ANDREA RODRIGUES VASCONCELOS

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA DIETA INTERMITENTE NA VIGÊNCIA DE UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO NO HIPOCAMPO DE RATOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2011

ANDREA RODRIGUES VASCONCELOS

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA DIETA INTERMITENTE NA VIGÊNCIA DE UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO NO HIPOCAMPO DE RATOS

Dissertação apresentada ao departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo

2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vasconcelos, Andrea Rodrigues.
Efeitos comportamentais e bioquímicos da dieta intermitente na vigência de um estímulo inflamatório no hipocampo de ratos. / Andrea Rodrigues Vasconcelos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Cristoforo Scavone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurofarmacologia e Neuroproteção.

Versão do título para o inglês: Behavioral and biochemical effects of intermittent fasting in the presence or abscence of on inflammatory stimulus (LPS) in rat hippocampus.

Descritores: 1. Dieta intermitente 2. Neuroproteção 3. Inflamação 4. Hipocampo 5. Cognição I. Scavone, Cristoforo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0177/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Andrea Rodrigues Vasconcelos

Título de Dissertação: Efeitos comportamentais e bioquímicos da dieta intermitente na vigência de um estímulo inflamatório no hipocampo de ratos.

Orientador (a): Cristoforo Scavone

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../ ...../ ....., considerou

( ) Aprovado (a) **( ) Reprovado (a)**

Examinador (a): Nome completo:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Nome completo:.....
Instituição:.....

Presidente: Nome completo:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **89** nas fls. **60** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Cristoforo Scavone, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Efeitos comportamentais e bioquímicos da restrição calórica na vigência de um estímulo inflamatório no sistema nervoso central de ratos***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Lídia Mitiko Yshii , Andréa Rodrigues Vasconcelose os pesquisadores Elisa Mitiko Kawamoto , Carolina Dermarchi Munhoz, Lucilia B. Lepsch,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **15.10.08,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Núcleo de Radioproteção

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que ANDREA RODRIGUES VASCONCELOS foi aprovado no Curso de Proteção Radiológica, promovido pelo Núcleo de Radioproteção do ICB/USP, no período de 10/12 a 12/12/2007 com carga horária de 15 horas.

São Paulo, 13 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. BENY SPIRA

NUCLEO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

Av. Prof. Lineu Prestes, 173 –Edifício Biomédicas IV–Cidade Universitária–CEP 05508-900–São Paulo–SP– Tel.: (11) 3091-7390

Aos meus pais,
por todo o amor, dedicação e apoio.
Sem a participação de vocês não
teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Cristoforo Scavone**, por me receber em seu laboratório, pelo tempo dedicado, paciência, incentivos, confiança, pelas inúmeras oportunidades oferecidas e por todos os ensinamentos que me serão úteis para a vida toda.

À minha co-orientadora, Dra. **Elisa Mitiko Kawamoto**, pelo estímulo, confiança, auxílio, por todos os ensinamentos e pela sua contribuição durante todo o desenvolvimento deste estudo.

À Profa. Dra. **Carolina Munhoz**, pela participação na minha formação e discussões científicas.

Aos professores **Tânia Viel** e **Hudson Buck**, pela colaboração e apoio nos experimentos comportamentais; às alunas da Santa Casa de São Paulo, **Suzanna**, **Carla** e **Ticiana**, pelo tempo dedicado.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, que tornaram os meus dias de trabalho muito mais agradáveis; especialmente à **Lidia Mitiko Yshii** e **Paula Fernanda Kinoshita**, que sempre estiveram empenhadas em me ajudar quando necessitei.

À **Larissa Lima**, pela paciência e pelo apoio técnico e burocrático que me foram dispensados.

À **Diana Zucas Andreotti** pelo auxílio nos experimentos do dia a dia e a **Fernando de Souza Lula** pelo apoio com o biotério.

