

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

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA CRÔNICA EM RATOS WISTAR:
AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX EM TECIDOS PERIFÉRICOS E DE
PARÂMETROS COGNITIVOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS
ENCEFÁLICOS EM MODELO DE DEMÊNCIA**

Márcio Ferreira Dutra

Porto Alegre, janeiro 2013

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

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA CRÔNICA EM RATOS *WISTAR*:
AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX EM TECIDOS PERIFÉRICOS E DE
PARÂMETROS COGNITIVOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS
ENCEFÁLICOS EM MODELO DE DEMÊNCIA**

Márcio Ferreira Dutra

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, janeiro 2013

*O conhecimento e o bom uso do conhecimento
são as chaves para termos uma sociedade
mais justa, igualitária e próspera.*

Agradecimentos

A minha família, pelo apoio e incentivo de sempre. Amo vocês!

Ao *Chefe*, CA ou também conhecido como Prof. Carlos Alberto, obrigado por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação durante esta jornada, pelo bom humor de sempre, pela disponibilidade e pelo exemplo de pessoa, de professor e de pesquisador.

A todas as colegas incríveis do laboratório 33 (LaBS100), em especial àquelas que participaram diretamente da conquista deste trabalho. À Fernanda Hansen, obrigado por sempre me escutar e aconselhar, pela parceria, pelo apoio estatístico e pelo ótimo trabalho em equipe. À Núbia Broetto, Cristiane Batassini e Regina Biasibetti, obrigado por toda a ajuda de sempre, principalmente no manuseio dos nossos “ratinhos”.

À Adriana Vizuite e à Daniela de Souza obrigado pela parceria, pelos ensinamentos e pela paciência. À Patrícia Nardin, obrigado pela ajuda e experiências trocadas. À prof. Marina Leite, obrigado por sempre estar disposta a me ajudar com alguma dúvida.

A todos as colegas do laboratório, obrigado pelo convívio: Maria Cristina Guerra, Caren Bernardi, Ana Tramontina, Krista Wartchow, Caroline Zanotto e Larissa Bobermin.

Obrigado também ao Prof. José Cláudio Moreira por ter aceitado a nossa parceria de trabalho e pelas orientações. Obrigado a querida Ivi Bristot, pela ajuda e amizade.

Obrigado a Prof. Tatiana Montanari e Prof. Simone Marcuzzo, pela amizade, pelo incentivo e apoio de sempre.

À Cléia Bueno, pela eficiência de sempre na secretaria do PPGBioquímica.

Sumário

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
Lista de Abreviaturas	4
1. Introdução	5
1.1. Restrição calórica	5
1.1.1. Breve histórico	5
1.1.2. Conceitos, definições e tipos de RC.....	6
1.1.3. Efeitos gerais da RC	7
1.1.4. Efeitos da RC sobre os rins, coração e fígado	8
1.2. Metabolismo aeróbico	9
1.2.1. Geração de ROS.....	9
1.2.2. Estresse oxidativo.....	9
1.2.3. Defesas antioxidantes.....	10
1.2.4. Marcadores de estresse oxidativo	11
1.3. Doença de Alzheimer e demência	12
1.3.1. Fisiopatologia da doença de Alzheimer	12
1.3.2. Tipos da doença de Alzheimer.....	13
1.4. Modelos animais da doença de Alzheimer	14
1.4.1. Estreptozotocina e doença de Alzheimer	14
1.5. Tipos celulares do SNC	15
1.5.1. Neurônios.....	15
1.5.2. Marcadores neuronais.....	15
1.5.3. Astrócitos.....	16
1.5.4. Marcadores astrocíticos	17
1.6. Efeitos da RC sobre o SNC.....	17
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
PARTE II	20
CAPÍTULO I	21
Effects of chronic caloric restriction in kidney and heart redox status and antioxidant enzymes activities of Wistar rats	21
Artigo publicado no periódico <i>BMB Reports</i>	21
CAPÍTULO II	29
Chronic caloric restriction alters the redox state and non-enzymatic antioxidant defenses in the liver of Wistar rats	29
Artigo a ser submetido	29
CAPÍTULO III	48
Effects of long-term caloric restriction on memory impairment and biochemical and morphological parameters in brain of rats from streptozotocin-induced model of dementia	48
Artigo em preparação	48
PARTE III	74
3. Discussão	75
3.1. Estado nutricional e metabólico	75
3.2. Efeitos da RC sobre os tecidos periféricos	75
3.2.1. Espécies reativas de oxigênio	75

3.2.2.	Marcadores de dano	76
3.2.3.	Defesas antioxidantes não-enzimáticas	78
3.2.4.	Defesas antioxidantes enzimáticas	79
3.2.5.	Possíveis conexões entre as alterações observadas	81
3.2.6.	Considerações sobre os efeitos periféricos da RC	83
3.3.	Restrição calórica e o modelo de demência.....	83
Conclusões	90
Perspectivas	91
Referências Bibliográficas	92

PARTE I

RESUMO

A restrição calórica (RC) é uma dieta caracterizada por redução na quantidade total de calorias consumidas sem que ocorra desnutrição e tem sido associada a efeitos benéficos sobre a saúde, incluindo modulação sobre o estado redox. Alguns estudos têm avaliado os efeitos da RC sobre o sistema nervoso central, especialmente na senescência e em condições neurodegenerativas. Entretanto, devido a dados inconsistentes e/ou controversos da literatura, novos estudos são necessários para ampliar o conhecimento no tema e consolidar mecanismos de ação da RC. No presente trabalho investigou-se os efeitos de 30% de RC crônica em ratos *Wistar* machos na fase adulta, totalizando 17 semanas, em dois contextos experimentais. No primeiro, avaliou-se os efeitos da RC crônica sobre parâmetros relacionados ao estado redox e ao dano celular e sobre defesas antioxidantes não-enzimáticas e enzimáticas em rim, coração e fígado. Demonstrou-se que a RC crônica causou um aumento significativo na atividade da catalase no rim, na carbonilação de proteínas no coração e no conteúdo de glutatona (GSH) no fígado, além de reduzir a geração de espécies reativas (ER) hepáticas. No segundo contexto experimental avaliou-se o possível efeito neuroprotetor da RC crônica sobre parâmetros cognitivos, bioquímicos e morfológicos no córtex cerebral frontal, no hipocampo e no estriado, mediante modelo de demência por infusão intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ). Demonstrou-se que a RC crônica melhorou todos os parâmetros da memória de referência avaliados através do teste do labirinto aquático de Morris. No córtex cerebral frontal, a RC e a infusão ICV de STZ causaram uma redução na geração de ER sem alterar os outros parâmetros. No hipocampo, a STZ causou uma diminuição significativa no conteúdo da GSH e da proteína sinaptofisina (SYN), sendo que a RC foi capaz de prevenir e/ou reverter a diminuição de GSH. Ainda a RC *per se* aumentou a geração de ER. As imagens obtidas com a microscopia confocal revelaram redução na imunoreatividade da SYN e aumento da imunoreatividade da GFAP no hipocampo dos animais submetidos à infusão ICV de STZ. No estriado, tanto a RC como a STZ causaram uma diminuição do conteúdo de GSH, sem alterar os outros parâmetros. Concluiu-se que a RC crônica é capaz de modular o estado redox em diferentes tecidos periféricos, entretanto, os efeitos da RC são tecido-específico, ou seja, podem variar dependendo do tipo de tecido estudado. Além disso, concluiu-se que a RC crônica é capaz de prevenir e/ou recuperar os prejuízos cognitivos e as alterações hipocampais encontradas no modelo de demência induzido por STZ.

ABSTRACT

The caloric restriction (CR) diet is characterized by a reduction in the quantity of calories consumed without the occurrence of malnutrition. It has been associated with beneficial health effects, including modulation of the redox status. Studies have evaluated the effects of CR on central nervous system, particularly in aging and neurodegenerative conditions. However, due to inconsistent and/or controversial literature, further studies are needed to increase the knowledge and consolidate mechanisms of CR action. It was investigated the effects of 30% of chronic CR in adult male Wistar rats followed by 17 weeks, in two experimental contexts. At first, it was evaluated the effects of chronic CR on parameters related to oxidative status and oxidative damage and also on non-enzymatic and enzymatic cellular antioxidant defenses in the kidney, heart and liver. Chronic CR caused a significant increase in catalase activity in kidney, in protein carbonylation in heart and in glutathione (GSH) content in liver, and it caused a significant decrease in generation of reactive species (RS) in the liver. In the second experimental context, it was evaluated the effects of chronic CR on cognitive parameters and on biochemical and morphological changes in frontal cerebral cortex, hippocampus and striatum in model of dementia induced by intracerebroventricular (ICV) infusion of streptozotocin (STZ). Chronic CR was able to improve all deficits of reference memory assessed by the Morris water maze test. In the frontal cerebral cortex, CR and ICV infusion of STZ decreased RS generation without affecting other parameters. In the hippocampus, STZ decreased GSH and synaptophysin (SYN) contents. CR was able to prevent and/or revert the decrease in GSH content and it also has a *per se* effect in increasing RS generation. Images from confocal microscopy showed a reduction in SYN expression and an increase in GFAP expression in the hippocampus of rats submitted to ICV infusion of STZ. In the striatum, both CR and STZ decreased GSH levels without altering other parameters. In summary, chronic CR was able to modulate the redox state in various peripheral tissues, however, the effects of CR are tissue-specific, i.e, may vary depending on the type of tissue studied. The main conclusion is that chronic CR is able to prevent and/or revert cognitive impairments and hippocampal alterations in the animal model of dementia induced by STZ.

Lista de Abreviaturas

AD = *ad libitum*

CAT = catalase

DA = doença de Alzheimer

DCF = diclorofluoresceína

DCFH-DA = 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína

GFAP = proteína glial fibrilar ácida

GSH = glutationa

ER= espécies reativas

ICV = intra-cérebro-ventricular

MDA = malondialdeído

NeuN= proteína nuclear neuronal

RC = restrição calórica

ROS = espécies reativas de oxigênio

Sham-AD= Sham *ad libitum*

Sham-RC= Sham restrição calórica

-SH = grupos tióis

STZ-AD= estreptozotocina *ad libitum*

STZ-RC= estreptozotocina restrição calórica.

SNC = sistema nervoso central

SOD = superóxido dismutase

STZ = estreptozotocina

SYN= sinaptofisina

TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. Introdução

1.1. Restrição calórica

1.1.1. Breve histórico

Ao longo da história da humanidade, as manipulações dietéticas (ou alimentares) são as formas mais antigas e comuns de intervenção sobre o organismo como um todo, sendo utilizadas com diferentes finalidades, desde por seus efeitos sobre a saúde, bem como por seus efeitos estéticos. Numerosas sociedades reconheceram os efeitos benéficos para a saúde e o bem estar geral da ingestão limitada de alimentos por certos períodos de tempo. Além disso, restrições alimentares também são praticadas por motivos religiosos ou em épocas de escassez de comida, como em guerras ou em alterações climáticas extremas (Roth e Polotsky, 2012).

O estudo científico aceito como o pioneiro a demonstrar que a restrição calórica (RC) pode aumentar a expectativa média e a máxima de vida, além de prevenir ou atenuar a severidade de doenças crônicas em ratos, foi publicado somente em 1935 (McCay *et al.*, 1989). Entretanto, a idéia de que a restrição da quantidade de alimento consumido traz benefícios para a saúde e assim aumente a expectativa de vida é muito mais antiga. Os primeiros relatos são de um nobre italiano chamando Luigi Cornaro, nascido em 1464. Ele viveu uma vida de excessos até a idade dos 35 anos, mas por conselho de um médico, Cornaro adotou uma existência frugal, a qual ele propôs em quatro livros pequenos, ou discursos, escritos quando ele tinha entre 83 e 95 anos e intitulados “*La vita sobria*” (Cornaro, 1917). A idéia de comer “o menos possível” preconizada por Cornaro parece ter feito bem a ele, uma vez que Cornaro viveu até os 102 anos, enquanto que a expectativa média de vida na Europa nesta época era menor do que 30 anos de idade (Leon, 2011).

Estudos experimentais investigando os efeitos da RC em animais iniciaram-se a partir do começo do século XX. Por exemplo, foi demonstrado que restringir a ingestão de alimento em ratos tem efeitos positivos na expectativa de vida e também no desempenho reprodutivo na vida adulta (Osborne *et al.*, 1917). Assim, McCay tido como o autor a primeiro publicar sobre RC, foi precedido pelo menos em 400 anos por evidências publicadas por Cornaro sobre os efeitos da RC em humanos e precedido também por 20 anos em experimentação similar (Speakman e Mitchell, 2011).

1.1.2. Conceitos, definições e tipos de RC

A RC é definida como uma redução no total de calorias consumidas, sem deficiência de nutrientes essenciais. Assim, animais submetidos a um programa de RC são aqueles que têm acesso a uma quantidade restrita de calorias, ou seja, a quantidade de alimento ingerido é menor do que aquela que o animal seria capaz de ingerir até ficar completamente saciado. Animais do grupo controle são aqueles que têm acesso livre a comida e são chamados de animais alimentados *ad libitum* (AD), ou seja, são aqueles que têm comida disponível em quantidade suficiente ou maior para saciar completamente o desejo de comer (Speakman e Mitchell, 2011).

A restrição pode ser feita de duas maneiras, ou controlando-se a quantidade de alimento fornecido, ou através da manipulação dos componentes da dieta. Os estudos conduzidos sobre RC têm utilizado a diminuição da quantidade de alimento sem manipular a quantidade e/ou qualidade calórica das dietas. Vale ressaltar que a RC não pode ser acompanhada de nenhum grau de desnutrição (Speakman e Mitchell, 2011).

Os protocolos que utilizam a RC como intervenção podem ser de dois tipos, levando em conta a administração da dieta: 1. Restrição contínua, aquela aplicada todos os dias do período experimental, com uma determinada quantidade de calorias (ou alimento) e 2. Dieta intermitente, administrado “dia sim, dia não” (em inglês,

intermittent fasting), na qual os animais são alimentados num dia com ração *ad libitum*, e no dia seguinte são privados de alimentação, alternando esses dias consecutivamente (Speakman e Mitchell, 2011).

Nos estudos sobre RC contínua utilizada em diferentes linhagens de ratos e camundongos, a redução na ingesta de alimento costuma variar entre 30% e 50% em relação ao grupo AD (Masoro, 2009). Os estudos que adotam uma RC de 40% ou mais, utilizam suplementação vitamínica e mineral para garantir uma ingesta de nutrientes equivalente a do grupo AD (Forster *et al.*, 2000, Sohal *et al.*, 1994, Anderson *et al.*, 2009).

1.1.3. Efeitos gerais da RC

Muitos estudos foram feitos com o objetivo de compreender os efeitos benéficos de uma redução na ingesta de calorias. Entretanto, apesar dos resultados serem promissores, ainda não há consenso sobre os exatos mecanismos através dos quais a RC exerce seus efeitos (Roth e Polotsky, 2012, Pallavi *et al.*, 2012, Fontana *et al.*, 2010, Longo e Finch, 2003).

Durante os anos de pesquisas avaliando os efeitos da RC, tem sido demonstrado que a mesma está associada a notáveis benefícios para saúde, como exercer efeitos opostos àqueles associados a doenças como câncer, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e autoimunes, além de aumentar a expectativa de vida de diversas espécies, como em leveduras, vermes, moscas, roedores, peixes e, possivelmente, até primatas (Speakman e Mitchell, 2011, Fontana *et al.*, 2010, Colman *et al.*, 2009, Masoro, 2009, Antebi, 2007). Entretanto, em humanos os efeitos da RC ainda não estão completamente esclarecidos (Roth e Polotsky, 2012, Ingram *et al.*, 2006, Heilbronn e Ravussin, 2003).

Hipóteses têm sido propostas para explicar os efeitos da RC sobre o metabolismo celular. Algumas das hipóteses sugerem que a redução da gordura corporal e modulação da via da insulina e da via semelhante à insulina são os principais mecanismos pelos quais a RC exerce seus potenciais efeitos benéficos (Speakman e Mitchell, 2011, Fontana *et al.*, 2010).

Outra hipótese sugere que os efeitos benéficos da RC são devidos principalmente a uma redução do estresse oxidativo nos tecidos. De acordo com esta hipótese, e como alguns resultados demonstram, a RC pode exercer seus efeitos através da modulação do estado redox nos tecidos e/ou modulação das defesas antioxidantes, resultando em um menor estado de dano oxidativo (Ash e Merry, 2011, Merry, 2004, Sohal e Weindruch, 1996).

1.1.4. Efeitos da RC sobre os rins, coração e fígado

Os rins são os órgãos responsáveis pela formação da urina, atuando na excreção de toxinas e na regulação de vários sistemas corporais, como o estado de volume intra e extracelulares, o equilíbrio ácido-básico. Além disso, a principal função hormonal dos rins é influenciar a pressão sanguínea, o metabolismo do cálcio e a proliferação de hemácias (Gueutin *et al.*, 2012).

O coração é o órgão central do sistema cardiovascular e tem a função vital de bombear o sangue através do corpo (Gavaghan, 1998). O fígado é um órgão vital, o qual possui um papel central na homeostase metabólica e tem uma ampla gama de funções, incluindo detoxificação e síntese de proteínas plasmáticas (Ramadori *et al.*, 2008).

Os efeitos de diferentes protocolos de RC sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e defesas antioxidantes, além de outras avaliações em órgãos como os rins, coração e fígado, têm sido investigados por grupos de pesquisa, tanto em ratos (Ramadori *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2008, Ugochukwu e Figgers, 2007, Colotti *et al.*,

2005, Lambert e Merry, 2005, Judge *et al.*, 2004), como em camundongos (Forster *et al.*, 2000, Sohal *et al.*, 1994, Cadenas *et al.*, 1994, Simonetti *et al.*, 1990). Entretanto, embora haja concordância entre alguns resultados, muitos ainda são controversos, sendo necessários mais estudos para compreender exatamente os efeitos biológicos e mecanismos de ação da RC.

1.2. Metabolismo aeróbico

1.2.1. Geração de ROS

Nas células dos organismos aeróbicos a geração de espécies reativas, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), é um processo normal e resulta do próprio metabolismo celular. Além disso, as ROS participam em vários processos fisiológicos, como na sinalização celular, modulando diferentes vias de sinalização redox-sensíveis (Forman *et al.*, 2010, Burhans e Heintz, 2009).

Dentre as espécies reativas, um radical livre é qualquer espécie química que possua um ou mais elétrons desemparelhados em seu último orbital. O radical livre que ocorre mais comumente em sistemas biológicos é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é produzido quando uma molécula de oxigênio (O_2) é reduzida parcialmente, ou seja, quando recebe apenas um elétron (Halliwell, 2007).

1.2.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e as defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), com consequente aumento das espécies reativas sem que o sistema de antioxidantes consiga contrabalancear tal aumento (Halliwell, 2007). O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O H_2O_2

formado, reagindo com metais de transição como Fe^{+2} e Cu^{+1} , pode gerar o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), na denominada reação de Fenton (Halliwell, 2007).

Assim, em condições de elevada geração espécies reativas, como as ROS, as mesmas podem reagir com diferentes macromoléculas biológicas as quais sofrem prejuízo de função, contribuindo para o estabelecimento de estresse oxidativo, o qual está envolvido com o declínio de função celular, patogênese de muitas doenças e senescência (Halliwell, 2007, Nordberg e Arner, 2001).

1.2.3. Defesas antioxidantes

Para proteger-se dos efeitos deletérios de subprodutos do próprio metabolismo celular, como as ROS, e também em condições de estresse oxidativo, as células possuem um efetivo sistema de defesa antioxidante endógeno, com componentes enzimáticos e não enzimáticos. Entre as defesas enzimáticas, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são duas importantes enzimas essenciais para a defesa celular contra danos oxidativos. A SOD converte o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 , o qual é convertido em $2\text{H}_2\text{O}$ e O_2 pela CAT. Juntas estas enzimas fazem parte do maior sistema enzimático que protege as células contra o dano causado por radicais livres (Halliwell, 2007, Nordberg e Arner, 2001).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, os tióis são compostos orgânicos caracterizados pela presença de grupos tióis ($-\text{SH}$) em suas estruturas. Tióis de baixo peso molecular são componentes celulares fundamentais, envolvidos em numerosos processos fisiológicos e patológicos (Di Simplicio *et al.*, 2003, Sen, 1998). A glutatona em sua forma reduzida (GSH) é o mais abundante antioxidante intracelular tiólico, prevalente em concentrações milimolares em todas as células aeróbicas (Nordberg e Arner, 2001). Assim, os grupos $-\text{SH}$ representam a primeira linha de defesa não

enzimática para proteger as células contra o estresse oxidativo (Di Simplicio *et al.*, 2003).

1.2.4. Marcadores de estresse oxidativo

Como mencionado, o aumento das espécies reativas pode causar danos a macromoléculas como lipídios e proteínas, levando a disfunção de componentes celulares. Neste contexto, o nível de malondialdeído (MDA, do inglês *malondialdehyde*), originado a partir de reações oxidativas em lipídios de membrana, tem sido usado como marcador de dano lipídico, ou lipoperoxidação, e mensurado pelo teste das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive species*) (Draper e Hadley, 1990).

Também, os níveis de proteínas carboniladas, as quais são originadas por oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina, têm sido frequentemente usados como marcador de modificações oxidativas em proteínas e a presença de grupos carbonis tem associado a oxidação de proteínas com o estresse oxidativo e algumas doenças (Requena *et al.*, 2001, Berlett e Stadtman, 1997). Ainda, o conteúdo de grupos -SH têm sido usado como um avaliador do estado/estresse oxidativo (Di Simplicio *et al.*, 2003, Ellman, 1959).

A produção intracelular de ROS pode ser detectada utilizando-se o composto não fluorescente 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, do inglês *dichlorofluorescein diacetate*) o qual é permeável a membrana celular. O DCFH-DA é hidrolisado pelas esterases intracelulares tornando-se diclorofluoresceína não fluorescente (DCFH), a qual é então oxidada pela ação de espécies reativas intracelulares gerando o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (De Almeida *et al.*, 2008).

1.3. Doença de Alzheimer e demência

A doença de Alzheimer (DA) é causa mais comum de demência, causando progressiva e permanente perda da função intelectual. Pacientes afetados por esta doença apresentam esquecimento que progride para uma perda irreversível de memória. Geralmente a DA é diagnosticada após 65 anos de idade, com uma prevalência de 5% na população acima desta faixa etária e chegando a 20% acima dos 85 anos (Nowotny *et al.*, 2001). Demência é um sério e crescente problema de saúde pública, tendo como característica clínica principal um progressivo declínio em funções cognitivas, devido ao acometimento de regiões encefálicas corticais e subcorticais além do que poderia se esperar do envelhecimento natural (Ritchie e Lovestone, 2002).

1.3.1. Fisiopatologia da doença de Alzheimer

A avaliação neuropatológica, realizada através de autópsia, revela a presença de duas características histológicas no sistema nervoso central (SNC) de pacientes com DA: as placas senis e os emaranhados neurofibrilares (Nowotny *et al.*, 2001). As placas são depósitos extracelulares insolúveis, compostas principalmente de β -amilóide, um peptídeo que pode ter de 40 a 43 aminoácidos, formado a partir da proteólise da proteína precursora β -amilóide. Os emaranhados neurofibrilares são depósitos intracelulares da proteína *tau* hiperfosforilada, a qual se presume que seja uma das proteínas fundamentais para o transporte celular e crescimento axonal (Nowotny *et al.*, 2001).

Embora o papel das placas e emaranhados neurofibrilares não esteja ainda precisamente esclarecido, são encontrados em grandes quantidades nas regiões encefálicas mais afetadas na doença de Alzheimer, principalmente hipocampo, córtex parieto-occipital, córtex temporal e córtex frontal (Fig.1). O hipocampo, o qual possui um papel central no estabelecimento e manutenção da memória, apresenta as mudanças

mais precoces na DA, com grande concentração de placas e emaranhados neurofibrilares. Estes achados correspondem aos iniciais e progressivos sintomas de perda de memória (Nowotny *et al.*, 2001).

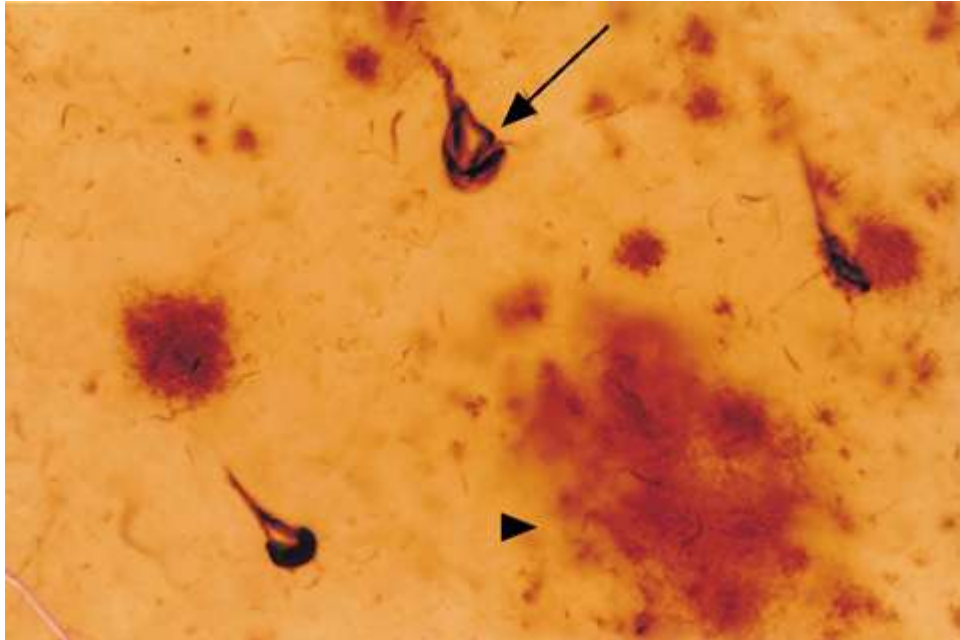


Fig. 1 - Micrografia óptica da neuropatologia da doença de Alzheimer. Secção do córtex de paciente com doença de Alzheimer mostrando emaranhados e placas. O emaranhado intraneuronal (seta) está corado de marrom escuro com um anticorpo que especificamente reconhece filamentos helicoidais pareados. Estes filamentos também são vistos como material marrom denso (processos distróficos) embebido na placa extracelular (cabeça de seta). A coloração levemente avermelhada da placa é de outro anticorpo dirigido especificamente contra o b-amilóide. Fonte: Nowotny *et al.*, 2001.

