

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Tharcila Quadros de Oliveira

**Restrição Calórica Reduz o Fenótipo
Neuroinflamatório no Hipocampo de
Camundongos Machos**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2021

Tharcila Quadros de Oliveira

Restrição Calórica Reduz o Fenótipo Neuroinflamatório no Hipocampo de Camundongos Machos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador (a): Dr (a) Márcia Giovenardi
Coorientador (a): Dr (a). Ana Carolina de Moura

**Porto Alegre
2021**

Catologação na Publicação

de Oliveira, Tharcila

Restrição Calórica Reduz o Fenótipo Neuroinflamatório no Hipocampo de Camundongos Machos / Tharcila de Oliveira. -- 2021.

62 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Márcia Giovenardi ; coorientador(a): Ana Carolina de Moura.

1. Dieta Restritiva. 2. Neuroinflamação. 3. Memória de Curto Prazo. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fisiologia Comportamental e Metabólica e de Biologia Molecular, ambos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) participou do financiamento deste trabalho, assim como, a UFCSPA.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois nada nesse universo se faz ou se forma sem a benção dele.

À minha família, que me entregou amor incondicional e sempre apoiou os meus projetos e meus sonhos. Todo o meu amor pertence a vocês.

Às minhas orientadoras, Márcia e Ana Carol, um agradecimento especial. Obrigada por acreditar na minha capacidade, pela paciência em todos os momentos de dificuldade e carinho que tiveram comigo, eu jamais vou esquecer.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica pelas trocas de ideias científicas, conversas e contribuições. Estamos juntos nessa jornada científica, contem sempre comigo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Alimentação Materna e o Ambiente Intrauterino.....	13
1.2 Dieta de Restrição Calórica	14
1.3 Hipocampo e Memória.....	16
1.4 Hipocampo e Restrição Calórica	18
1.5 Barreira Hematoencefálica e Permeabilidade.....	20
1.6 Marcadores Neuroinflamatórios.....	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 ARTIGO CIENTÍFICO	25
4 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	53
ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	53
II CURRÍCULO LATTES.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2- Araquidonoilglicerol

AA - Ácido Araquidônico

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BHE – Barreira Hematoencefálica

CA - Corno de Ammon

CA1 - Corno de Ammon 1

CA2 - Corno de Ammon 2

CA3 - Corno de Ammon 3

CE - Área Entorrinal

DG - Giro Dentado

DAMP - Padrão Molecular Associado a Dano, do inglês: Damage-associated molecular pattern

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FOXO1 - *Forkhead box protein O1*

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

HPC - Hipocampo

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-18 – Interleucina 18

JAM - Moléculas de Adesão Juncional

LPHC - Dieta Hipoproteica-Hiperglicídica, do inglês: Low-protein high carbohydrate

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

mTOR – Proteína Alvo Mecanístico da Rapamicina em Mamíferos

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NF- κ B - Fator de transcrição NF- κ B

NO - Óxido Nítrico

NLRP3 - Inflamassoma – Receptor do Tipo NOD com Domínio Pirina 3

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PGC1 α - Coativador 1 α do Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissomo

RC - Restrição Calórica

RI - Resistência à Insulina

RNA - Ácido Ribonucleico

Sir2 - Proteína Reguladora de Informação Silenciosa 2

SIRT 1 - Sirtuína 1

SNC - Sistema Nervoso Central

siRNA - *Small interfering* RNA

TA - Tecido Adiposo

TLR-4 - Receptor Tipo Toll 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral *Alfa*

ZO-1 - Zônula Occludens -1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas anatômicas componentes do hipocampo.....	17
Figura 2 – Expressão dos genes SIRT1 e TLR4 na região do hipocampo	45
Figura 3 – Relação da expressão de marcadores neuroinflamatórios na região do hipocampo.....	46

RESUMO

As dietas restritivas podem influenciar o fenótipo inflamatório das mães e de seus filhos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da restrição calórica sobre o perfil neuroinflamatório do hipocampo e sobre a memória de curto prazo de filhotes machos adultos de mães submetidas a restrição calórica (RC). As mães dos camundongos receberam dieta padrão *ad libitum* (CONT) ou dieta restritiva (RC; redução de 30% do consumo de CONT) durante a gravidez e lactação. Filhotes machos foram desmamados aos 21 dias e divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam CONT ou RC; os grupos foram nomeados de acordo com as dietas maternas seguido da dieta da prole: CONT/CONT, CONT/RC, RC/CONT e RC/RC. Aos 90 dias, a memória de curto prazo foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos (TRO); o estado inflamatório do hipocampo foi analisado pela expressão gênica de sirtuin-1 (SIRT1) e inflamassoma NLRP3; e por expressão de proteína de receptor toll-like-4 (TLR-4) e zonula occludens-1 (ZO-1). Nossos resultados mostraram a influência da dieta materna e da prole na memória de curto prazo. A expressão de SIRT1 foi maior em RC/CONT em comparação com CONT/CONT e com RC/RC; NLRP3 foi afetado pela dieta materna. Em relação ao TLR-4, a expressão foi maior em RC/CONT em relação a CONT/CONT, representando um efeito da dieta materna; e RC/CONT tiveram níveis aumentados de TLR-4 quando comparados a RC/RC, mostrando efeito da dieta da prole. A expressão de ZO-1 foi maior em RC/CONT em comparação com CONT/CONT. Em resumo, nossos achados demonstram que a restrição calórica materna promove proteção no desenvolvimento do fenótipo neuroinflamatório da prole adulta.

Palavras-chave: sirtuin-1, receptor toll-like 4, zonula occludens-1, inflamassoma NLRP3, memória de curto prazo.

ABSTRACT

Restrictive diets (RD) can influence the inflammatory phenotype of mothers and their offspring. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of caloric restriction on the neuroinflammatory profile of the hippocampus and on the short-term memory of the adult male offspring from RD-fed dams. Mice dams received standard diet *ad libitum* (CONT) or restrictive diet (RD; 30% reduction of CONT consumption) during pregnancy and lactation. Male pups were weaned at 21 days and randomly divided into two groups that received CONT or RD; groups were named according to maternal/offspring diets: CONT/CONT, CONT/RD, RD/CONT and RD/RD. At 90 days old, short-term memory was assessed by the object recognition test (ORT); the inflammatory state of the hippocampus was analyzed by gene expression of sirtuin-1 (SIRT1) and inflammasome NLRP3; and by protein expression of toll-like receptor-4 (TLR-4) and zonula occludens-1 (ZO-1). Our results showed the influence of maternal and offspring's diet in short-term memory. The expression of SIRT1 was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT and to RD/RD; NLRP3 was affected by maternal diet. Regarding TLR-4, expression was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT, representing a maternal diet effect; and RD/CONT had increased levels of TLR-4 when compared to RD/RD, showing an offspring diet effect. ZO-1 expression was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT. In summary, our findings demonstrate that maternal caloric restriction promotes protection in the development of the neuroinflammatory phenotype of adult offspring.

Keywords: sirtuin-1, toll-like receptor-4, zonula occludens-1, inflammasome NLRP3, short-term memory.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alimentação materna e o ambiente intrauterino

As origens do desenvolvimento da teoria de saúde e da doença indicam que qualquer distúrbio no ambiente intrauterino, causado por alteração no consumo de macronutrientes, pode resultar em alterações no desenvolvimento fetal e no aumento do risco do desenvolvimento de doenças metabólicas com o aumento da idade da prole (1).

Durante a fase gestacional, fatores ambientais aos quais a mãe possa ser exposta, como a dieta, infecções e hormônios do estresse podem alterar o ambiente materno, alterando os níveis circulantes de citocinas, lipídios, hormônios do estresse e padrões metabólicos. Estas mudanças podem ser passadas pela placenta impactando no desenvolvimento do feto (2). Durante o desenvolvimento perinatal, marcas epigenéticas ocorrem nos cromossomos e estão associadas aos processos de transcrição e tradução gênica. Estas marcas estão envolvidas no desligamento ou na reprogramação de um determinado gene em certos tecidos, em que a sua expressão se faz ou não necessária (3). Quando adquirida no início da vida, elas podem ter um impacto sobre o fenótipo adulto e podem ter influência nos fenótipos das gerações seguintes por meio de efeitos geracionais ou multigeracionais (4).

A existência de um componente herdável da epigenética é bastante discutida na literatura e dois tipos de herança epigenética são geralmente descritas. A primeira envolve marcas epigenéticas herdadas em linhagem de células somáticas e podem ser conservadas durante a mitose (5). A segunda trata-se da herança epigenética transgeracional, em que as marcas são herdadas através da linhagem de células germinativas, que controla os padrões de expressão de genes que são passados de uma geração para a próxima geração (6,7).

Desta forma, conceituamos que um fenótipo é o resultado da interação entre o genoma e o epigenoma, desde que este depende do ambiente em que o animal foi introduzido durante o seu período de desenvolvimento e durante a vida adulta (8).

Durante o período gestacional, o feto recebe através da nutrição placentária um contínuo fornecimento de substratos energéticos para o crescimento e para o metabolismo oxidativo. Neste período, a dieta recebida pelo feto é rica em carboidratos e baixa em lipídeos. No período pós-natal, o perfil nutricional da dieta do neonato muda e passa a ser rico também em lipídeos além dos glicídios (9).

Ao longo do desenvolvimento animal, os componentes alimentares, bem como a quantidade e a frequência da ingesta alimentar, são mecanismos efetores altamente modificáveis e que podem ser ajustados para melhor manutenção da quantidade de adiposidade corporal, glicemia sanguínea, metabolismo cerebral, entre outros (10).

1.2. Dieta de restrição calórica

A restrição calórica (RC) é uma estratégia caracterizada por redução da ingestão calórica por meio da oferta controlada de alimentos, sem promover desnutrição. Esta tem sido uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, dentre elas, os mamíferos. Alguns estudos realizados em modelos animais associam a RC a uma menor incidência de doenças relacionadas ao avanço da idade, tais como doenças cardiovasculares, câncer e a diabetes (11,12).

A utilização de uma dieta de RC passa por uma fase inicial de adaptação, onde ocorrem ajustes metabólicos em decorrência da diminuição energética proveniente da dieta, sendo seguida por uma fase estável que apresenta mudanças do estado fisiológico, incluindo diminuição da temperatura corporal, da glicemia, insulina, gordura corporal e de peso, que será responsável pelo aumento do tempo de longevidade (13).

