Anne SD, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain, behavior, and immunity*. 2008;22(2):140-7.
66. Larsen PH, Holm TH, Owens T. Toll-like receptors in brain development and homeostasis. *Sci STKE*. 2007;2007(402):pe47-pe.
67. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017;96(1):17-42.
68. Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*. 2016;64(11):1801-40.
69. Gomes FCA, Tortelli VP, Diniz L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos Avançados*. 2013;27:61-84.
70. Hao S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;51:230-9.
71. Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron glia biology*. 2011;7(1):99-108.
72. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013;77(1):10-8.
73. Bell-Temin H, Culver-Cochran AE, Chaput D, Carlson CM, Kuehl M, Burkhardt BR, et al. Novel Molecular Insights into Classical and Alternative Activation States of Microglia as Revealed by Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)-based Proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2015;14(12):3173-84.
74. Franco R, Fernandez-Suarez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015;131:65-86.
75. Yuan L, Liu S, Bai X, Gao Y, Liu G, Wang X, et al. Oxytocin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells and attenuates microglial activation in lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13(1):77.
76. Neniskyte U, Vilalta A, Brown GC. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS letters*. 2014;588(17):2952-6.
77. Chunchai T, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. The possible factors affecting microglial activation in cases of obesity with cognitive dysfunction. *Metabolic brain disease*. 2018;33(3):615-35.
78. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*. 2016;53(2):1181-94.
79. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001;33(3):256-66.

80. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*. 2007;50(6):1267-76.
81. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
82. Gargiulo S, Gramanzini M, Megna R, Greco A, Albanese S, Manfredi C, et al. Evaluation of growth patterns and body composition in C57Bl/6J mice using dual energy X-ray absorptiometry. *BioMed research international*. 2014;2014:253067.
83. Fredriksson I, Hultman M, Stromberg T, Larsson M. Machine learning in multiexposure laser speckle contrast imaging can replace conventional laser Doppler flowmetry. *Journal of biomedical optics*. 2019;24(1):1-11.
84. Estado V, Obadia N, Carvalho-Tavares J, Freitas FS, Reis P, Castro-Faria Neto H, et al. Blockade of the renin-angiotensin system improves cerebral microcirculatory perfusion in diabetic hypertensive rats. *Microvascular research*. 2013;87:41-9.
85. Soares AC, Araujo RN, Carvalho-Tavares J, Gontijo Nde F, Pereira MH. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: the challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitology international*. 2014;63(1):229-36.
86. Costa RR, Villela NR, Souza M, Boa BC, Cyrino FZ, Silva SV, et al. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc Res*. 2011;82(3):416-22.
87. Hallof-Bustrich H, Di Benedetto B. Examining the Coverage of Blood Vessels by Astrocyte Endfeet in an Animal Model of Major Depressive Disorder. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2019;1938:255-63.
88. Margaritescu O, Pirici D, Margaritescu C. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(4):1283-92.
89. Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PloS one*. 2011;6(11):e27385.
90. Giannakaki-Zimmermann H, Kokona D, Wolf S, Ebnetter A, Zinkernagel MS. Optical Coherence Tomography Angiography in Mice: Comparison with Confocal Scanning Laser Microscopy and Fluorescein Angiography. *Translational vision science & technology*. 2016;5(4):11.
91. Diniz LP, Matias I, Siqueira M, Stipursky J, Gomes FCA. Astrocytes and the TGF-beta1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. *Molecular neurobiology*. 2018.
92. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.
93. Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ, et al. Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(12):5419-26.
94. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nature immunology*. 2012;13(8):707-12.
95. Bremer AA, Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *Journal of obesity*. 2013;2013:393192.
96. Deng J, Liu S, Zou L, Xu C, Geng B, Xu G. Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(9):6240-9.
97. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.

98. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*. 2007;100(11):1589-96.
99. Neergaard JS, Dragsbaek K, Christiansen C, Nielsen HB, Brix S, Karsdal MA, et al. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, and Cognitive Dysfunction: Does Your Metabolic Profile Affect Your Brain? *Diabetes*. 2017;66(7):1957-63.
100. Trevino S, Aguilar-Alonso P, Flores Hernandez JA, Brambila E, Guevara J, Flores G, et al. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse (New York, NY)*. 2015;69(9):421-33.
101. Obadia N, Lessa MA, Daliry A, Silveiras RR, Gomes F, Tibirica E, et al. Cerebral microvascular dysfunction in metabolic syndrome is exacerbated by ischemia-reperfusion injury. *BMC neuroscience*. 2017;18(1):67.
102. Ahirwar AK, Jain A, Singh A, Goswami B, Bhatnagar MK, Bhattacharjee J. The study of markers of endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2015;24(3):131-6.
103. Sun YX, Hu SJ, Zhang XH, Sun J, Zhu CH, Zhang ZJ. [Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders]. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences*. 2006;35(3):315-8.
104. Sarafidis PA, Bakris GL. Review: Insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(2):379-85.
105. Reho JJ, Rahmouni K. Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2017;131(14):1689-700.
106. Lynch CM, Kinzenbaw DA, Chen X, Zhan S, Mezzetti E, Filosa J, et al. Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced obesity. *Stroke*. 2013;44(11):3195-201.
107. De Batista PR, Palacios R, Martin A, Hernanz R, Medici CT, Silva MA, et al. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS one*. 2014;9(8):e104020.
108. Feldeisen SE, Tucker KL. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*. 2007;32(1):46-60.
109. Su HY, Sheu WH, Chin HM, Jeng CY, Chen YD, Reaven GM. Effect of weight loss on blood pressure and insulin resistance in normotensive and hypertensive obese individuals. *American journal of hypertension*. 1995;8(11):1067-71.
110. Case CC, Jones PH, Nelson K, O'Brian Smith E, Ballantyne CM. Impact of weight loss on the metabolic syndrome. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2002;4(6):407-14.
111. Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011;60(10):2474-83.
112. Fandriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *Journal of internal medicine*. 2017;281(4):319-36.
113. Frisardi V, Solfrizzi V, Capurso C, Imbimbo BP, Vendemiale G, Seripa D, et al. Is insulin resistant brain state a central feature of the metabolic-cognitive syndrome? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;21(1):57-63.
114. Kloting N, Bluher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2014;15(4):277-87.
115. Dalvi PS, Chalmers JA, Luo V, Han DY, Wellhauser L, Liu Y, et al. High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF-alpha on appetite-regulating NPY neurons. *International journal of obesity (2005)*. 2017;41(1):149-58.

116. Rijnsburger M, Unmehopa UA, Eggels L, Serlie MJ, la Fleur SE. One-week exposure to a free-choice high-fat high-sugar diet does not disrupt blood-brain barrier permeability in fed or overnight fasted rats. *Nutritional neuroscience*. 2017;1-10.
117. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485-501.
118. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1229-37.
119. Fellmann L, Nascimento AR, Tibirica E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(3):331-40.
120. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, et al. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(10):2046-54.
121. Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(4):F619-28.
122. Kloting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schon MR, Kern M, et al. Insulin-sensitive obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;299(3):E506-15.
123. Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, Bouillot JL, Dietrich A, Kloting N, et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(8):E1466-70.
124. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2015;16(3):207-24.
125. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105-9.
126. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Lofgren P, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia*. 2010;53(12):2496-503.
127. Almagro TA, Ewart MA, Salt IP, Kennedy S. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *British journal of pharmacology*. 2014;171(3):595-617.
128. Engin A. Endothelial Dysfunction in Obesity. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;960:345-79.
129. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;959(1):368-83.
130. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology*. 2004;25(1):4-7.
131. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short-and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002;106(10):1211-8.
132. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, DeCarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(9):2672-713.
133. Frisardi V, Solfrizzi V, Capurso C, Imbimbo BP, Vendemiale G, Seripa D, et al. Is insulin resistant brain state a central feature of the metabolic-cognitive syndrome? *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;21(1):57-63.

