

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

Vanessa Fernanda Da Silva

**Efeito da restrição calórica sobre a neuroinflamação aguda induzida com LPS
em ratos Wistar**

Porto Alegre

2021

Vanessa Fernanda Da Silva

**Efeito da restrição calórica sobre a neuroinflamação aguda induzida com LPS
em ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador(a): Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Vanessa Fernanda
Efeito da restrição calórica sobre a
neuroinflamação aguda induzida com LPS em ratos Wistar
/ Vanessa Fernanda Silva. -- 2021.
48 f.
Orientadora: Carlos Alberto Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Restrição calórica. 2. LPS. 3. Inflamação. 4.
Atrócito. 5. Microglia. I. Gonçalves, Carlos Alberto,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Dedico esta dissertação a meus pais, Lourdes e Hélquio,
meus maiores exemplos e minha inspiração.**

**"A religião é o ópio do povo."
(Karl Marx)**

Agradecimentos

Aos meus pais Lourdes e Hélquio pelo amor incondicional, torcida e incentivo constantes, meus maiores exemplos de vida.

Às minhas irmãs Viviane e Vitória por serem meus orgulhos, minhas inspirações e as melhores amigas que a vida poderia ter me dado.

Ao meu esposo e colega de laboratório Vitor por todo apoio, incentivo e por jamais me deixar desistir. Por me ajudar a lutar por aquilo que quero, me fazendo mais forte e tornando a minha jornada mais leve e divertida.

Aos meus sogros e cunhado, Mari, Flávio e Bruno, pelo carinho e torcida.

Ao pessoal da secretaria, Giordano, Cléia e Douglas.

A Silvana, ao Rodrigo. Ao pessoal do biotério. E a todos os funcionários “invisíveis” que tornam nosso trabalho possível.

A todos os colegas do laboratório 33.

A colega de laboratório Adriana Vizuete, por me apresentar ao laboratório.

A Fê Hansen pelo convite para ingressar na Iniciação científica.

A Caro Zanotto por me acolher quando a Fê assumiu seu concurso em Santa Catarina.

Aos meus embustes, amigos e colegas do laboratório, Lets, Krista, Lili, Nick, Anderson, Bárbara, Aline, Jéssica e Eder (Mozão), por tornarem meus dias mais leves e ser um ótimo grupo de trabalho.

A Char por todos os momentos de ajuda e cumplicidade.

A Rafa, minha amiga e IC, por todos os momentos de confiança e choro, mas principalmente pelos de alegrias. Sem você esse trabalho não teria sido o mesmo.

A todos do laboratório 31M e 31A, em especial ao Gabriel, a Fezinha, a Marininha e a Jéssica Taday por toda ajuda no início desta jornada.

Ao professor André e a professora Marina, por todas as conversas, ajudas e conselhos.

A Pati Sesterheim por todas as conversas, sugestões e pela amizade. A Yasmin e ao Emerson por tornarem a vida mais leve e divertida.

Por fim, ao professor CA, orientador, amigo, psicólogo e pai científico. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação, pelas conversas sérias e também pelas divertidas. Muito obrigada pela tua confiança. Tu és uma inspiração e

modelo a seguir tanto na vida acadêmica como fora dela. Obrigada por ser essa pessoa incrível, que me aceitou no teu laboratório sem saber fazer sequer uma solução, e por me ensinar de forma direta ou indireta tudo o que sei hoje.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Restrição calórica: conceito e usos	4
1.2 Neuroinflamação.....	5
1.3 Células gliais e a defesa do SNC	6
2 JUSTIFICATIVA	9
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4 METODOLOGIA.....	11
4.1 Animais.....	11
4.2 Grupos experimentais.....	11
4.3 Dieta	11
4.4 Indução da inflamação.....	12
4.5 Eutanásia e Coleta de amostras.....	13
4.6 Captação de Glutamato.....	13
4.7 Atividade de GS.....	13
4.8 Conteúdo de GSH	14
4.9 Conteúdo sérico.....	14
4.10 ELISA de TNF α e IL-6	14
4.11 Western Blotting	14
4.12 Quantificação De Proteínas	15
4.13 Análise estatística.....	15
5 RESULTADOS	16
5.1 Efeito da RC sobre a massa corporal e parâmetros bioquímicos séricos.....	16

5.2 Astrócitos são afetados pela RC no hipotálamo	20
5.3 Microglia é afetada pela RC no hipocampo	22
5.4 RC reverte as alterações nas defesas antioxidantes induzidas por LPS i.p. ...	24
5.5 RC atenua os efeitos do LPS na captação de glutamato	25
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO.....	30
8 PERSPECTIVAS.....	31
9 APOIO FINANCEIRO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

Resumo

Dados experimentais indicam que a restrição calórica (RC) protege o sistema nervoso central (SNC) de várias condições patológicas, incluindo processos inflamatórios e degenerativos. As células gliais auxiliam na resposta inflamatória induzida por lipopolisacarídeo (LPS), em especial os astrócitos, que possuem o receptor Toll like 4 (TLR4), que atua como mediador da inflamação induzida por LPS nestas células. Neste estudo, avaliamos as alterações astrogliais e microgliais do hipocampo e hipotálamo em resposta à RC de 4 ou 8 semanas, frente ao insulto por LPS. Os parâmetros astrogliais avaliados foram, imunoconteúdo da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), captação de glutamato e conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), além da molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (IBA-1) como marcador microglial. Os animais submetidos a RC tiveram ganho de massa corporal menor em ambos os tempos e o insulto inflamatório causou aumento dos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), atenuada nos animais que realizaram RC. Entretanto, as alterações na lipídemia e glicemia induzidas pelo LPS não foram modificadas em animais em protocolo de RC. Não percebemos uma ativação glial induzida pelo LPS, com base no conteúdo de GFAP e IBA-1. No entanto, o LPS causou uma redução de GSH no hipotálamo, mas não no hipocampo, inferindo em uma prevenção causada pela RC nos animais em protocolo de dieta. Por outro lado, no hipocampo observou-se um aumento da captação de glutamato induzida por LPS parcialmente prevenida nos animais que realizaram RC. O estudo indica que RC modula funções astrogliais, reforçando a ideia de um efeito neuroprotetor contra inflamação aguda mediada por receptores TLR4.

Palavra-chave: Restrição calórica; LPS; Inflamação; Astrócito; Microglia; Neuroproteção.