Já no sistema nervoso central (SNC) estudos nos mostram que os efeitos benéficos estão relacionados com a estimulação da neurogênese em indivíduos adultos e diminuição da expressão de genes relacionados com a neuroinflamação e com a resposta ao estresse, sendo assim, acabam funcionando como um agente protetor do SNC de patologias crônicas e agudas. Estudos em humanos sugerem que a RC reduz o risco de

neuropatologias crônicas como Alzheimer e Parkinson, assim como doenças agudas, como acidente vascular cerebral (AVC) (14). Já o óxido nítrico (NO), um importante mensageiro celular, tem sido associado a ações neurodegenerativas e neuroprotetoras (15).

Estudos mostram que a RC é capaz de atenuar os danos oxidativos por meio de ações como inibição da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento de defesas antioxidantes (16,17). Em contrapartida, o óxido nítrico foi considerado essencial para a sobrevivência de linhagens celulares neuronais e neurônios primários em cultura sob vários aspectos relacionados à morte celular. Além disso, sua falta pode agravar algumas condições neuropatológicas, demonstrado em alguns experimentos em animais (Jang. e colaboradores, 2010). Estes estudos focam principalmente na sua ação como regulador negativo da proliferação de células precursoras neuronais e seu papel na promoção da diferenciação neural (16).

Entretanto, as espécies reativas de oxigênio ativam um fator transcricional pró-inflamatório denominado NF- κ B, responsável pela transcrição de proteínas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1, 2 e 6 (17–19). Os danos oxidativos, como a ativação de genes pró-inflamatórios causados por essas espécies reativas de oxigênio, estão fortemente relacionados ao envelhecimento e à patogênese de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como aterosclerose, diabetes, artrite reumatoide, desordens neurodegenerativas e câncer (20). O mecanismo pelo qual a RC diminui a formação das espécies reativas de oxigênio ainda não está muito claro, porém, a RC parece estabelecer uma melhora nos danos oxidativos, como a supressão da expressão e a ativação do NF- κ B. Fora isso, ainda parece ter uma influência na melhora do sistema de reparação do DNA celular (21).

Estudos recentes que avaliaram o efeito da RC e o seu impacto no sistema imune demonstram que este efeito parece ser dependente da ativação de linfócitos T e macrófagos, pois estes são responsáveis pelo tipo e extensão da resposta imunológica. Em estudos com modelos animais, a RC parece protelar o início das doenças autoimunes dependentes de linfócito T e macrófagos, tais como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide. Estudo em modelo animal para lúpus eritematoso sistêmico com doença renal como

agravante, notou-se que a RC de 40%, quando iniciada com seis semanas de vida, retardava o aparecimento de doença renal autoimune em 30% dos casos (22).

Um outro ponto importante a ser levado em consideração se trata da via de sinalização que foi encontrada em leveduras, onde se descobriu que o efeito determinante da longevidade era mediado pela ativação de um gene denominado *silent information regulator 2* (regulador de informação silenciosa, ou apenas *Sir2*) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Experimentos de proteômica comparada mostraram que a *Sir2* pertence a uma classe de proteínas, as chamadas sirtuínas (23).

Em mamíferos, há sete genes de sirtuínas de forma geral, e especificamente a sirtuína 1 (SIRT1) é a mais semelhante com a *Sir2* (24). Sabe-se que, em mamíferos, a dieta do tipo RC aumenta os níveis de SIRT1 e da sua expressão, enquanto a atividade biológica parece mediar a atividade de consideráveis reguladores de transcrição do metabolismo (12). Entretanto, é compreendido que grande parte dos efeitos da RC aparentam ser mediados pela regulação dos genes envolvidos no reparo celular, na resistência ao estresse e na proteção contra danos oxidativos, assim como genes responsáveis pela diminuição da inflamação e na prevenção de algumas modificações da expressão gênica que ocorrem com o passar da idade (25).

1.4 Hipocampo e Memória

O hipocampo (HPC) é uma estrutura cerebral complexa e está inserida profundamente no lobo temporal fazendo parte do sistema límbico, onde ele participa do processamento de respostas adequadas ao contexto em que o animal está inserido, baseando-se em aprendizados anteriores e memória (24).

O hipocampo contém duas partes principais: Cornu ammonis (hipocampo propriamente dito) e giro dentado. Ambas as partes são separadas pelo sulco hipocampal e se curvam uma na outra. Abaixo do sulco encontra-se o subículo. Como o hipocampo faz parte do allocórtex (arquicórtex), existe uma zona que o separa do neocórtex. Alguns anatomistas o dividem em hipocampo propriamente dito (Cornu ammonis; CA), giro dentado (DG), subículo e área

entorrinal (CE). O conjunto inteiro é chamado de formação hipocampal (26). O HPC propriamente dito consiste na região de Cornu Ammonis (CA), denominação em latim para Corno de Ammon, que se trata de uma tira de neurônios piramidais e pelo giro dentado, que consiste em células granulares. O CA e o giro dentado estão inseridos de forma anatômica numa estrutura compactada, que constitui a formação do hipocampo (25).

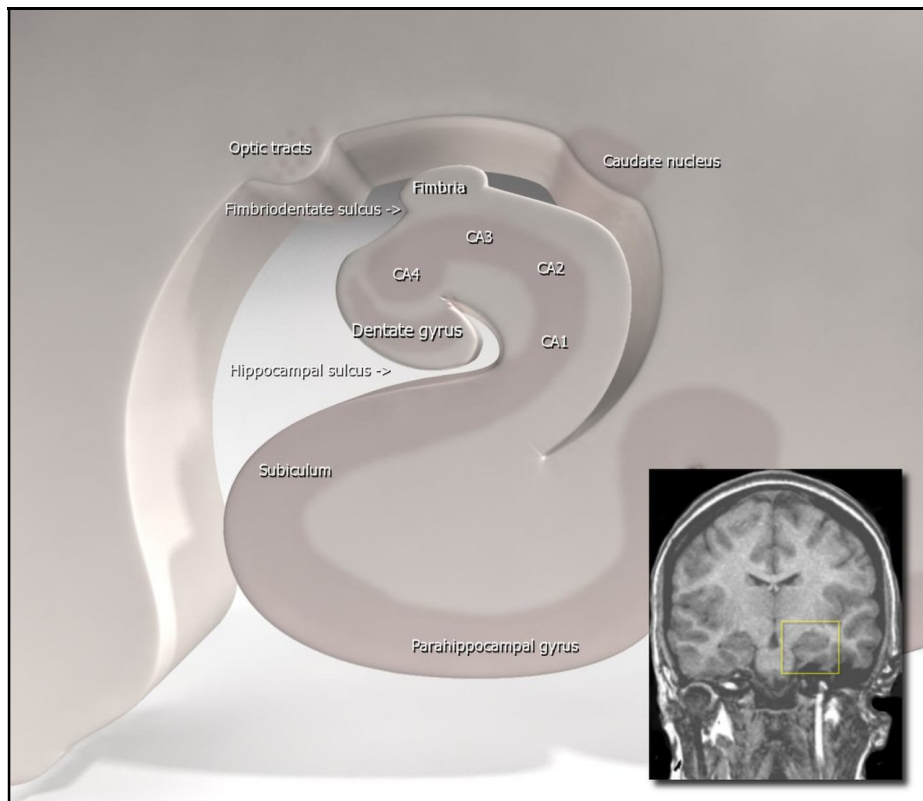


Figura 1. Estruturas anatômicas componentes do hipocampo. Fonte da imagem: Adaptado de Andersen, Per, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss e John O'Keefe, eds. *O livro do hipocampo*. Nova York: Oxford University Press, 2006.

Os primeiros estudiosos da área descreveram duas áreas distintas do CA em encéfalos de roedores: a porção superior, que consistia em pequenos neurônios piramidais e a porção inferior, que continha neurônios piramidais maiores. Porém, em 1934, Rafael Lorente de Nó compreendeu que uma pequena área da região inferior era muito singular em sua citoarquitetura e conectividade para justificar uma nomenclatura separada. Sendo assim, ele

designou três áreas CA contendo neurônios piramidais descritos como CA1, CA2 e CA3 (27).

Em mamíferos, a formação hipocampal é essencial para a aprendizagem e memória, exerce importantes funções relacionadas à conversão da memória de curto prazo em memória de longo prazo, na orientação espacial, no processamento do medo, na regulação da resposta ao estresse e nos comportamentos sociais (28). Ainda possui múltiplas funções na motivação para consumo de alimentos, e pesquisadores começam a enfatizar o papel dos mecanismos de aprendizagem e memória no controle do comportamento alimentar (29,30).

Os engramas são meios hipotéticos utilizados pelos estudiosos para descrever quais traços da memória são armazenados como alterações físicas ou químicas no cérebro em resposta a determinados estímulos externos. A existência de engramas tem sido proposta por diversas teorias científicas que propõem explicar a persistência da memória e como algumas delas são armazenadas. O hipocampo parece ser capaz de identificar e selecionar os aspectos mais relevantes dos menos relevantes de uma experiência definida para transformá-los em memória de longo prazo. De acordo com a denominação de rotulagem emocional, a experiência será rotulada como primordial por meio da ativação da amígdala em eventos emocionalmente sugestivos e a plasticidade sináptica será promovida em outras regiões do cérebro, como no hipocampo. Recentemente, foi demonstrado que a ativação da amígdala pode transformar a plasticidade transitória em plasticidade de longa duração (31,32).

1.5 Hipocampo e Restrição Calórica

Valadares et al, (2010) investigaram os efeitos da restrição proteica materna (6%) durante a lactação e o desmame no desempenho dos filhotes nas tarefas que avaliavam aprendizagem e memória. Os resultados mostraram prejuízos na memória operacional no labirinto aquático de Morris, porém esse déficit diminuiu seis meses depois, sugerindo que a recuperação nutricional foi eficiente para reverter as alterações causadas pela restrição proteica nos descendentes. No entanto, a tarefa de memória no teste de reconhecimento de

objetos foi prejudicada independente do período, por isso da importância eminente da restrição calórica não promover denutrição dos animais estudados (33). Já Akitake e colaboradores, (2015) demonstraram que a restrição calórica durante a gravidez leva a um pior desempenho da prole no teste de reconhecimento de objetos. Entretanto, essa alteração foi vista apenas com 3 semanas de idade, quando o teste foi realizado novamente com esses camundongos já adultos, não apresentaram diferenças significativas de prejuízos no desempenho da prole nos testes de reconhecimento de objetos (34).