1.3.2. Tipos da doença de Alzheimer

A DA é geralmente diagnosticada após os 65 anos de idade, sendo referida como DA de início tardio. A condição afeta 5% da população acima dos 65 anos e mais de 20% da população acima dos 85 anos (Nowotny *et al.*, 2001).

Apenas 10% de todas as pessoas diagnosticadas com DA desenvolvem sintomas antes dos 65 anos de idade, sendo estes casos denominados como DA de início precoce. Aproximadamente 10% dos casos de início precoce têm a forma familiar da doença, a qual é transmitida de forma autossômica dominante. Mutações em três genes (proteína percursora β -amilóide, presenilina 1 e presenilina 2) causam a maioria dos casos familiares da DA. Entretanto, a grande maioria dos casos não é claramente transmitida como traços herdados. Muitos casos de início precoce e tardio geralmente ocorrem esporadicamente ou com agregação familiar que não tem um padrão claro de herança mendeliana (Nowotny *et al.*, 2001)

Os diferentes tipos de DA são difíceis de distinguir clinicamente e patologicamente. Assim, o aparecimento da DA pode representar uma via comum da neurodegeneração, a qual pode ser iniciada por um de vários fatores distintos, incluindo mutações genéticas simples ou uma combinação de fatores genéticos e ambientais. (Nowotny *et al.*, 2001)

1.4. Modelos animais da doença de Alzheimer

Embora as causas exatas da DA permaneçam não esclarecidas, muitos possíveis fatores de risco e alterações patológicas têm sido utilizados para a elaboração de modelos desta doença, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Modelos animais incluem a hipoperfusão cerebral crônica (Vicente *et al.*, 2009), infusão intra-cérebro-ventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ, do inglês *streptozotocin*) (Biasibetti *et al.*, 2013, Tramontina *et al.*, 2011, Rodrigues *et al.*, 2009, 2010) e lesão do núcleo magnocefalular basal (Swarowsky *et al.*, 2008).

1.4.1. Estreptozotocina e doença de Alzheimer

Anormalidades drásticas na glicose e no metabolismo energético cerebral têm sido demonstradas na DA do tipo esporádica, o que aponta para um distúrbio primário

na insulina neuronal e na transdução do sinal do receptor da insulina, contribuindo para a causa de demência. O composto STZ é conhecido por inibir a função do receptor da insulina. Ratos que receberam uma dose de STZ, administrada ICV, desenvolveram duradouros e progressivos prejuízos no aprendizado, na memória e no comportamento cognitivo, indicados pela diminuição no trabalho e memória de referência na tarefa de tábua com orifícios e na esQUIVA inibitória, concomitantemente com prejuízo energético cerebral (Lannert e Hoyer, 1998) e também no labirinto aquático de Morris (Grunblatt *et al.*, 2007).

1.5. Tipos celulares do SNC

As células constituintes do SNC podem ser agrupadas em dois grandes grupos, as células neuronais (ou neurônios) e as células da glia (ou células gliais), caracterizadas por possuírem funções, formas, tamanhos e localizações diferentes.

1.5.1. Neurônios

Existem vários tipos de neurônios no SNC, os quais podem ser classificados de acordo com sua forma, com o tipo de neurotransmissor que utilizam e sua localização histológica. Seus tipos variam também entre as regiões encefálicas, e basicamente os neurônios são as células responsáveis pela transmissão do impulso nervoso (Emes e Grant, 2012).

1.5.2. Marcadores neuronais

Os terminais axonais pré-sinápticos dos neurônios que estabelecem sinapse possuem alta quantidade de sinaptofisina, uma proteína do tipo integral de membrana sendo uma das principais proteínas de vesículas sinápticas. Está envolvida com o tráfego de vesículas, no ancoramento e fusão das vesículas sinápticas com a membrana

pré-sináptica e na secreção de neurotransmissores (Greengard *et al.*, 1993, Iwamoto *et al.*, 2004)), todos processos celulares de alta complexidade (Tripathi *et al.*, 2008). Assim, diferenças na imunorreatividade para sinaptofisina podem refletir mudanças no número de vesículas sinápticas e tem sido utilizada como um marcador da densidade sináptica, bem como um marcador para desordens de conectividade sináptica em muitas doenças do SNC (Masliah *et al.*, 2001).

1.5.3. Astrócitos

Dentre as células gliais, os astrócitos são as que estão presentes em maior número. Os astrócitos liberam fatores neurotróficos e citocinas, orientam o desenvolvimento neuronal, direcionam o crescimento dos axônios, regulam o metabolismo dos neurotransmissores e os níveis de íons extracelulares (Fig. 2) (Wang e Bordey, 2008, Dong e Benveniste, 2001).

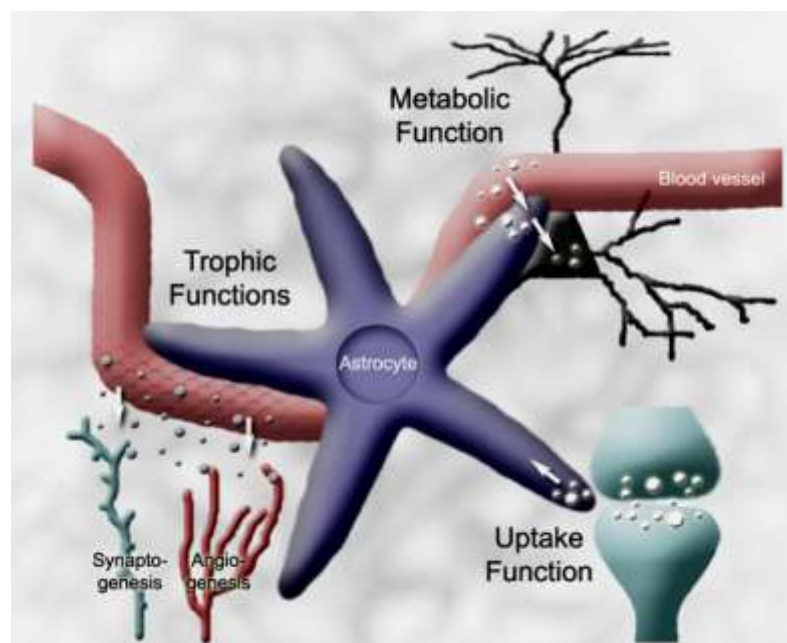


Fig. 2 - As funções bem estabelecidas. Os astrócitos têm várias funções homeostáticas, mantendo um ambiente viável no sistema nervoso para os neurônios. Estas funções incluem: (1) prover apoio metabólico para os neurônios, (2) captação de potássio e

neurotransmissores, (3) sinaptogênese, angiogênese e manutenção da barreira hematoencefálica. Fonte: Wang e Bordey, 2008.

1.5.4. Marcadores astrocíticos

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é a principal proteína de filamentos intermediários de 8-9 nm de diâmetro em astrócitos maduros no SNC, apresentado a função de modular a estabilidade estrutural dos processos astrocíticos. Esta proteína apresenta uma atividade dinâmica modulada por fosforilação e defosforilação, efetuando um papel fundamental na plasticidade astrocítica (Rodnight *et al.*, 1997). Seu estado de fosforilação é regulado, dentre outros fatores, pela proteína S100B (Ziegler *et al.*, 1998).

O fator trófico S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida e secretada principalmente por astrócitos no SNC, possuindo atividade trófica sobre neurônios e células gliais (Van Eldik e Wainwright, 2003). Durante o desenvolvimento do encéfalo, e após ativação glial aguda, a proteína S100B atua como fator neurotrófico e proteína de sobrevivência neuronal. Por outro lado, a superprodução de S100B pela ativação glial pode contribuir com o processo de neuroinflamação e de disfunção neuronal. Esta dualidade suporta o potencial da S100B como um biomarcador de dano encefálico, o que implica a ativação glial como um possível alvo no tratamento de desordens agudas e crônicas do SNC (Van Eldik e Wainwright, 2003). Além disso, os níveis de S100B no soro e no líquido cefalorraquidiano têm sido utilizados como marcador de dano encefálico (Rothermundt *et al.*, 2003).

1.6. Efeitos da RC sobre o SNC

Estudos recentes indicam que a RC pode proteger o SNC de doenças relacionadas ao envelhecimento, ou seja, pode prevenir o surgimento de sintomas e de sinais

associados com doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Mattson, 2008).

Embora os mecanismos neurobiológicos responsáveis pelos efeitos da RC sobre o SNC não estejam ainda completamente esclarecidos, estudos recentes sugerem que a RC regula células-tronco neuronais adultas, aumenta a neurogênese em ratos adultos jovens, e reduz o declínio relacionado à idade da neurogênese em ratos senis (Levenson e Rich, 2007).

Além disso, estudos sobre o papel da RC no SNC indicam que os efeitos anti-envelhecimento estão relacionados com a estimulação de neurogênese em adultos e a diminuição da expressão de genes relacionados com a inflamação e com a resposta ao estresse, protegendo o SNC de patologias crônicas e agudas (Contestabile e Ciani, 2004).

Diante do exposto, fica evidente que novos estudos investigando os efeitos da RC sobre tecidos periféricos e encefálicos são necessários, especialmente aqueles relacionados ao estado oxidativo. Além disso, os efeitos em modelos de demência também são de alta relevância para que se possa aumentar o conhecimento sobre as alterações neurogliciais e rotas de sinalização envolvidas, bem como para o estabelecimento de estratégias terapêuticas neuroprotetoras.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da RC sobre o estado redox em tecidos periféricos e sobre parâmetros cognitivos, bioquímicos e morfológicos encefálicos em modelo animal de demência.

2.2. Objetivos Específicos

A) Avaliar os efeitos da RC crônica sobre parâmetros relacionados ao estado oxidativo (geração de ROS), ao dano tecidual (carbonilação de proteínas e níveis de malondialdeído) e sobre defesas antioxidantes não-enzimáticas (conteúdo de grupos tióis e conteúdo de GSH) e enzimáticas (atividades da SOD e CAT), nos rins, no coração e no fígado;

B) Investigar os efeitos da RC sobre parâmetros cognitivos relacionados à memória espacial e sobre parâmetros bioquímicos (geração de ROS, conteúdo de GSH e de sinaptofisina) e morfológicos (microscopia confocal para sinaptofisina e GFAP) em modelo animal de demência induzida pela infusão ICV de STZ;

C) Avaliar os efeitos da RC e da infusão ICV de STZ sobre o ganho de peso corporal dos animais e sobre parâmetros bioquímicos séricos e líquóricos.

PARTE II

CAPÍTULO I

Effects of chronic caloric restriction in kidney and heart redox status and antioxidant enzymes activities of Wistar rats

Artigo publicado no periódico *BMB Reports*

Effects of chronic caloric restriction on kidney and heart redox status and antioxidant enzyme activities in Wistar rats

Márcio Ferreira Dutra^{*}, Ivi Juliana Bristot, Cristiane Batassini, Níbia Broetto Cunha, Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete, Daniela Fraga de Souza, José Cláudio Fonseca Moreira & Carlos-Alberto Gonçalves

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

Caloric restriction (CR) has been associated with health benefits and these effects have been attributed, in part, to modulation of oxidative status by CR; however, data are still controversial. Here, we investigate the effects of seventeen weeks of chronic CR on parameters of oxidative damage/ modification of proteins and on antioxidant enzyme activities in cardiac and kidney tissues. Our results demonstrate that CR induced an increase in protein carbonylation in the heart without changing the content of sulfhydryl groups or the activities of superoxide dismutase and catalase (CAT). Moreover, CR caused an increase in CAT activity in kidney, without changing other parameters. Protein carbonylation has been associated with oxidative damage and functional impairment; however, we cannot exclude the possibility that, under our conditions, this alteration indicates a different functional meaning in the heart tissue. In addition, we reinforce the idea that CR can increase CAT activity in the kidney. [BMB Reports 2012; 45(11): 671-676]

INTRODUCTION

Caloric restriction (CR), a reduction in total calories intake without essential nutrient deficiency, has been shown to exert opposing effects in association with many diseases such as cancer, diabetes, obesity, cardiovascular and autoimmune diseases (1-3). The reduction in food intake used in different rat and mouse strains usually ranges from 30 to 50% below the level of control *ad libitum* (AD) (4). In humans, although there are few results available, CR provides sustained beneficial effects that may reduce insulin resistance, obesity, inflammation, oxidative stress and left ventricular diastolic dysfunction (5). At the cellular level, the basic mechanism proposed to explain

the benefits of CR is that resistance to oxidative and metabolic insults occurs as a response to the cellular stress caused by reduced calorie availability to cells (1, 6). For example, CR has been shown to modulate free radical metabolism in the liver of aging rats (7).

Pro-oxidant molecules, such as reactive oxygen species (ROS), result from normal cellular metabolism and have a role in many physiological processes, such as cellular signaling (8, 9). However, in conditions of imbalance between oxidant agents and antioxidant defenses, the phenomenon of oxidative stress occurs, which is involved in cellular function decline, the pathogenesis of many diseases and the aging process (10). In this context, protein carbonylation, which occurs by oxidation of lysine, arginine, proline and threonine residues, has been used frequently as a marker for the oxidative modification of proteins, and the presence of carbonyl groups has been associated with protein, oxidative stress and some diseases (11, 12).

To protect against the deleterious effects of oxidative by-products of normal cellular metabolism, and also under conditions of oxidative stress, cells have an effective endogenous system of defense. Non-enzymatic thiols are very active organic compounds characterized by the presence of -SH (thiol) groups in their structures. Low molecular-mass thiols are critical cellular components involved in numerous physiological and pathological processes, as well as in the metabolism and homeostasis (13). The -SH groups represent the first line of non-enzymatic cellular protection against oxidative stress in cells (14). In addition, two important enzymes are essential for cellular defense against oxidative insults, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD is an enzyme that converts the superoxide radical into hydrogen peroxide (H_2O_2), which is converted to $2H_2O$ and O_2 by CAT. Together SOD and CAT are part of the major enzymatic system to protect the cells against free radical damage (10).

Investigations about the changes of oxidative parameters induced by CR were reported from many tissues, particularly liver and brain (e.g. 6, 15). Our group has focused on brain effects (16, 17). However, the effects of CR in oxidative alterations in proteins and enzymatic activities in different tissues are still controversial.

The aim of the current study was to evaluate the effect of seventeen weeks of CR on carbonyl levels, -SH content and on

^{*}Corresponding author. Tel: +55-51-3308-5566; Fax: +55-51-3308-5540; E-mail: marciodutra5@yahoo.com.br
<http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.11.094>

Received 2 May 2012, Revised 13 July 2012, Accepted 30 July 2012

Keywords: Carbonylation, Dietary reduction, Food intake, Oxidative stress

SOD and CAT activities in heart and kidney of Wistar rats, organs that are centrally involved in the regulation of circulatory and ionic homeostasis.

RESULTS

Our results demonstrating weight gain showed that, at the end of experiment, the CR rats (368 ± 14 g) had an approximately 28% reduction in body weight gain, when compared to AD rats (450 ± 17 g, $P = 0.001$), as illustrated in Fig. 1. In addition, as shown in Table 1, no significant differences were observed between AD and CR rats in biochemical serum parameters, such as glucose, total protein, albumin, urea, creatinin, HDL cholesterol and triacylglycerol. However, total cholesterol showed a significant 20% reduction in CR rats, when compared to AD rats.

We observed no significant change in the total content of carbonyl groups in the kidney after CR (AD = 0.027 ± 0.002 ; CR = 0.032 ± 0.002 nmol carbonyl/mg protein, $P = 0.118$), as shown in Fig. 2A. Interestingly, our results for the heart tissue (Fig. 2A) indicate that chronic CR induces a significant increase in carbonyl group content (0.009 ± 0.0005 nmol carbonyl/mg protein) when compared to carbonyl group content for the AD diet (0.006 ± 0.0007 nmol carbonyl/mg protein, $P = 0.001$). No difference was found in the total -SH content in the kidney tissue (AD = 3.06 ± 0.1 ; CR = 3.28 ± 0.1 μ mol SH/mg protein, $P = 0.111$; Fig. 2B) and no difference was observed in the heart tissue (AD = 2.7 ± 0.1 ; CR = 2.7 ± 0.1 μ mol SH/mg protein, $P = 0.755$; Fig. 2B).

As shown in Fig. 3A, no changes were observed in the SOD activity in the kidney tissue (AD = 6.5 ± 0.5 ; CR = 5.9 ± 0.5 U SOD/mg protein, $P = 0.43$), as well as in the heart tissue (AD = 4.4 ± 0.4 ; CR = 5.5 ± 0.6 U SOD/mg protein, $P = 0.158$). On the other hand, our results showed that CR increased CAT activity in the kidney (34 ± 2 , U CAT/mg pro-

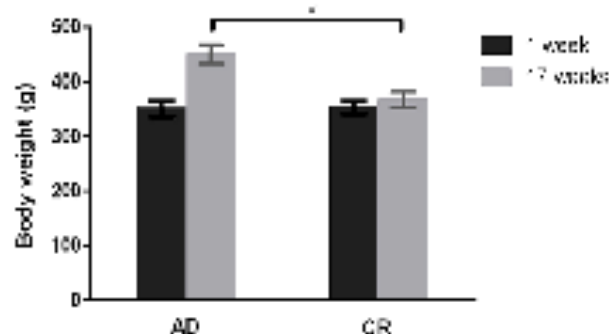


Fig. 1. Body weight at the first and seventeen weeks after ad libitum (AD) and caloric restriction (CR) diets. The results showed that the AD rats ($n = 10$) had an approximately 32% increase in body mass gain and that the CR rats ($n = 10$) had an approximately 2% increase in body mass gain at the end of experimental period. *Significant different ($P = 0.001$, Student's *t*-test). Data are mean \pm S.E.M.

tein), as compared to the AD diet (23 ± 4 U CAT/mg protein, $P = 0.021$; Fig. 3B). Furthermore, in the heart (Fig. 3B), CAT activity was not altered by CR (6 ± 0.4 U SOD/mg protein), as compared to the AD diet (6 ± 0.4 U SOD/mg protein, $P = 0.331$).

DISCUSSION

For weight gain analyses, we monitored the animals' weights weekly; after seventeen weeks, the rats submitted to the CR showed a significant 28% reduction in body weight gain, when compared to AD rats. This result is in agreement with recently data published by our research group, in which twelve weeks of CR result in a 27% reduction in body weight gain (16), suggesting a good reproducibility of this model of CR.

We performed biochemical serum analyses to assess the nutritional and the metabolic status of rats under AD or CR diets at the end of the experimental period. No significant differences were observed between AD and CR animals in serum parameters evaluated, indicating a good health state and adequate nutrition of all animals. However, CR caused a significant reduction in total cholesterol and this data is in agreement with previous results (16).

To evaluate the parameter of oxidative damage/modification of proteins, we measured the content of carbonyl groups in the kidney and heart tissues of rats submitted to AD and CR diets. Our results demonstrated that chronic CR did not alter protein carbonylation in the kidney. Furthermore, Sohal and colleagues (1994) compared AL and CR mice at nine, seventeen and twenty-three months of age and found that protein carbonyl content in the kidney and heart increased with age and was significantly reduced by CR in both tissues at each of the three ages (18). In addition, CR was found to reduce the protein carbonylation in the kidney of rats (19).

Interestingly, our results in heart tissue indicated that chronic CR induces a significant increase in carbonyl group content. This data is in agreement with those of a previous study, in which short-term CR (two months) caused a significant in-

Table 1. Serum biochemistry

	AD	CR	P value
Glucose (mg/dl)	101 ± 6	109 ± 5	0.286
Total protein (g/dl)	6.2 ± 0.1	6.0 ± 0.1	0.103
Albumin (g/dl)	2.7 ± 0.02	2.8 ± 0.03	0.106
Urea (mg/dl)	61 ± 5	65 ± 3	0.503
Creatinin (mg/dl)	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.07	0.237
Cholesterol (mg/dl)	80 ± 4	$64 \pm 3^*$	0.009
HDL (mg/dl)	32 ± 3	30 ± 2	0.633
Triacylglycerol (mg/dl)	50 ± 6	61 ± 7	0.270

Data are expressed as mean \pm standard error of mean ($n = 8-10$ for each group). *Significantly different from AD by Student's *t*-test ($P = 0.01$).

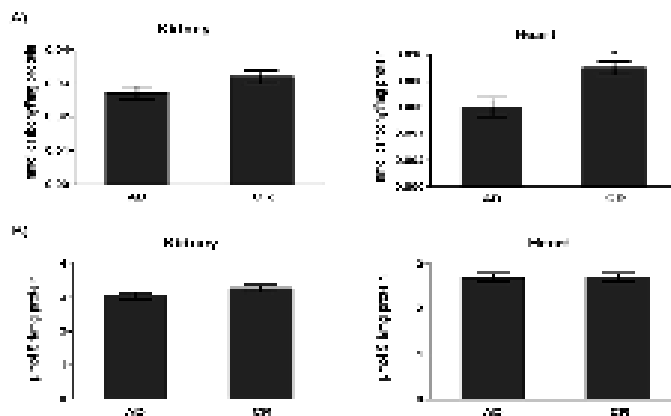


Fig. 2. Effects of seventeen weeks of *ad libitum* (AD) or caloric restriction (CR) diets on protein carbonylation and sulfhydryl (-SH) content. (A) Carbonyl protein levels in the kidney (AD n = 9; CR n = 9) and in the heart (AD n = 7; CR n = 7). Results indicate that CR can induce oxidative modification to proteins in the heart tissue. *Significantly different from AD (P = 0.001, Student's t-test). (B) Total -SH content in the kidney (AD n = 10; CR n = 8) and in the heart (AD n = 8; CR n = 9). The data indicate that neither the AD diet nor the chronic CR diet alter the total -SH content in the kidney or the heart. Data are mean ± S.E.M.

crease in protein carbonyl content in the heart cytosol and mitochondria (20). However, Colotti and colleagues (2005) did not find any difference in the carbonyl content in heart tissue between twenty-one months of intermittent feeding rats and AD rats (21).

Protein carbonylation has been associated with oxidative damage to proteins, i.e., this parameter may reflect the proportion of proteins that have been damaged by oxidation, leading to defective function of proteins with a central role in the basic mechanisms of disease and aging (12, 22). However, protein carbonylation may also have a potential role in protein quality control and cellular deterioration (23) and also occurs in young animals and normal tissues, as well as, in pathological conditions and older animals, indicating that carbonylation may have a physiological role (23, 24).

We also measured the total -SH content in rats on AD or CR diets. No differences were found between the AD or CR diets in either the kidney or heart tissues; to our knowledge, this is the first study to measure the -SH content in the kidney of rats submitted to chronic CR. However, others results indicate that chronic CR in aged mice increases heart -SH content, when compared to aged AL mice (25).

We evaluated the activities of two key antioxidant enzymes, SOD and CAT. No changes were observed between AD and CR diets for the SOD activity in the kidney and heart tissues, suggesting that chronic CR does not alter the activity of this enzyme in either organ. However, a previous study indicated that CR reduced SOD activity at seventeen months of age in the heart and at twenty-three months in the kidney (18).

However, our results showed that CR increases the CAT activity in the kidney, indicating that a chronic reduction in calo-

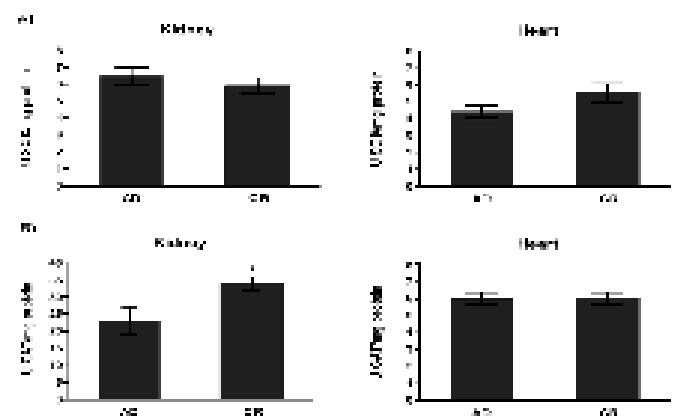


Fig. 3. Effects of seventeen weeks of *ad libitum* (AD) or caloric restriction (CR) diets on superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. (A) SOD activity in the kidney (AD n = 10; CR n = 10) and in the heart (AD n = 9; CR n = 9). The data indicate that neither the AD nor chronic CR diets alter the SOD activity in the kidney or the heart. (B) CAT activity in the kidney (AD n = 7; CR n = 8) and in the heart (AD n = 10; CR n = 10). Data indicate that the chronic CR diet can increase the SOD activity in the kidney without altering this activity in the heart. *Significantly different from AD (P = 0.021, Student's t-test). Data are mean ± S.E.M.

rie intake can alter the activity of this antioxidant enzyme in the kidney. This result is in accordance with those of a previous study, in which the CR diet increased the CAT in this organ at nine, seventeen and twenty-three months of age in mice (18). Furthermore, the same study indicated that CR reduced the CAT activity in the heart at nine months, but increased this activity at seventeen and twenty-three months of age. In this study, we did not find any difference between the AD and CR diets for CAT activity in the heart.