Abstract

Experimental data indicate that caloric restriction (CR) protects the central nervous system from various pathological conditions, including inflammatory and degenerative processes. Glial cells help in the inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS), especially astrocytes, which have the Toll-like receptor 4 (TLR4), which acts as a mediator of inflammation induced by LPS in these cells. In this study, we evaluated the astroglial and microglial alterations of the hippocampus and hypothalamus in response to CR at 4 or 8 weeks, in face of the LPS insult. The astroglial parameters evaluated were glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunocontent, glutamate uptake and reduced glutathione (GSH) content, in addition to the ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA-1) as a microglial marker. The animals submitted to CR had a lower body mass gain in both periods and the inflammatory insult caused an increase in the serum levels of interleukin-6 (IL-6), attenuated in the animals that underwent CR. However, changes in lipidemia and glycemia induced by LPS were not modified in animals in CR protocol. We did not notice an LPS-induced glial activation based on the content of GFAP and IBA-1. However, LPS caused a reduction in GSH in the hypothalamus, but not in the hippocampus, inferring a prevention caused by CR in animals on a diet protocol. On the other hand, in the hippocampus, an increase in glutamate uptake induced by LPS was partially prevented in animals that underwent CR. The study indicates that CR modulates astroglial functions, reinforcing the idea of a neuroprotective effect against acute inflammation mediated by TLR4 receptors.

Keywords: Caloric restriction; LPS; Inflammation; Astrocyte; Microglia; Neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BHE	Barreira hematoencefálica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FOXO1	Fator de transcrição “forkhead” 1
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLUT4	Transportador de glicose 4
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida
HBSS	Solução equilibrada de Hanks
HMGB1	Grupo de alta mobilidade box-1
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
ICV	Intracerebroventricular
IP	Intraperitoneal
LLP	Lipase de lipoproteína
LPS	Lipopolisacarídeo
NF κ B	Fator nuclear kappa B
PGC-1 α	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
RC	Restrição calórica
TGF β	Fator de crescimento transformador β
TLR	Receptor “toll-like”
TNF α	Fator de necrose tumoral α
Sir2	Regulador de informação silenciosa 2
Sirt	Sirtuína
SNC	Sistema nervoso central

1 INTRODUÇÃO

1.1 Restrição calórica: conceito e usos

A restrição calórica (RC) é definida como uma redução no total de calorias consumidas, sem a deficiência de nutrientes essenciais da dieta. Esta redução na ingestão de calorias diminui a taxa de envelhecimento biológico em diferentes espécies¹. O envelhecimento é um processo natural, para sistemas, indivíduos e células, que envolvem mudanças ao longo do tempo. Por ser natural, não se pode falar em causas do envelhecimento, mas comumente, do ponto de vista bioquímico, nos referimos a um acúmulo de danos (principalmente oxidação)²⁻⁴, em especial no sistema nervoso central (SNC). O envelhecimento cerebral possui manifestações clínicas gradativas bem características, como declínio da memória e cognição, prejuízo motor e na execução de tarefas. Sabe-se que o envelhecimento cerebral vem acompanhado de alterações funcionais e morfológicas, o que inclui atrofia, perda de massa encefálica, déficit sináptico, neurogênese reduzida, disfunção mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), oxidação de proteínas, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e neuroinflamação crônica⁵⁻⁷.

Por muito tempo procurou-se diferentes formas de prolongar a vida e reduzir os efeitos do envelhecimento. Um fato interessante sobre o envelhecimento é que muitas mutações são capazes de prolongar a vida, e também diminuem a atividade das vias de sinalização de nutrientes, sugerindo assim que existe uma relação entre o envelhecimento e a nutrição⁸. Em 1935, foi publicado o primeiro estudo sobre os efeitos da RC em roedores, por McCay e colaboradores. Este estudo demonstrou que a RC quando iniciada após a puberdade, prolonga a vida e previne doenças crônicas em roedores^{5,8,9}. Esta redução na ingestão de calorias diminui a taxa de envelhecimento biológico em diferentes espécies, bem como melhora os efeitos do envelhecimento cerebral em diferentes níveis^{1,8,10}.

A RC pode ser realizada de duas maneiras, controlando a quantidade de alimento fornecido ou através da manipulação dos componentes da dieta. Os protocolos podem ainda, ser realizados de forma intermitente (intercalando os dias da administração da dieta), ou, restrição contínua (administrando a dieta restrita diariamente)¹¹. Pesquisas utilizam modelos animais com redução de 30% a 50% do

total calórico da dieta, quando utilizado de forma contínua, e é comumente empregada para prevenir doenças neurodegenerativas relacionadas com o envelhecimento como a Doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, além de alterações no metabolismo periférico do organismo, como dislipidemias, doenças cardiovasculares e autoimunes^{1,12,13}.

Sabe-se que RC altera o metabolismo energético tanto na periferia quanto no SNC de mamíferos. Apesar dos benefícios da RC serem conhecidos há muitos anos, os mecanismos de sua ação permanecem sem completo esclarecimento. A sua complexidade está em múltiplos efeitos incluindo, alterações metabólicas, neuroendócrinas e apoptóticas, que variam em intensidade e exibem diferenças notáveis entre os diferentes órgãos^{4,5,13,14}.

1.2 Neuroinflamação

O sistema imunológico desempenha um papel indispensável na manutenção da homeostase do tecido e da resposta às infecções e lesões. Alguns estímulos inflamatórios possuem efeitos benéficos (fagocitose de detritos e células apoptóticas), afinal, a inflamação relaciona-se com processos de reparação tecidual, porém, uma inflamação descontrolada e crônica resulta na produção de fatores neurotóxicos que podem desencadear alterações neuroquímicas e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas^{5,15}. A inflamação crônica de baixo grau em todo o corpo é uma das principais características do envelhecimento, sintomas semelhantes aos encontrados em indivíduos obesos ou com distúrbios metabólicos, demonstrando o efeito benéfico da RC na inflamação sistêmica. No entanto, a inflamação crônica pode ter efeitos danosos no envelhecimento normal, bem como, no envelhecimento patológico, como é o caso das doenças neurodegenerativas^{1,5,15,16}.

A neuroinflamação pode ser induzida de diferentes maneiras, dentre elas, a administração de lipopolissacarídeo (LPS), um constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas, podendo ser aplicado intraperitonealmente (i.p.) ou intracerebroventricularmente (i.c.v.)^{15,17,18}. Quando o LPS é administrado, os receptores Toll like 4 (TLR4) induzem a ativação de mediadores intracelulares, como o fator nuclear kappa B (NFkB). Esse receptor não é ativado exclusivamente pelo LPS, mas proteínas endógenas como o grupo de alta mobilidade box-1 (HMGB1),

classificadas como alarminas, podem ativá-lo^{17,19}. Essa ativação induz a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias^{18,19}. Sabe-se que a RC é capaz de modular a resposta inflamatória e promover neuroproteção, em modelos que utilizam LPS²⁰⁻²³.