A nível celular, a RC evita uma diminuição da neuroplasticidade sináptica do hipocampo dependente da idade (35). Também, ocorre o aumento da neurogênese (36), e melhora da plasticidade neuronal no córtex visual através do aumento da produção do conteúdo neuronal de GABA (37,38), além disso, é relatado que a RC aumenta o metabolismo neuronal e mantém esta atividade ativa até mesmo no cérebro envelhecido (39).

A funcionalidade da atividade das redes neuronais, assim como a neuroproteção adaptativa e permanente, é assegurada principalmente pelos astrócitos, as células homeostáticas do sistema nervoso central, que protegem a homeostase cerebral em todos os seus níveis de organização (39). Os astrócitos também estão envolvidos no suporte do metabolismo neuronal e na modulação dos neurotransmissores. O mecanismo pelo qual a RC afeta os astrócitos ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, estudo prévio demonstrou que a RC crônica pode causar uma diminuição do tamanho dos astrócitos em camundongos de 19 a 24 meses de idade quando comparados com os controles que foram alimentados por meio da oferta controlada de alimento (Popov, A., 2020). Outros estudos sugerem a remodelação morfofuncional astrocítica sendo responsável por uma maior plasticidade sináptica, o que fornece uma base para a melhora do aprendizado e da memória relatada após a dieta de RC (40). Outro estudo com modelo de RC (restrição moderada da dieta durante a gravidez) demonstrou níveis aumentados do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e do ácido araquidônico (AA) no hipocampo de filhotes machos recém-nascidos, sugerindo a ocorrência de uma adaptação fetal frente a disponibilidade

reduzida de nutrientes para preservar, dessa forma, o desenvolvimento do hipocampo (41–43).

Além disso, os níveis aumentados de AA e 2-AG em filhotes machos de ratos sugerem que a implementação de uma RC moderada, previamente animais bem nutridos, pode ter um impacto modesto no armazenamento de ácidos graxos no início da gravidez, favorecendo a deposição de AA no hipocampo (44).

No estudo realizado por Wahl, Devin, et al., 2018 foi comparada a expressão gênica de genes relacionados à longevidade, citocinas e morfogênese dendrítica no hipocampo em camundongos adultos que receberam a 20% de RC ou com acesso da oferta controlada de alimentos, e em camundongos que receberam ração de baixo teor proteico e alto teor de carboidratos. Em camundongos, os padrões de expressão de RNA no hipocampo foram semelhantes entre camundongos alimentados com dieta RC e com dieta hipoproteica-hiperglicídica (LPHC). Proteínas sensoras de nutrientes, como as SIRT1, mTOR e PGC1 α , também sofreram influência da dieta, entretanto, os efeitos variaram de acordo com o sexo do animal. As dietas RC e LPHC foram associadas ao aumento dos espinhos dendríticos nos neurônios no giro dentado. Camundongos que fizeram uso de RC e LPHC apresentaram melhora no desempenho do labirinto de Barnes e nos testes de reconhecimento de novos objetos. Dietas do tipo LPHC também demonstram alguns dos benefícios apresentadas pela RC em relação ao envelhecimento do cérebro (45).

Em roedores, já foi demonstrado que a RC melhora a memória, o aprendizado, o desempenho comportamental, aumenta a plasticidade sináptica e a neurogênese hipocampal (46), no entanto, a maioria desses resultados foi obtida a partir de experimentos em mamíferos que foram submetidos à RC desde o desmame (47). Sendo assim, esse paradigma não pode ser facilmente associado aos seres humanos, pois envolveria mudanças ao longo da vida do indivíduo, nos hábitos alimentares e culturais. Portanto, se torna um desafio importante determinar os efeitos da RC iniciando numa idade mais avançada (48).

1.5 Barreira Hematoencefálica e Permeabilidade

O encéfalo possui características próprias que diferenciam a sua resposta inflamatória da de outros órgãos do corpo humano. Confinado dentro da caixa craniana e com uma vasculatura própria apresentando junções fechadas, a barreira hematoencefálica. Dessa forma, a entrada de grandes moléculas e células circulantes é limitada. Essas características levaram ao conceito do encéfalo como um órgão possuindo um determinado "privilegio imunológico". Por exemplo, em um estudo com animais, estímulos com lipopolissacarídeos bacterianos estudados em roedores induzem uma rápida e elevada invasão de neutrófilos na pele, mas uma resposta limitada e tardia no encéfalo⁵. O pico máximo de recrutamento de neutrófilos em tecidos não neurais foi em torno de 6-8 horas, enquanto no sistema nervoso central foi em aproximadamente 24 horas. A barreira hematoencefálica é uma estrutura que dificulta o acesso dessas substâncias do sangue para o sistema nervoso central, tais como anticorpos, sistema complemento e fatores de coagulação. (49,50)

O conceito de barreira hematoencefálica (BHE) teve seu surgimento no final do século XIX, na região da Alemanha, através de experimentos do cientista e pesquisador Paul Ehrlich que injetou corante, tanto na circulação arterial como na venosa, de animais em experimentação. O achado foi que todos os órgãos, exceto o cérebro e a medula espinhal, se coravam, levando à hipótese de dois compartimentos distintos (51).

A BHE é composta por células endoteliais da parede capilar, astrócitos envolvendo este capilar, pericitos embutidos na membrana basal do capilar, microglias, neurônios e componente não celular resultante da matriz extracelular. As principais propriedades BHE estão relacionadas às células endoteliais vasculares cerebrais. Esta barreira é formada pela presença das denominadas junções endoteliais, que são responsáveis pela abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula. Foi reconhecido que a função adequada das células endoteliais vasculares cerebrais é garantida pela presença de proteínas de junção apertada, como zonula ocludente (ZOs), ocludinas, claudinas e moléculas de adesão juncional (JAMs). A zônula occludens-1 (ZO-1) pertence à família dos ZOs, desempenha um papel

importante na manutenção da integridade da barreira e sua função pode ser modulada por seu nível de expressão e estado de fosforilação. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucina-6 (IL-6), aumentam a fosforilação de ZO-1 e prejudicam a integridade da BHE no endotélio microvascular (52,53).

1.6 Marcadores Neuroinflamatórios

O receptor toll-like 4 (TLR4) pertence à família dos receptores de reconhecimento de padrões altamente conservados e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), representando, assim, a resposta primária na linha de defesa contra infecções (54).

O TLR4 também está envolvido no reconhecimento de moléculas endógenas liberadas por tecidos lesados e células necróticas. Essas moléculas, chamadas moléculas de padrão molecular associado a danos (DAMP's), induzem a ativação de uma resposta pró-inflamatória por meio da interação com TLR4 (55). Em níveis baixos, esses fatores como o TLR4 possuem um papel neuroprotetor; no entanto, em níveis elevados, eles podem induzir um processo neurodegeneração (56).

Outro importante marcador neuroinflamatório é o inflamassoma NLRP3, que está altamente ativado na inflamação crônica, característica da obesidade e da resistência à insulina. O excesso de nutrientes gera moléculas associadas ao perigo que ativam o inflamassoma-caspase 1 do NLRP3, levando à maturação de IL-1 β e IL-18, que são citocinas pró-inflamatórias liberadas por células imunes que infiltram o tecido adiposo de indivíduos obesos (57).

Em humanos e camundongos, a SIRT1 é expressa no cérebro, especialmente em áreas relacionadas a doenças neurodegenerativas, como o córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base. Também é expressa em importantes centros metabólicos do cérebro, incluindo os núcleos arqueados hipotalâmicos, ventromediais, dorsomediais e paraventriculares. Vários estudos sugerem que a SIRT1 regula a ingestão de alimentos e o peso corporal por meio do sistema central de melanocortina do cérebro. Os níveis de proteína SIRT1 são modulados pelo estado nutricional, uma vez que o jejum aumentou os níveis hipotalâmicos de SIRT1 e essa alteração foi atenuada no hipotálamo de camundongos leptíndicos. Ademais, o mRNA de SIRT1 é expresso em neurônios pró-opiomelanocortina, que são integradores essenciais da

homeostase adequada da glicose e da regulação do peso corporal. Como exemplo, uma diminuição na sinalização de SIRT1 hipotalâmica por inibição farmacológica ou por pequenos RNAs de interferência diminui a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal (58)

Com base no exposto, a hipótese central deste estudo é que a restrição calórica nos períodos gestacional e lactacional pode proteger a interface materno-fetal do desenvolvimento de patologias e alterações metabólicas relacionadas a uma alimentação rica em gordura, proporcionando benefícios na saúde e no neurodesenvolvimento ao longo da vida adulta da prole.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da restrição calórica no perfil neuroinflamatório do hipocampo e na memória de curto prazo de camundongos machos na vida adulta cujas mães também receberam dieta de restrição calórica.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica, em nível transcricional, da sirtuina1 (SIRT1) e do inflamassoma NLRP3 no hipocampo de machos adultos;
- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica por meio da expressão proteica da zonula occludens-1 (ZO-1) no hipocampo de machos adultos;
- Estudar a expressão do toll-like receptor-4 (TLR-4) no hipocampo de machos adultos;
- Avaliar a memória de curta duração nestes animais.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo formatado nas normas da revista Behavioral Brain Research

Link:

Maternal caloric restriction in mice improves memory and reduces the neuroinflammatory phenotype in the hippocampus of adult offspring

Tharcila Quadros de Oliveira ^a, Ana Carolina de Moura ^a, Vanessa Feistauer ^a, Roberto Damiani ^a, Matheus Filipe Braga ^b, Silvana Almeida ^a, Márcia Giovenardi ^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil - CEP 90050-170.

^b Acadêmico do Curso de Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil - CEP 90050-170.