We speculate that a chronic reduction in the ingestion of calories could lead to a compensatory increase in endogenous antioxidant CAT activity in the kidney. However, it has been proposed that a chronic reduction in the ingestion of antioxidant vitamins, such as vitamin E, could lead to compensatory mechanisms in the endogenous antioxidant systems (26). We discard this possibility, taking into account that the majority of studies with 40% reduction in calorie intake provide vitamin and mineral supplementation to ensure an equivalent nutrient intake for animals on CR and AD diets (18, 25, 27). However, it has been shown a decrease in the levels of vitamin E in kidney and heart of rats submitted to 40% of chronic CR (28).

We adopted a 30% reduction in the calorie intake and serum biochemistry analyses indicated no differences in the nutritional state of the CR animals, except the reduction in total cholesterol levels in CR rats. Therefore, the increase in CAT activity observed in the kidney tissue is probably a compensatory response for the maintenance of appropriate kidney homeostasis, which can increase the H₂O₂ decomposition capacity in rats under CR. Meantime, it has been reported that there are no effects of CR in CAT activity in the kidney of mice

SOD and CAT activities in heart and kidney of Wistar rats, organs that are centrally involved in the regulation of circulatory and ionic homeostasis.

RESULTS

Our results demonstrating weight gain showed that, at the end of experiment, the CR rats (368 ± 14 g) had an approximately 28% reduction in body weight gain, when compared to AD rats (450 ± 17 g, $P = 0.001$), as illustrated in Fig. 1. In addition, as shown in Table 1, no significant differences were observed between AD and CR rats in biochemical serum parameters, such as glucose, total protein, albumin, urea, creatinin, HDL cholesterol and triacylglycerol. However, total cholesterol showed a significant 20% reduction in CR rats, when compared to AD rats.

We observed no significant change in the total content of carbonyl groups in the kidney after CR (AD = 0.027 ± 0.002 ; CR = 0.032 ± 0.002 nmol carbonyl/mg protein, $P = 0.118$), as shown in Fig. 2A. Interestingly, our results for the heart tissue (Fig. 2A) indicate that chronic CR induces a significant increase in carbonyl group content (0.009 ± 0.0005 nmol carbonyl/mg protein) when compared to carbonyl group content for the AD diet (0.006 ± 0.0007 nmol carbonyl/mg protein, $P = 0.001$). No difference was found in the total -SH content in the kidney tissue (AD = 3.06 ± 0.1 ; CR = 3.28 ± 0.1 μ mol SH/mg protein, $P = 0.111$; Fig. 2B) and no difference was observed in the heart tissue (AD = 2.7 ± 0.1 ; CR = 2.7 ± 0.1 μ mol SH/mg protein, $P = 0.755$; Fig. 2B).

As shown in Fig. 3A, no changes were observed in the SOD activity in the kidney tissue (AD = 6.5 ± 0.5 ; CR = 5.9 ± 0.5 U SOD/mg protein, $P = 0.43$), as well as in the heart tissue (AD = 4.4 ± 0.4 ; CR = 5.5 ± 0.6 U SOD/mg protein, $P = 0.158$). On the other hand, our results showed that CR increased CAT activity in the kidney (34 ± 2 , U CAT/mg pro-

tein), as compared to the AD diet (23 ± 4 U CAT/mg protein, $P = 0.021$; Fig. 3B). Furthermore, in the heart (Fig. 3B), CAT activity was not altered by CR (6 ± 0.4 U SOD/mg protein), as compared to the AD diet (6 ± 0.4 U SOD/mg protein, $P = 0.331$).

DISCUSSION

For weight gain analyses, we monitored the animals' weights weekly; after seventeen weeks, the rats submitted to the CR showed a significant 28% reduction in body weight gain, when compared to AD rats. This result is in agreement with recently data published by our research group, in which twelve weeks of CR result in a 27% reduction in body weight gain (16), suggesting a good reproducibility of this model of CR.

We performed biochemical serum analyses to assess the nutritional and the metabolic status of rats under AD or CR diets at the end of the experimental period. No significant differences were observed between AD and CR animals in serum parameters evaluated, indicating a good health state and adequate nutrition of all animals. However, CR caused a significant reduction in total cholesterol and this data is in agreement with previous results (16).

To evaluate the parameter of oxidative damage/modification of proteins, we measured the content of carbonyl groups in the kidney and heart tissues of rats submitted to AD and CR diets. Our results demonstrated that chronic CR did not alter protein carbonylation in the kidney. Furthermore, Sohal and colleagues (1994) compared AL and CR mice at nine, seventeen and twenty-three months of age and found that protein carbonyl content in the kidney and heart increased with age and was significantly reduced by CR in both tissues at each of the three ages (18). In addition, CR was found to reduce the protein carbonylation in the kidney of rats (19).

Interestingly, our results in heart tissue indicated that chronic CR induces a significant increase in carbonyl group content. This data is in agreement with those of a previous study, in which short-term CR (two months) caused a significant in-

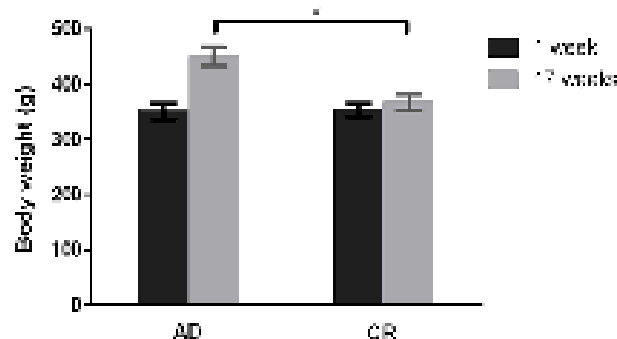


Fig. 1. Body weight at the first and seventeen weeks after ad libitum (AD) and caloric restriction (CR) diets. The results showed that the AD rats ($n = 10$) had an approximately 32% increase in body mass gain and that the CR rats ($n = 10$) had an approximately 2% increase in body mass gain at the end of experimental period. *Significant different ($P = 0.001$, Student's *t*-test). Data are mean \pm S.E.M.

Table 1. Serum biochemistry

	AD	CR	P value
Glucose (mg/dl)	101 ± 6	109 ± 5	0.206
Total protein (g/dl)	6.2 ± 0.1	6.0 ± 0.1	0.103
Albumin (g/dl)	2.7 ± 0.02	2.8 ± 0.03	0.106
Urea (mg/dl)	61 ± 5	65 ± 3	0.503
Creatinin (mg/dl)	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.07	0.237
Cholesterol (mg/dl)	80 ± 4	$64 \pm 3^*$	0.009
HDL (mg/dl)	32 ± 3	30 ± 2	0.633
Triacylglycerol (mg/dl)	50 ± 6	61 ± 7	0.270

Data are expressed as mean \pm standard error of mean ($n = 8-10$ for each group). *Significantly different from AD by Student's *t*-test ($P = 0.01$).

(26). CAT activity was also not altered by CR in the rat heart tissue in this work, in agreement with a previous study of rats under intermittent feeding at twelve and eighteen months of age, which had no significant effects on the levels and distribution of antioxidant enzymes, such as SOD and CAT, in the left ventricular wall (29).

Protein carbonylation may also occur as the consequence of other mechanisms in addition to oxidative damage (23, 24). We can speculate that this increase in carbonylation, under our experimental conditions, may have different effects to those caused by oxidative damage, since our results showed that CR caused an increase in protein carbonylation in the heart tissue without changing the content of -SH groups or SOD and CAT activities (key enzymatic defenses against oxygen toxicity).

Meantime, we may speculate that the increase in carbonyl group content in heart proteins may be a consequence of the lack of increase in CAT activity or SOD. Additionally, -SH groups are the most important non-enzymatic antioxidant defenses in cells; this content was also not altered in the heart, suggesting that the anti-oxidant protection system did not work in an efficient manner in the CR group hearts. The increase observed in kidney CAT activity probably attenuated redox imbalance and prevented protein carbonyl formation in this organ.

From the comparison of our results with those of previous studies, we speculate that the effects of chronic CR on oxidative parameters and on antioxidant enzyme activities may vary depending on tissue type, duration of CR diets, the strains and the type of damage/defense studied. For example, other factors that can explain the different effects of CR could be the nature and quantity of the specific proteins present in a particular tissue and exposed to carbonylation or loss of -SH groups (25).

In summary, our results showed that CR induces an increase in protein carbonylation in the heart and increases CAT activity in the kidney. No changes were observed in SOD activity and -SH content in either tissue types. These data contribute to the understanding of the effects of CR on the heart and kidney. However, further studies are needed to explain the underlying effects of chronic CR in the different tissues.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twenty male 120-day-old Wistar rats were obtained from our breeding colony and were maintained under controlled light and environmental conditions (12-h light/12-h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N° 80-23), revised 1996, and following the regulations of the local animal house authorities and all experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Diets

All groups received regular laboratory chow (Nuvilab-CR1, from Nuvital, Brazil) shortly before dark cycle onset. Animals were weight matched and divided into two groups: *ad libitum* (AD) and caloric restriction (CR). The AD animals had free access to chow, whereas the CR was progressive, being initiated at 10% restriction during the first week, and changed to 20% during the second week and to 30% in the third week, until the end of treatment (total of seventeen weeks of CR). The food intake was monitored daily and the animals were weighed weekly (17).

Experimental procedures

After a total time of seventeen weeks of dietary regimes, all animals were overnight-starved for 8 h and anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively, i.p) and the whole blood was obtained with an intracardiac puncture using a 0.37-mm diameter needle. The blood samples were incubated at room temperature (25°C) for 10 min and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min; the serum was collected and immediately stored at -80°C until the day of biochemical analysis. After killing the animals by decapitation, the kidneys and heart were immediately dissected out in ice and immediately stored at -80°C until the day of analysis.

Biochemical analyses

Biochemical serum analyses were carried out with a multi-test analyzer (Mega; Merck, Darmstadt, Germany), using specific kits supplied by Labtest (Brazil): glucose, total protein; albumin; urea; creatinin; total cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerol.

Protein carbonylation

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups, based on a reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (30). Proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

Measurement of total -SH content

An assay that serves to analyze the oxidative status of tissues was used to measure the level of reduced thiol (-SH) content in samples (31). Briefly, a 100- μg sample aliquot was diluted in PBS 10 and 10 mM 5,5-dithionitrobis 2-nitrobenzoic acid and read in a spectrophotometer at 412 nm after a 60 min incubation at 25°C . All results are expressed as $\mu\text{mol SH/mg}$ protein.

Antioxidant enzyme activities

The activities of two important antioxidant enzymes were analyzed: catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD).

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by measuring the

rate of decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance in a spectrophotometer at 240 nm (32). CAT activity was expressed as Units (U) CAT/mg protein.

Superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm (33). SOD activity was expressed as U SOD/mg protein.

Protein content

The total protein content was determined by the modified method of Lowry (34), using BSA as standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error mean (S.E.M.) and were analyzed by Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the SPSS program, Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Acknowledgements

This study was supported by the 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), FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

REFERENCES

1. Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V. D. (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* **328**, 321-326.
2. Speakman, J. R. and Mitchell, S. E. (2011) Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* **32**, 159-221.
3. Sohal, R. S. and Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
4. Masoro, E. J. (2009) Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1040-1048.
5. Fontana, L. and Klein, S. (2007) Aging, adiposity, and caloric restriction. *JAMA* **297**, 986-994.
6. Hunt, N. D., Hyun, D. H., Allard, J. S., Minor, R. K., Mattson, M. P., Ingram, D. K. and De Cabo, R. (2006) Bioenergetics of aging and caloric restriction. *Ageing Res. Rev.* **5**, 125-143.
7. Lee, D. W. and Yu, B. P. (1991) Food restriction as an effective modulator of free radical metabolism in aging rats. *Korean Biochem. J.* **24**, 148-154.
8. Forman, H. J., Maiorino, M. and Ursini, F. (2010) Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**, 835-842.
9. Burhans, W. C. and Heintz, N. H. (2009) The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1282-1293.
10. Halliwell, B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147-1150.
11. Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. and Stadtman, E.

- R. (2001) Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 69-74.
12. Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997) Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316.
13. Kusmierek, K., Chwatko, G., Głowacki, R. and Bald, E. (2009) Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 3300-3308.
14. Di Simplicio, P., Franconi, F., Frosali, S. and Di Giuseppe, D. (2003) Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids.* **25**, 323-339.
15. Martin, B., Mattson, M. P. and Maudsley, S. (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* **5**, 332-353.
16. Santin, K., Da Rocha, R. F., Cechetti, F., Quincozes-Santos, A., De Souza, D. F., Nardin, P., Rodrigues, L., Leite, M. C., Moreira, J. C. F., Salbego, C. G. and Gonçalves, C. A. (2011) Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res.* **1421**, 1-10.
17. Ribeiro, L. C., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C., Abib, R. T., Kleinkauf-Rocha, J., Biasibetti, R., Rotta, L. N., Wofchuk, S. T., Perry, M. L. S., Gonçalves, C. A. and Gottfried, C. (2009) Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci. Res.* **64**, 330-334.
18. Sohal, R. S., Ku, H. H., Agarwal, S., Forster, M. J. and Lal, H. (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74**, 121-133.
19. Chen, J., Velalar, C. N. and Ruan, R. (2008) Identifying the changes in gene profiles regulating the amelioration of age-related oxidative damages in kidney tissue of rats by the intervention of adult-onset caloric restriction. *Rejuvenation Res.* **11**, 757-763.
20. Judge, S., Judge, A., Grune, T. and Leeuwenburgh, C. (2004) Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R254-R259.
21. Colotti, C., Cavallini, G., Vitale, R. L., Donati, A., Maltinti, M., Del Ry, S., Bergamini, E. and Giannessi, D. (2005) Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology* **6**, 397-406.
22. Stadtman, E. R. and Berlett, B. S. (1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* **30**, 225-243.
23. Nyström, T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311-1317.
24. Nakamura, A., Kawakami, K., Kametani, F., Nakamoto, H. and Goto, S. (2010) Biological significance of protein modifications in aging and caloric restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1197**, 33-39.
25. Forster, M. J., Sohal, B. H. and Sohal, R. S. (2000) Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxi-

- ductive damage. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55A**, B522-529.
26. Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (1994) Caloric and carbohydrate restriction in the kidney: effects on free radical metabolism. *Exp. Gerontol.* **29**, 77-88.
27. Anderson, R. M., Shanmuganayagam, D. and Weindruch, R. (2009) Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol. Pathol.* **37**, 47-51.
28. Kamzalov, S. and Sohal, R. S. (2004) Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and α -tocopherol levels in the rat. *Exp. Gerontol.* **39**, 1199-1205.
29. Simonetti, I., De Tata, V., Del Rosso, A., Gori, Z. and Bergamini, E. (1990) Changes in the transmural distribution of antioxidant enzyme activities across the left ventricle heart wall from rats fed *ad libitum* or food-restricted during growth and aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **10**, 163-171.
30. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**, 464-478.
31. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
32. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121-126.
33. Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170-3175.
34. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.

CAPÍTULO II

Chronic caloric restriction alters the redox state and non-enzymatic antioxidant defenses in the liver of Wistar rats

Artigo a ser submetido

Chronic caloric restriction alters the redox state and non-enzymatic
antioxidant defenses in the liver of Wistar rats

Márcio Ferreira Dutra^{1,*}, Ivi Juliana Bristot¹, Fernanda Hansen¹, Cristiane Batassini¹, Núbia Broetto
Cunha¹, Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete¹, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Carlos Alberto Gonçalves¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Márcio F. Dutra

Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,
Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

E-mail: marciodutra5@yahoo.com.br

Tel: +55-51-33085566

Fax: +55-51-33085540

ABSTRACT

The modulation of oxidative status in different tissues through caloric restriction (CR), without malnutrition, is known to play a central role in the effects associated with low caloric intake. However, available data are still controversial. We investigated the effects of late-onset 30% chronic CR on parameters related to oxidative status/stress, such as reactive oxygen species (ROS) generation and malondialdehyde (MDA) levels, in the liver tissue. Additionally, we measured the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the total thiol (-SH) and glutathione (GSH) contents. Our results demonstrate that chronic CR decreases ROS generation and increases GSH content, without changing other parameters. ROS are inevitable byproducts of metabolism in aerobic organisms and GSH is one of the major antioxidant defenses present in aerobic cells. Our results corroborate the idea that CR can modulate parameters related to oxidative stress and antioxidant defenses in the liver tissue of Wistar rats.

Keywords: dietary reduction, food intake, ROS generation, GSH

INTRODUCTION

Since the pioneering article, published by McCay and Crowell in 1934 [1], caloric restriction (CR) has attracted the interest of different researchers in various health and biological areas. Defined as a reduction in the total quantity of calories consumed without malnutrition, CR is well known to extend the mean and maximum lifespan and to retard the aging process in a wide variety of organisms and also to have beneficial effects in many pathological conditions [2, 3, 4, 5, 6].

It is known that CR is able to exert effects on different metabolic routes and cell signaling pathways, causing changes in levels of trophic factors, and in the expression and activity of apoptotic proteins and antioxidant enzymes, in addition to other factors, in different tissues and organs [4, 5, 6, 7]. In this context, the modulation of the redox state has been postulated as one of the major CR-mediated effects; however, some of the data available are contradictory and there is still no consensus regarding the exact effects of CR on different aspects of the redox state [8, 9].

The generation of reactive oxygen species (ROS) is a normal process for aerobic organisms, in which ROS can modulate different redox-sensitive signaling pathways [10, 11]. However, under conditions of elevated ROS generation, ROS react with lipids, producing oxidative damage to macromolecules [12, 13]. In this context, the levels of malondialdehyde (MDA), originating from oxidative reactions in membrane lipoproteins, have been used as a marker of damage lipid (lipoperoxidation) and extensively assessed by the TBARS test [14].

On the other hand, for cellular protection against oxidation agents, such as ROS, cells possess antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD catalyzes the reaction in which two molecules of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) form hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2) and is therefore a source of cellular H_2O_2 . CAT catalyzes the dismutation of H_2O_2 to water (H_2O) and O_2 [12, 13].

During the process of antioxidant protection, thiol (-SH) groups react with ROS to neutralize these molecules and protect the cell against oxidative damage [15, 16]. As such, -SH group content has been used as a measurement of oxidative status/stress [15, 17]. The reduced form of glutathione (GSH) is the most abundant intracellular thiol-based antioxidant, and is prevalent in millimolar concentrations in all living aerobic cells, where its function is mainly to act as a sulfhydryl buffer [17, 13].

The liver is a vital organ and plays a central role in metabolic homeostasis, with a wide range of functions, including detoxification and protein synthesis [18]. This study was carried out to investigate the effects of late-onset chronic CR on parameters related to oxidative status/stress (total ROS generation and TBARS test), antioxidant capacity (activities of SOD and CAT) and also redox status (contents of GSH and -SH groups) in the hepatic tissue of male Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twenty male 120-day-old Wistar rats were obtained from our breeding colony and were maintained under controlled light and environmental conditions (12-h light/12-h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) with free access to water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications N° 80-23), revised 1996, and the handling of animals was approved by the local University Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals.

Diets

All groups received regular laboratory chow (Nuvilab-CR1, from Nuvital, Brazil) shortly before dark cycle onset. Animals were weight matched and divided into

two groups; *ad libitum* (AD) and caloric restriction (CR). The AD animals had free access to chow, whereas the CR was progressive, being initiated at 10% restriction during the first week, and changed to 20% during the second week and to 30% during the third week, until the end of treatment (total of seventeen weeks of CR). Food intake was monitored daily [19].

Experimental procedures

At twelve and seventeen weeks of CR, the serum glucose levels of animals were evaluated. For this, rats were overnight-starved for 8 hours and serum glucose measured by collecting a drop of tail blood, using a glucometer. After a total time of seventeen weeks of dietary regimes, all animals were overnight-starved for 8 h and killed by decapitation. The liver was immediately dissected out on ice and immediately stored at -80 °C until the day of analysis.

Evaluation of Intracellular ROS Production

Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by the action of cellular oxidants. Samples were homogenized and treated with DCFH-DA (10 μ M) for 30 min at 37 °C. Following DCFH-DA exposure, the samples were scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm and values were expressed as fluorescence units/ μ g protein [25].

Lipoperoxidation

The thiobarbituric acid reactive species (TBARS) consists of an acid-heating reaction of the lipid peroxidation end product, malondialdehyde (MDA), with thiobarbituric acid (TBA, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2-thiol). TBARS were determined at 532 nm, as previously described [14], and expressed as nmol/mg protein.

Antioxidant enzyme activities

The activity of SOD (E.C.1.15.1.1) was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm [20] and expressed as Units (U) SOD/mg protein. The activity of CAT (EC 1.11.1.6) was assayed by measuring the rate of decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance in a spectrophotometer at 240 nm [21] and expressed as U CAT/mg protein.

Glutathione and total thiol contents

The level of total reduced thiol content was determined, as previously described [31]. Briefly, a 100- μ g sample aliquot was diluted in PBS and 10 mM 5,5-dithionitrobis 2-nitrobenzoic acid and read in a spectrophotometer at 412 nm after a 60 min incubation at 25 °C. Results were expressed as μ mol SH/mg protein.

Reduced GSH content was determined as previously described [22]. Briefly, samples were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0–500 μ M). The concentration of GSH was calculated and expressed as nmol/mg protein.

Protein content

The total protein content was determined by the modified method of Lowry [23], using BSA as standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error mean (S.E.M.) and were analyzed by Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the SPSS program, Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

To evaluate the serum glucose levels of animals, we measured glycemia at two time-points during the experiment. Results demonstrate no alteration on glucose levels at both twelve (AD = 88 ± 4 mg/dL, CR = 88 ± 3 mg/dL, $P = 0.9$) and seventeen (AD = 94 ± 1.2 mg/dL; CR = 88 ± 3 mg/dL, $P = 0.3$) weeks of CR diet.

Effects on total ROS generation and lipoperoxidation

As shown in Fig. 1, the chronic CR (50 ± 8 DCF UF/ μ g protein) caused a significant reduction in ROS production (based on oxidation of DCFH-DA) in the liver, as compared to AD (72 ± 4 DCF UF/ μ g protein, $P = 0.017$) diet. No differences were observed in lipoperoxidation between AD (0.013 ± 0.003 nmol/mg lipid) and CR (0.017 ± 0.001 nmol/mg lipid, $P = 0.278$) diets, as demonstrated in Fig. 2.

Effects on antioxidant enzyme activities

No changes were observed in SOD activity in the liver after chronic CR (10 ± 1 U SOD/mg protein), compared to the AD diet (9 ± 1 U SOD/mg protein, $P = 0.848$; Fig.

3). In addition, CAT activity results showed no difference between AD (25 ± 3 U CAT/mg protein) and CR (21 ± 3 , U CAT/mg protein, $P = 0.985$) rats, as demonstrated in Fig. 4.

Effects on total -SH and GSH contents

No changes were observed in the total SH content (AD = 1.42 ± 0.13 ; CR = 1.51 ± 0.08 $\mu\text{mol SH/mg protein}$, $P = 0.546$; Fig. 5). On the other hand, our results showed that chronic CR (112 ± 10 $\mu\text{mol GSH/mg protein}$) caused a significant increase in the reduced GSH content when compared to AD ($83 \mu\text{mol} \pm 5 \mu\text{mol GSH/mg protein}$, $P = 0.014$) diet, as shown in Fig. 6.

DISCUSSION

The liver is the central organ for controlling systemic glucose homeostasis in mammals and maintaining blood glucose levels nearly constant during different nutritional statuses, being a crucial source of glucose during food deprivation [24]. To evaluate the serum glucose levels of animals, we measured glycemia at two time-points during the experiment. Our results showed that twelve and seventeen weeks of CR did not alter the glucose levels, indicating that the CR protocol used ensures glucose levels equal to those of AD animals.

We used the DCFH-DA technique to measure the levels of total ROS generation in hepatic tissue. Our results showed that chronic CR caused a significant reduction (31%) in total ROS generation and this is consistent with the idea that CR can act by reducing ROS generation and steady-state levels of markers of oxidative damage to macromolecules. [4, 8, 9]. Recently, using DCF for quantifying ROS production, Hayashida and cols (2011) reported a significant reduction in mitochondrial ROS generation caused by CR [9]. However, no differences were found in total ROS

generation in homogenate liver [25] and in isolated hepatocytes [26] from rats on CR diets.

The majority of studies investigating the effects of CR on ROS generation in liver of rodents measured the H₂O₂ production in isolated mitochondria and reported a lower H₂O₂ production induced by CR [26, 27, 28, 29, 30]. This decrease in H₂O₂ production was found to be located at complex I as it only took place with complex I-linked substrates (pyruvate/malate), where the mechanism involved constitutes a lower reduction degree in the complex I generator that reduces its free radical leak [30]. As speculated by Barja (2002), reductions in ROS generation that occur via a decline in the degree of reduction of complex I may be a highly conserved evolutionary mechanism of longevity, both between different species and intraspecifically, to resist periods of scarcity of food [31].

As a reduction in ROS generation was found, we investigated whether this effect is reflected in the level of lipid peroxidation. For this, we measured the levels of MDA, an index of lipid peroxidation by ROS, using the TBARS test. Our results demonstrated that a chronic CR did not alter hepatic lipoperoxidation. On the other hand, previous results demonstrate that long-term CR causes a significant reduction in hepatic levels of TBARS [32, 33]. The CR significantly decreases lipid peroxidation in non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats [25] and other studies using different strains of rats and different intensities and durations of CR found a reduction in lipid peroxidation in the liver mitochondria following 25% and 50% of CR for two weeks (Maheshwari *et al.*, 2012) and a reduction in lipoperoxidation in total liver homogenates following 40% of CR (started at two weeks of age) at ages of 12 and 21 months [34].