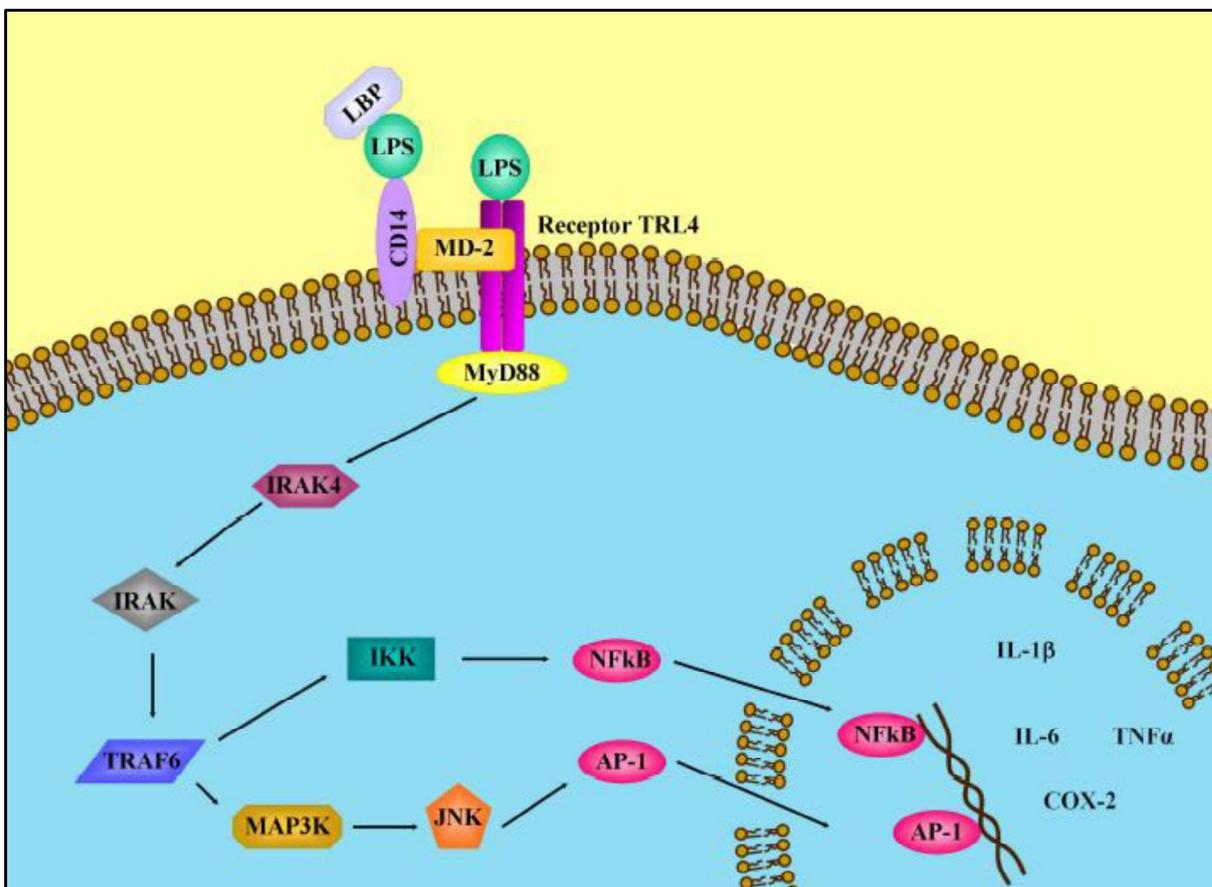


Figura 1: Sinalização por LPS. Fonte: Adaptado de Guerra, 2010.

1.3 Células gliais e a defesa do SNC

O SNC é composto por diferentes tipos celulares, incluindo neurônios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos. Todas as células do SNC atuam em níveis diferentes para combater processos inflamatórios, embora as células astrocitárias e microgliais atuem de forma mais acentuada. A neuroinflamação manifesta-se como astrogliose, microgliose e com o aumento de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e proteínas complementares. Portanto, a literatura descreve que a neuroinflamação está ligada ao declínio das funções cerebrais durante o envelhecimento^{5,24}.

A microglia é um tipo celular do sistema imune inato, que está envolvida no cuidado da resposta inflamatória do SNC, ao interagir com patógenos ocorre a ativação de vias neurais e humorais para comunicação com os demais tecidos cerebrais^{5,25}. Após o desafio imunológico a microglia passa a seu estado ativo, acarretando em uma mudança morfológica e funcional. A resposta de ativação microglial está associada com a fase aguda da resposta imunológica, diminuindo a biodisponibilidade de ferro para limitar o metabolismo do patógeno e prevenir o excesso de dano no SNC após a lesão^{24,26}. Um importante marcador de ativação da microglia é a proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (IBA-1), que após a ativação microglial passa a aumentar sua expressão. As células microgliais podem ainda secretar diferentes citocinas e quimiocinas como, fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), por exemplo. A microglia recebe e envia sinais regulatórios para outras células neurais chave na resposta neuroinflamatória – os astrócitos^{24,26,27}.

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC e possuem um importante papel na manutenção de suas funções fisiológicas. Os astrócitos fornecem suporte metabólico, fatores tróficos e defesas antioxidantes, como a glutathiona (GSH), realizam a homeostase hídrica e iônica cerebral através de canais específicos como, aquaporinas (AQP) e o canal de potássio retificador interno (Kir4.1), e realizam a regulação e metabolismo de neurotransmissores, principalmente do glutamato²⁸.

A GSH possui grande relevância na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, atuando juntamente com as enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona-S-transferase, participando também, na modulação de transdução de sinais, regulação da proliferação celular e resposta imune. Visto seu papel na proteção contra o estresse oxidativo, a disponibilidade de GSH na forma reduzida torna-se um fator importante para a manutenção celular, ou seja, quanto menor a quantidade de glutathiona na célula menor a probabilidade de sobrevivência da mesma^{27,29}.

Os astrócitos realizam ainda a captação do glutamato excedente da fenda sináptica. A glutamina sintetase (GS) é uma aminotransferase amplamente distribuída entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida. No SNC, a GS atua na redução da concentração de amônia e conseqüente detoxificação, através da conversão de glutamato em glutamina que será captada por

neurônios, para a nova síntese de glutamato, este processo é conhecido como ciclo glutamato-glutamina^{29,30}.

Os astrócitos participam ativamente na regulação de processos inflamatórios, assumindo seu estado reativo, sofrendo alterações morfológicas e funcionais, o que aumenta a expressão de proteínas sinalizadoras como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína S100B^{16,27,31,32}. Estas células expressam ainda o receptor TLR, que reconhecem patógenos e alarminas, iniciando a resposta imunológica^{27,33}.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que os astrócitos estão envolvidos na neuroinflamação e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas através da reatividade astrogliar e da disfunção astrocitária, e que a RC é capaz de modular o processo inflamatório principalmente durante o envelhecimento. Entretanto, ainda não são bem conhecidas as mudanças gliais e os mecanismos reguladores. Portanto, são necessários estudos que avaliem as mudanças neurais e os mecanismos reguladores induzidos pela RC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compreender o efeito da RC de 4 ou 8 semanas num modelo inflamatório agudo induzido por LPS i.p., particularmente sobre as mudanças metabólicas, inflamatórias e gliais em ratos Wistar machos adultos de 90 dias.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da RC sobre parâmetros neuroinflamatórios, astrogliais e microgliais (e.g. GFAP, GS, GSH, captação de glutamato, IBA-1) em 2 regiões encefálicas (hipocampo e hipotálamo);

Avaliar o efeito da RC sobre peso e parâmetros metabólicos periféricos (e.g. glicemia, lipidemia);

Avaliar o efeito sobre parâmetros neuroinflamatórios e gliais sob estímulo inflamatório agudo induzido com LPS i.p.;

Avaliar o efeito sobre os parâmetros metabólicos periféricos sob estímulo inflamatório agudo induzido com LPS i.p.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos adultos de 90 dias de idade (peso: 266g – 383g), provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Desde o nascimento até a eutanásia os animais foram mantidos em ciclo de 12h/12h claro e escuro, a temperatura constante de 22°C ± 2°, com livre acesso a água, foi utilizada a dieta padrão do biotério sendo livre ou restrita conforme o grupo experimental dos animais. A manipulação e tratamento dos animais respeitam as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Rio Grande do Sul.