*Corresponding Author: Dr. Márcia Giovenardi
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245, sala 308C - Prédio 1- 90050-170
Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: marciag@ufcspa.edu.br

Highlights

Maternal caloric restriction protects adult offspring from neuroinflammation

Caloric restriction, when moderate and early in life, can improve cognition

Expression of *SIRT1* is increased in groups that received restrictive diet

Caloric restriction decreased TLR-4 expression in the hippocampus of adult offspring

Restriction diet may protect the blood brain barrier in the adult offspring

Abstract

Restrictive diets (RD) can influence the inflammatory phenotype of dams and their offspring. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of caloric restriction on the neuroinflammatory profile of the hippocampus and on the short-term memory of the adult male offspring from RD-fed dams. Mice dams received standard diet *ad libitum* (CONT) or restrictive diet (RD; 30% reduction of CONT consumption) during pregnancy and lactation. Male pups were weaned at 21 days and randomly divided into two groups that received CONT or RD; groups were named according to maternal/offspring diets: CONT/CONT, CONT/RD, RD/CONT and RD/RD. At 90 days old, short-term memory was assessed by the object recognition test (ORT); the inflammatory state of the hippocampus was analyzed by gene expression of sirtuin-1 (*SIRT1*) and inflammasome *NLRP3*; and by protein expression of toll-like receptor-4 (TLR-4) and zonula occludens-1 (ZO-1). Our results showed the influence of maternal and offspring's diet in short-term memory. The expression of *SIRT1* was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT and to RD/RD; *NLRP3* was affected by maternal diet. Regarding TLR-4, expression was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT, representing a maternal diet effect; and RD/CONT had increased levels of TLR-4 when compared to RD/RD, showing an offspring diet effect. ZO-1 expression was higher in RD/CONT compared to CONT/CONT. In summary, our findings demonstrate that maternal caloric restriction promotes protection in the development of the neuroinflammatory phenotype of adult offspring.

Keywords: sirtuin-1, toll-like receptor-4, zonula occludens-1, inflammasome *NLRP3*, short-term memory.

1 INTRODUCTION

Calorie restriction (CR) is a strategy characterized by reducing caloric intake below *ad libitum*, without promoting malnutrition. In 1935, the positive effects of CR on life expectancy were described in rodents, which was later confirmed in several species [1, 2]. It has been shown that a restrictive diet (RD), with 20 to 40% reduction in the calorie intake, can prevent several diseases by exerting protective functions that increase longevity [3]. Mice submitted to RD showed reduced oxidative damage, attenuated inflammation, increased protection against type 2 diabetes, cardiovascular and cerebrovascular diseases, liver fibrosis, and promotes the improvement of hippocampal plasticity [4, 5]. There is also evidence indicating that restrictive caloric diets affect the physiology of hippocampal neurons and astrocytes [6, 7]. It was shown [8] that astrocytic morpho functional remodeling is responsible for enhanced synaptic plasticity, which provides a basis for improved learning and memory reported after CR.

In CR, CNS cells detect the lower availability of nutrients and translate this information into protective adaptive responses, with a connection between cell metabolism and chromatin remodeling, affecting neuronal gene expression. Thus, epigenetic changes can stably modify the response of neural cells to nutrient availability [9]. Furthermore, CR seems to reduce the inflammatory phenotype in several tissues, including the CNS. Proinflammatory markers are increased after the consumption of a high fat diet, and mainly in obesity. Thus, CR could influence the balance of pro and anti-inflammatory profiles in the brain [10-13].

However, there are some concerns that CR during intrauterine life is associated with increased vulnerability to develop metabolic disease and behavioral changes in adulthood [14]. Previous studies [15, 16] showed that the offspring from RD-fed dams present lower insulin and leptin levels, higher adipocyte area, decreased locomotion in

the lateral area in the open field test, and modified expression of dopaminergic system genes in the ventral tegmental area (VTA) when compared to the offspring from standard-fed dams, showing that the maternal restriction diet promotes effects in the metabolism, behavior and gene expression of the offspring in adult life. Thus, maternal RD provides a beneficial response in metabolic parameters, but its effects on behavior are not completely clarified.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of caloric restriction on the neuroinflammatory profile of the hippocampus and on the short-term memory of male offspring from RD-fed dams. Based on the above, the central hypothesis of this study is that caloric restriction in gestational and lactational periods may protect the maternal-fetal interface, providing benefits in the adult life of the offspring.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

Hippocampal samples used for this study were obtained from animals of the project entitled “Behavioral, biochemical and epigenetic analysis of the effect of maternal nutrition in an animal model” approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at UFCSPA, number 388/15. All procedures performed in this project followed the standards proposed by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS [17] Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and the Procedures for the Scientific Use of Animals Act (Act # 11.794, 8 October 2008).

Samples were obtained from male (N=43) and female (N=32) isogenic mice (*Mus musculus*) of the BALB/c lineage, albinos, with approximately 60 days of age and

weight around 30-40 g, kept in acrylic boxes in the vivarium of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). The animals remained isolated while receiving the specific diet with free access to water. The room where the animals remained had temperature control ($21\pm 1^\circ\text{C}$) and a 12-hour light-dark cycle (lights remained on from 4am to 4pm).

2.2 Experimental Procedures

Both mothers and their male offspring were kept isolated in acrylic boxes and received two types of diet: control diet (CONT, standard diet, *ad libitum*) or restrictive diet (RD, 30% reduction of standard diet consumed by the control group). The amount of food offered to the RD group was adjusted weekly using the standard amount of food consumed by the animals in the CONT group, according to previous studies [15, 16].

On the 10th day of diet, females (mothers) were grouped with males (3:1 ratio) for mating, while they were fed *ad libitum*. The presence of the vaginal plug was checked daily and, if present, it was taken as an indication of pregnancy, and considered the first day of pregnancy. Then, the females were separated and placed one per box until delivery. The day of delivery was considered day zero. After parturition, the pups were standardized to 6 per female.

During pregnancy and lactation, dams continued to receive their specific diets, which were predetermined by randomization. After weaning, male offspring were randomly assigned for CONT or RD groups, independently of the maternal dietary group. The experimental groups were abbreviated according to maternal/offspring diets: CONT/CONT, CONT/RD, RD/CONT and RD/RD.

2.3 Behavioral Analysis

At 90 days of age, short-term memory was assessed using the object recognition test (ORT). ORT test was performed in a plastic box (30.5 cm × 19.8 cm × 13.4 cm), in which animals were previously habituated for 10 minutes. On the following day, mice were placed in the same arena for the first test, this time containing two identical objects, which they could freely explore for a total of 5 minutes. Three hours later, short-term memory was assessed by the second test, which consisted in introducing the animal to the same object (familiar object) and to a new and unknown object (novel object) in the same arena for 5 minutes [18]. All tests were recorded for posterior analysis by The Observer® (Noldus, Holand). Exploration was defined by the amount of time spent actively sniffing or interacting with the object at a maximum distance of 2 cm. Recognition index (RI) of the test was calculated by time spent exploring the new object/time exploring both objects multiplied by 100.

2.4 Tissue Collection

Ninety days old male offspring was decapitated after receiving an average dose of 240 mg/kg of ketamine and 30 mg/kg of xylazine intraperitoneally and the hippocampus was macroscopically dissected while protected from light, and stored in RNA later™ stabilization solution (Invitrogen, São Paulo, Brazil), for later storage at -80 °C for subsequent molecular analysis.

2.5 Molecular Analysis

2.5.1 Total RNA Extraction

Total RNA from the hippocampus was extracted by the TRIzol® (Invitrogen, Brazil) method, according to the manufacturer's specifications. Samples were incubated with chloroform at room temperature, and then centrifuged. After centrifugation, three

phases were observed: one phase containing chloroform and phenol, one interfase, and one aqueous phase. The latter was removed for RNA isolation. Quantification was assessed by spectrometry BioSpec-nano[®] (Shimazu, Kioto, Japan) at 260nm and 280nm.

2.5.2 RT-PCR

After total RNA extraction, cDNA synthesis (complementary DNA) was performed by reverse transcription reactions (GoScript[™] Reverse Transcription Kit, Promega, Brazil). A total of 1000 ng of RNA was incubated with oligo (dT), dNTPs and DEPC (diethyl pyrocarbonate) water for 5 minutes at 65 °C, followed by 1 minute on ice. Then, buffer solution, DTT (dithiothreitol) and RNaseOUT, were added for 2 minutes at 37 °C. Finally, M-MLV-RT enzyme was added for cDNA synthesis, for 1 hour at 50 °C. Synthesis reaction was inactivated by incubation at 70 °C for 15 min.

2.5.3 Analysis of Gene Expression by qPCR

Table 1 shows all primer sequences used in this study, which were designed using the software Primer-3 based on mice mRNA sequences in the GenBank database. Primer's specificity was checked using BLAST search against nucleotide collection (nr) of the NCBI database. All primers were purchased from Invitrogen, São Paulo, Brazil.

Analysis of hippocampal expression of sirtuin 1 (*SIRT1*) and inflammasome *NLRP3* genes was performed at the transcriptional level, in which the mRNA content was evaluated, using specific primers to amplify the cDNAs (10 ng of cDNA per well). As an internal control of gene expression Actin-beta (*Actb*) was used as a housekeeping gene [19]. Amplification products were analyzed using the SYBR[™] Green method by Real-Time PCR (Life Technologies, Brazil). CT value of each reaction was used to

calculate the level of mRNA expression of that specific gene after normalization to the expression of the reference gene that was analyzed in parallel in the same reaction plate. Relative quantification (mean of normalized expression to the housekeeping gene) was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [20].

2.6 Western Blot Analysis

To evaluate the protein expression of toll-like receptor-4 (TLR-4) and of zonula occludens-1 (ZO-1) in the hippocampus, samples were first homogenized in RIPA buffer with protease inhibitors' cocktail and then centrifuged for 10 minutes at 8,000 rpm. Protein concentration was determined by Bradford protein assay. Thirty μg of proteins were mixed with Laemmli buffer and heated 100 °C for 3 minutes. After that, proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE gel at 140 V for 2 h and then, proteins were transferred into nitrocellulose membranes and blocked overnight at 4°C with 5% non-fat milk in Tris-buffered solution (TBS) with tween. Membranes were washed with distilled water and incubated overnight with primary antibodies against ZO-1 (1:500, Invitrogen) or TLR-4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were washed with TBS, and then incubated for two hours with an HRP-conjugated secondary antibody. A chemiluminescent signal was visualized in a Chemi-Doc MP Imaging System (Bio-Rad, USA) after exposition of membranes to electrochemiluminescence solution (Bio-Rad, USA).