We measured the activities of two important scavenger ROS enzymes to investigate whether the observed reduction in ROS generation could be a consequence of the increased activity of these enzymes. Our results indicated that chronic CR caused no

change in the activities of hepatic CAT and SOD, suggesting that chronic CR does not alter the activity of these enzymes in the liver tissue. However, a previous study reported that 6 months of 40% CR caused a significant increase in the activities of the SOD and CAT enzymes in old rats [32] and also other results from long-term CR in rats showed an increase in hepatic SOD and CAT activities [34]. On the other hand, data show that the CR is able to significantly decrease the activity of hepatic CAT in non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats, without significantly decreasing the activity of hepatic SOD [25]. In mice, previous data indicate that chronic CR increases SOD activity by 50% and reduces CAT activity by 10% [35], and other data indicate that CR increase the hepatic CAT activity without altering SOD [36]. This variety of results suggests that individual activities of the antioxidant enzymes, SOD and CAT, in different tissues do not follow a consistent pattern in response to CR.

In addition, to verify the effects of CR on the non-enzymatic antioxidant defense of hepatic tissue, we decided to measure the total content of -SH groups and GSH. Thiol groups participate in reactions, such as conjugations, redox and exchange reactions and these react with almost all physiological oxidants, thus protecting cells and tissues against oxidative damage [15, 37]. Moreover, -SH groups are involved in most biological properties and functions, such as protein structure, enzyme catalysis and redox-signaling pathways [38]. Our results demonstrate that CR did not alter the total -SH content in hepatic tissue. On the other hand, our data demonstrate that a chronic reduction in calorie intake significantly increases GSH levels and are consistent with previous data that demonstrate that CR significantly increases the GSH content in hepatic tissue [25]. In contrast, another study demonstrated a reduction in hepatic GSH levels in rats subjected to long-term dietary restriction [33].

As reviewed by Sohal and Weindruch (1996), it has been shown that CR can reduce the steady-state level of oxidative stress and slow the increase in oxidative

damage associated with aging [9]. We speculate that the decrease in ROS generation induced by CR could have two different mechanisms, rather than indicating a simple reduction in oxidative stress/status. Firstly, in our study, no changes were observed for the activities of SOD and CAT, both of which are ROS scavenger enzymes. These data corroborate our hypothesis, as the activities of these enzymes are upregulated under conditions of oxidative stress [39, 40] and we found no difference between the AD and CR diets.

Secondly, the finding that there were no alterations in MDA levels also suggests that the decrease in ROS generation does not affect oxidative stress in hepatic tissue. In fact, ROS are not only causative of cellular injury, but also activate redox signal pathways [10, 11, 41]. In this context, ROS are important signaling molecules and, from our results, we suggest that reduced ROS generation, induced by CR, can exert effects in hepatic tissue.

From the results for the GSH levels, together with the findings for ROS production, we speculate that the CR could modulate the redox status in liver. The high level of GSH, a major antioxidant molecule in mammalian cells, induced by CR, could in part be responsible for the reduction in ROS levels, resulting in a low oxidative status. Many ROS are quenched by GSH by its reaction with its thiol group [42]. Therefore, the CR could improve the protection of cells against ROS production by increasing the function of the cellular antioxidant defense system. This idea is consistent with previous data showing that CR causes an increase in the activity of hepatic glutathione reductase (GR) and also an increase in GSH content [25].

Another possibility is that the reduction in ROS generation, induced by CR, could cause a subsequent economy of GSH content. In addition to being a cofactor for various antioxidant enzymes, GSH possesses several functions, which include direct

scavenging of $\bullet\text{OH}$, O_2 , and regeneration of other antioxidants, such as vitamin C and E, to their active forms [42, 43].

In summary, our results demonstrated that 30% chronic CR induces a reduction in ROS generation and an increase in GSH content in the hepatic tissue of Wistar rats, but without changing other redox parameters evaluated such as MDA levels, SOD and CAT activities and total -SH content. Our results reinforce the idea that CR can modulate the oxidative status and also the antioxidant defenses in tissues under normal physiological conditions.

Figures and Legends

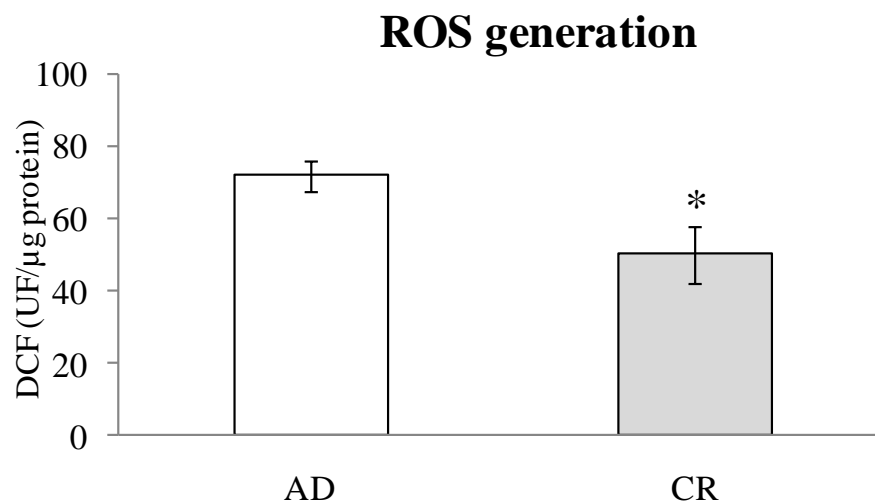


Figure 1 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on total reactive oxygen species (ROS) generation in the liver tissue. Data indicate that CR (n = 8) caused an approximately 70% reduction in ROS generation, when compared to the AD (n = 10) diet. (*) Significantly different from AD ($P = 0.017$). Data are means \pm S.E.M.

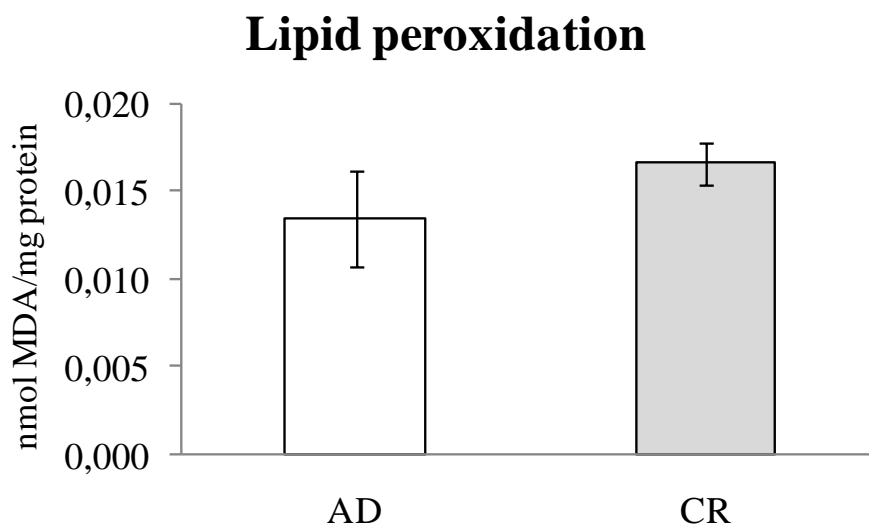


Figure 2 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on malondialdehyde (MDA) levels in the liver tissue. Data indicate that neither the AD (n

= 10) nor chronic CR (n = 8) diets alter MDA levels ($P = 0.278$). Data are means \pm S.E.M.

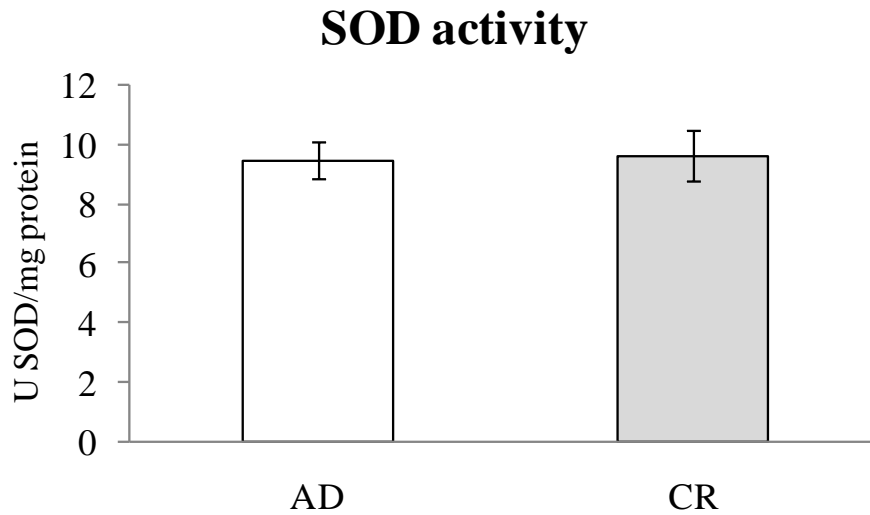


Figure 3 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on superoxide dismutase (SOD) activity in the liver tissue. Data indicate that neither the AD (n = 10) nor the chronic CR (n = 10) diets alter SOD activity ($P = 0.848$). Data are means \pm S.E.M.

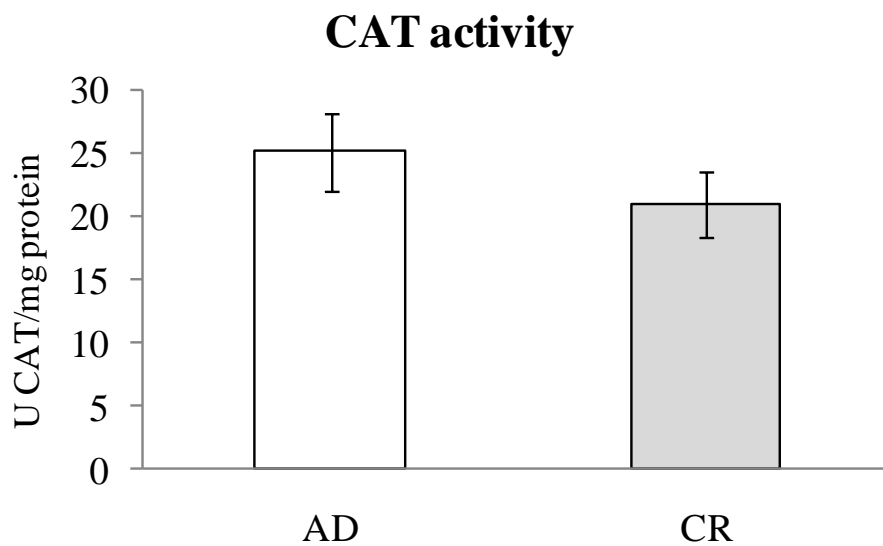


Figure 4 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on catalase (CAT) activity in the liver tissue. The data indicate that neither the AD (n = 9) nor the chronic CR (n = 8) diets alter SOD activity ($P = 0.985$). Data are means \pm S.E.M.

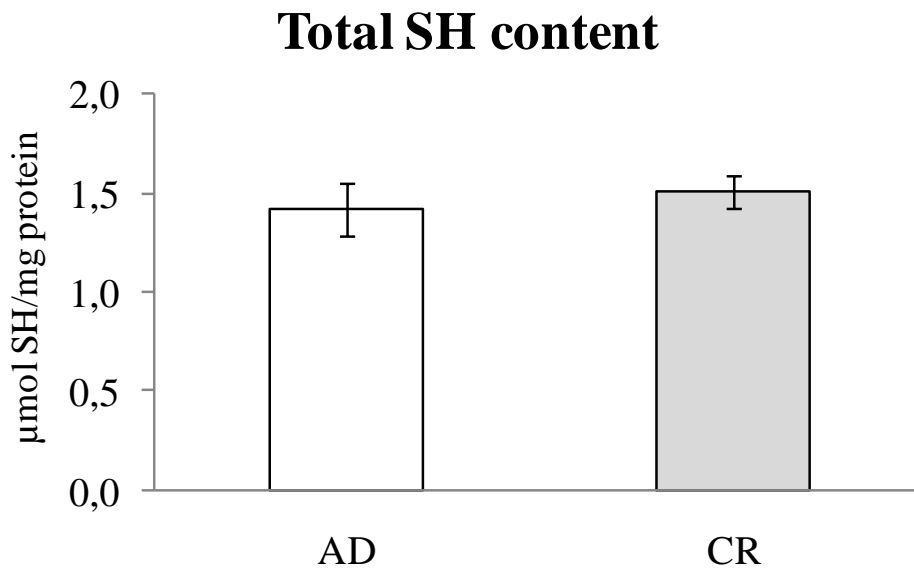


Figure 5 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on total thiol (-SH) content in liver tissue. The data indicate that neither the AD (n = 10) nor the chronic CR (n = 10) diets altered the total -SH content ($P = 0.546$). Data are means \pm S.E.M.

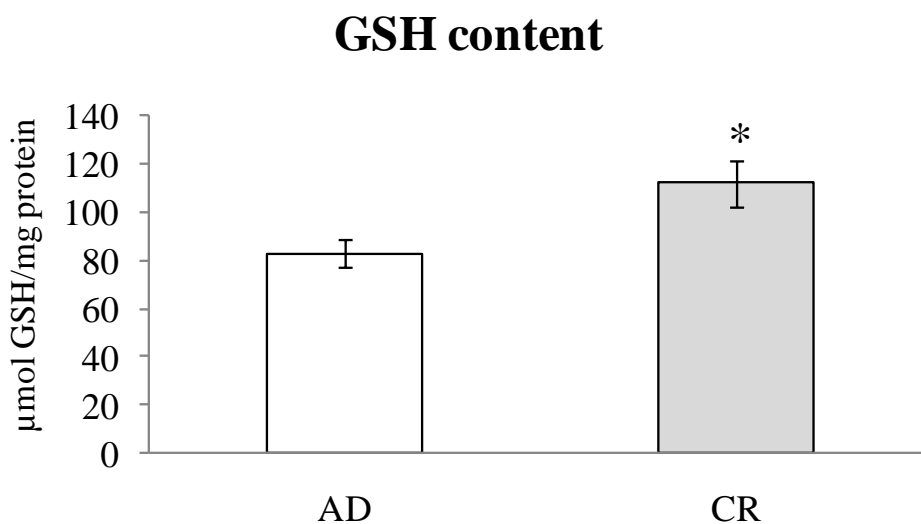


Figure 6 - Effects of chronic ad libitum (AD) or caloric restriction (CR) diets on reduced glutathione (GSH) content in liver tissue. The data indicate that chronic CR (n = 10) induce a 135% increase in GSH content when compared to AD (n =10) diet. (*) Significant different from AD ($P = 0.014$). Data are mean \pm S.E.M.

References

1. McCay CMC, Mary F.: Prolonging the Life Span. *The Scientific Monthly* 1934, 39:10.
2. Swindell WR: Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev* 2012, 11:254-270.
3. Pallavi R, Giorgio M, Pelicci PG: Insights into the beneficial effect of caloric/dietary restriction for a healthy and prolonged life. *Front Physiol* 2012, 3:318.
4. Speakman JR, Mitchell SE: Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011, 32:159-221.
5. Fontana L, Partridge L, Longo VD: Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010, 328:321-326.
6. Longo VD, Finch CE: Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 2003, 299:1342-1346.
7. Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R: Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol Pathol* 2009, 37:47-51.
8. Kowaltowski AJ: Caloric restriction and redox state: does this diet increase or decrease oxidant production? *Redox Rep* 2011, 16:237-241.
9. Sohal RS, Weindruch R: Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996, 273:59-63.
10. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F: Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2010, 49:835-842.
11. Burhans WC, Heintz NH: The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 2009, 47:1282-1293.
12. Halliwell B: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007, 35:1147-1150.
13. Nordberg J, Arner ES: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001, 31:1287-1312.
14. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990, 186:421-431.
15. Di Simplicio P, Franconi F, Frosali S, Di Giuseppe D: Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* 2003, 25:323-339.
16. Sen CK: Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 1998, 55:1747-1758.
17. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82:70-77.
18. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J: Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 2008, 59 Suppl 1:107-117.
19. Ribeiro LC, Quincozes-Santos A, Leite MC, Abib RT, Kleinkauf-Rocha J, Biasibetti R, Rotta LN, Wofchuk ST, Perry ML, Goncalves CA, Gottfried C: Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neurosci Res* 2009, 64:330-334.

20. Misra HP, Fridovich I: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972, 247:3170-3175.
21. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105:121-126.
22. Browne RW, Armstrong D: Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 1998, 108:347-352.
23. Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977, 83:346-356.
24. Choi JH, Park MJ, Kim KW, Choi YH, Park SH, An WG, Yang US, Cheong J: Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett* 2005, 579:2795-2801.
25. Ugochukwu NH, Figgers CL: Dietary caloric restriction improves the redox status at the onset of diabetes in hepatocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2007, 165:45-53.
26. Lambert AJ, Merry BJ: Lack of effect of caloric restriction on bioenergetics and reactive oxygen species production in intact rat hepatocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005, 60:175-180.
27. Ash CE, Merry BJ: The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation. *Mech Ageing Dev* 2011, 132:43-54.
28. Gomez J, Caro P, Naudi A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G: Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 2007, 8:555-566.
29. Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R, Ramsey JJ: Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 288:E674-684.
30. Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G: Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002, 32:882-889.
31. Barja G: Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 2002, 1:397-411.
32. Hamden K, Carreau S, Ayadi F, Masmoudi H, El Feki A: Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepatotoxicity in aged rats. *Biomed Environ Sci* 2009, 22:381-387.
33. Aydin C, Ince E, Koparan S, Cangul IT, Naziroglu M, Ak F: Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem Funct* 2007, 25:129-137.
34. Rao G, Xia E, Nadakavukaren MJ, Richardson A: Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr* 1990, 120:602-609.
35. Dubnov G, Kohen R, Berry EM: Diet restriction in mice causes differential tissue responses in total reducing power and antioxidant compounds. *Eur J Nutr* 2000, 39:18-30.
36. Koizumi A, Weindruch R, Walford RL: Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J Nutr* 1987, 117:361-367.
37. Winterbourn CC, Hampton MB: Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008, 45:549-561.
38. Bindoli A, Fukuto JM, Forman HJ: Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10:1549-1564.

39. D'Alessandro A, Zolla L: The SODyssey: superoxide dismutases from biochemistry, through proteomics, to oxidative stress, aging and nutraceuticals. *Expert Rev Proteomics* 2011, 8:405-421.
40. Cao C, Leng Y, Kufe D: Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003, 278:29667-29675.
41. Finley LW, Haigis MC: The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 2009, 8:173-188.
42. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P: Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008, 10:1343-1374.
43. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:351-369.

CAPÍTULO III

Effects of long-term caloric restriction on memory impairment and biochemical and morphological parameters in brain of rats from streptozotocin-induced model of dementia

Artigo em preparação

Observação: A parte introdutória referente a este artigo em preparação encontra-se na secção “Introdução” desta tese (página 12 a 16) e a discussão deste artigo encontra-se na secção “Discussão” desta tese (página 81 a 88).

Effects of long-term caloric restriction on memory impairment and
biochemical and morphological parameters in brain of rats from
streptozotocin-induced model of dementia

Márcio Ferreira Dutra^{1,*}, Fernanda Hansen¹, Cristiane Batassini¹, Núbia Broetto Cunha¹, Adriana
Fernanda Kuckartz Vizuete¹, Daniela Fraga de Souza¹, Patrícia Nardin¹, Carlos Alberto Gonçalves¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Márcio F. Dutra

Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,
Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

E-mail: marciodutra5@yahoo.com.br

Tel: +55-51-33085566

Fax: +55-51-33085540

Materials and methods

Animals and Diets

Fifty male 120-day-old Wistar rats were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12-h light/12-h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) with free access to water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23), revised 1996, and following the regulations of the local animal house authorities. Animals were weight matched and divided into four groups: Sham *ad libitum* (Sham-AD); Sham caloric restricted (Sham-CR); streptozotocin *ad libitum* (STZ-AD) and streptozotocin caloric restricted (STZ-CR).

CR diet

All groups received regular laboratory chow (Nuvilab-CR1, from Nuvital, Brazil) shortly before dark cycle onset. The CR was progressive, initiated at 10% restriction in the first week, changed to 20% at second week, and to 30% at third week until the end of treatment (total of seventeen weeks of CR). The food intake was monitored daily, and the animals were weighed weekly (adapted from Ribeiro *et al.*, 2009).

Stereotaxic Surgery

After twelve weeks of AD and CR diets, the surgery was performed, as described in our previous studies (Rodrigues *et al.*, 2009, 2010). Briefly, rats were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively, i.p.) and

positioned in a stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp and burr holes were drilled in the skull on both sides over the lateral ventricles. The lateral ventricles were accessed using the following coordinates (Paxinos and Watson 1998): 0.9 mm posterior to the bregma; 1.5 mm lateral to the sagittal suture; 3.6 mm beneath the surface of the brain. Both STZ groups (STZ/AD and STZ/CR) received a single bilateral infusion of 5 μ L STZ (3 mg/kg), while sham groups (sham/AD and sham/CR) received the same volume of vehicle (Hank's balanced salt solution—HBSS—containing in mM: 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂; and 10 glucose, in pH 7.4) using a 10- μ L Hamilton syringe. At post-surgery, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at 37.5 ± 0.5 °C, and were maintained there until recovery from anesthesia. Only two animals died after surgery, two from STZ-AD group.

Morris water maze test

After the stereotaxic surgery, all groups were maintained on their dietary regimes (AD or CR) for more five weeks. Behind this time, the animals were submitted to spatial learning evaluation in the Morris water maze test using the Reference Memory protocol, as described in our previous studies (Rodrigues *et al.*, 2009, 2010). This procedure was performed between 08:00 and 12:00 h. The apparatus consisted of a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high), filled with water (depth 30 cm; 24 ± 1 °C) and placed in a room with consistently located spatial clues. An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from water and was located in the same quadrant for every trial. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each training day, all four start positions were used once in a random sequence, i.e., four

training trials per day. A trial began by placing the animal in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the animal failed to escape within 60 s, it was gently conducted to the platform by the experimenter. The rat was allowed to stay there for 20 s. The inter-trial interval was 10 min. After each trial, the rats were dried and returned to their cages at the end of the session. Animals were trained for 5 days. At 24 h after the last training session, the rats were submitted to a test session (7 weeks after surgery). Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 1 min. The latency to arrive at the original platform location, the number of crossings over the previous location and time spent in the target quadrant compared to the opposite quadrant were measured on the day of testing.

Cerebrospinal fluid and serum samples

One day after the Morris water maze task (total time of seventeen weeks of AD and CR dietary regimes), all animals were overnight-starved (8th hours), anesthetized (ketamine and xylazine 75 and 10 mg/kg, i.p.) and positioned in a stereotaxic holder for cerebrospinal fluid collection from the cisterna magna. The puncture was performed using an insulin syringe (27 gauge 9 1/200 length). Rats were then removed from the stereotaxic apparatus and placed in a flat place; whole blood was obtained through an intracardiac puncture using a 0.37-mm diameter needle. The blood samples were incubated at room temperature (25 °C) for 10 min and centrifugated at 3000 rpm for 10 min. Serum and CSF were stored at -80 °C until the day of the analysis. Biochemical analyses were carried out in a multi-test analyzer (Mega; Merck, Darmstadt, Germany), using specific kits supplied by Labtest (Brazil): glucose, total protein; albumin; urea; creatinin; total cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerol.

Brain tissue samples

The animals were killed by decapitation, brains were removed and right and left hemispheres were separated. The left brain structures (frontal cerebral cortex, hippocampus and striatum) were dissected out and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄ and 10 glucose, adjusted to pH 7.4, and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper for subsequent analysis. The samples were immediately stored at -80 °C until the day of biochemical analyses. The right hemispheres were processed to immunofluorescence and confocal microscopy, as follow described.

ELISA for S100B

The S100B immunocontents in liquor, serum and adipose were measured by ELISA (Leite *et al.*, 2008). Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.01 to 10 ng/mL.

ROS Production

Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by the action of cellular oxidants. Samples were homogenized

and treated with DCFH-DA (10 μ M) for 30 min at 37 °C. Following DCFH-DA exposure, the samples were scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm and values were expressed as fluorescence units/ μ g protein (De Almeida *et al.*, 2008).

GSH content

GSH content was determined as previously described (Browne and Armstrong, 1998). Briefly, samples were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0–500 μ M). GSH concentrations were calculated and expressed as nmol/mg protein.

Western blotting

For Western blotting analysis proteins were isolated in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS) containing a cocktail inhibitor of protease and phosphatases (0.5 μ l of cocktail/ml of buffer). The homogenates were centrifuged at 12,000 rpm at 4 °C for 10 min. Equal amounts of proteins (10 μ g per lane) were load, separated by 10% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were overnight blocked at 7 °C with TBS buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5) containing 2% BSA (bovine serum albumin) and overnight incubated at 7 °C with mouse monoclonal anti-SYN (Millipore, MAB368), diluted 1:2000 in Tween-TBS (0.05% Tween 20) buffer

containing 2% BSA. After, the membranes were incubated with anti-mouse peroxidase-linked, diluted 1:2000 in TBST (0.05% Tween 20) buffer containing 2% BSA (adapted from Mladenovic-Djordjevic *et al.*, 2010). Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence detection system according to the manufacturer's protocol (ECL, Amersham Biosciences, NJ, EUA). The protein bands were quantified with Optic Quanta software and standardized to the measurement results of the Sham-AD group.

Immunofluorescence and Confocal analysis

The right hemispheres were fixed with 4% paraformaldehyde for 4 h at room temperature and cryoprotected by immersing in 15% and 30% sucrose solution in PBS at 4°C. The hemispheres were then frozen by immersion in isopentane cooled with CO₂ and stored in a freezer (-80°C) for later analyses. Serial coronal sections (40 µm) of frontal cortex, hippocampus and striatum were obtained using a cryostat at -20°C (Leitz). The sections were processed for double immunofluorescence labeling for SYN and GFAP. The free-floating sections were incubated two overnights at 4°C with rabbit polyclonal anti-GFAP (DAKO) and mouse monoclonal anti-SYN (Millipore, MAB368), both diluted 1:3000 in PBS-Tx 0.3%. After washing several times in PBS, tissue sections were incubated with anti-rabbit Alexa 488 and anti-mouse Alexa 568, both diluted 1:500 in PBS-TX 0.3% for 1 h at room temperature. Afterwards, the sections were washed several times in PBS, transferred to slides covered with gel followed by rapidly dry at 37 °C, mounted with Fluor Save and covered with coverslips. The negative control was done by omitting primary antibodies. The images were obtained with a Confocal Olympus IX-81 microscope.