4.2 Grupos experimentais

Inicialmente os animais foram divididos em grupo Controle e RC, passado 4 ou 8 semanas conforme o grupo experimental os animais foram divididos novamente para receber uma injeção única de LPS (1mg/Kg) intraperitonealmente ou veículo (Figura 1), conforme seu grupo experimental. Compondo então os seguintes grupos: Controle, LPS, RC e RC+LPS.

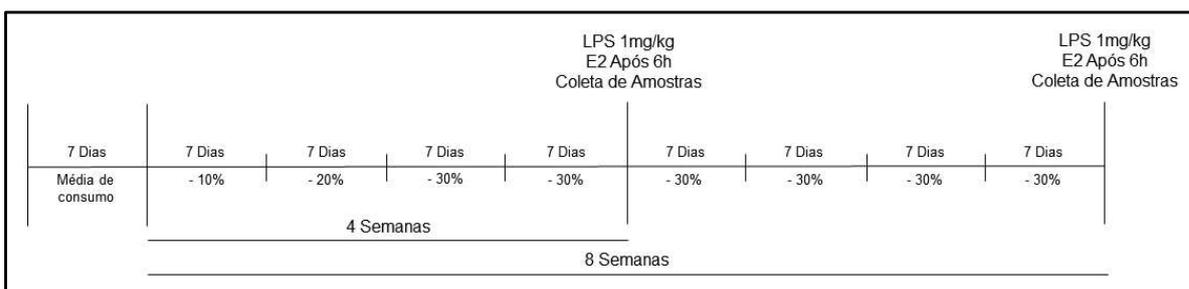


Figura 1: Desenho experimental.

4.3 Dieta

A dieta *ad libitum* é a ração balanceada padrão (50% carboidrato, 22% proteína e 4% lipídio) para roedores utilizada pelo Biotério de Departamento de Bioquímica da

UFRGS. A composição da dieta segue a normativa AIN-93. A ração fornecida pelo Biotério do Departamento de Bioquímica é a NUVILAB CR 1 (Tabela 1).

A RC foi realizada em dois protocolos distintos: 4 semanas e 8 semanas. Os animais foram pesados e alojados em caixas conforme o seu peso, 3 animais por caixa. No período de uma semana foi disponibilizado diariamente 100g de ração para cada caixa, após 24h a sobra de todas as caixas foi pesada, a fim de verificar o consumo diário para realizar a média de consumo. Posteriormente, os animais foram divididos em dois grupos: Controle e RC. O grupo Controle continuou a receber 100g de ração diariamente até o fim do protocolo. O grupo RC iniciou a dieta de forma gradativa, diminuindo 10% na primeira semana, 20% na segunda semana e 30% a partir da terceira semana até o fim do protocolo. A ingestão de alimento foi monitorada diariamente, sempre verificando a quantidade de sobra dos grupos e disponibilizando ração fresca nas devidas quantias. O peso dos animais foi acompanhado semanalmente. Segundo dados da literatura, o protocolo de 30% de restrição calórica não necessita de suplementação de vitaminas ou minerais.^{29,34,35}

Composição da ração do biotério	
Composição gramas por caloria (g/kg)	
Gorduras totais	110
Óleo de girassol	5
Proteínas	220
Fibras	30
Ash Fibra bruta	60
Vitaminas	20
Carboidratos	520

Tabela 1. Composição da ração Nuvilab- CR1.

4.4 Indução da inflamação

Transcorrido 4 e 8 semanas de RC e *Ad libitum* conforme os grupos, foi administrado o LPS (SIGMA L2880) 1mg/kg intraperitonealmente (i.p.) para induzir a inflamação ou tampão fosfato de sódio (em mM) 58,44 NaCl; 137,99 NaH₂PO₄·H₂O; 177,99 Na₂HPO₄·2H₂O; pH 7,4 como veículo, conforme o grupo experimental.³⁶

4.5 Eutanásia e Coleta de amostras

Após 6 horas da aplicação do LPS, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). As amostras de sangue foram obtidas por punção intracardíaca e os animais foram eutanasiados por decapitação. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 3200 rpm. O soro foi armazenado a -80°C até o dia da análise.⁴ Os encéfalos foram removidos e colocados em solução de tampão fosfato de sódio (em mM) 58,44 NaCl; 137,99 NaH₂PO₄·H₂O; 177,99 Na₂HPO₄·2H₂O; pH 7,4. Foram dissecados o hipocampo e o hipotálamo, posteriormente obtidas fatias através de um equipamento de corte (McIlwain Tissue Chopper). Todas as amostras foram acondicionadas em freezer -80° para posterior análise.

4.6 Captação de Glutamato

A captação de glutamato foi realizada segundo Feoli e colaboradores. Fatias de hipocampo foram incubadas a 37°C em solução salina equilibrada de Hanks (HBSS). O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1 mM de L-glutamato e 0,33 µCi/mL de L-[2,3-³H] glutamato. A incubação foi parada após 5 min pela remoção do meio e lavagem das fatias três vezes com HBSS gelado. As fatias foram homogeneizadas em uma solução 0,5 M de NaOH. Após a adição de líquido de cintilação, a radioatividade foi medida em um contador de cintilação (Perkin Elmer Precisely Tri-Carb 2800TR). Os valores foram corrigidos pelo valor de proteínas totais.^{30,37,38}

4.7 Atividade de GS

Fatias de hipocampo e hipotálamo foram lisadas em imidazol 50mM (pH 6,8), incubadas em tampão com imidazol 50 mM, glutamina 100 mM, hidroxilamina 50 mM, arsenato de sódio 25 mM, cloreto de manganês 2 mM e ADP 022mM, por 15 minutos a 37°C, a reação foi interrompida com cloreto férrico em meio ácido. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos em 1000xg a 4°C, o produto corado foi analisada à 540 nm.^{27,39}

4.8 Conteúdo de GSH

As fatias foram lisadas em tampão fosfato contendo KCl (20 mM/140 mM) e, após, foi adicionado ácido metafosfórico (concentração final de 4,6 mg/mL). O homogeneizado foi então centrifugado 1000 x g por 10 minutos. As amostras e os pontos da curva foram pipetados em microplaca de 96 poços, contendo tampão GSH (fosfato de sódio monobásico 0,1 M e EDTA 0,005 M). Após, a placa foi incubada com OPT a 1 mg/mL, diluído em metanol por 15 minutos a temperatura ambiente. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 nm e 420 nm, respectivamente.^{30,40}

4.9 Conteúdo sérico

As análises bioquímicas do conteúdo sérico foram realizadas através de kit comercial da Bioclin, conforme instruções do fabricante. Foram realizados testes de ácido úrico (K139-1), albumina (K040-1), creatinina (K067-1), colesterol (K083-2), glicose (K082-3), triglicerídeos (K117-1) e ureia (K056-1).