2.7 Statistical Analyses

Data normality was tested by the D'Agostino-Pearson omnibus test. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. For two-way ANOVA,

factors evaluated were maternal and offspring diet (CONT and RD). Statistical analyses were made using GraphPad Prism 6 (La Jolla, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

Short-term memory of male offspring was evaluated by the ORT test (Table 2). We found an effect of the offspring diet [F (1.39) = 6.625] and a higher Recognition Index (RI) of the RD/RD group when compared to the RD/CONT group ($p = 0.0140$). These findings indicate that RD may improve short-term memory mainly when the dams and the offspring are both submitted to this diet regimen.

qPCR analysis (Fig. 1) showed an interaction between the diets [F(1.28)=19.76; $p = 0.0001$], as the relative expression of *SIRT1* was higher in RD/CONT when compared to CONT/CONT ($p < 0.01$), which demonstrates a maternal diet effect; and the offspring diet effect was showed by the increased expression of *SIRT1* in RD/CONT when compared to RD/RD ($p < 0.0001$). Maternal diet effect was also observed in *NLRP3* gene expression [F (1.24) = 4.512; $p = 0.0442$], where the RD offspring of CONT dams had a decreased expression than the ones from RD dams.

The protein expression (Fig. 2) revealed an interaction between the diets received by the dams and the pups [F (1.16) = 11.57; $p = 0.0036$], since TLR-4 was higher in RD/CONT in comparison to CONT/CONT ($p < 0.05$), representing a maternal diet effect; and RD/CONT also had increased levels of TLR-4 than RD/RD ($p < 0.05$), showing an offspring diet effect. For the ZO-1, the expression was higher in RD/CONT when compared to CONT/CONT ($p = 0.0023$), which demonstrates an offspring diet effect [F (1.15) = 13.42].

4 DISCUSSION

A growing literature has demonstrated that high fat diet (HFD) consumption can cause memory impairments in humans and rodents long before clear signs of obesity appear [10, 11, 21, 22]. On the other hand, caloric restriction can positively influence the memory. Popov et al (2020) showed that 3-month-old mice on a 1-month diet exhibit hippocampal astrocyte morpho functional remodeling, which is possibly responsible for the increased synaptic plasticity, providing a basis for the improved learning and memory reported after CR [8].

Previous study [23] showed that DR provokes a mild neuronal stress response, which would lead to the stabilization of key molecules in synaptic plasticity and neurogenesis and would generate neuroprotection. The CR improves HFD memory deficits induced by up-regulation of expression in the Neurogranin (Ng-Ca²⁺) pathways, involved in synaptic transmission.

In the review by Dias et al (2020) it is concluded that depending on the intensity, duration, and period of life in which it is started, CR can lead to different learning and memory. However, it can be speculated that a mild or moderate CR ($\leq 40\%$), lead to beneficial effects on learning and memory when initiated in the early stages of life. Our results showed that male offspring of RD dams submitted to restriction diet have better performance in the ORT test than the ones that received CONT; this is evidenced by the increase in the exploration time of the new object, which allows us to infer that they showed improvement in short-term memory. These findings reinforce the idea that CR can improve cognition, when performed with moderate intensity and early in life. If it is more severe and later, it can damage cognition [24].

In our study, we demonstrated that the gene expression of *SIRT1* is increased in groups that received a restrictive diet, with an effect of maternal diet and that consumed

by the offspring. In both cases (maternal diet and offspring diet effects) the RD promotes increased gene expression of *SIRT1* when compared to the CONT group.

Among the various identified mechanisms that demonstrate how the CR acts, the role of the sirtuin family is highlighted, once, as histone deacetylases, they repress genome transcription, regulating a select set of proteins related to energy metabolism, therefore, playing a fundamental role in the longevity effects caused by caloric restriction. *SIRT1* promotes deacetylation of transcription factors such as NFkB, thus reducing the activation of pro-inflammatory pathways [25].

Defects in the pathways controlled by *SIRT1* and sirtuin-3 (*Sirt3*) result in some metabolic disturbances. Activation of sirtuins by genetic or pharmacological means promotes metabolic benefits that protect mice from diet-induced obesity, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (for review see Nogueiras et al, 2012) [26]. Moreover, in mice the overexpression of *SIRT1* is associated with positive metabolic outcomes [27].

Previous studies [28, 29] showed that *SIRT1* protein levels are modulated by the animal's nutritional status, as fasting increases hypothalamic *SIRT1* levels, and this change was attenuated in the hypothalamus of leptin-deficient mice. Studies suggest that *SIRT1* regulates food intake and body weight through the central melanocortin system. Our results agree with several works that show that caloric restriction increases *SIRT1* in some tissues, including the brain [30].

Regarding the gene expression of *NLRP3*, we observed an effect of the maternal diet, where caloric restriction seems to exert a protective effect for the offspring regardless of what they eat throughout their lives. The *NLRP3* inflammasome is a critical component of the innate immune system and an important regulator of acute and chronic inflammation, both systemic and central. Given the broad array of *NLRP3*

activators, *NLRP3* appears to sense the disturbance of cellular homeostasis rather than directly react to these stimuli (for review see Song et al, 2017) [31].

The activation of *NLRP3* inflammasomes involves the protein apoptosis-associated speck-like protein (ASC), which has also been associated with weight gain and insulin resistance. The absence of ASC decreases weight gain in male animals submitted to an HFD (60% lipid) diet for 12 weeks, as well as increased insulin sensitivity in these animals, decreasing serum glucose and insulin levels [32]. Similarly, knockout females for ASC and *NLRP3* fed with HFD for 12 months showed a significant improvement in insulin action when compared to the control group, in addition to a protection to pancreatic cells [33].

The reduced *NLRP3* expression in adipose tissue is associated with decreased inflammation and improved insulin sensitivity in obese patients with type 2 diabetes. In the same study, *NLRP3* deficient mice with induced obesity showed reduced adipose tissue interleukin-18 and interferon-gamma [34].

TLR-4 is a receptor related to innate immune responses associated with neuroinflammation and in tissue damage responses, however, its role in CNS plasticity has already been described. Studies performed with knockout to TLR-4 as well as adult mice infused intracerebroventricular of TLR-4 antagonist showed the role of TLR-4 in the formation of spatial and contextual learning and memory [35]. In our study, when evaluating the expression of the TLR-4 protein, we observed the effect of CR in both the maternal diet and the diet consumed by the offspring. In both cases CR affected TLR-4 expression in the hippocampus of adult offspring. We can speculate that the improvement in the performance of the RD/RD animals in the OTR was in part due to the reduction in TLR-4 expression in the hippocampus.

Furthermore, concerning the quantification of zonula occludens-1 (ZO-1), we observed that the maternal diet affected the expression of this protein. ZO-1 is a tight junction protein and it can be used as a marker for blood-brain barrier (BBB) integrity. ZO-1 reduces the permeability of cerebral vessels by restricting free molecular exchange between blood and brain tissues [36]. The decreased expression and its disarrangement are closely associated with the degree of damage to the BBB making it a valuable marker [37]. Therefore, the increased expression of ZO-1 protein can promote BBB repair. Our results show that ZO-1 expression had increased levels in CONT offspring of RD-fed dams. Thus, we can infer that the restriction diet may have been able to protect the BBB in the adult offspring.

Moreover, the relationship between damage to the BBB and cognitive decline has been demonstrated in animals, similar to the previously demonstrated BBB dysfunction association with cognitive decline in Diabetes Mellitus (DM) patients [38]. Besides, memory deficits have been documented in animal models of DM [39], which showed BBB dysfunction in parallel with pericyte loss and neuronal dysfunction, and was associated with cognitive decline [40]. BBB lesion indicators have been considered with better predictive power for the development of dementia than genetic markers of Alzheimer's disease [41].

5 CONCLUSIONS

Our findings demonstrate that caloric restriction applied to the dams promotes protection in the development of the neuroinflammatory phenotype of male offspring in adulthood. Furthermore, a restrictive diet throughout life can improve the short-term memory and the inflammatory profile in the hippocampus of the offspring.

Funding: This work was supported by CAPES/Brazil and PROAP/UFCSPA.

References

1. Roth, G.S., D.K. Ingram, and M.A. Lane, *Caloric restriction in primates and relevance to humans*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **928**: p. 305-15.
2. Bordone, L. and L. Guarente, *Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 298-305.
3. Smiljanic, K., et al., *Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats*. Biogerontology, 2015. **16**(1): p. 71-83.
4. Spindler, S.R., *Caloric restriction: from soup to nuts*. Ageing Res Rev, 2010. **9**(3): p. 324-53.
5. Fernandes, G., *Progress in nutritional immunology*. Immunol Res, 2008. **40**(3): p. 244-61.
6. Murphy, T., G.P. Dias, and S. Thuret, *Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap*. Neural Plast, 2014. **2014**: p. 563160.
7. Kuhla, A., et al., *Lifelong caloric restriction increases working memory in mice*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68778.
8. Popov, A., et al., *Caloric restriction triggers morphofunctional remodeling of astrocytes and enhances synaptic plasticity in the mouse hippocampus*. Cell Death Dis, 2020. **11**(3): p. 208.
9. Oliveira, P.F., et al., *The Role of Sperm in the Transmission to the Offspring of the Risk for Diabetes Mellitus*. Revista Portuguesa de Diabetes. **12**(4): p. 149-158.
10. de Oliveira, S., et al., *Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats*. Obesity (Silver Spring), 2021. **29**(1): p. 116-124.
11. Feijó, G.D.S., et al., *Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity*. Neurochem Res, 2019. **44**(8): p. 1869-1877.
12. Bok, E., et al., *Dietary Restriction and Neuroinflammation: A Potential Mechanistic Link*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(3).
13. Wang, R., et al., *Caloric restriction ameliorates high-fat diet induced cognitive deficits through attenuating neuroinflammation via the TREM2-PI3K/AKT signaling pathway*. Food Funct, 2021. **12**(14): p. 6464-6478.
14. McMillen, I.C., et al., *Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. **102**(2): p. 82-9.
15. Feistauer, V., et al., *Restriction and hyperlipidic diets during pregnancy, lactation and adult life modified the expression of dopaminergic system related genes both in female mice and their adult offspring*. Brain Res Bull, 2020. **162**: p. 245-252.