Protein content

The total protein content was determined by the modified method of Lowry (Peterson, 1977), using BSA as standard.

Statistical analysis

Body mass gain and escape latency were evaluated by repeated measures analysis of variance (ANOVA) and other data were evaluated by two-way ANOVA. Difference between groups were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test, assuming $P < 0.05$. The Student's t test was used only to compare the time spent in quadrants (target x opposite), assuming $P < 0.05$. Data are presented as means \pm standard error. All analyses were performed using the SPSS program, Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Body weight gain

We measured the body weight of all animals once a week during the experimental period to determine the effects of CR diet and ICV-STZ injection on body weight gain. As illustrated in Fig. 1, the CR diet adopted was able to significant reduced the body weight gain when compared to AD diet. The sham-CR group (373 ± 16 g) had an approximately 28% reduction in body weight gain when compared to sham-AD group (471 ± 18 g, $P = 0.001$) and the STZ-CR group (384 ± 6 g) had an approximately 27% reduction in body weight gain when compared to STZ-AD group (486 ± 7 g, $P = 0.001$).

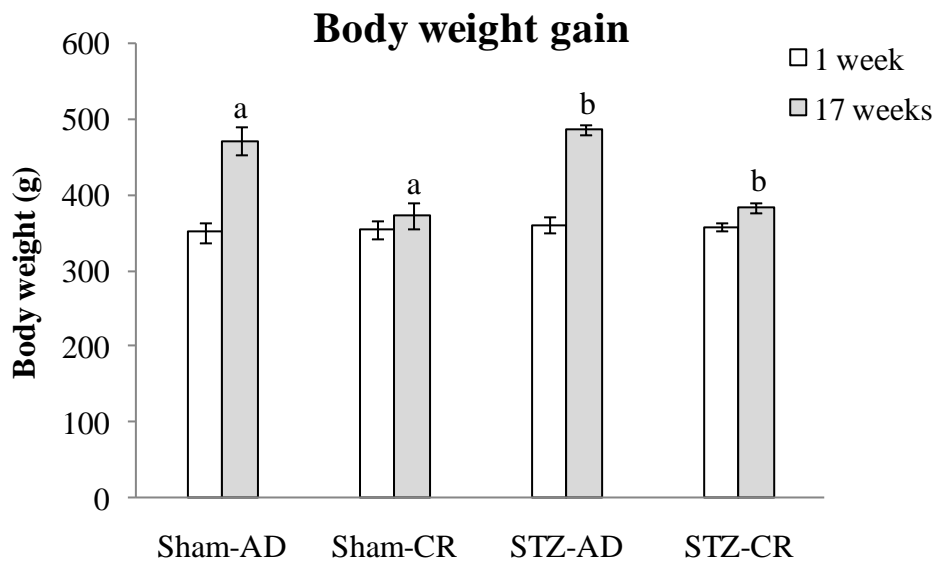


Fig. 1 - Body weight gain of rats submitted to CR diet and ICV-STZ injection. The values represent the body weight at first and at seventeen weeks of experimental period. The results shown that CR diet caused a significant reduction in body weight gain, as revealed by two-way ANOVA, which demonstrated a significant effect of CR factor ($F_{(1,27)} = 6.933$, $P = 0.014$). Both CR groups (Sham-CR and STZ-CR) presented a significant reduction in body weight gain when compared to their counterparts AD groups. The values that share the same superscript letters are significantly different, one-way ANOVA, followed by Tukey's test, (a) $P = 0.014$; (b) $P = 0.014$.

Serum biochemistry

We performed several serum biochemistry analyses at the end of experimental period to verify the nutritional and metabolic status of animals submitted to CR diet and ICV-ST injection. As shown in Table 1, no differences between the groups were found in levels of glucose, total protein, albumin, urea, uric acid, creatinin and triacylglycerol.

Table 1– Serum biochemistry.

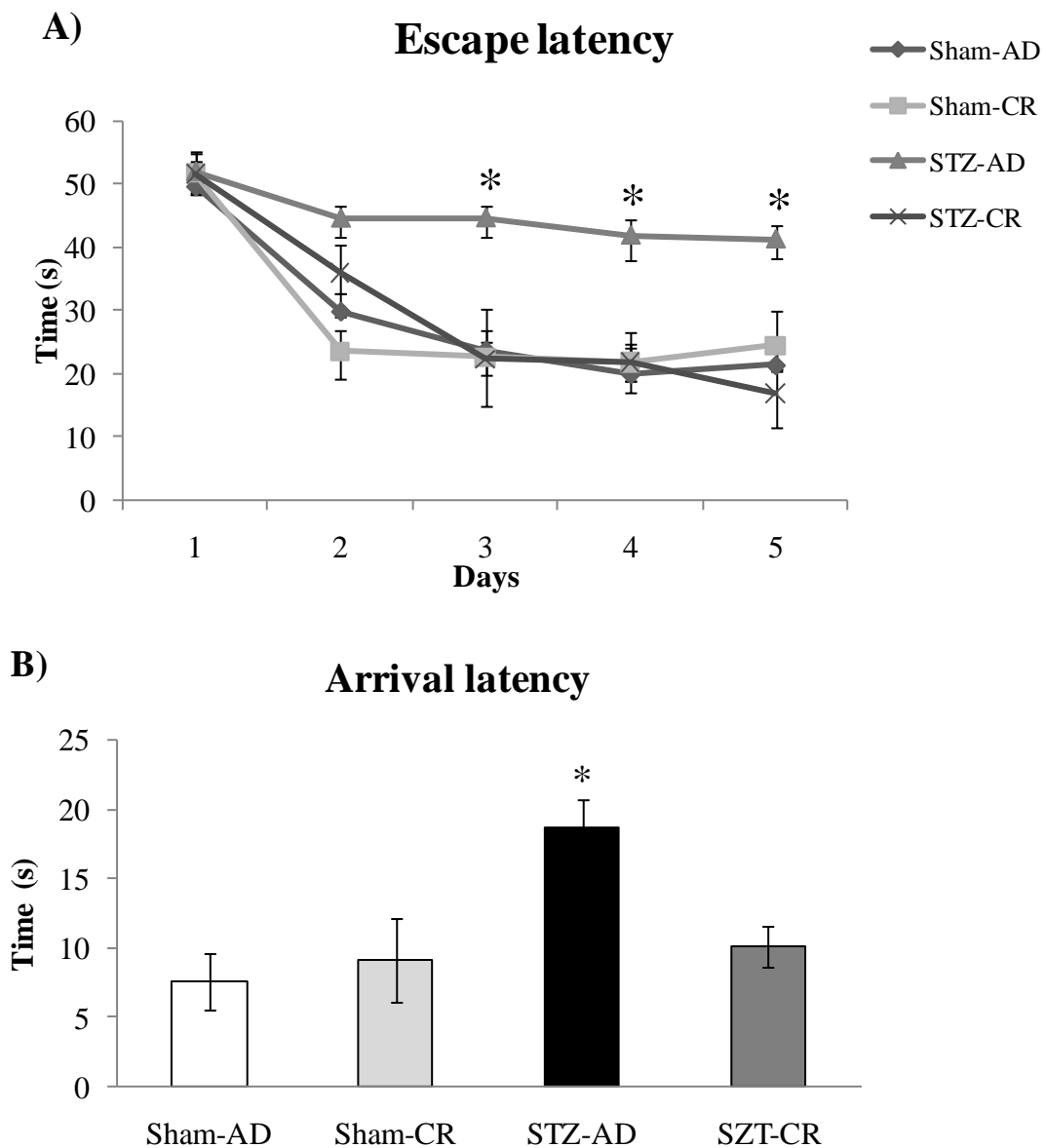
	Sham-AD	Sham-CR	STZ-AD	STZ-CR
Glucose (mg/dL)	105±7	101±8	103±7	105±6
Total Protein (g/dL)	6.3±0.2	6.3±0.1	6.4±0.2	6.3±0.1
Albumin (g/dL)	2.9±0.03	2.7±0.04	2.8±0.05	2.8±0.06
Urea (mg/dL)	58±3	63±4	63±4	59±4
Uric Acid (mg/dL)	0.6±0.04	0.7±0.05	0.7±0.09	0.6±0.05
Creatinin (mg/dL)	0.61±0.03	0.58±0.04	0.58±0.3	0.62±0.04
Cholesterol (mg/dL)	82±4 ^{ab}	66±5 ^a	89±5 ^{bc}	73±3 ^c
HDL (mg/dL)	30±4	34±5	36±3 ^e	27±2 ^e
Triacylglycerol (mg/dL)	56±8	59±5	49±7	49±4

Cholesterol: two-way ANOVA revealed a significant effect of CR ($F_{(1,36)} = 20.212$, $P = 0.003$) and significant effect of STZ factor ($F_{(1,36)} = 18.756$, $P = 0.004$); the values that share the same superscript letters are significantly different (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, (a) $P = 0.03$; (b) $P = 0.03$; (c) $P = 0.02$). **HDL:** (e) statistical tendency to be different (one-way ANOVA, followed by Tukey's test). Data are expressed as mean ± standard error of mean (n = 8-10 for each group).

Cognitive effects

We adopted the Morris water maze (MWM) test to evaluate the effects of ICV-STZ infusion and CR diet on reference memory in the four groups: Sham-AD, Sham-CR, STZ-AD and STZ-CR. In the training sessions, from day 3 onwards, there was a significant increase in the average time to find the platform (escape latency) in the STZ-AD group, when compared with others groups (Fig. 2A) ($F_{(1,34)} = 17.375$, $P = 0.001$). In the probe trial, the STZ-AD group presented the highest latency to arrive at the original

platform location, in relation to all other groups (Fig. 2B) ($F_{(1,42)} = 8.571, P = 0.005$). Moreover, the number of crossings over the previous platform location were significantly lower in the STZ-AD group when compared with the other groups (Fig. 2C) ($F_{(1,42)} = 20.639, P = 0.001$). The CR diet *per se* significantly increased the number of crossings in the previous platform location ($F_{(1,42)} = 23.212, P = 0.001$) and was able to prevent and/or revert the cognitive decline observed in this model (Fig. 2C). In addition, the STZ-AD group demonstrated no differences in the time spent in the target quadrant when compared with the opposite quadrant (Student's *t* test, $P = 0.527$), in contrast to the other groups (Fig. 2D).



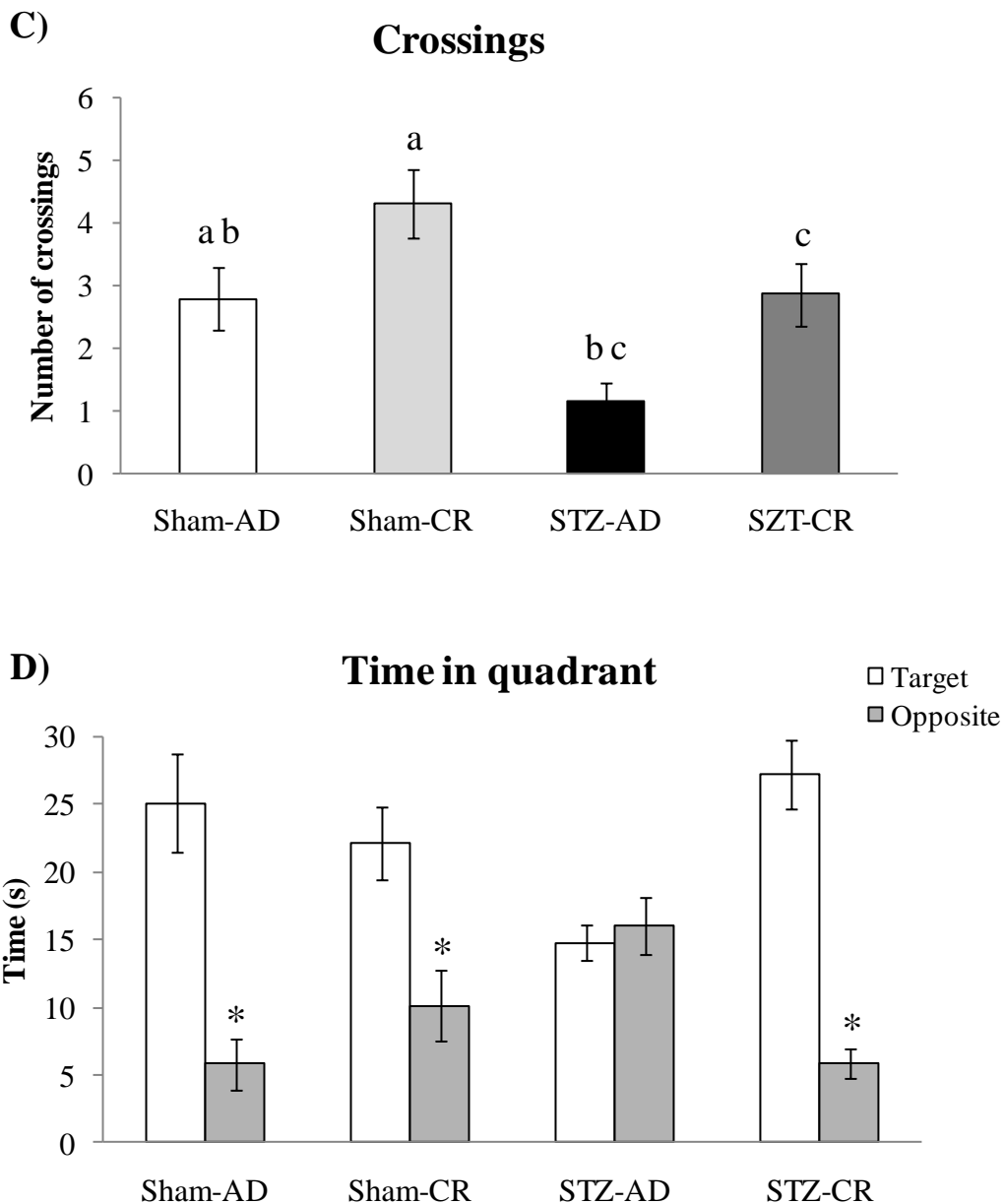
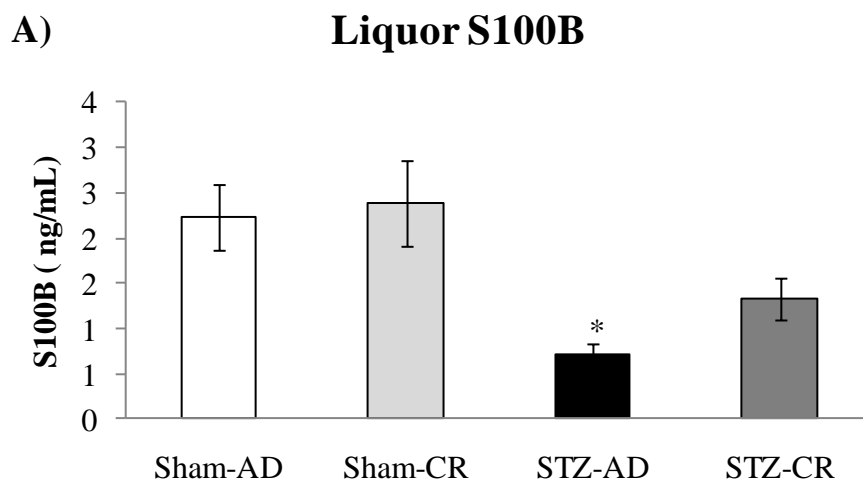


Fig. 2 - Cognitive performance of rats submitted to CR diet and ICV-STZ injection, as evaluated by the Morris water maze test. A) Performance in the reference memory protocol, based on escape latency. Each point represents the mean \pm standard error. *Significant differences were detected by comparing STZ-AD and other groups from day 3 onward (N = 11-12, repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test, $P < 0.05$). B) Memory in the probe trial of reference memory, as measured by latency to arrive at the original place of platform location. Values are mean \pm standard error. STZ-AD was different from other groups (N = 11-12, two-way ANOVA followed by Tukey's test, $P < 0.05$). C) Number of crossings over the previous platform position.

Values are mean \pm standard error. The values that share the same superscript letters are significantly different. (N = 11–12, two-way ANOVA followed by Tukey's test, a) $P = 0.01$; b) $P = 0.008$; c) $P = 0.004$. D) Time spent in the target quadrant compared to the opposite quadrant. Values are mean \pm standard error. *Significant difference between the times spent in quadrants in each group (N = 11–12, Student's t test, $P < 0.05$).

S100B immunocontent

To investigate the effects of CR diet and ICV-STZ injection on S100B immunocontent in liquor, serum and adipose tissue we used the ELISA technique. As showed in Fig. 3A, the STZ-AD group presented a significant reduction in liquor S100B immunocontent when compared to Sham-AD group ($P = 0.007$) and when compared to Sham-CR group ($P = 0.004$). Note that the CR did not have *per se* effect in liquor S100B levels ($F_{(1,26)} = 1.877$, $P = 0.182$). In serum, the STZ-AD group (0.16 ± 0.03 ng S100B/ mL) presented the highest S100B immunocontent in relation to all other groups (Fig. 3B) ($F_{(3,26)} = 10.586$, $P = 0.001$). Note that the CR diet was able to prevent and/or revert this increase when compared the STZ-CR group (0.05 ± 0.01 ng S100B/ mL) to STZ-AD group ($P = 0.002$). As showed in Fig. 3C, the STZ-RC group (0.96 ± 0.06 ng S100B/ μ g protein) presented a significant reduction in adipose S100B immunocontent, when compared to STZ-AD group (1.24 ± 0.09 ng S100B/ μ g protein, $P = 0.034$).



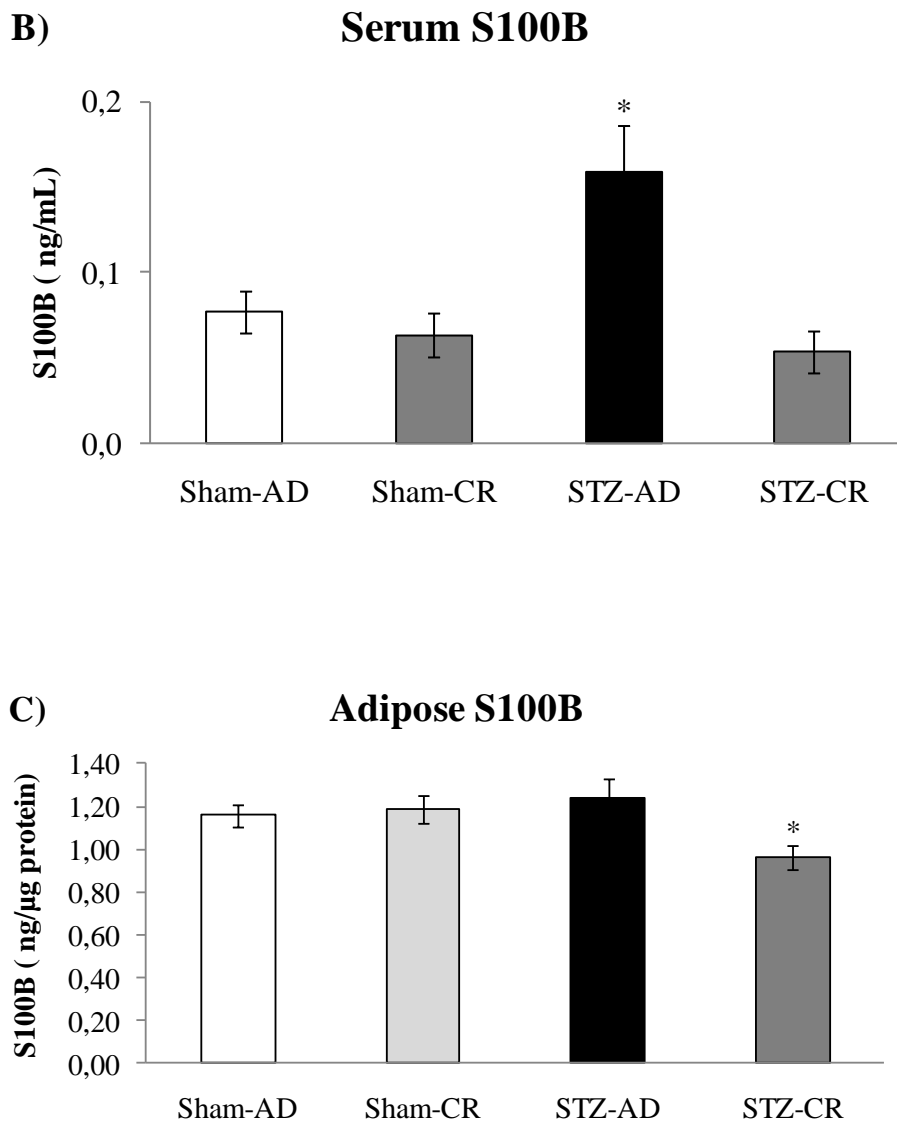
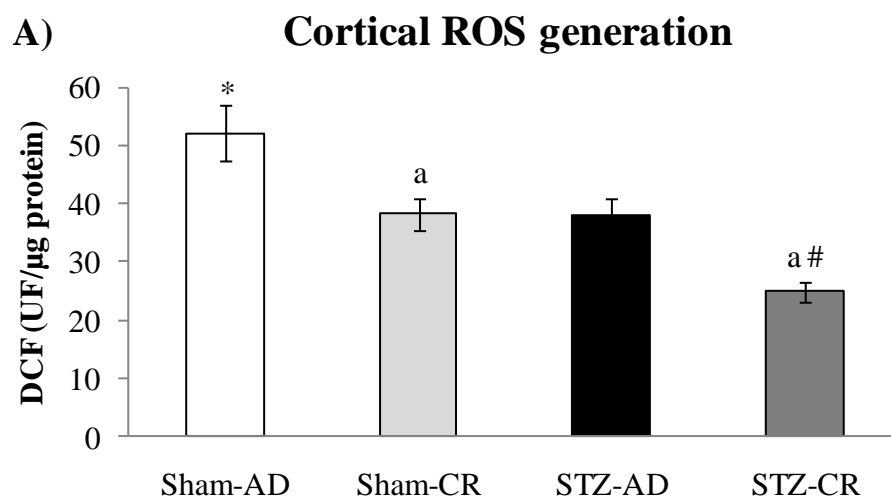


Fig. 3 - Effects of CR diet and ICV-STZ injection on S100B immunocontent, measured by ELISA. A) Liquor S100B: the results shown that ICV-STZ injection caused a significant reduction in liquor S100B levels, as revealed by two-way ANOVA, which demonstrated a significant effect of STZ factor ($F_{(1,26)} = 17.934$, $P = 0.001$); *significant different from Sham-AD group (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $P = 0.007$) and from Sham-CR group ($P = 0.004$). B) Serum S100B: the results shown that ICV-STZ injection caused a significant increase in serum S100B levels (effect of STZ factor, $F_{(1,26)} = 5.673$, $P = 0.025$); note that CR diet was able to prevent and/or revert the increase in S100B levels induced by ICV-STZ injection (significant effect of CR factor, $F_{(1,26)} = 15.224$, $P = 0.001$ and interaction between STZ and CR factors, $F_{(1,26)} = 9.120$,

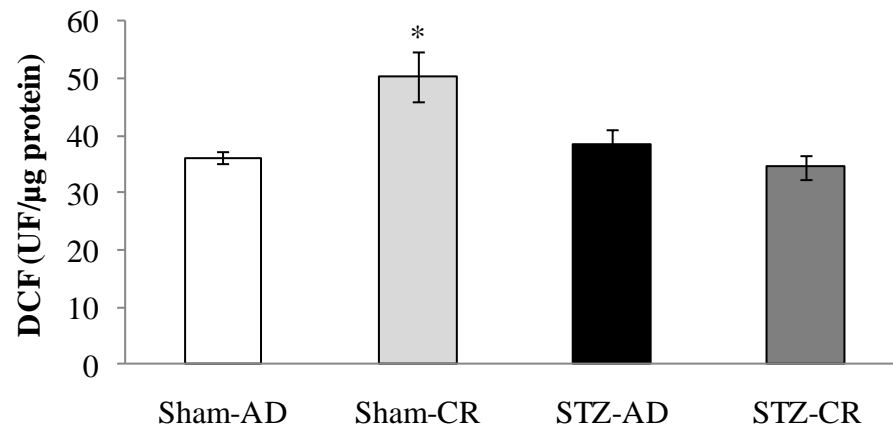
$P = 0.006$); *significant different from other groups (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $P \leq 0.004$). C) Adipose S100B, there was a significant reduction in adipose S100B levels when compared the STZ-CR group to STZ-AD group (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $*P = 0.034$). Values are mean \pm standard error (N = 8–10 for group).

ROS generation

We used the technique of DCFH-DA to measure the levels of total ROS generation in cortex, hippocampus and striatum of rats submitted to CR diet and ICV-STZ injection. As showed in Fig. 4A, the Sham-AD group (52 ± 5 DCF UF/ μ g protein) presented the highest cortical ROS generation in relation to all other groups ($F_{(1,42)} = 8.571$, $P \leq 0.02$). The Sham-CR group (38 ± 3 DCF UF/ μ g protein), STZ-AD group (38 ± 3 DCF UF/ μ g protein) and STZ-CR (25 ± 2 DCF UF/ μ g protein) showed a significant reduction in cortical ROS generation when compared to Sham-AD ($P = 0.020$). Also, there was a tendency to ROS generation be lower in STZ-CR (25 ± 2 DCF UF/ μ g protein) when compared to STZ-AD (38 ± 3 DCF UF/ μ g protein, $P = 0.062$). In the hippocampus, the Sham-CR group presented the highest level of ROS generation in relation to all other groups (Fig. 4B) ($P < 0.05$). As showed in Fig. 4C, the ICV-STZ injection and CR diet did not alters the striatal ROS generation.