4.10 ELISA de TNF α e IL-6

Utilizamos kit comercial da PeProtech para avaliação do conteúdo de IL-6 (900-M86) no soro e TNF α (900-M54) no hipocampo e hipotálamo dos animais, através da técnica de ELISA, a técnica foi realizada conforme instruções do fabricante.⁴¹

4.11 Western Blotting

Quantidades iguais (20 μ g) de proteínas de cada amostra foram fervidas em tampão [0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 2% (w / v) SDS, 5% (w / v) β -mercaptoetanol, 10% (v / v) glicerol, 0,002% (w / v) de azul de bromofenol] e separados por SDS-PAGE em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida a 14%, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 2 horas a 4 ° C com albumina bovina padrão - BSA (alamar tecno-científica LTDA, ref.1870) 5% em solução salina tamponada com Tris e com Tween 20 (TTBS), foram feitas 3 lavagens

de 5 minutos com TTBS, posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IBA-1 (diluído 1:2000 em TTBS e 1% de BSA, Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha; Cod.: MABN92) ou com anti-GFAP (diluído 1:2000 em TTBS e 1% de BSA, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha; Cod.: G9269) por 4h a 4°C. Foram realizadas lavagens com TTBS, e as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase de rábano (HRP) anti-coelho ou anti-camundongo (diluídos 1:10000) por 2h a temperatura ambiente. As bandas quimioluminescentes foram detectadas por Fotodorevelador (Image Quant LAS400 da GE) a densidade ótica foi quantificada utilizando ImageJ. Os resultados foram expressos em porcentagens do grupo Controle.^{24,30,42}

4.12 Quantificação De Proteínas

O conteúdo total de proteínas foi determinado através do método de Lowry, modificado por Peterson, utilizando BSA como padrão.^{29,43}

4.13 Análise estatística

Os dados foram demonstrados como média \pm erro padrão, e foram analisados através de ANOVA de duas vias para os resultados de massa corporal, e ANOVA de uma via para os demais resultados. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas através do software GraphPad Prism, versão 8.0.2 (San Diego, California USA).

6 DISCUSSÃO

Os benefícios da RC são bem estabelecidos em todas as espécies avaliadas até o momento (leveduras, lombrigas, roedores, macacos e humanos), principalmente no que diz respeito a processos dependentes do envelhecimento e longevidade^{8,21,29,44}.

Um efeito interessante da longevidade foi observado por estudos realizados em leveduras, através da indução do gene regulador de informação silenciosa (Sir2) que codifica a estona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Estudos de proteômica demonstraram que a Sir2 pertence a classe das sirtuínas (Sirt), em mamíferos existem sete genes de Sirt, sendo a Sirt1 muito similar a Sir2⁸. A RC aumenta a expressão de Sirt1 e parece mediar a atividade de importantes reguladores do metabolismo, como fator de transcrição “forkhead” 1 (FOXO1), receptor ativado por proliferadores de peroxissomo α (PPAR α), receptor ativado por proliferadores de peroxissomo γ (PPAR γ), coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α)^{8,45}. A Sirt1 desacetila e ativa a PGC-1 α , que interage com a FOXO1, induzindo ativação de gliconeogênese no fígado, já no tecido muscular ativa PGC-1 α , levando a biogênese mitocondrial, elevando a oxidação de ácidos graxos. No tecido adiposo branco, a Sirt1 anula a atividade transcricional do PPAR γ , aumentando a mobilização de gordura e diminuindo a adipogênese, causando consequente perda de massa corporal^{29,45,46}. Em nosso estudo, os animais submetidos a RC tiveram uma redução na massa corporal em ambos os protocolos de dieta, corroborando com os dados existentes na literatura. Após três semanas de RC, observamos uma estabilização da perda de massa e aumento da mesma, indicando que a dieta proporciona uma reprogramação metabólica, este padrão também foi observado em trabalhos de corte^{29,47-50}. Além disso, os animais submetidos a RC não estão desnutridos, pois não houveram diferenças nos parâmetros séricos de albumina (dados não mostrados) entre o grupo controle e RC.

O tecido adiposo é um reservatório energético regulado por nervos, hormônios, nutrientes, mecanismos autócrinos e parácrinos, e considerado um importante órgão endócrino com funções reguladoras no balanço energético e outras funções neuroendócrinas^{46,47,51,52}. O tecido adiposo secreta uma variedade de adipocinas que

regulam diferentes processos orgânicos. Estas adipocinas desencadeiam ações pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, atuando de forma autócrina, parácrina e/ou endócrina, estando envolvidas com diferentes doenças como o diabetes e a síndrome metabólica^{47,51-53}. As funções fisiológicas das adipocinas são muito variadas, englobando diferentes proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas TNF α e IL-6, fator de crescimento transformador β (TGF β) e proteínas da via complemento como a adiposina. Portanto, podemos inferir que alterações nos adipócitos podem alterar a regulação hormonal destes tecidos, como liberar maiores concentrações de adiponectina e menor concentração de TNF α e IL-6, o que melhora a sensibilidade à insulina em diferentes tecidos^{5,8,41,47,54}. Evidenciamos que os protocolos de RC utilizados neste trabalho apresentam um efeito de proteção parcial na periferia após entrar em contato com insulto inflamatório por LPS, possivelmente através dos mecanismos de regulação endócrinos exercidos pelos adipócitos e a consequente diminuição de seu estoque de gordura devido a dieta restritiva.

O TNF α e a IL-6 são citocinas do sistema imune, e possuem ação direta no tecido adiposo, sendo capazes de regular o acúmulo de gordura e alterando processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídeos, bloqueando a lipogênese, através da inibição da expressão da lipase de lipoproteína (LLP), GLUT-4 e da acetilCoA sintetase, consequentemente aumentando a lipólise^{8,41,46-48,55}. Demonstramos que o insulto inflamatório agudo altera consideravelmente os parâmetros séricos, aumentando os níveis glicêmicos e diminuindo os triglicerídeos. Curiosamente há uma flutuação nos níveis de colesterol, pois ocorre um aumento nos animais submetidos a protocolo de 4 semanas de RC e posterior inflamação aguda, enquanto os animais submetidos a protocolo de 8 semanas de RC não apresentam alterações nos níveis de colesterol, estas alterações podem ser explicadas pelo aumento dos níveis séricos de IL-6 que realiza processos dependentes de insulina, neste estudo não avaliamos a ação do TNF α periférico. Nossos achados sobre as alterações na mobilização de aminoácidos podem estar relacionados ao efeito antioxidante realizado pela urea, ou ainda associados ao fato de ocorrer um possível sequestro destas moléculas para que ocorra a modulação inflamatória decorrente do insulto com LPS, havendo uma maior ativação do ciclo da ureia⁵⁶. Assim sendo, observamos que os níveis séricos de ácido úrico e ureia estão

aumentados nos animais que foram submetidos ao LPS, porém não observamos diferença nos níveis de creatinina.