16. Fisch, J., et al., *Maternal feeding associated to post-weaning diet affects metabolic and behavioral parameters in female offspring*. *Physiol Behav*, 2019. **204**: p. 162-167.
17. *CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. *Altern Lab Anim*, 1985. **12**(4): p. ii-.
18. Akkerman, S., et al., *Object recognition testing: statistical considerations*. *Behav Brain Res*, 2012. **232**(2): p. 317-22.
19. Moura, A.C., et al., *Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control?* Einstein (Sao Paulo), 2014. **12**(3): p. 336-41.
20. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
21. Kanoski, S.E. and T.L. Davidson, *Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet*. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 2010. **36**(2): p. 313-9.
22. Beilharz, J.E., J. Maniam, and M.J. Morris, *Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats*. *Brain Behav Immun*, 2014. **37**: p. 134-41.
23. Kim, H., et al., *Caloric restriction improves diabetes-induced cognitive deficits by attenuating neurogranin-associated calcium signaling in high-fat diet-fed mice*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016. **36**(6): p. 1098-110.
24. Dias, I.R., et al., *Does calorie restriction improve cognition?* *IBRO Rep*, 2020. **9**: p. 37-45.
25. Zhang, F., et al., *Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system*. *Prog Neurobiol*, 2011. **95**(3): p. 373-95.
26. Nogueiras, R., et al., *Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(3): p. 1479-514.
27. Bordone, L., et al., *SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction*. *Aging Cell*, 2007. **6**(6): p. 759-67.
28. Ramadori, G., et al., *Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability*. *J Neurosci*, 2008. **28**(40): p. 9989-96.
29. Cakir, I., et al., *Hypothalamic SIRT1 regulates food intake in a rodent model system*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8322.
30. Dietrich, M.O., et al., *Agrp neurons mediate SIRT1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for SIRT1 in neuronal firing and synaptic plasticity*. *J Neurosci*, 2010. **30**(35): p. 11815-25.
31. Song, L., et al., *NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies*. *Front Cell Neurosci*, 2017. **11**: p. 63.
32. Boini, K.M., et al., *Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: Effects of ASC gene deletion and silencing*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(5): p. 836-45.
33. Youm, Y.H., et al., *Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage*. *Endocrinology*, 2011. **152**(11): p. 4039-45.
34. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. *Nat Med*, 2011. **17**(2): p. 179-88.
35. Okun, E., et al., *Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47522.

36. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(1): p. 13-25.
37. Nusrat, A., et al., *Tight junctions are membrane microdomains*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 10)**: p. 1771-81.
38. Janelidze, S., et al., *Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype*. Neurobiol Aging, 2017. **51**: p. 104-112.
39. Sharma, B. and N. Singh, *Pitavastatin and 4'-hydroxy-3'-methoxyacetophenone (HMAP) reduce cognitive dysfunction in vascular dementia during experimental diabetes*. Curr Neurovasc Res, 2010. **7**(3): p. 180-91.
40. Stranahan, A.M., et al., *Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(12): p. 2108-2121.
41. Rom, S., et al., *Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 1883-1896.

FIGURES LEGENDS

Table 1. Primer's sequences used.

Table 2. Influence of maternal and offspring's diet in short-term memory in male offspring.

Figure A. Relative gene expression of *SIRT1* and *NLRP3* in the hippocampus of control (CONT) and restrictive diet (RD)-fed offspring from dams that received standard (CONT) and RD diet. Data are expressed as mean \pm SEM compared by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.01$ in comparison to the CONT/CONT group. # $p < 0.0001$ in comparison to the RD/CONT group. $n = 8$ /group.

Figure B. Western blot analysis TLR-4 and ZO-1 expression in the hippocampus of control (CONT) and restrictive diet (RD)-fed offspring from dams that received standard (CONT) and RD diet. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ in comparison to the CONT/CONT group. # $p < 0.05$ in comparison to the RD/CONT group. $n = 4$ to 6 /group.

Table 1. Primer's sequences used.

Gene	Primer F	Primer R
<i>SIRT1</i>	5'GGCCGCGGATAGGTCCATA'3	5'ACAATCTGCCACAGCGTCAT'3
<i>NLRP3</i>	5'GACACGAGTCCTGGTGACTION'3	5'GGCTTAGGTCCACACAGAAAG'3
<i>Actb</i>	5'AGATCAAGATCATTGCTCCTCT'3	5'ACGCAGCTCAGTAACAGTCC'3

Abbreviations: *SIRT1*: sirtuin 1; *NLRP3*: NLR family, pyrin domain containing 3; *Actb*: actin beta.

Table 2. Influence of maternal and offspring's diet in short-term memory in male offspring.

Offspring's diet	Dam's diet		p values		Interaction	Maternal Diet	Offspring Diet
	CONT (n=10)	RD (n=11)	CONT (n=11)	RD (n=11)			
3h Recognition Index (%)	65.69 ± 4.22	68.95 ± 3.43	57.10 ± 2.96	71.80 ± 3.36*	0.109	0.416	0.023

Data expressed as mean ± S.E.M.

Two-Way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test.

* $p < 0.05$ when compared to RD/CONT group.

Figure A

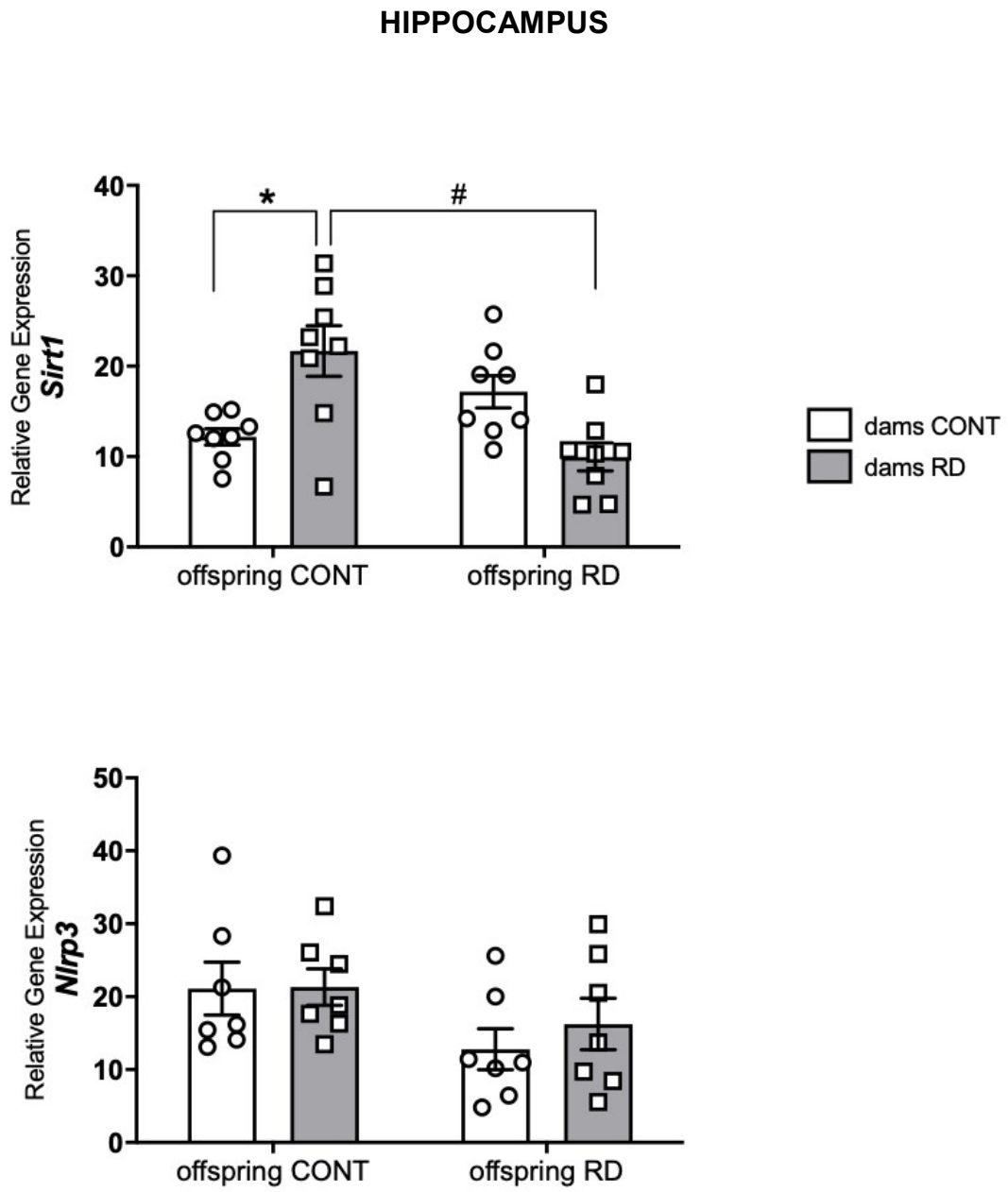
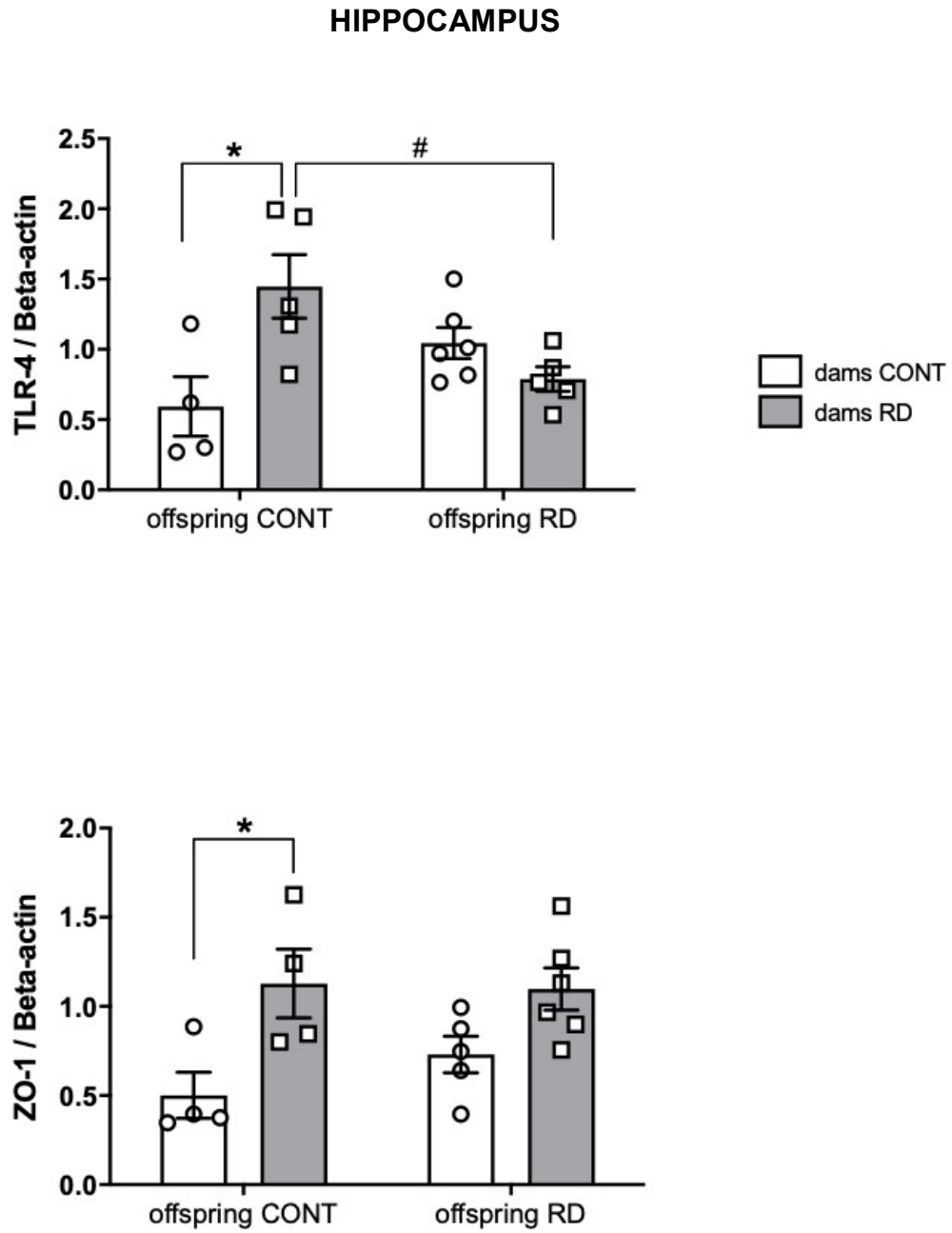