B) Hippocampal ROS generation



C) Striatal ROS generation

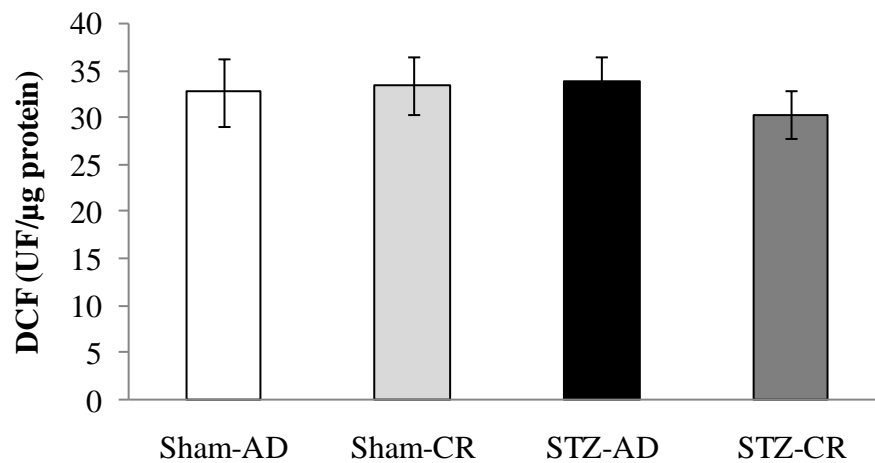
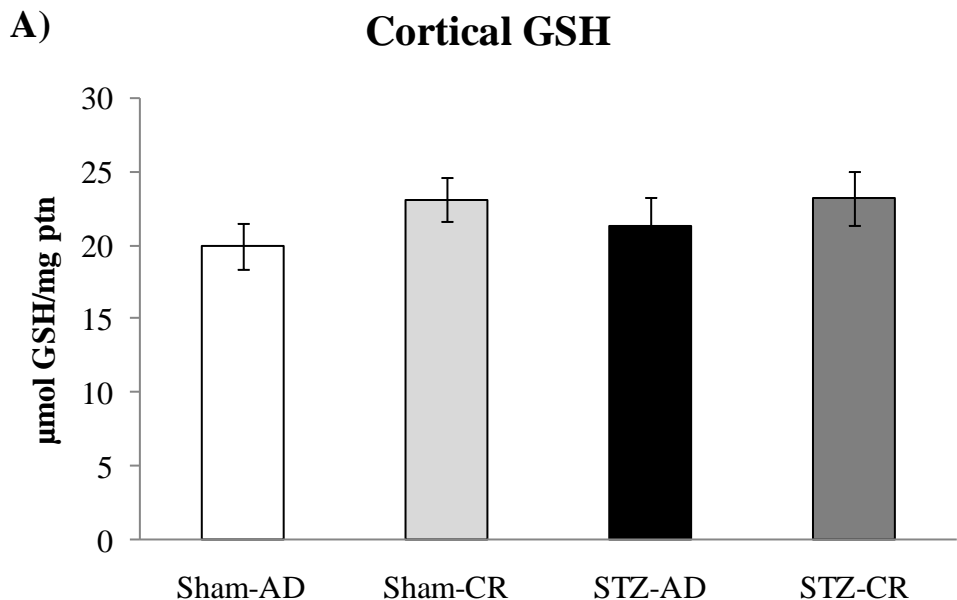


Fig. 4 - Effects of CR diet and ICV-STZ injection on total ROS generation based on DCFH-DA technique. A) Cortical ROS generation: the results demonstrate that ICV-STZ injection caused a significant reduction in total ROS generation, as revealed by two-way ANOVA, which demonstrated a significant effect of STZ factor ($F_{(1,29)} = 5.061$, $P = 0.032$); *Significant different from other groups, (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $P \leq 0.03$; the values that share the same superscript letters are significantly different, a) $P = 0.001$; # tendency to be different to STZ-AD, $P = 0.062$. B) Hippocampal ROS generation: the results demonstrate that CR diet caused a significant increase in ROS generation (significant effect of CR factor $F_{(1,27)} = 6.933$, $P = 0.014$); *Significant different from other groups, (one-way ANOVA, followed by

Tukey's test, $P \leq 0.03$. C) Striatal ROS generation: the results demonstrate that neither CR diet nor ICV-STZ injection alters the striatal ROS generation. Values are mean \pm standard error (N = 8–10 for group).

GSH content

The content of GSH was determined to evaluate the effects of CR diet and ICV-STZ injection in this antioxidant thiol-based peptide. As showed in Fig. 5A, no changes were observed in cortical GSH content at both CR diet and ICV-STZ injection. In the hippocampus, the STZ-AD group ($10 \pm 1 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) presented the lowest level of GSH in relation to all other groups (Fig. 5B) ($P \leq 0.002$). The STZ-CR group ($20 \pm 2 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) showed a significant increase in GSH content when compared to STZ-AD group ($P = 0.001$). Note that CR diet did not have *per se* effect. In the striatum, the Sham-AD group ($3.36 \pm 0.21 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) presented the highest GSH content in relation to all other groups (Fig. 5C) ($P \leq 0.03$). Both Sham-CR group ($2.22 \pm 0.15 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) and STZ-AD group ($1.9 \pm 0.38 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) and STZ-CR group ($2.2 \pm 0.31 \mu\text{mol GSH/mg protein}$) showed a significant reductions in striatal GSH content when compared to Sham-AD group ($P = 0.037$, $P = 0.003$ and $P = 0.023$, respectively).



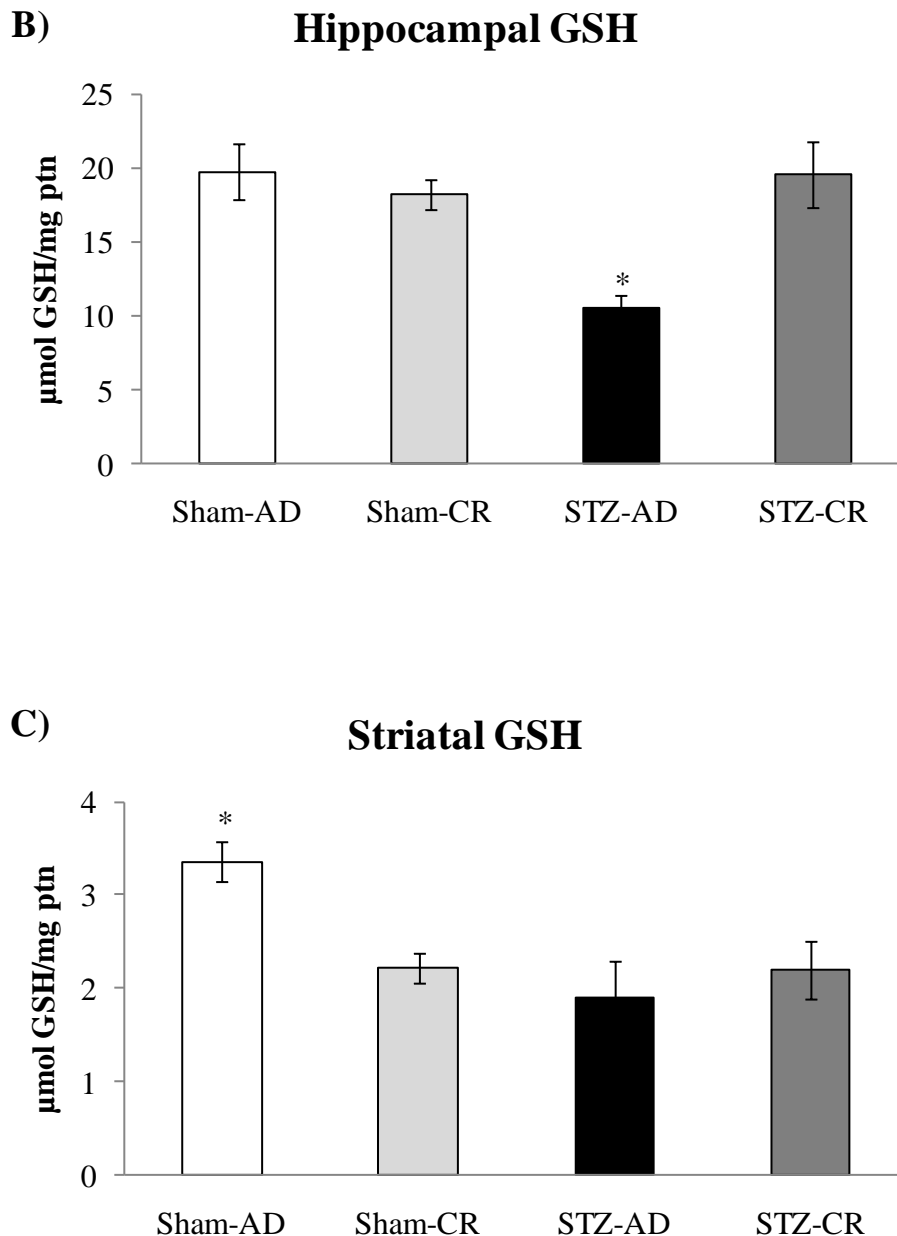
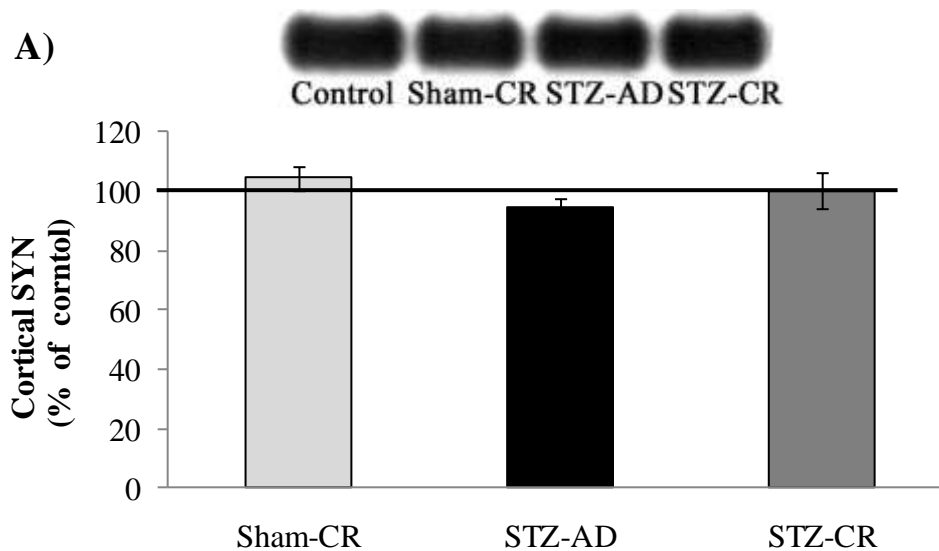


Fig 5 - Effects of CR diet and ICV-STZ injection on GSH levels. A) Cortical GSH: the results shown that neither CR diet nor ICV-STZ injection alters GSH levels. B) Hippocampal GSH: the results demonstrate that ICV-STZ injection caused a significant reduction in hippocampal GSH levels, as revealed by two-way ANOVA, which demonstrated a significant effect of STZ factor ($F_{(1,29)} = 5.061$, $P = 0.032$); note that CR diet prevented and/or reverted the decrease in hippocampal GSH levels (significant effect of CR factor $F_{(1,29)} = 9.791$, $P = 0.004$); *significant different from other groups (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $P \leq 0.002$). C) Striatal GSH: the results

demonstrate that ICV-STZ injection caused a significant reduction in GSH levels (significant effect of CR factor $F_{(1,27)} = 6.933$, $P = 0.014$); *Significant different from other groups, (one-way ANOVA, followed by Tukey's test, $P \leq 0.03$). Values are mean \pm standard error (N = 8–10 for group).

SYN expression

We used the western blotting analyses to measure the levels of SYN in frontal cortex, hippocampus and striatum of rats submitted to CR diet and ICV-STZ injection. In frontal cortex (Fig. 6A) and striatum (Fig. 6C) the CR diet and ICV-STZ injection did not showed effect on SYN expression. On the other hand, ss showed in Fig. 6B, the STZ-AD group ($88 \pm 4\%$) showed a significant reduction in hippocampal SYN expression, when compared to Sham-CR group ($P = 0.038$). Note that CR diet did not alter *per se* the hippocampal SYN expression ($F_{(3,26)} = 0.164$, $P = 0.688$).



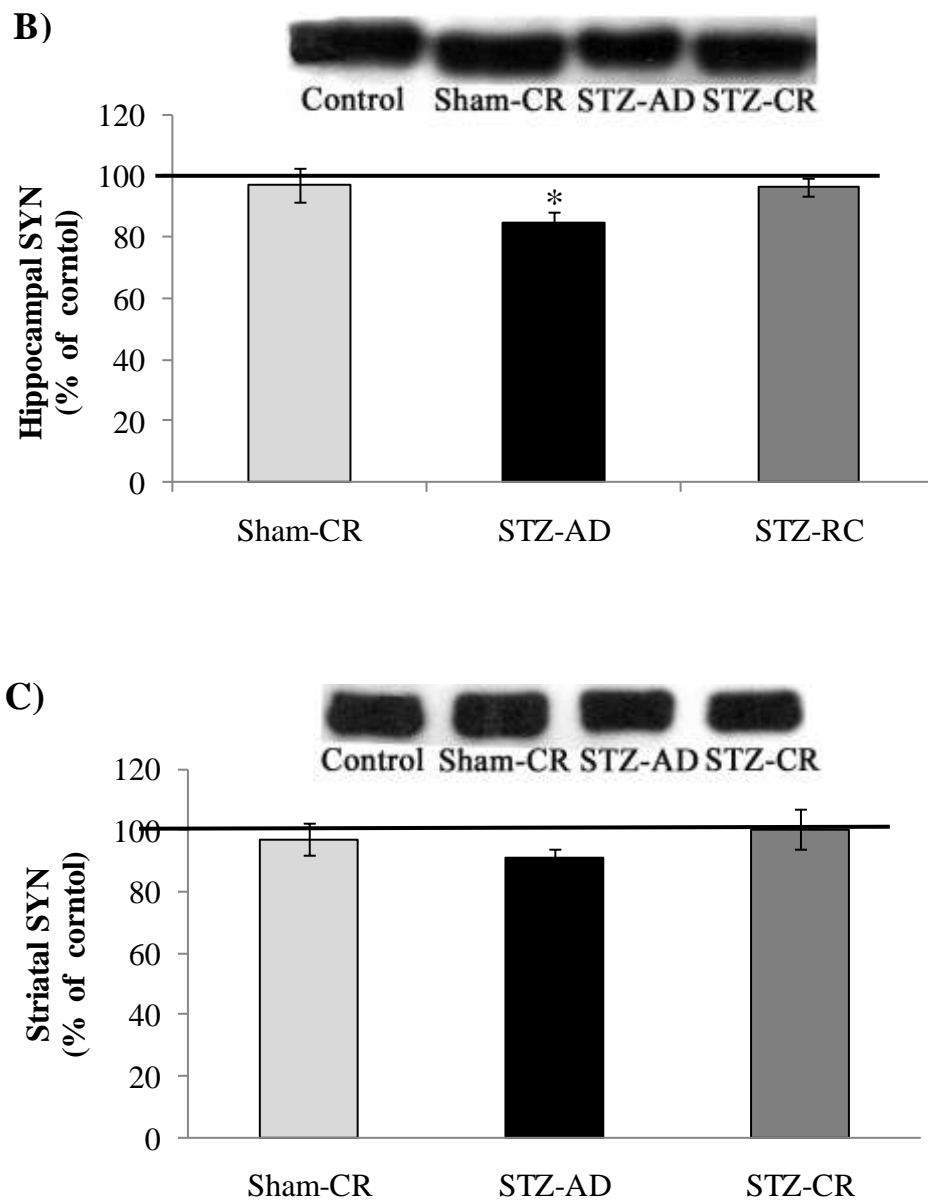


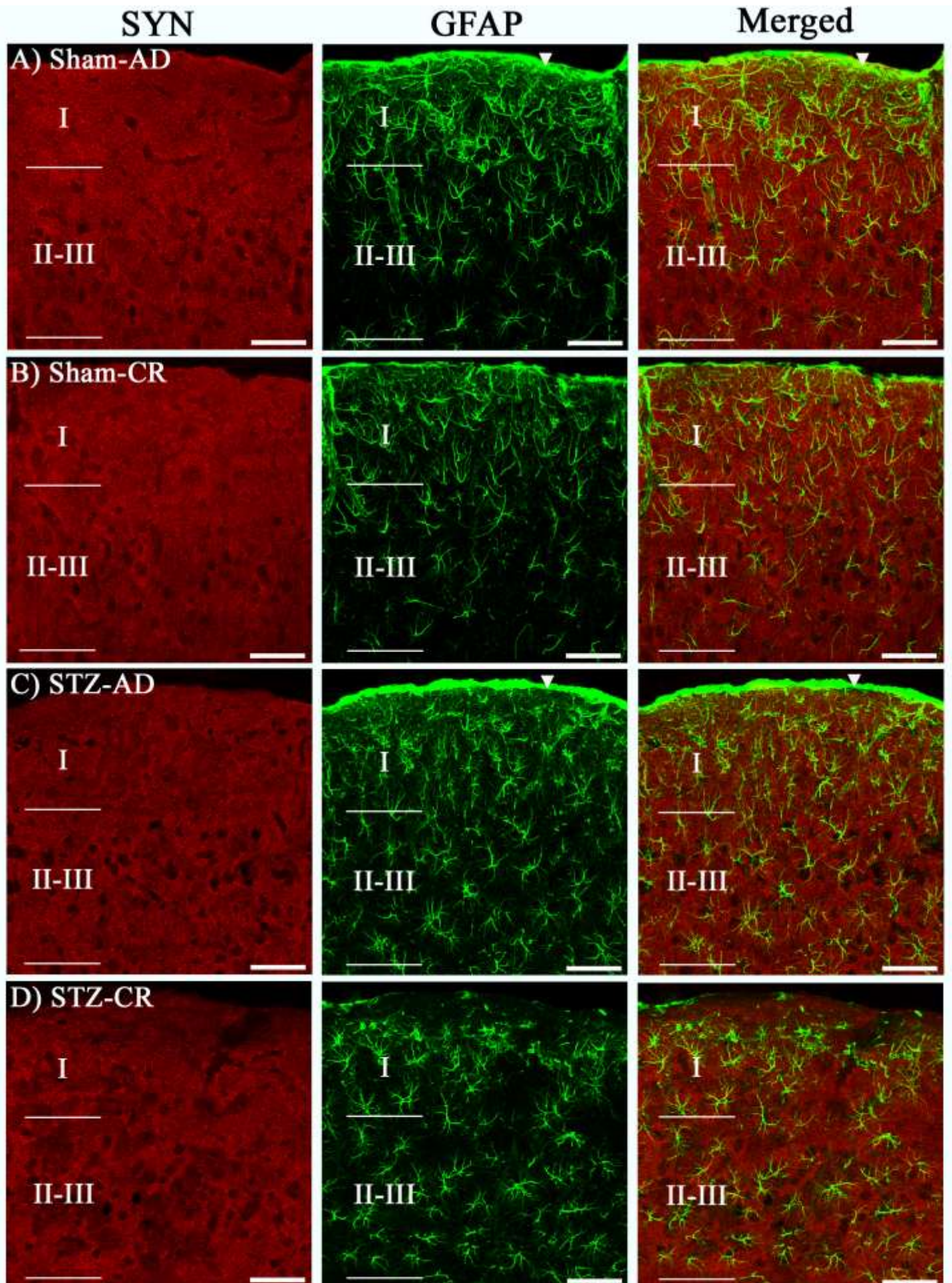
Fig 6 - Effects of CR diet and ICV-STZ injection on SYN expression. A) Cortical SYN: the results shown that neither CR diet nor ICV-STZ injection alters the SYN expression. B) Hippocampal SYN: the results shown that ICV-STZ injection caused a significant reduction of SYN expression, as revealed by two-way ANOVA, which demonstrated a significant effect of STZ factor ($F_{(1,26)} = 10.934$, $P = 0.004$); *Significant different from control group ($P = 0.038$). C) Striatal SYN: the results shown that neither CR diet nor ICV-STZ injection alters the SYN expression. Values are calculate in percentage, assuming the Sham-AD group as control group (100% of SYN expression, horizontal bar). Values are mean \pm standard error (N = 6–8, for grup).

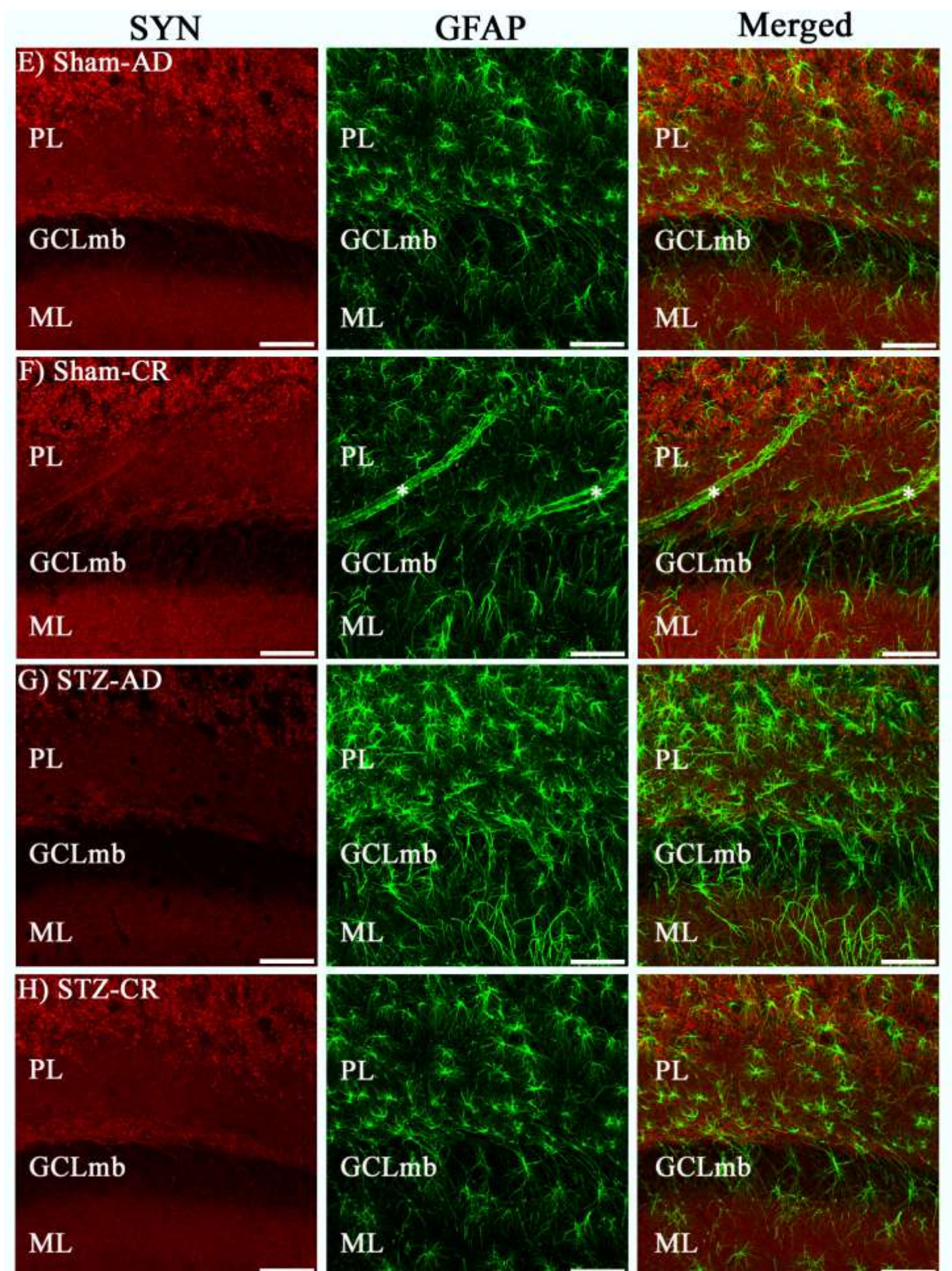
Confocal microscopy

In the frontal cortex, immunostaining for SYN appears diffusely throughout the tissue, with more intensive marked regions corresponding to regions of pre-synaptic contact (Fig. 7 A-D). Also, immunostaining around the neuronal bodies may correspond to presynaptic contacts from axosomatic synapses. Immune negative regions for SYN were confirmed, including the corpus callosum (not showed) and the region of neuronal bodies. There was no difference between the groups in immunostaining for SYN. The analysis of obtained images seem to indicate an increase of GFAP immunostaining specifically in the cortical layer II-III of the STZ-AD and STZ-CR groups when compared to Sham-AD and Sham-CR, suggesting a possible astrogliosis induced by STZ.

In the hippocampus, specifically in the region of the dentate gyrus, confocal microscopy indicated a reduction of immunostaining for SYN in STZ-AD group when compared to Sham-AD and Sham-CR groups, which suggest a possible reduction in presynaptic contacts (Fig. 7 E-H). Furthermore, STZ-CR group appears to have a more pronounced immunostaining for SYN when compared to STZ-AD and also appears there was no difference between STZ-CR, Sham-AD and Sham-STZ groups. The images showed an increased immunostaining for GFAP in STZ-AD group when compared to Sham-AD and Sham-CR, which suggests a possible astrogliosis caused by the infusion of STZ. Apparently the CR is able to prevent/revert this astrogliosis, since the STZ-CR group- appears to have a reduced immunostaining for GFAP when compared to STZ-AD group.