Diferentes vias de sinalização metabólica e celular envolvidas nas alterações que a RC apresenta para a saúde central e periférica foram investigados^{1,13,57-59}. No entanto, apesar das evidências experimentais apontarem que a RC oferece proteção contra a perda neuronal relacionada a idade e doenças neurodegenerativas, pouco se sabe sobre os efeitos da RC na neuroinflamação. Todas as células SNC participam em algum grau para combater processos neuroinflamatórios, porém os astrócitos e a microglia atuam de forma mais acentuada^{16,27,31,60}.

O envelhecimento é caracterizado por uma perda progressiva de várias funções e aumento da suscetibilidade a vários distúrbios relacionados com a idade. Mesmo pessoas idosas saudáveis costumam experimentar um declínio em funções fisiológicas, incluindo metabolismo, regulação hormonal, ritmo circadiano, reprodução e cognição^{25,61,62}. Curiosamente, a maioria das funções fisiológicas que diminuem com o envelhecimento são amplamente geridas pelo hipotálamo, uma região do cérebro que regula diversos processos fisiológicos, incluindo sono, ritmo circadiano, temperatura corporal, pressão arterial, sede e apetite^{25,63}. Além disso, o hipotálamo conecta o cérebro e o corpo para que as informações ambientais sejam transmitidas. Portanto, o hipotálamo é um importante regulador do processo de envelhecimento de todo o corpo^{5,25,60}. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal é ativado em episódios de inflamação, sendo crucial para respostas a diferentes estímulos. A fim de investigar o processo inflamatório no hipotálamo, avaliamos os níveis de TNF α e as proteínas GFAP e IBA-1 para verificar quais células gliais são mais afetadas pela RC em protocolos de 4 ou 8 semanas de dieta. Observamos um aumento de GFAP no grupo exposto a protocolo de 8 semanas de RC e insulto por LPS, demonstrando que os astrócitos são favorecidos no hipotálamo destes animais, curiosamente, não foram observados aumentos nos níveis de TNF α , sugerindo que esta região encefálica esteja envolvida em outros processos de regulação durante uma inflamação aguda.

Outra estrutura encefálica fortemente afetada pelo envelhecimento, é o hipocampo, devido seu envolvimento no declínio cognitivo e aprendizagem, esta estrutura é fortemente influenciada pela inflamação e quaisquer alterações biológicas^{41,64,65}. Nossos dados evidenciam que em 4 semanas de RC com posterior insulto por LPS, a microglia é favorecida no hipocampo, visto o aumento nos níveis de

IBA-1 que ocorrem nesta estrutura, contudo, o mesmo não ocorre em 8 semanas de RC. Observamos também, que os níveis da citocina inflamatória TNF α são aumentados no hipocampo após insulto inflamatório, com proteção total ou parcial da dieta. Nossos dados corroboram com estudos anteriores do grupo, que demonstraram a capacidade da RC em modular funções gliais importantes em ratos Wistar machos^{4,29,66,67}.

Ao decorrer dos anos diferentes mecanismos foram propostos para elucidar os benefícios da RC, mas dois são mais aceitos pela comunidade acadêmica. Em 1928, Pearl propôs que longevidade em mamíferos esta inversamente relacionada as taxas metabólicas por unidade de massa de tecido, ou seja, taxa de vida. Algumas décadas posteriores, em 1956, Harman sugeriu que as alterações provenientes do envelhecimento estão ligadas a produção de ERO, estes subprodutos da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias danificam o ácido desoxirribonucleico (ADN), lipídeos e proteínas, prejudicando o funcionamento celular e acarretando no envelhecimento biológico acelerado^{8,54,68,69}.

Espécies reativas de oxigênio são formadas pela respiração celular, as principais espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH⁻), estas moléculas são extremamente reativas, e acabam por oxidar moléculas que estejam próximas, como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos. Outro fato interessante é que as ERO são capazes de ativar a translocação de NF κ B ao núcleo, acarretando na transcrição de proteínas pro-inflamatórias como o TNF- α e interleucinas 1, 2 e 6^{5,8,70,71}. A GSH é uma molécula chave na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, atuando juntamente com as enzimas glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, participa também na modulação de transdução de sinais, regulação da proliferação celular e resposta imune. Visto seu papel na proteção contra o estresse oxidativo, a disponibilidade de GSH na forma reduzida torna-se um fator importante para a manutenção celular, ou seja, quanto menor a quantidade de glutathione na célula menor a probabilidade de sobrevivência da mesma^{27,70,72,73}. Nossos dados evidenciam a diminuição nos níveis de GSH no hipotálamo após insulto com LPS, e uma proteção total nos animais submetidos a protocolo de 8 semanas de RC, no entanto, não observamos o mesmo padrão em protocolo de 4 semanas. Curiosamente, observamos que ocorre o aumento de GSH no hipocampo dos animais que realizaram

o protocolo de RC de menor período, e um retorno destes níveis no grupo RC+LPS. Esta flutuação no efeito antioxidante astrocitário merece um estudo mais minucioso sobre quais mecanismos a RC e o LPS estão envolvidos em diferentes regiões encefálicas, além de diferentes protocolos experimentais de dieta e idade.

O aumento na concentração de glutamato durante a neurotransmissão (~ 100µM a 1mM) e a deficiência astrocitária em remover este excesso leva a danos excitotóxicos e até morte neuronal. Os astrócitos são responsáveis pela remoção do excesso de glutamato da fenda sináptica durante a neurotransmissão, a fim de manter sua concentração baixa em períodos de repouso (1-10µM), devido à alta quantidade de transportadores de glutamato^{2,29,66}. Nossos dados apontam o aumento na captação de glutamato hipocampal na resposta inflamatória de animais submetidos a 8 semanas de RC, indicando modulação na atividade e/ou número de seus transportadores, porém não houve o aumento na atividade de GS, indicando uma possível sobrecarga astrocitária. No entanto, dados anteriores de nosso grupo demonstram aumento da captação de glutamato e da atividade de GS em protocolos de 12 semanas de RC, utilizando ratos Wistar machos de 60 dias. Não podemos afirmar ao certo por qual motivo ocorrem estas variações nos resultados, mas possivelmente isto esteja relacionado a idade dos animais e tempo de dietas utilizados^{29,66}.