Figure B



4. CONCLUSÕES

A partir deste estudo podemos evidenciar o papel neuroprotetor da alimentação restritiva sob influências inflamatórias no sistema nervoso central em filhotes na idade adulta de mães que fizeram uso desta dieta restritiva. Além disso, nosso experimento demonstrou também uma melhora significativa na memória a curto prazo em roedores machos.

Tivemos algumas limitações relacionadas ao tempo para a realização dos experimentos, assim como o N total das amostras do nosso trabalho não eram tão robustos quanto desejávamos. Com o avançar da pandemia de SARS CoV - 2, foram estabelecidas restrições de horário nos laboratórios em que realizamos o nosso estudo e houve dificuldade também para encontrar alguns insumos necessários utilizados em nossos testes. Entretanto, tivemos êxito ao finalizar os estudos e experimentos, conseguindo proporcionar um trabalho de qualidade e reforçar o impacto positivo que a dieta restritiva tem na saúde neural ao longo do desenvolvimento dos indivíduos, podendo chamar atenção mais uma vez que o tipo de dieta consumida possui um papel crucial na saúde e bem-estar das pessoas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal P, Morriveau TS, Kereliuk SM, Doucette CA, Wicklow BA, Dolinsky VW. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2018;55(2):71–101. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1422109>
2. Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. 2015;16(6):332–44.
3. Paiva JT, Resende MDV, Resende RT, Oliveira HR, Silva HT, Caetano GC, et al. Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. *Arch*

- Zootec. 2019;68(262):304–11.
4. Goddard ME, Whitelaw E. The use of epigenetic phenomena for the improvement of sheep and cattle. *Front Genet.* 2014;5(JUL):1–6.
 5. Jablonka EVA, Raz GAL. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q Rev Biol.* 2009;84(2):131–76.
 6. Bohacek J, Mansuy IM. A guide to designing germline-dependent epigenetic inheritance experiments in mammals. *Nat Methods.* 2017;14(3):243–9.
 7. Hu J, Barrett RDH. Epigenetics in natural animal populations. Vol. 30, *Journal of Evolutionary Biology.* Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1612–32.
 8. Sinclair KD, Rutherford KMD, Wallace JM, Brameld JM, Stöger R, Alberio R, et al. Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals [Internet]. Vol. 28, *Reproduction, Fertility and Development.* 2016 [cited 2021 Aug 4]. p. 1443–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1071/RD16102>
 9. Collier G, Johnson DF, Mathis C. THE CURRENCY OF PROCUREMENT COST. *J Exp Anal Behav.* 2002;78(1):31–61.
 10. West DB, Fey D, Woods SC. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 1984;15(5):776–87.
 11. Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Caloric restriction in primates and relevance to humans. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001. p. 305–15.
 12. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):298–305.
 13. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? [Internet]. Vol. 17, *Genes and Development.* 2003 [cited 2021 Aug 4]. p. 313–21. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1052903>.
 14. Contestabile A, Ciani E. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int.* 2004;45(6):903–14.
 15. Arnhold S, Faßbender A, Klinz FJ, Kruttwig K, Löhnig B, Andressen C, et al. NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons - An immunocytochemical and functional approach. *Int J Dev Neurosci.* 2002;20(2):83–92.
 16. Jang YC, Lustgarten MS, Liu Y, Muller FL, Bhattacharya A, Liang H, et al. Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *FASEB J.* 2010 May;24(5):1376–90.
 17. Mecocci P, Fanó G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(3–4):303–8.
 18. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 2001;137(4):231–43.

19. Ingram DK, Roth GS, Lane MA, Ottinger MA, Zou S, de Cabo R, et al. The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: Extrapolation from monkey studies. *Biogerontology*. 2006;7(3):143–8.
20. Jolly CA, Muthukumar A, Avula CPR, Troyer D, Fernandes G. Life span is prolonged in food-restricted autoimmune-prone (NZB×NZW)F(1) mice fed a diet enriched with (n-3) fatty acids. *J Nutr* [Internet]. 2001 [cited 2021 Aug 4];131(10):2753–60. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/131/10/2753/4686521>
21. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5807–11.
22. Kaerberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol* [Internet]. 2004 [cited 2021 Aug 4];2(9). Available from: www.plosbiology.org
23. Birkisdóttir MB, Jaarsma D, Brandt RMC, Barnhoorn S, van Vliet N, Imholz S, et al. Unlike dietary restriction, rapamycin fails to extend lifespan and reduce transcription stress in progeroid DNA repair-deficient mice. *Aging Cell*. 2021 Feb 1;20(2).
24. Anand K, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012;15(4):239–46.
25. Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region: The Lateral and Medial Entorhinal Areas. *Hippocampus*. 2007;1031:697–708.
26. Larriva-Sahd JA. Some predictions of rafael lorente de no 80 years later. *Front Neuroanat*. 2014;8(DEC):1–8.
27. Dudek SM, Alexander GM, Farris S. Rediscovering area CA2: Unique properties and functions [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Neuroscience*. 2016 [cited 2021 Aug 4]. p. 89–102. Available from: <http://mouse.brain-map.org/search/show?>
28. SILVÉRIO GC, ROSAT RM. Memória de longo prazo: mecanismos neurofisiológicos de formação. *Rev Médica Minas Gerais*. 2006;16(4):219–23.
29. Davidson TL, Jarrard LE. A role for hippocampus in the utilization of hunger signals. *Behav Neural Biol*. 1993;59(2):167–71.
30. Tracy AL, Jarrard LE, Davidson TL. The hippocampus and motivation revisited: Appetite and activity. *Behav Brain Res*. 2001;127(1–2):13–23.
31. Duvernoy HM, Cattin F, Risold PY, Vannson JL, Gaudron M. The human hippocampus: Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI, fourth edition [Internet]. Vol. 92, *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI, Fourth Edition*. 2013 [cited 2021 Sep 1]. 1–237 p. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=5GkpPjk5z1IC&oi=fnd&pg=PP9&dq=.+DUVERNOY+HM:+The+Human+Hippocampus.+Springer,+Berlin,+2005.&ots=ubkx-NQHS6&sig=bAf_UOFHoKYHW0XOhOyvMJVxY8g#v=onepage&q&f=false

32. Castro-Sierra E, De León FCP, Domínguez LFG, Rivera AP. Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo. GABA y memoria. Segunda parte. Salud Ment [Internet]. 2007 [cited 2021 Sep 1];30(5):47–54. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252007000400007
33. Valadares CT, Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS. Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutr Neurosci*. 2010;13(6):274–82.
34. Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutr Res* [Internet]. 2015;35(1):76–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.10.014>
35. Okada M, Nakanishi H, Amamoto T, Urae R, Ando S, Yazawa K, et al. How does prolonged caloric restriction ameliorate age-related impairment of long-term potentiation in the hippocampus? *Mol Brain Res*. 2003;111(1–2):175–81.
36. Fontán-Lozano Á, López-Lluch G, Delgado-García JM, Navas P, Carrión ÁM. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*. 2008;38(2):167–77.
37. Yang J, Wang Q, He F, Ding Y, Sun Q, Hua T, et al. Dietary restriction affects neuronal response property and GABA synthesis in the primary visual cortex. *PLoS One*. 2016;11(2).
38. Lin AL, Coman D, Jiang L, Rothman DL, Hyder F. Caloric restriction impedes age-related decline of mitochondrial function and neuronal activity. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2014;34(9):1440–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.114>
39. Verkhatsky A, Parpura V, Vardjan N, Zorec R. Physiology of astroglia. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. p. 45–91.
40. Popov A, Denisov P, Bychkov M, Brazhe A, Lyukmanova E, Shenkarev Z, et al. Caloric restriction triggers morphofunctional remodeling of astrocytes and enhances synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020;11(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2406-3>
41. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001;410(6830):822–5.
42. Keimpema E, Hökfelt T, Harkany T, Doherty P. The molecular interplay between endocannabinoid and neurotrophin signals in the nervous system and beyond. *Eur J Neurosci*. 2014;39(3):334–43.
43. Teresa Ramírez-López M, Vázquez M, Lomazzo E, Hofmann C, Noemi Blanco R, Alé F, et al. A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner. 2017 [cited 2021 Aug 4]; Available from:

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174307>
44. Ramírez-López MT, Vázquez M, Bindila L, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco RN, et al. Maternal caloric restriction implemented during the preconceptional and pregnancy period alters hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces overweight and increased adiposity at adulthood in male rat offspring. *Front Behav Neurosci*. 2016;10(NOV):1–16.
 45. Wahl D, Solon-Biet SM, Wang Q-P, Wali JA, Pulpitel T, Clark X, et al. Comparing the Effects of Low-Protein and High-Carbohydrate Diets and Caloric Restriction on Brain Aging in Mice. *Cell Rep*. 2018;25(8):2234–43.
 46. Smiljanic K, Pesic V, Mladenovic Djordjevic A, Pavkovic Z, Brkic M, Ruzdijic S, et al. Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. *Biogerontology*. 2015;16(1):71–83.
 47. Martini C, Pallottini V, Cavallini G, Donati A, Bergamini E, Trentalance A. Caloric restrictions affect some factors involved in age-related hypercholesterolemia. *J Cell Biochem*. 2007;101(1):235–43.
 48. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature* [Internet]. 2019;571(7764):183–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1365-2>
 49. Vieira GDD, Sousa CM de. Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica. *J Heal Biol Sci*. 2013;1(4):166.
 50. Lima RR, Costa AMR, Souza RD de, Gomes-Leal W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev Para Med* [Internet]. 2007 [cited 2021 Oct 19];21(2). Available from: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-59072007000200006
 51. Davson H. Review lecture. The blood-brain barrier. *J Physiol* [Internet]. 1976 Feb 1 [cited 2021 Sep 1];255(1):1–28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1309232/>
 52. Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic A V. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2008 Sep 11 [cited 2021 Sep 1];6(3):179. Available from: </pmc/articles/PMC2687937/>
 53. Chen Y, Mou D, Hu L, Zhen J, Che L, Fang Z, et al. Effects of Maternal Low-Energy Diet during Gestation on Intestinal Morphology, Disaccharidase Activity, and Immune Response to Lipopolysaccharide Challenge in Pig Offspring. *Nutrients* [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2021 Sep 1];9(10). Available from: </pmc/articles/PMC5691731/>
 54. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(1):12–9.
 55. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Sep 1];14(11):2592. Available from: </pmc/articles/PMC4373479/>

56. Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon MJ. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's Dement*. 2008;4(4):242–50.
57. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism* [Internet]. 2017;74:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.06.002>
58. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, et al. SIRTUIN 1 AND SIRTUIN 3: PHYSIOLOGICAL MODULATORS OF METABOLISM. *Physiol Rev* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2021 Sep 1];92(3):1479. Available from: </pmc/articles/PMC3746174/>

ANEXO I: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) **PROTOCOLO Nº:** 171/15

2) **DATA DO PARECER:** 09/03/2016

Parecer 388/15

3) **TÍTULO DO PROJETO:**

Análise comportamental, bioquímica e epigenética do efeito da nutrição materna em modelo animal.

4) **PESQUISADOR RESPONSÁVEL:**

Márcia Giovenardi

5) **RESUMO DO PROJETO:**

O projeto visa analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC). Protocolo 1: camundongas serão acasaladas na proporção de 3:1 e iniciarão a dieta quando confirmada a prenhez (esfregaço vaginal), sendo avaliadas no 1º e 10º dia pós-natal, quanto a massa corporal e no 7º dia pós-natal quanto ao comportamento maternal, 8º dia – ansiedade (labirinto em cruz) e 9º dia, quanto a locomoção (campo aberto). Estas serão avaliadas também, quanto a massa corporal nos dias 3, 9, 15 e 21 pós-natal e eutanasiadas por decapitação no 22º dia, para coleta de sangue troncular para avaliação bioquímica (glicemia, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e colesterol) e regiões cerebrais para análise da expressão de genes envolvidos nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico. Protocolo 2: as ninhadas serão padronizadas ao nascimento, em oito filhotes cada e, 3 machos e 3 fêmeas de cada ninhada serão submetidos as respectivas dietas (independentemente da dieta materna). Será verificado na prole: massa corporal nos dias 3, 9, 15 e 21 pós-natal, 55º dia - ansiedade (labirinto em cruz) e 60º dia - locomoção (campo aberto), sendo as fêmeas acompanhadas quanto ao ciclo estral (3 ciclos regulares) e testadas em diestro. A eutanásia será realizada em

torno de 65 dias pós-natal, da mesma forma e com avaliação das mesmas variáveis descritas para as mães.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC).

Específicos:

- analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos maternal, de ansiedade e de locomoção das genitoras;
 - analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico das genitoras;
 - analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos de ansiedade e locomoção da prole;
 - analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico da prole;
- Identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema dopaminérgico da prole;
- identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema serotoninérgico da prole;
 - analisar o efeito de diferentes dietas no perfil lipídico da genitora e da prole.

7) **FINALIDADE DO PROJETO:** Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Detalhar na metodologia:

- o cálculo do tamanho da amostra foi apresentado e referenciado;
- o procedimento de acasalamento e adequado a espécie em consonância com os objetivos da pesquisa.
- a justificativa para a decapitação foi apresentada e referenciada.

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não
Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Biotério da UFCSPA, Laboratório de Fisiologia comportamental e metabólica e o Laboratório de Biologia Molecular.

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Não referida	Camundongos	Macho	15
Não referida	Camundongas	Fêmeas	45

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início 10/03/2016 Data de Término 30/12/2019

Comentários gerais sobre o projeto:

O tema é relevante, o uso dos animais é justificado por necessitar avaliação genética, metabólica e comportamental *in vivo*. O projeto está adequado para ser desenvolvido na forma apresentada.

ANEXO II: CURRÍCULO LATTES



Tharcila Quadros de Oliveira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2731587094904027>

ID Lattes: **2731587094904027**

Última atualização do currículo em 30/08/2021

Possui graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário Ritter dos Reis (2018). Atualmente é biomédica patologista clínica no Laboratório Pasteur. Pós-graduanda em Análises Clínicas e Microbiologia na Faculdade Única - Grupo Prominas. Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Possui experiência em Análises Clínicas, Imunohematologia e Neurobiologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Tharcila Quadros de Oliveira
Nome em citações bibliográficas	OLIVEIRA, T. Q.
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/2731587094904027

Endereço

Endereço Profissional	Hospital Centenário de São Leopoldo. Avenida Theodomiro Porto da Fonseca - de 601 a 1059 - lado ímpar Flô 93020645 - São Leopoldo, RS - Brasil Telefone: (51) 33598000 Fax: (51) 33598001 URL da Homepage: https://hospitalcentenario.rs.gov.br/
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2019	Mestrado em andamento em BIODICIÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Restrição Calórica Reduz o Fenótipo Neuroinflamatório no Hipocampo de Camundongos Machos, Orientador: Márcia Giovanardi. Coorientador: Ana Carolina de Moura.
2021	Especialização em andamento em Análises Clínicas e Microbiologia. (Carga Horária: 500h). Instituto Prominas Serviços Educacionais, PROMINAS, Brasil.
2012 - 2018	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Ritter dos Reis, UNIRITTER, Brasil. Título: Efeitos do Uso da Hormonioterapia em Pessoas Transsexuais. Orientador: Virginia Meneghini Lazzari. Bolsista do(a): Prefeitura Municipal de Porto Alegre, UNPOA, Brasil.

Formação Complementar

2018 - 2018	INTERPRETAÇÃO CLÍNICO - LABORATORIAL DE ALTERAÇÕES HORMONAIS. (Carga horária: 6h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2014 - 2014	Seminário Sobre Gestão de Resíduos. (Carga horária: 3h). Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.
2012 - 2012	1 Semana Acadêmica da Biomedicina. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Ritter dos Reis, UNIRITTER, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Purificação de Proteínas úteis para Biotecnologia. (Carga horária: 5h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.

Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - Atual

Vínculo: Profissional, Enquadramento Funcional: Biomédica hematologista, Carga horária: 36

Outras informações

Testes pré transfusionais: hemaglutinação, imunocromatografia, imunohematologia, prova reversa (tipagem sanguínea), tipagem Rh (D) em tubo e pesquisa de anticorpos irregulares. Imunohematologia e Transfusão de Sangue: Testes de tipagem sanguínea em lâminas, tubos de ensaio; Pesquisa, titulação e identificação de anticorpos irregulares; Coombs direto; Crioaglutininas e Isohemaglutininas. Acompanhamento da transfusão de sangue e atendimento da demanda de sangue no bloco cirúrgico. Controle de qualidade: Acompanhamento de toda rotina do controle de qualidade do banco de sangue e dos componentes sanguíneos.

Centro Universitário Ritter dos Reis, UniRITTER, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2014

Outras informações

Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Pesquisadora, Carga horária: 20
Pesquisadora de extensão Universitária.

Projetos de extensão

2013 - Atual

Integração acadêmica nas redes de cuidado e promoção da saúde nas diferentes fases do desenvolvimento humano
Descrição: Visa a análise de demanda de necessidades dos postos de saúde da região Sul/Centro Sul.
Situação: Em andamento; Natureza: Extensão.
Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Tharcila Quadros de Oliveira - Coordenador / Louise Adad Barbosa - Integrante / Fernanda Teixeira - Integrante / Leonardo Martins Costa Garavelo - Integrante.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica/Especialidade: Hematologia.
4. Grande área: Ciências Humanas / Área: Psicologia / Subárea: Psicologia Fisiológica/Especialidade: Psicobiologia.

Idiomas

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. OLIVEIRA, T. Q.. Oficina Transdisciplinar em Saúde Coletiva. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. I SIMPÓSIO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA NA PRÁTICA CLÍNICA. 2021. (Simpósio).
2. INTERPRETAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE ALTERAÇÕES HORMONAIS. 2018. (Oficina).
3. XV CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES. DETERMINAÇÃO DE PONTOS DE CORTE PARA USO QUANTITATIVO DA PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA PRÉ-TRANSPLANTE RENAL COM DOADOR FALECIDO. 2017. (Congresso).
4. 36ª Semana Científica do HCPA, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2016. (Seminário).
5. IV Congresso Internacional de Bioanálises VII Congresso Sul - Brasileiro de Biomedicina XI Seaman Gaúcha de Biomedicina. 2011. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 01/09/2021 às 19:09:17

[Imprimir currículo](#)