In the striatum, the images showed that there was no difference in SYN and GFAP immunostaining between four groups studied, suggesting that both infusion STZ when the CR cause no effects on these protein specifically in this brain structure (Fig. 7 I-M).





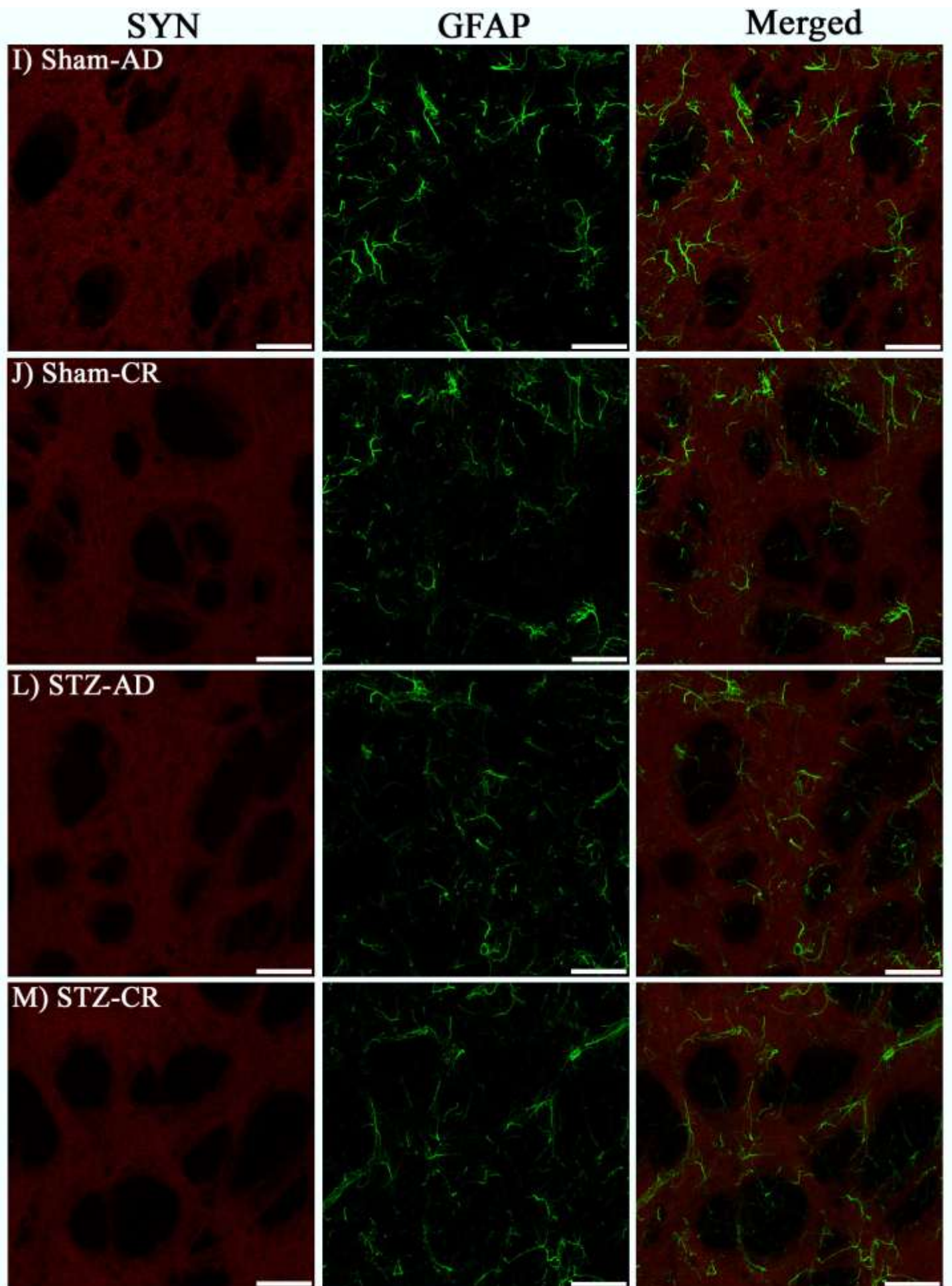


Fig.7 - Confocal microscopy images of the effects of CR diet and ICV-STZ injection. The serial stack images of SYN and GFAP immunofluorescence staining were obtained with a Confocal Olympus IX-81 microscope. A-D) Frontal cerebral cortex: The expression of SYN was not altered among groups and there is apparently a more intense immunolabeling for GFAP in layer I than in II layer on Sham-AD and Sham-CR groups. In STZ-AD and STZ-CR groups immunolabeling in layers I and II is apparently the same; layer I, layer II-III, ► pia mater. E-F) Dentate gyrus of hippocampus: The ICV-STZ injection significantly decreased SYN expression and increased GFAP expression (indicative of astrogliosis) (panel G); Interestingly, CR diet prevented and/or revert the STZ effect on SYN and GFAP expression (panel H); GCLmb: medial blade of granular cell layer, ML: molecular layer, PL: plexiform layer, * blood vessels. I-M) Striatum: The expression of SYN and GFAP were not altered among groups in striatum. Magnification $\times 400$, 1.35 μm of optical stack thickness and thirteen confocal planes. Scale bar = 50 μm .

References

- Browne, R. W. e D. Armstrong. Reduced glutathione and glutathione disulfide. Methods Mol Biol, v.108, p.347-52. 1998.
- Leite, M. C., F. Galland, *et al.* A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. J Neurosci Methods, v.169, n.1, Mar 30, p.93-9. 2008.
- Mladenovic-Djordjevic, A., M. Perovic, *et al.* Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. Neurochem Int, v.56, n.2, Jan, p.250-5. 2010.
- Peterson. G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 1977, 83:346-356.
- Ribeiro, L. C., A. Quincozes-Santos, *et al.* Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. Neurosci Res, v.64, n.3, Jul, p.330-4. 2009.
- Rodrigues, L., R. Biasibetti, *et al.* Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. J Alzheimers Dis, v.17, n.1, p.193-202. 2009.
- Rodrigues, L., M. F. Dutra, *et al.* Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. J Neural Transm, v.117, n.11, Nov, p.1295-305. 2010.
- Vieira De Almeida, L. M., C. C. Pineiro, *et al.* Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. Neurochem Res, v.33, n.1, Jan, p.8-15. 2008.,

PARTE III

3. Discussão

3.1. Estado nutricional e metabólico

O peso dos animais foi monitorado semanalmente para a avaliação do ganho de peso corporal ao longo do período experimental. Após 17 semanas, o grupo de animais submetido à RC apresentou uma redução significativa de 28% no ganho de peso corporal quando comparados ao grupo de animais AD. Tais resultados estão de acordo com dados recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais 12 semanas de RC resultaram em redução de 27% de ganho de peso corporal (Santin *et al.*, 2011), sugerindo uma boa reprodutibilidade deste modelo de RC.

Os níveis de glicose plasmática foram medidos utilizando-se um glicômetro, em dois tempos ao longo do período experimental. Os resultados demonstraram que 12 e 17 semanas de RC não alteraram os níveis de glicose, o que indica que o protocolo de RC adotado garante níveis de glicose iguais aos dos animais do grupo AD. O estado nutricional e metabólico dos animais submetidos à dieta AD e RC foram feitos ao final do período experimental, por meio de medidas bioquímicas séricas. Os resultados demonstraram não haver diferenças entre os dois grupos, o que indica um bom estado de saúde e adequada nutrição dos animais. Entretanto, a RC causou uma redução significativa nos níveis de colesterol sérico, o que está de acordo com dados prévios (Santin *et al.*, 2011).

3.2. Efeitos da RC sobre os tecidos periféricos

3.2.1 Espécies reativas de oxigênio

Os níveis de geração total de ROS no fígado foram mensurados pela técnica de DCFH-DA. Os resultados demonstraram que a RC crônica causou uma redução significativa de 31% na geração total de ROS e este dado está de acordo com a idéia de

que a RC pode atuar reduzindo a geração de ROS e reduzindo os níveis basais de marcadores de dano oxidativo a macromoléculas (Sohal e Weindruch, 1996; Kowaltowski, 2011, Speakman e Mitchell, 2011). Recentemente, utilizando a técnica de DCF, Hayashida *et cols* (2011) reportaram uma redução significativa na geração de ROS mitocondriais induzida pela RC (Hayashida *et al.*, 2011). Entretanto, não foram encontradas diferenças na geração total de ROS em homogenato de fígado (Ugochukwu e Figgers, 2007) e em hepatócitos isolados de ratos submetidos à RC (Lambert e Merry, 2005).

A maioria dos estudos que investigaram os efeitos da RC sobre a geração de ROS no fígado de roedores mensuraram a produção de H₂O₂ em isolado mitocondrial e tem sido reportado uma diminuição na produção de H₂O₂ causada pela RC (Gomez *et al.*, 2007, Lambert e Merry, 2005, Hagopian *et al.*, 2005, Lopez-Torres *et al.*, 2002, Ash e Merry, 2011). Esta diminuição tem sido localizada no complexo I da cadeia transportadora de elétrons, pois tal diminuição acontece apenas com substratos ligados ao complexo I (piruvato/malato) e o mecanismo envolvido é um baixo grau de redução do gerador complexo I, o que reduz o fluxo de elétrons através deste complexo (Lopez-Torres *et al.*, 2002). Como especulado por Barja (2002) a redução na geração de ROS através de um declínio no grau de redução do complexo I pode ser um mecanismo evolucionário da longevidade altamente conservado, tanto entre diferentes espécies quanto em uma espécie específica para resistir a períodos de escassez de alimento (Barja, 2002).

3.2.2. Marcadores de dano

Como foi encontrada uma redução na geração de ROS, nós decidimos investigar se tal efeito poderia ser refletido nos níveis de peroxidação lipídica no fígado. Para isto, mensuramos os níveis de MDA, um marcador de peroxidação lipídica causada por

ROS, utilizando o teste de TBARS. Os resultados obtidos demonstraram que a RC crônica não alterou a lipoperoxidação hepática. Por outro lado, resultados prévios demonstraram que a RC de longo prazo causa uma redução significativa nos níveis hepáticos de TBARS (Aydin *et al.*, 2007, Hamden *et al.*, 2009). Ainda, a RC diminuiu significativamente a peroxidação lipídica em ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina (Ugochukwu e Figgers, 2007) e outros estudos utilizando diferentes cepas de ratos e diferentes intensidades e durações de RC encontraram uma redução na lipoperoxidação em isolado mitocondrial hepático com 25% e 50% de RC durante 2 semanas (Maheshwari *et al.*, 2012) e uma redução da lipoperoxidação em homogenato total hepático com 40% de RC aos 12 e aos 21 meses de idade (Rao *et al.*, 1990).

Para avaliar parâmetros de dano/modificação oxidativa em proteínas, mensuramos o conteúdo de grupamentos carbonis no rim e coração. Os resultados indicaram que a RC não altera a carbonilação de proteínas no rim. Interessantemente, nossos resultados demonstram que a RC aumenta significativamente os grupos carbonis no coração. Neste contexto, Sohal *e cols.* (1994) encontraram um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas relacionado ao envelhecimento, no rim e coração de camundongos, e tal aumento foi significativamente reduzido pela RC (Sohal *et al.*, 1994). Além disso, outros resultados demonstraram que RC pode reduzir a carbonilação de proteínas no rim de ratos (Chen *et al.*, 2008). Os nossos resultados de aumento na carbonilação de proteínas no coração estão de acordo com dados prévios, nos quais a RC de curta duração (2 meses) causou um aumento significativo no conteúdo de proteínas carboniladas citosólicas e mitocondriais no coração (Judge *et al.*, 2004). Entretanto, Colotti *e cols* (2005) não encontraram nenhuma diferença no conteúdo de carbonis no coração entre ratos submetidos a 21 meses de jejum intermitente ou dieta AD (Colotti *et al.*, 2005).

A carbonilação de proteínas tem sido relacionada com dano oxidativo a proteínas, ou seja, tal parâmetro pode refletir a proporção de proteínas que foram danificadas através da oxidação, o que leva a dano da função da proteína, tendo assim papel central nos mecanismos básicos de diversas doenças e na senescência (Berlett e Stadtman, 1997, Stadtman e Berlett, 1998). Todavia, a carbonilação de proteínas pode ter também um papel potencial no controle da qualidade de proteínas e na deterioração celular (Nystrom, 2005), pode ocorrer em animais jovens e tecidos normais, bem como, em condições patológicas e em animais velhos, o que indica que a carbonilação de proteínas pode ter um papel fisiológico (Nystrom, 2005; Nakamura *et al.*, 2010).

3.2.3. Defesas antioxidantes não-enzimáticas

O conteúdo total de grupos -SH foi avaliado no rim, no coração e no fígado e não foram encontradas diferenças entre os grupo AD e RC. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mensurar o conteúdo de grupos -SH no rim de ratos submetidos a RC crônica. Entretanto, outro estudo indicou que a RC crônica em camundongos velhos pode aumentar o conteúdo de grupos -SH (Forster *et al.*, 2000). Os grupos -SH participam de várias reações, como conjugações, e podem reagir com quase todos oxidantes fisiológicos, assim protegendo as células e tecidos contra o dano oxidativo (Winterbourn e Hampton, 2008, Di Simplicio *et al.*, 2003). Além disso, os grupos -SH estão envolvidos em muitas propriedades e funções biológicas, como na estrutura de proteínas, catalises enzimáticas e vias de sinalização sensíveis ao estado redox (Bindoli *et al.*, 2008).

Nós também mensuramos no fígado os níveis de GSH, o mais abundante antioxidante tiólico intracelular, e os resultados demonstraram que a redução crônica na ingesta de calorias aumenta significativamente os níveis de GSH, o que está de acordo com dados previamente publicados, os quais demonstraram que a RC pode aumentar o

conteúdo de GSH hepática (Ugochukwu e Figgers, 2007). Todavia, outro estudo encontrou uma redução nos níveis de GSH no fígado em ratos submetidos a RC de longa duração (Aydin *et al.*, 2007).

3.2.4. Defesas antioxidantes enzimáticas

O efeito da RC crônica sobre defesas antioxidantes enzimáticas foi avaliado pela atividade de SOD e CAT, duas enzimas com papéis fundamentais na defesa contra insultos oxidativos. Não foram observadas diferenças entre as dietas AD e RC na atividade da SOD no rim, no coração e no fígado e não foram encontradas diferenças na atividade da CAT no coração e no fígado, o que sugere que a RC crônica não altera tais atividades enzimáticas nestes órgãos. Entretanto, estudo prévio demonstrou que a RC reduz a atividade da SOD aos 17 meses de idade no coração e aos 23 meses de idade no rim. O mesmo estudo indicou que a RC reduz a atividade da CAT no coração aos 9 meses de idade, mas aumenta tal atividade aos 17 e 23 meses de idade (Sohal *et al.*, 1994). As atividades da CAT e da SOD não foram alteradas pela RC no coração dos ratos no nosso estudo, o que está de acordo com uma publicação prévia, na qual ratos submetidos ao jejum intermitente não apresentaram efeitos significativos na atividade e distribuição de enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT, na parede do ventrículo esquerdo aos 12 e aos 18 meses de idade (Simonetti *et al.*, 1990).

Em relação os efeitos da RC sobre a atividade da SOD e CAT no fígado, dados publicados indicam que 6 meses de 40% de RC causa um aumento significativo nas atividades da SOD e CAT em ratos velhos (Hamden *et al.*, 2009) e também outros resultados demonstraram aumento na atividades da SOD e CAT hepáticas em ratos submetidos a RC de longo prazo (Rao *et al.*, 1990). Todavia, outros resultados indicaram que a RC é capaz de diminuir significativamente a atividade da CAT hepática em ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina, sem diminuir

significativamente a atividade da SOD hepática nestes ratos (Ugochukwu e Figgers, 2007). Resultados prévios indicaram que a RC crônica aumenta em 50% a atividade da SOD e reduz em 10% a atividade da CAT no fígado de camundongos (Dubnov *et al.*, 2000), e outros resultados indicaram que a RC aumenta a atividade da CAT sem alterar a atividade da SOD (Koizumi *et al.*, 1987).

Por outro lado, nossos resultados demonstram que RC aumenta a atividade da CAT no rim, o que indica que uma redução crônica na ingesta de calorias pode alterar a atividade desta enzima no rim. Tal resultado está de acordo com resultados previamente publicados, os quais demonstraram que a RC aumenta a atividade da CAT no rim aos 9, 17 e 23 meses de idade em camundongos (Sohal *et al.*, 1994). Entretanto, foi reportado não haver efeito da RC sobre a atividade da CAT no rim de camundongos (Cadenas *et al.*, 1994).

Nós especulamos que uma redução crônica na ingestão de calorias poderia levar a um aumento compensatório na atividade antioxidante endógena da CAT no rim. Entretanto, tem sido proposto que uma redução crônica na ingestão de vitaminas antioxidantes, como a vitamina E, poderia levar a mecanismos compensatórios no sistema de antioxidantes endógenos (Cadenas *et al.*, 1994). Nós descartamos tal possibilidade, levando em consideração que a maioria dos estudos que utilizam 40% de redução na ingesta de calorias prove suplementação vitamínica e mineral para garantir uma ingesta equivalente de nutrientes para os animais submetidos à RC, em relação aos animais AD (Sohal *et al.*, 1994; Forster *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2009). Todavia, já foi demonstrado haver uma diminuição nos níveis de vitamina E no rim e no coração de ratos submetidos a 40% de RC crônica (Kamzalov e Sohal, 2004).

Nós adotamos uma redução de 30% na ingesta de calorias e as análises bioquímicas séricas indicaram não haver diferenças no estado nutricional dos animais do grupo RC quando comparados ao grupo AD, exceto pela redução nos níveis de

colesterol total do grupo RC. Portanto, o aumento na atividade da CAT observado no tecido renal é provavelmente uma resposta compensatória para a manutenção de uma adequada homeostase renal, o qual pode aumentar a capacidade de decomposição do H_2O_2 nos ratos submetidos à RC.

3.2.5. Possíveis conexões entre as alterações observadas

A carbonilação de proteínas também ocorre como consequência de outros mecanismos além do dano oxidativo (Nystrom, 2005, Nakamura *et al.*, 2010). Nós especulamos que tal aumento na carbonilação de proteínas, em nossas condições experimentais, pode ter efeitos diferentes daqueles causados pelo dano oxidativo, uma vez que nossos resultados demonstraram que a RC causa um aumento na carbonilação protéica no coração, sem alterar o conteúdo de grupos -SH ou as atividades da SOD e CAT (duas enzimas chaves contra a toxicidade do oxigênio).

Todavia, nós também especulamos que o aumento no conteúdo de proteínas carboniladas no coração pode ser uma consequência da falta de aumento nas atividades da SOD e CAT neste órgão. Além disso, os grupos -SH constituem um dos mais importantes sistema de defesa antioxidante não-enzimático das células e o conteúdo de grupos -SH também não foi alterado no coração, o que sugere que o sistema de proteção antioxidante pode não trabalhar de uma maneira eficiente no coração dos ratos submetidos a RC. Assim, o aumento observado na atividade da CAT no rim provavelmente atenuou o desequilíbrio no estado redox e preveniu a formação de proteínas carboniladas neste órgão.

Como revisado por Sohal e Weindruch (1996), tem sido demonstrado que a RC pode reduzir os níveis basais de estresse oxidativo e retardar o aumento no dano oxidativo associado à senescência (Sohal e Weindruch, 1996). Nós especulamos que a diminuição na geração de ROS induzida pela RC pode ter dois significados diferentes

de apenas simplesmente uma redução no estado/estresse oxidativo. Primeiro, em nosso estudo não foram observadas diferenças nas atividades da SOD e da CAT no fígado, ambas enzimas sequestradoras de ROS. Estes dados corroboram tal idéia, pois a atividade destas enzimas são suprarreguladas em condições de estresse oxidativo (D'alessandro e Zolla, 2011, Cao *et al.*, 2003) e nós não encontramos diferenças entre os grupos AD e RC.

Segundo, nossos resultados sobre os níveis de MDA também sugerem que a redução na geração de ROS não afetou o estado de estresse oxidativo no tecido hepático. De fato, as ROS não são somente causadoras de dano celular, mas também atuam em vias de sinalização sensíveis ao estado redox (Forman *et al.*, 2010, Burhans e Heintz, 2009, Finley e Haigis, 2009). Neste contexto, as ROS são importantes moléculas sinalizadoras e, a partir de nossos resultados, nós sugerimos que a redução na geração de ROS pode ser um dos mecanismos pelos quais a RC exerce seus efeitos no tecido hepático.

A partir de nossos resultados sobre GSH juntamente com os resultados de produção de ROS, nós especulamos como a RC poderia modular o estado redox no fígado. O elevado nível de GSH, a principal molécula antioxidante nas células de mamíferos, induzido pela RC poderia, em parte, ser responsável pela redução nos níveis de ROS, o que resultaria em um baixo estado oxidativo. Muitas ROS são eliminadas pela GSH através de reações com seus grupamentos tiólicos (Trachootham *et al.*, 2008). Portanto, a RC pode aumentar a proteção das células contra a produção de ROS através do aumento da função do sistema de defesa antioxidante. Esta idéia é consistente com dados prévios que demonstraram que a RC causa um aumento na atividade da glutathione redutase e também aumenta o conteúdo de GSH no fígado (Ugochukwu e Figgers, 2007).

Outra especulação seria que a redução na geração de ROS causada pela RC poderia levar a uma conseqüente economia do conteúdo de GSH. Além de ser um cofator para diversas enzimas antioxidantes, a GSH possui várias funções, as quais incluem a eliminação direta de $\bullet\text{OH}$ e de O_2 , e a regeneração de outros antioxidantes como as vitaminas C e E para suas formas ativas (Trachootham *et al.*, 2008; Nakamura, 1997).

3.2.6. Considerações sobre os efeitos periféricos da RC

A partir da comparação de nossos resultados com estudos prévios, nós podemos concluir que os efeitos da RC crônica sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e sobre as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas podem variar dependendo do tipo de tecido e da espécie animal estudada, da duração da RC e do tipo de defesa/dano estudado. Por exemplo, outros fatores que podem explicar os diferentes efeitos causados pela RC podem ser a natureza e a quantidade de proteínas específicas presentes em um tipo de tecido e expostas a carbonilação ou perda de grupos -SH (Forster, 2000).

3.3. Restrição calórica e o modelo de demência

Nossos resultados dos efeitos da RC sobre o ganho de peso corporal dos animais submetidos ao modelo de demência por infusão ICV de STZ estão de acordo com os resultados obtidos na parte experimental relacionada aos tecidos periféricos. Como demonstrado, o ganho de peso corporal ao final do experimento foi significativamente reduzido nos animais submetidos à RC, ou seja, tanto os animais do grupo Sham-RC como os do grupo STZ-RC tiveram menor ganho de peso quando comparados aos grupos Sham-AD e STZ-AD. Assim, nós consideramos que o protocolo de RC adotado possui uma boa reprodutibilidade. Além disso, os resultados também permitem concluir

que a infusão ICV de STZ não afetou o ganho de peso dos animais ao final do experimento.

Ainda, os resultados sobre as medidas bioquímicas séricas demonstraram efeitos equivalentes aos anteriores, não havendo diferenças entre os quatro grupos experimentais (Sham-AD, Sham-RC, STZ-AD e STZ-RC) para os níveis de glicose, proteínas totais, albumina, uréia, ácido úrico, creatinina e triglicerídeos. A RC crônica novamente reduziu significativamente os níveis de colesterol sérico e, interessante, a infusão ICV de STZ causou um aumento significativo no colesterol sérico. Como podemos observar dos resultados, a RC foi capaz de reverter tal aumento.

Nós utilizamos o teste do labirinto aquático de Morris para avaliar os efeitos da RC e da infusão ICV de STZ sobre parâmetros cognitivos, mais especificamente sobre parâmetros da memória de referência. Assim como resultados prévios publicados por nosso grupo de pesquisa (Biasibetti *et al.*, 2013; Tramontina *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2009, 2010) a infusão ICV de STZ causou um significativo prejuízo na memória dos animais, como demonstrado pelo pior desempenho do grupo STZ-AD na curva de aprendizado e também no dia do teste de memória, no qual o grupo STZ-AD apresentou a maior latência para encontrar o local da plataforma, o menor número de cruzamentos sobre o local da plataforma e não houve diferença entre o tempo de permanência nos quadrantes alvo e oposto.

Nossos resultados também demonstraram que a RC crônica foi capaz de reverter e/ou prevenir o prejuízo na memória de referência induzida pela infusão ICV de STZ. Os animais do grupo STZ-RC apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle em todos os parâmetros de memória avaliados. A RC apresentou efeito *per se* em apenas um dos parâmetros avaliados: o grupo Sham-RC apresentou um maior número de cruzamentos sobre o local da plataforma quando comparado ao grupo Sham-AD.

Os resultados de melhora funcional induzida pela RC estão de acordo com resultados previamente publicados, nos quais a RC de longa duração atenuou déficits de memória relacionados ao envelhecimento em tarefas dependentes do hipocampo em diferentes cepas de ratos (Adams *et al.*, 2008, Markowska e Savonenko, 2002, Stewart *et al.*, 1989, Ingram *et al.*, 1987; Idrobo *et al.*, 1987).

A técnica ELISA foi utilizada para a mensuração dos níveis da proteína S100B no líquido, no soro e no tecido adiposo dos animais. Nossos resultados demonstraram que a infusão ICV de STZ causou uma redução significativa nos níveis líquidos de S100B, resultado que está de acordo com outros previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Biasibetti *et al.*, 2013, Rodrigues *et al.*, 2009, 2010). A RC crônica não foi capaz de alterar a redução nos níveis de S100B no líquido e também não apresentou efeito *per se*. Considerando-se que a S100B extracelular possui efeito trófico sobre neurônios e células gliais e que no SNC a S100B é produzida e secretada predominantemente pelos astrócitos (Gonçalves *et al.*, 2010, Van Eldik e Wainwright, 2003), a diminuição observada no conteúdo de S100B no líquido do grupo STZ-AD pode representar um prejuízo na função astrogliar em algumas regiões encefálicas para responder a danos.