7 CONCLUSÃO

Demonstramos neste estudo que a RC melhora parâmetros relacionados a inflamação e envelhecimento em diferentes estruturas, atenuando o estado homeostático. No entanto, existem limitações no desenho deste estudo: os animais utilizados eram adultos e saudáveis; a dieta foi administrada por 4 e 8 semanas para investigar os efeitos em curtos prazos de RC. Portanto, torna-se indispensável a avaliação de estudos mais aprofundados sobre os efeitos da RC em diferentes idades e diferentes períodos de dieta, devido aos diferentes padrões encontrados sobre seus efeitos tanto no SNC como na periferia. Destacamos ainda a importância de verificar a influência do LPS em diferentes concentrações e períodos de tempo, pois neste estudo vislumbramos apenas seus efeitos agudos em protocolos de curto e médio período de tempo de RC.

4 Semanas			8 Semanas		
	LPS	RC+LPS		LPS	RC+LPS
	<ul style="list-style-type: none"> ↑ IL-6 ↓ Glicose ↑ Triglicérides ↑ Colesterol ↑ Ureia ↑ Ácido Úrico ↑ Creatinina 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ IL-6 ↓ Glicose ↑ Triglicérides ↑ Colesterol ↑ Ureia ↑ Ácido Úrico ↑ Creatinina 		<ul style="list-style-type: none"> ↑ IL-6 ↓ Glicose ↑ Triglicérides ↑ Colesterol ↑ Ureia ↑ Ácido Úrico ↑ Creatinina 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ IL-6 ↓ Glicose ↑ Triglicérides ↑ Colesterol ↑ Ureia ↑ Ácido Úrico ↑ Creatinina
HT 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 TNF-alfa GSH 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 TNF-alfa GSH 	HT 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 TNF-alfa ↓ GSH 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ GFAP IBA1 TNF-alfa GSH
HC 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 ↑ TNF-alfa ↑ GSH Captação Glutamato 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 ↓ TNF-alfa GSH Captação Glutamato 	HC 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 ↑ TNF-alfa GSH ↑ Captação Glutamato 	<ul style="list-style-type: none"> GFAP IBA1 ↓ TNF-alfa GSH ↓ Captação Glutamato

Figura 9: Resumo dos dados.

8 PERSPECTIVAS

Avaliar os efeitos da RC em astrócitos através dos níveis de S100B no hipocampo e hipotálamo dos animais.

Avaliar os parâmetros hormonais de leptina e adiponectina, devido seu envolvimento com a saciedade e apetite.

Avaliar os níveis do Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu perfil neuroprotetor em células gliais.

Analisar os papéis de vias de sinalização associadas ao metabolismo e envelhecimento como a GSK3 β e a SIRT1 em parâmetros gliais.

Analisar os efeitos eletrofisiológicos em fatias de hipocampus e de hipotálamo dos animais submetidos a RC e posterior insulto por LPS.

9 APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González, O., Tobia, C., Ebersole, J. & Novak, M. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases: Caloric restriction and inflammation. *Oral Dis.* **18**, 16–31 (2012).
2. Bellaver, B. *et al.* Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways. *Neurochem. Res.* **40**, 1600–1608 (2015).
3. Bellaver, B. *et al.* Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. *Purinergic Signal.* **11**, 571–580 (2015).
4. Ribeiro, L. C. *et al.* Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. *Brain Res.* **1472**, 11–19 (2012).
5. Bok, E. *et al.* Dietary Restriction and Neuroinflammation: A Potential Mechanistic Link. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 464 (2019).
6. Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A. & van de Beek, D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J. Neuroinflammation* **12**, 114 (2015).
7. Nishioku, T. *et al.* Detachment of Brain Pericytes from the Basal Lamina is Involved in Disruption of the Blood–Brain Barrier Caused by Lipopolysaccharide-Induced Sepsis in Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* **29**, 309–316 (2009).
8. Genaro, P. de S., Sarkis, K. S. & Martini, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 667–672 (2009).
9. McCAY, C. M., Crowell, M. P. & Maynard, L. A. THE EFFECT OF RETARDED GROWTH UPON THE LENGTH OF LIFE SPAN AND UPON THE ULTIMATE BODY SIZE. *Am. J. Physiol.* **17**.

10. Langley, M. R., Triplet, E. M. & Scarisbrick, I. A. Dietary influence on central nervous system myelin production, injury, and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165779 (2020).
11. Speakman, J. R. & Mitchell, S. E. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* **32**, 159–221 (2011).
12. Morgan, T. E., Wong, A. M. & Finch, C. E. Anti-Inflammatory Mechanisms of Dietary Restriction in Slowing Aging Processes. in *Interdisciplinary Topics in Gerontology* (eds. Mobbs, C. V., Yen, K. & Hof, P. R.) 83–97 (KARGER, 2006). doi:10.1159/000096557.
13. Popov, A. *et al.* Caloric restriction triggers morphofunctional remodeling of astrocytes and enhances synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Cell Death Dis.* **11**, 208 (2020).
14. Wood, S. H. *et al.* Transcriptome analysis in calorie-restricted rats implicates epigenetic and post-translational mechanisms in neuroprotection and aging. *Genome Biol.* **16**, 285 (2015).
15. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. & Gage, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* **140**, 918–934 (2010).
16. Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 388–405 (2015).
17. Guerra, M. *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J. Neuroinflammation* **8**, 128 (2011).
18. Gasparotto, J. *et al.* Systemic Inflammation Changes the Site of RAGE Expression from Endothelial Cells to Neurons in Different Brain Areas. *Mol. Neurobiol.* **56**, 3079–3089 (2019).

19. Song, H.-H. *et al.* High mobility group box 1 mediates inflammatory response of astrocytes via cyclooxygenase 2/prostaglandin E2 signaling following spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* **16**, 1848 (2021).
20. Soto-Tinoco, E., Guerrero-Vargas, N. N. & Buijs, R. M. Interaction between the hypothalamus and the immune system: Hypothalamus-immune system interaction. *Exp. Physiol.* **101**, 1463–1471 (2016).
21. Verkhratsky, A. *et al.* Astroglial asthenia and loss of function, rather than reactivity, contribute to the ageing of the brain. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **473**, 753–774 (2021).
22. Wrotek, S., Jędrzejewski, T., Nowakowska, A. & Kozak, W. LPS alters pattern of sickness behavior but does not affect glutathione level in aged male rats. *Biogerontology* **17**, 715–723 (2016).
23. MacDonald, L., Hazi, A., Paolini, A. G. & Kent, S. Calorie restriction dose-dependently abates lipopolysaccharide-induced fever, sickness behavior, and circulating interleukin-6 while increasing corticosterone. *Brain. Behav. Immun.* **40**, 18–26 (2014).
24. dos Santos, J. P. A., Vizuete, A. F. & Gonçalves, C.-A. Calcineurin-Mediated Hippocampal Inflammatory Alterations in Streptozotocin-Induced Model of Dementia. *Mol. Neurobiol.* **57**, 502–512 (2020).
25. Kim, K. & Choe, H. K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. *Mech. Ageing Dev.* **177**, 74–79 (2019).
26. Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E. & Godbout, J. P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge: Iba1 and GFAP Are Unreliable Activation Markers. *Glia* **64**, 300–316 (2016).