134. Alfaro FJ, Gavrieli A, Saade-Lemus P, Lioutas VA, Upadhyay J, Novak V. White matter microstructure and cognitive decline in metabolic syndrome: a review of diffusion tensor imaging. *Metabolism: clinical and experimental*. 2018;78:52-68.
135. Buccafusco JJ. *Frontiers in Neuroscience* The Revival of Scopolamine Reversal for the Assessment of Cognition-Enhancing Drugs. In: nd, Buccafusco JJ, editors. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Taylor & Francis Group, LLC.; 2009.
136. Lam VYY, Raineki C, Takeuchi LE, Ellis L, Woodward TS, Weinberg J. Chronic Stress Alters Behavior in the Forced Swim Test and Underlying Neural Activity in Animals Exposed to Alcohol Prenatally: Sex- and Time-Dependent Effects. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2018;12:42.
137. Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. *J Physiol*. 2012;590(10):2485-99.
138. Chang B. Survey of the nob5 mutation in C3H substrains. *Molecular vision*. 2015;21:1101-5.
139. Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Progress in neurobiology*. 1991;36(5):343-62.
140. Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of aging*. 2010;31(2):224-43.
141. Suzanne M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB reports*. 2009;42(8):475.
142. Tsai CK, Kao TW, Lee JT, Wu CJ, Hueng DY, Liang CS, et al. Increased risk of cognitive impairment in patients with components of metabolic syndrome. *Medicine*. 2016;95(36):e4791.
143. Sarelius IH, Glading AJ. Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue barriers*. 2015;3(1-2):e985954.
144. Habas K, Shang L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. *Tissue & cell*. 2018;54:139-43.
145. Brake DK, Smith EO, Mersmann H, Smith CW, Robker RL. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;291(6):C1232-9.
146. Estado V, Nascimento A, Antunes B, Gomes F, Coelho L, Rangel R, et al. Cerebral Microvascular Dysfunction and Inflammation Are Improved by Centrally Acting Antihypertensive Drugs in Metabolic Syndrome. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2017;15(1):26-35.
147. Ding Y, Li J, Rafols JA, Phillis JW, Diaz FG. Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33(10):2492-8.
148. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2003;166(2):387-94.
149. Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, et al. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(4):871-82.
150. Lee OH, Kim J, Kim JM, Lee H, Kim EH, Bae SK, et al. Decreased expression of sirtuin 6 is associated with release of high mobility group box-1 after cerebral ischemia. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;438(2):388-94.

151. Wang HH, Lin M, Xiang GD. Serum HMGB1 levels and its association with endothelial dysfunction in patients with polycystic ovary syndrome. *Physiological research*. 2018;67(6):911-9.
152. Hashimoto T, Ishii J, Kitagawa F, Yamada S, Hattori K, Okumura M, et al. Circulating high-mobility group box 1 and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):490-5.
153. Wu H, Li R, Pei LG, Wei ZH, Kang LN, Wang L, et al. Emerging Role of High Mobility Group Box-1 in Thrombosis-Related Diseases. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;47(4):1319-37.
154. Thorin-Trescases N, de Montgolfier O, Pincon A, Raignault A, Caland L, Labbe P, et al. Impact of pulse pressure on cerebrovascular events leading to age-related cognitive decline. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2018;314(6):H1214-h24.
155. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-25.
156. Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Archives of physiology and biochemistry*. 2011;117(3):151-64.
157. Jialal I, Kaur H. The Role of Toll-Like Receptors in Diabetes-Induced Inflammation: Implications for Vascular Complications. *Current diabetes reports*. 2012.
158. Marinković S, Milisavljević M, Puškaš L. Microvascular anatomy of the hippocampal formation. *Surgical neurology*. 1992;37(5):339-49.
159. Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, Javier Miguel-Hidalgo J, Maciag D. Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biological psychiatry*. 2013;73(7):613-21.
160. Deng Z, Wang Y, Zhou L, Shan Y, Tan S, Cai W, et al. High salt-induced activation and expression of inflammatory cytokines in cultured astrocytes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2017;16(8):785-94.
161. Lizarbe B, Soares AF, Larsson S, Duarte JMN. Neurochemical Modifications in the Hippocampus, Cortex and Hypothalamus of Mice Exposed to Long-Term High-Fat Diet. *Frontiers in neuroscience*. 2018;12:985.
162. Papageorgiou IE, Lewen A, Galow LV, Cesetti T, Scheffel J, Regen T, et al. TLR4-activated microglia require IFN-gamma to induce severe neuronal dysfunction and death in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(1):212-7.
163. Bocarsly ME, Fasolino M, Kane GA, LaMarca EA, Kirschen GW, Karatsoreos IN, et al. Obesity diminishes synaptic markers, alters microglial morphology, and impairs cognitive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(51):15731-6.
164. Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, Garcia-Caceres C, de la Fuente E, et al. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia*. 2014;62(1):17-25.
165. Hsuchou H, Kastin AJ, Pan W. Blood-borne metabolic factors in obesity exacerbate injury-induced gliosis. *Journal of molecular neuroscience:MN*. 2012;47(2):267-77.
166. Moser VA, Uchoa MF, Pike CJ. TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity. *Journal of neuroinflammation*. 2018;15(1):306.