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, a qual no SNC é expressa e secretada predominantemente por astrócitos e níveis elevados desta proteína em estruturas encefálicas têm sido observados em doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Gonçalves *et al.*, 2010). Intracelularmente, a S100B liga-se a muitas proteínas alvo e pode modular proliferação celular, plasticidade do citoesqueleto e metabolismo energético dos astrócitos (Gonçalves *et al.*, 2010, Van Eldik e Wainwright, 2003). A partir de nossos resultados podemos concluir que no SNC a RC crônica não exerce seus efeitos através da modulação dos níveis da proteína S100B.

Interessantemente, no soro, os resultados indicaram que a infusão ICV de STZ causou um aumento significativo no imunoconteúdo da proteína S100B e que tal aumento foi revertido pela RC crônica, visto que o grupo STZ-RC apresentou nível de S100B semelhante ao grupo Sham-AD. Por outro lado, no tecido adiposo a única alteração encontrada foi diferença estatística entre os grupos STZ-AD e STZ-RC.

Entre os candidatos a ser um marcador molecular periférico confiável para injúrias e/ou disfunções do SNC está a proteína S100B (Dassan *et al.*, 2009, Gonçalves *et al.*, 2008, Kleindienst e Ross Bullock, 2006). De fato, estudos com amostras séricas, após dano encefálico agudo, têm demonstrado que os níveis de S100B podem alterar-se; todavia a interpretação destes resultados é complexa, principalmente devido às fontes extra-encefálicas que contribuem para o conteúdo sérico de S100B (Gonçalves *et al.*, 2010).

Como o grupo STZ-AD apresentou aumento significativo no imunoconteúdo sérico de S100B, redução significativa de S100B presente no líquido e não alterou S100B no tecido adiposo é possível que outras fontes periféricas de S100B possam ter contribuído para o aumento encontrado no soro. De fato, a S100B tem sido localizada em várias células de tecidos não neuronais (Haimoto *et al.*, 1987, Zimmer e Van Eldik, 1987), como em condrócitos (Stefansson *et al.*, 1982) e melanócitos (Cocchia *et al.*, 1981).

Nós mensuramos os níveis de geração de ROS no córtex cerebral frontal, hipocampo e estriado. Os resultados indicaram que tanto a RC crônica quanto a infusão ICV de STZ causaram uma redução na geração de ROS cortical, uma vez que os grupos Sham-RC, STZ-AD e STZ-RC apresentaram os menores níveis de geração de ROS, quando comparados ao grupo Sham-AD. Ainda, nossos resultados indicaram haver uma tendência para a adição dos efeitos da RC e da STZ em baixar a geração de ROS cortical.

Por outro lado, a geração de ROS foi aumentada pela RC no hipocampo, sendo que os animais do grupo Sham-RC apresentaram os maiores níveis de geração de ROS. A infusão ICV de STZ não alterou a geração de ROS hipocampal; entretanto, dados prévios indicaram haver um aumento na geração de ROS no hipocampo de ratos submetidos a este modelo (Biasibetti *et al.*, 2013). No estriado, nossos resultados demonstraram não haver efeitos da RC ou da STZ sobre a geração de ROS.

A partir destes resultados podemos indicar que os efeitos da RC e da infusão ICV de STZ são específicos para as diferentes estruturas encefálicas estudadas, visto que a STZ reduziu a geração de ROS no córtex cerebral frontal, sem alterar tais níveis no hipocampo e no estriado. A RC reduziu a geração de ROS no córtex cerebral frontal, aumentou no hipocampo e não alterou no estriado.

Ainda, nós mensuramos os níveis de GSH nas três estruturas encefálicas estudadas. Os resultados demonstraram que tanto a RC crônica e a infusão ICV de STZ não alteraram os níveis corticais de GSH. No hipocampo, a infusão de STZ reduziu significativamente os níveis de GSH, sendo que o grupo STZ-AD apresentou os menores níveis de GSH. Este resultado sobre diminuição de GSH hipocampal induzida pela infusão ICV de STZ está de acordo com resultados prévios publicados pelo nosso grupo (Biasibetti *et al.*, 2013, Rodrigues *et al.*, 2009, 2010) o que indica uma boa reprodutibilidade deste modelo de demência. No estriado, os resultados demonstraram que a RC e a infusão de STZ causam uma diminuição no conteúdo de GSH, pois os grupos Sham-RC, STZ-AD e STZ-RC apresentaram níveis significativamente menores de GSH quando comparados ao grupo Sham-AD.

Neste contexto, considerando-se que a principal fonte de GSH no SNC é dependente da síntese astrocítica e ainda que o estresse oxidativo é uma característica comum em várias doenças neurodegenerativas, a diminuição no conteúdo de GSH

hipocampal no grupo STZ-AD sugere um prejuízo na capacidade de defesa antioxidante astrocítica neste modelo.

Para avaliar os efeitos da RC crônica e da infusão ICV de STZ sobre a expressão da proteína sinaptofisina, utilizada para a marcação específica de sinapses (Wiedenmann e Franke, 1985), utilizamos a técnica *Western blotting*. Os resultados demonstraram que tanto a RC como a infusão de STZ não alteraram a expressão da sinaptofisina no córtex cerebral frontal e no estriado. Entretanto, no hipocampo, a infusão de STZ reduziu significativamente a expressão de sinaptofisina. Este efeito foi completamente prevenido e/ou revertido pelo grupo STZ-RC.

Nosso resultado de redução da expressão da proteína sinaptofisina no grupo STZ-AD reforça o uso deste modelo animal para o estudo da demência, uma vez que a redução de tal proteína em condições neurodegenerativas tem sido reportada, como na DA (Masliah *et al.*, 2001). Embora a microscopia eletrônica seja a única maneira para determinar conclusivamente se existem alterações no número de sinapses ou na configuração das sinapses, a diminuição na quantidade da proteína sinaptofisina detectada pela técnica *Western blotting* pode ser devido a uma redução no número de sinapses e/ou uma alteração na configuração sináptica (Adams *et al.*, 2008). Além disso, mudanças na imunorreatividade para sinaptofisina podem refletir mudanças no número de vesículas sinápticas ou no tamanho das vesículas, assim, tem sido usada como um marcador de densidade sináptica e marcador de desordens da conectividade sináptica em muitas doenças do SNC (Honer *et al.*, 1999, Masliah *et al.*, 1991).

Estudo prévio demonstrou que a RC é capaz de estabilizar os níveis da proteína sinaptofisina ao longo da vida no hipocampo de ratos (Adams *et al.*, 2008). Outro estudo observou que a RC crônica pode modular as alterações transcricionais relacionadas à senescência, como por exemplo, mantendo estáveis os níveis de RNA mensageiro para a sinaptofisina no córtex cerebral de ratos, sem alterar tal parâmetro no

hipocampo. Ainda, este estudo indicou que os efeitos da RC crônica sobre a quantidade da proteína sinaptofisina, mensurada por *Western blotting*, são mais proeminentes no hipocampo do que no córtex cerebral (Mladenovic-Djordjevic *et al.*, 2010).

Ainda, nós realizamos a técnica de imunofluorescência para sinaptofisina e GFAP nas estruturas encefálicas para o estudo tecidual através da microscopia confocal. No hipocampo as imagens indicaram claramente uma redução na expressão da proteína sinaptofisina e um aumento na expressão da proteína GFAP no grupo STZ-AD. Os nossos achados confirmam dados de que a sinaptofisina é altamente expressa em regiões encefálicas adultas com potencial para mudanças plásticas (Wiedenmann e Franke, 1985), uma vez que as imagens indicaram uma marcação nitidamente mais intensa para sinaptofisina nas regiões hipocampais quando comparada às regiões do córtex cerebral frontal e do estriado.

A GFAP é utilizada como um marcador específico de astrócitos e sua expressão aumentada está associada com astrogliose, a qual foi observada em diferentes tipos de dano no SNC (Eng *et al.*, 2000). Além disso, astrogliose cortical, analisada através de imuno-histoquímica para GFAP, foi observada neste modelo de demência induzido por infusão ICV de STZ (Shoham *et al.*, 2007). É importante enfatizar que o fato de haver aumento na expressão de GFAP não significa somente uma resposta acentuada ao dano encefálico, mas pode representar uma reação protetora do SNC (Liberto *et al.*, 2004).

Como podemos observar através das imagens obtidas com a microscopia confocal, a astrogliose hipocampal foi caracterizada por um aumento na expressão de GFAP, acompanhada de um corpo celular astrocítico mais pronunciado e mais projeções celulares. Apesar da análise tecidual ter sido realizada em apenas 2 animais de cada grupo, a RC parece prevenir e/ou reverter o aumento na expressão da GFAP no hipocampo.

Conclusões

Em resumo, avaliamos os efeitos da RC crônica sobre o estado redox em tecidos periféricos e sobre parâmetros cognitivos, bioquímicos e morfológicos encefálicos em modelo animal de demência.

Nossos resultados demonstraram que a RC crônica é capaz de aumentar a atividade da CAT no rim, o conteúdo de proteínas carboniladas no coração, e conteúdo de GSH no fígado, além de diminuir a geração de ROS hepática. Tais resultados contribuem para um melhor entendimento sobre os efeitos da RC em tecidos periféricos como o renal, o cardíaco e o hepático, e reforçam a idéia de que a RC pode modular o estado oxidativo e também as defesas antioxidantes em tecidos periféricos em condições fisiológicas.

Além disso, a RC crônica, no modelo animal de demência, preveniu e/ou reverteu no grupo STZ o prejuízo cognitivo observado no labirinto aquático de Morris e as alterações hipocampais, como a diminuição no conteúdo de GSH, a diminuição da expressão de sinaptofisina e a aparente astrogliose. Ainda, outras alterações causadas pela RC e/ou infusão ICV de STZ foram encontradas no córtex cerebral frontal e no estriado e no líquido e soro, todavia tais alterações são tecido-específicas, pois não seguem um padrão específico. Tais resultados colaboram para uma melhor compreensão dos efeitos da RC crônica sobre o SNC, particularmente neste modelo de demência.

Perspectivas

- Mensurar os efeitos da RC crônica e da infusão ICV de STZ sobre o imunoconteúdo de GFAP e de S100B no córtex cerebral frontal, no hipocampo e no estriado, através da técnica ELISA;
- Aumentar o número amostral das imagens de imunomarcção por fluorescência para SYN e GFAP obtidas através da microscopia confocal e quantificar as fluorescências encontradas;
- Realizar a imunomarcção por fluorescência para Neu-N (proteína nuclear específica de neurônios) e GFAP e quantificar as fluorescências encontradas, além de realizar a técnica histológica de *Nissl*, no córtex cerebral frontal, no hipocampo e no estriado no contexto experimental de RC e modelo de demência.

Referências Bibliográficas

- Adams, M. M., L. Shi, *et al.* Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. Exp Neurol, v.211, n.1, May, p.141-9. 2008.
- Anderson, R. M., D. Shanmuganayagam, *et al.* Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. Toxicol Pathol, v.37, n.1, Jan, p.47-51. 2009.
- Antebi, A. Ageing: when less is more. Nature, v.447, n.7144, May 31, p.536-7. 2007.
- Ash, C. E. e B. J. Merry. The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation. Mech Ageing Dev, v.132, n.1-2, Jan-Feb, p.43-54. 2011.
- Aydin, C., E. Ince, *et al.* Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. Cell Biochem Funct, v.25, n.2, Mar-Apr, p.129-37. 2007.
- Barja, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. Ageing Res Rev, v.1, n.3, Jun, p.397-411. 2002.
- Berlett, B. S. e E. R. Stadtman. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem, v.272, n.33, Aug 15, p.20313-6. 1997.
- Biasibetti, R., A. C. Tramontina, *et al.* Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. Behav Brain Res, v.236, n.1, Jan 1, p.186-93. 2013.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto, *et al.* Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. Antioxid Redox Signal, v.10, n.9, Sep, p.1549-64. 2008.
- Burhans, W. C. e N. H. Heintz. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. Free Radic Biol Med, v.47, n.9, Nov 1, p.1282-93. 2009.
- Cadenas, S., C. Rojas, *et al.* Caloric and carbohydrate restriction in the kidney: effects on free radical metabolism. Exp Gerontol, v.29, n.1, Jan-Feb, p.77-88. 1994.
- Cao, C., Y. Leng, *et al.* Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. J Biol Chem, v.278, n.32, Aug 8, p.29667-75. 2003.
- Chen, J., C. N. Velalar, *et al.* Identifying the changes in gene profiles regulating the amelioration of age-related oxidative damages in kidney tissue of rats by the intervention of adult-onset calorie restriction. Rejuvenation Res, v.11, n.4, Aug, p.757-63. 2008.
- Cocchia, D., F. Michetti, *et al.* Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. Nature, v.294, n.5836, Nov 5, p.85-7. 1981.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science, v.325, n.5937, Jul 10, p.201-4. 2009.

- Colotti, C., G. Cavallini, *et al.* Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology*, v.6, n.6, Dec, p.397-406. 2005.
- Contestabile, A. e E. Ciani. Dietary restriction differentially protects from neurodegeneration in animal models of excitotoxicity. *Brain Res*, v.1002, n.1-2, Mar 26, p.162-6. 2004.
- D'Alessandro, A. e L. Zolla. The SODyssey: superoxide dismutases from biochemistry, through proteomics, to oxidative stress, aging and nutraceuticals. *Expert Rev Proteomics*, v.8, n.3, Jun, p.405-21. 2011.
- Dassan, P., G. Keir, *et al.* Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis*, v.27, n.3, p.295-302. 2009.
- Di Simplicio, P., F. Franconi, *et al.* Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids*, v.25, n.3-4, Dec, p.323-39. 2003.
- Dong, Y. e E. N. Benveniste. Immune function of astrocytes. *Glia*, v.36, n.2, Nov, p.180-90. 2001.
- Draper, H. H. e M. Hadley. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v.186, p.421-31. 1990.
- Dubnov, G., R. Kohen, *et al.* Diet restriction in mice causes differential tissue responses in total reducing power and antioxidant compounds. *Eur J Nutr*, v.39, n.1, Feb, p.18-30. 2000.
- Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, v.82, n.1, May, p.70-7. 1959.
- Emes, R. D. e S. G. Grant. Evolution of synapse complexity and diversity. *Annu Rev Neurosci*, v.35, p.111-31. 2012.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, *et al.* Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, v.25, n.9-10, Oct, p.1439-51. 2000.
- Finley, L. W. e M. C. Haigis. The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev*, v.8, n.3, Jul, p.173-88. 2009.
- Fontana, L., L. Partridge, *et al.* Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, v.328, n.5976, Apr 16, p.321-6. 2010.
- Forman, H. J., M. Maiorino, *et al.* Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, v.49, n.5, Feb 9, p.835-42. 2010.
- Forster, M. J., B. H. Sohal, *et al.* Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxidative damage. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v.55, n.11, Nov, p.B522-9. 2000.

- Gavaghan, M. Cardiac anatomy and physiology: a review. AORN J, v.67, n.4, Apr, p.802-22; quiz 824-8. 1998.
- Gomez, J., P. Caro, *et al.* Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. Biogerontology, v.8, n.5, Oct, p.555-66. 2007.
- Goncalves, C. A., M. C. Leite, *et al.* Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. Cardiovasc Psychiatry Neurol, v.2010, p.790431. 2010.
- _____. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. Clin Biochem, v.41, n.10-11, Jul, p.755-63. 2008.
- Greengard, P., F. Valtorta, *et al.* Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. Science, v.259, n.5096, Feb 5, p.780-5. 1993.
- Grunblatt, E., M. Salkovic-Petrisic, *et al.* Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. J Neurochem, v.101, n.3, May, p.757-70. 2007.
- Gueutin, V., G. Deray, *et al.* [Renal physiology]. Bull Cancer, v.99, n.3, Mar 1, p.237-49. 2012.
- Hagopian, K., M. E. Harper, *et al.* Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.4, Apr, p.E674-84. 2005.
- Haimoto, H., S. Hosoda, *et al.* Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. Lab Invest, v.57, n.5, Nov, p.489-98. 1987.
- Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 5, Nov, p.1147-50. 2007.
- Hamden, K., S. Carreau, *et al.* Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepato-toxicity in aged rats. Biomed Environ Sci, v.22, n.5, Oct, p.381-7. 2009.
- Hayashida, T., T. Komatsu, *et al.* Modest inhibition of the growth hormone axis does not affect mitochondrial reactive oxygen species generation or redox state, unlike calorie restriction. Geriatr Gerontol Int, v.11, n.4, Oct, p.496-503. 2011.
- Heilbronn, L. K. e E. Ravussin. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. Am J Clin Nutr, v.78, n.3, Sep, p.361-9. 2003.
- Honer, W. G., P. Falkai, *et al.* Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. Neuroscience, v.91, n.4, p.1247-55. 1999.
- Idrobo, F., K. Nandy, *et al.* Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. Arch Gerontol Geriatr, v.6, n.4, Dec, p.355-62. 1987.

- Ingram, D. K., G. S. Roth, *et al.* The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. Biogerontology, v.7, n.3, Jun, p.143-8. 2006.
- Iwamoto, M., T. Hagishita, *et al.* Age-related changes in the levels of voltage-dependent calcium channels and other synaptic proteins in rat brain cortices. Neurosci Lett, v.366, n.3, Aug 19, p.277-81. 2004.
- Judge, S., A. Judge, *et al.* Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.286, n.2, Feb, p.R254-9. 2004.
- Kamzalov, S. e R. S. Sohal. Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and alpha-tocopherol levels in the rat. Exp Gerontol, v.39, n.8, Aug, p.1199-205. 2004.
- Kleindienst, A. e M. Ross Bullock. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. J Neurotrauma, v.23, n.8, Aug, p.1185-200. 2006.
- Koizumi, A., R. Weindruch, *et al.* Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. J Nutr, v.117, n.2, Feb, p.361-7. 1987.
- Kowaltowski, A. J. Caloric restriction and redox state: does this diet increase or decrease oxidant production? Redox Rep, v.16, n.6, p.237-41. 2011.
- Lambert, A. J. e B. J. Merry. Lack of effect of caloric restriction on bioenergetics and reactive oxygen species production in intact rat hepatocytes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.60, n.2, Feb, p.175-80. 2005.
- Lannert, H. e S. Hoyer. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. Behav Neurosci, v.112, n.5, Oct, p.1199-208. 1998.
- Leon, D. A. Trends in European life expectancy: a salutary view. Int J Epidemiol, v.40, n.2, Apr, p.271-7. 2011.
- Levenson, C. W. e N. J. Rich. Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. Nutr Rev, v.65, n.9, Sep, p.412-5. 2007.
- Liberto, C. M., P. J. Albrecht, *et al.* Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. J Neurochem, v.89, n.5, Jun, p.1092-100. 2004.
- Longo, V. D. e C. E. Finch. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? Science, v.299, n.5611, Feb 28, p.1342-6. 2003.
- Lopez-Torres, M., R. Gredilla, *et al.* Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. Free Radic Biol Med, v.32, n.9, May 1, p.882-9. 2002.
- Markowska, A. L. e A. Savonenko. Retardation of cognitive aging by life-long diet restriction: implications for genetic variance. Neurobiol Aging, v.23, n.1, Jan-Feb, p.75-86. 2002.

Masliah, E., M. Mallory, *et al.* Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. Neurology, v.56, n.1, Jan 9, p.127-9. 2001.

_____. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. Neuron, v.6, n.5, May, p.729-39. 1991.

Masoro, E. J. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. Biochim Biophys Acta, v.1790, n.10, Oct, p.1040-8. 2009.

Mattson, M. P. Dietary factors, hormesis and health. Ageing Res Rev, v.7, n.1, Jan, p.43-8. 2008.

McCay, C. M., M. F. Crowell, *et al.* The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. Nutrition, v.5, n.3, May-Jun, p.155-71; discussion 172. 1989.

Merry, B. J. Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction. Aging Cell, v.3, n.1, Feb, p.7-12. 2004.

Mladenovic-Djordjevic, A., M. Perovic, *et al.* Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. Neurochem Int, v.56, n.2, Jan, p.250-5. 2010.

Nakamura, A., K. Kawakami, *et al.* Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction. Ann N Y Acad Sci, v.1197, Jun, p.33-9. 2010.

Nordberg, J. e E. S. Arner. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med, v.31, n.11, Dec 1, p.1287-312. 2001.

Nystrom, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J, v.24, n.7, Apr 6, p.1311-7. 2005.

Osborne, T. B., L. B. Mendel, *et al.* The Effect of Retardation of Growth Upon the Breeding Period and Duration of Life of Rats. Science, v.45, n.1160, Mar 23, p.294-5. 1917.

Pallavi, R., M. Giorgio, *et al.* Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life. Front Physiol, v.3, p.318. 2012.

Ramadori, G., F. Moriconi, *et al.* Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. J Physiol Pharmacol, v.59 Suppl 1, Aug, p.107-17. 2008.

Rao, G., E. Xia, *et al.* Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. J Nutr, v.120, n.6, Jun, p.602-9. 1990.

Requena, J. R., C. C. Chao, *et al.* Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.1, Jan 2, p.69-74. 2001.

- Ritchie, K. e S. Lovestone. The dementias. Lancet, v.360, n.9347, Nov 30, p.1759-66. 2002.
- Rodnight, R., C. A. Goncalves, *et al.* Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. Braz J Med Biol Res, v.30, n.3, Mar, p.325-38. 1997.
- Rodrigues, L., R. Biasibetti, *et al.* Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. J Alzheimers Dis, v.17, n.1, p.193-202. 2009.
- Rodrigues, L., M. F. Dutra, *et al.* Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. J Neural Transm, v.117, n.11, Nov, p.1295-305. 2010.
- Roth, L. W. e A. J. Polotsky. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. Maturitas, v.71, n.4, Apr, p.315-9. 2012.
- Rothermundt, M., M. Peters, *et al.* S100B in brain damage and neurodegeneration. Microsc Res Tech, v.60, n.6, Apr 15, p.614-32. 2003.
- Santin, K., R. F. Da Rocha, *et al.* Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. Brain Res, v.1421, Nov 3, p.1-10. 2011.
- Sen, C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. Biochem Pharmacol, v.55, n.11, Jun 1, p.1747-58. 1998.
- Shoham, S., C. Bejar, *et al.* Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. Neuropharmacology, v.52, n.3, Mar, p.836-43. 2007.
- Simonetti, I., V. De Tata, *et al.* Changes in the transmural distribution of antioxidant enzyme activities across the left ventricle heart wall from rats fed ad libitum or food-restricted during growth and aging. Arch Gerontol Geriatr, v.10, n.2, Mar-Apr, p.163-71. 1990.
- Sohal, R. S., H. H. Ku, *et al.* Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. Mech Ageing Dev, v.74, n.1-2, May, p.121-33. 1994.
- Sohal, R. S. e R. Weindruch. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science, v.273, n.5271, Jul 5, p.59-63. 1996.
- Stefansson, K., R. L. Wollmann, *et al.* S-100 protein in human chondrocytes. Nature, v.295, n.5844, Jan 7, p.63-4. 1982.
- Speakman, J. R. e S. E. Mitchell. Caloric restriction. Mol Aspects Med, v.32, n.3, Jun, p.159-221. 2011.

- Stadtman, E. R. e B. S. Berlett. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Drug Metab Rev, v.30, n.2, May, p.225-43. 1998.
- Stewart, J., J. Mitchell, *et al.* The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. Neurobiol Aging, v.10, n.6, Nov-Dec, p.669-75. 1989.
- Swarowsky, A., L. Rodrigues, *et al.* Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. Behav Brain Res, v.190, n.2, Jul 19, p.206-11. 2008.
- Trachootham, D., W. Lu, *et al.* Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal, v.10, n.8, Aug, p.1343-74. 2008.
- Tramontina, A. C., K. M. Wartchow, *et al.* The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. J Neural Transm, v.118, n.11, Nov, p.1641-9. 2011.
- Trikash, I. O., G. P. Volynets, *et al.* Docking and fusion of synaptic vesicles in cell-free model system of exocytosis. Neurochem Int, v.53, n.6-8, Dec, p.401-7. 2008.
- Ugochukwu, N. H. e C. L. Figgers. Dietary caloric restriction improves the redox status at the onset of diabetes in hepatocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. Chem Biol Interact, v.165, n.1, Jan 5, p.45-53. 2007.
- Van Eldik, L. J. e M. S. Wainwright. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. Restor Neurol Neurosci, v.21, n.3-4, p.97-108. 2003.
- Van Eldik, L. J. e M. S. Wainwright. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. Restor Neurol Neurosci, v.21, n.3-4, p.97-108. 2003.
- Vicente, E., D. Degerone, *et al.* Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Brain Res, v.1251, Jan 28, p.204-12. 2009.
- Vieira De Almeida, L. M., C. C. Pineiro, *et al.* Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. Neurochem Res, v.33, n.1, Jan, p.8-15. 2008.
- Wang, D. D. e A. Bordey. The astrocyte odyssey. Prog Neurobiol, v.86, n.4, Dec 11, p.342-67. 2008.
- Wiedenmann, B. e W. W. Franke. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. Cell, v.41, n.3, Jul, p.1017-28. 1985.
- Winterbourn, C. C. e M. B. Hampton. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radic Biol Med, v.45, n.5, Sep 1, p.549-61. 2008.

Ziegler, D. R., C. E. Innocente, *et al.* The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. Neurochem Res, v.23, n.10, Oct, p.1259-63. 1998.

Zimmer, D. B. e L. J. Van Eldik. Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. Am J Physiol, v.252, n.3 Pt 1, Mar, p.C285-9. 1987.