27. Bobermin, L. D. *et al.* Sulforaphane Induces Glioprotection After LPS Challenge. *Cell. Mol. Neurobiol.* (2020) doi:10.1007/s10571-020-00981-5.
28. Bobermin, L. D., Roppa, R. H. A. & Quincozes-Santos, A. Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1865**, 634–647 (2019).
29. Ribeiro, L. C. *et al.* Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci. Res.* **64**, 330–334 (2009).
30. Lissner, L. J. *et al.* Short-Term Alterations in Behavior and Astroglial Function After Intracerebroventricular Infusion of Methylglyoxal in Rats. *Neurochem. Res.* **46**, 183–196 (2021).
31. Kamphuis, W. *et al.* Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 492–510 (2014).
32. Nardin, P. *et al.* Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. *Neurochem. Res.* **41**, 2006–2016 (2016).
33. Alvarado, A. G. & Lathia, J. D. Taking a Toll on Self-Renewal: TLR-Mediated Innate Immune Signaling in Stem Cells. *Trends Neurosci.* **39**, 463–471 (2016).
34. Anton, S. D. *et al.* Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting: Flipping the Metabolic Switch. *Obesity* **26**, 254–268 (2018).
35. Chen, G.-H. *et al.* Chronic adjunction of 1-deoxynojirimycin protects from age-related behavioral and biochemical changes in the SAMP8 mice. *AGE* **37**, 102 (2015).
36. Andrade, V. S. *et al.* A Possible Anti-Inflammatory Effect of Proline in the Brain Cortex and Cerebellum of Rats. *Mol. Neurobiol.* (2017) doi:10.1007/s12035-017-0626-z.

37. Feoli, A. M. *et al.* Brain Glutathione Content and Glutamate Uptake Are Reduced in Rats Exposed to Pre- and Postnatal Protein Malnutrition. *J. Nutr.* **136**, 2357–2361 (2006).
38. Tramontina, F. *et al.* Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* **162**, 282–286 (2007).
39. Minet, R., Villie, F., Marcollet, M., Meynial-Denis, D. & Cynober, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin. Chim. Acta* **268**, 121–132 (1997).
40. Browne, R. W. & Armstrong, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. in *Free Radical and Antioxidant Protocols* vol. 108 347–352 (Humana Press, 1998).
41. Da Ré, C. *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling. *Behav. Brain Res.* **379**, 112360 (2020).
42. Wartchow, K. M. *et al.* Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site. *Life Sci.* **251**, 117587 (2020).
43. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356 (1977).
44. Anton, S. & Leeuwenburgh, C. Fasting or caloric restriction for Healthy Aging. *Exp. Gerontol.* **48**, 1003–1005 (2013).
45. Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J. & Kroemer, G. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab.* **29**, 592–610 (2019).

46. Stekovic, S. *et al.* Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans. *Cell Metab.* **30**, 462-476.e6 (2019).
47. Redman, L. M. *et al.* Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab.* **27**, 805-815.e4 (2018).
48. Christ, A., Lauterbach, M. & Latz, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity* **51**, 794–811 (2019).
49. Cheng, Z., Zheng, L. & Almeida, F. A. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. *J. Nutr. Biochem.* **54**, 1–10 (2018).
50. Nowak, K. L. & Hopp, K. Metabolic Reprogramming in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Evidence and Therapeutic Potential. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 577–584 (2020).
51. Devlin, M. J. *et al.* Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 2078–2088 (2010).
52. Zhao, P. *et al.* TBK1 at the Crossroads of Inflammation and Energy Homeostasis in Adipose Tissue. *Cell* **172**, 731-743.e12 (2018).
53. Antoni, R., Johnston, K. L., Collins, A. L. & Robertson, M. D. Intermittent v . continuous energy restriction: differential effects on postprandial glucose and lipid metabolism following matched weight loss in overweight/obese participants. *Br. J. Nutr.* **119**, 507–516 (2018).
54. Teixeira, I. N. D. O. & Guariento, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciênc. Saúde Coletiva* **15**, 2845–2857 (2010).
55. Teixeira, C. S. L. TNF-ALFA E METABOLISMO DO ADIPÓCITO. **54** (2015).

56. Arulseivan, P. *et al.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–15 (2016).
57. Maalouf, M., Rho, J. M. & Mattson, M. P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res. Rev.* **59**, 293–315 (2009).
58. Lalo, U., Bogdanov, A. & Pankratov, Y. Diversity of Astroglial Effects on Aging- and Experience-Related Cortical Metaplasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 239 (2018).
59. Lalo, U., Bogdanov, A. & Pankratov, Y. Age- and Experience-Related Plasticity of ATP-Mediated Signaling in the Neocortex. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 242 (2019).
60. Harrison, L., Pfuhlmann, K., Schriever, S. C. & Pfluger, P. T. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Mol. Metab.* **24**, 149–155 (2019).
61. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **50**, 216–229 (2006).
62. Kaur, M., Sharma, S. & Kaur, G. Age-related impairments in neuronal plasticity markers and astrocytic GFAP and their reversal by late-onset short term dietary restriction. *Biogerontology* **9**, 441–454 (2008).
63. Yoo, S. & Blackshaw, S. Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Prog. Neurobiol.* **170**, 53–66 (2018).
64. Zanotto, C. *et al.* Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood–Brain and Blood–CSF Barriers in Diabetic Rats. *Mol. Neurobiol.* **54**, 2154–2166 (2017).

65. Bettio, L. E. B., Rajendran, L. & Gil-Mohapel, J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **79**, 66–86 (2017).
66. Santin, K. *et al.* Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res.* **1421**, 1–10 (2011).
67. Dutra, M. F. *et al.* Effects of chronic caloric restriction on kidney and heart redox status and antioxidant enzyme activities in Wistar rats. *BMB Rep.* **45**, 671–676 (2012).
68. Mattson, M. P. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. *Cell Metab.* **16**, 706–722 (2012).
69. Mattson, M. P., Moehl, K., Ghena, N., Schmaedick, M. & Cheng, A. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 81–94 (2018).
70. Stone, V. *et al.* Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. *J. Nutr. Biochem.* **67**, 138–148 (2019).
71. Cheng, A., Hou, Y. & Mattson, M. P. Mitochondria and Neuroplasticity. *ASN Neuro* **2**, AN20100019 (2010).
72. Gonçalves, C.-A. *et al.* Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. *Front. Neurosci.* **12**, 1035 (2019).
73. Kelli, H. M. *et al.* Relation of Changes in Body Fat Distribution to Oxidative Stress. *Am. J. Cardiol.* **120**, 2289–2293 (2017).