Às secretárias da Pós-graduação do Departamento de Farmacologia **Selma Rigonatti** e **Camila Trindade**, por todo apoio burocrático e pronto atendimento.

À **Luisa Scavone**, pela revisão ortográfica e à bibliotecária **Monica Amaral**, pelo trabalho de revisão e normalização do manuscrito.

Aos meus pais, **Therezinha de Jesus** e **Luiz Jether Vasconcelos**, pela compreensão da minha ausência em decorrência do trabalho, pelo apoio, incentivo e amor que sempre recebi.

À **Daniel Amaral**, por todo o companheirismo, carinho e paciência durante esses dois anos de mestrado.

A todos aqueles que contribuíram para que este momento pudesse acontecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro (FAPESP Processo – Mestrado 2009/11915-4; auxílio à Pesquisa - FAPESP Processo 2008/58865-9).

Finalmente, agradeço a Deus pela vida que tenho e por me reservar saúde e proteção.

RESUMO

Vasconcelos AR. Efeitos comportamentais e bioquímicos da dieta intermitente na vigência de um estímulo inflamatório no hipocampo de ratos [Mestrado em Farmacologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Hormese é uma resposta adaptativa das células e dos organismos a um estresse moderado, normalmente intermitente, que pode apresentar muitos efeitos benéficos ao sistema biológico. Exemplos incluem a exposição a baixas doses de certos fitoquímicos como curcumina, isotocianatos e resveratrol, o exercício físico e a dieta intermitente. Esta última, quando não causa desnutrição, expõe os organismos a um estresse nutricional moderado, que não apenas estimula as proteínas de estresse, mas também os mecanismos de defesa do organismo, tornando a célula ou o organismo mais resistente a estímulos tóxicos. Em linhas gerais, a dieta intermitente parece atuar em vias associadas à sobrevivência celular e à resposta inflamatória, envolvendo com isso a modulação de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares associados a estes efeitos, assim como o envolvimento da hormese na sinalização de vias importantes associadas a neuroproteção e neurogenese, como a do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) e a sinalização associada a via da WNT, além de sua correlação com a sinalização inflamatória. Este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da dieta intermitente na memória e no aprendizado e nos mecanismos de sinalização associados à proteína WNT, aos fatores de transcrição CREB e NF-κB, e expressão de genes regulados por esses fatores de transcrição no hipocampo de ratos na ausência e na presença de um estímulo inflamatório, representado pela administração intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que a dieta intermitente melhora o desempenho dos animais nos testes comportamentais labirinto de Barnes e esquiva inibitória na presença ou ausência de LPS. Ainda, a dieta intermitente induz um aumento de CREB fosforilado e da sinalização canônica da WNT e promove alterações de diversos marcadores inflamatórios, tais como o aumento da razão interleucina-10 (IL-10) / fator de necrose tumoral (TNF) e a diminuição dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) do receptor Toll-tipo 4 (*Tlr-4*), da oxido nítrico sintase induzida (*Nosi*) e da cicloxigenase 2 (*Cox-2*) desses animais quando comparado ao grupo controle. Em conjunto, os dados sugerem que a dieta intermitente induz um predomínio das vias de sinalização protetoras no sistema nervoso central (SNC) de ratos.

Palavras-chave: Dieta intermitente. Neuroproteção. Inflamação. Hipocampo. Cognição.

ABSTRACT

Vasconcelos AR. Behavioral and biochemical effects of intermittent fasting in the presence or absence of an inflammatory stimulus (LPS) in rat hippocampus [Master in Pharmacology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Hormesis is an adaptive response of cells and organisms to a moderate stress, usually intermittent, which may have many beneficial effects to the biological system. Examples include exposure to low doses of certain phytochemicals such as curcumin, resveratrol and isothiocyanates, exercise and intermittent fasting dietary restriction. The latter, when it does not cause malnutrition, induces a moderate nutritional stress to the organism, which not only stimulates the stress proteins, but also the body's defense mechanisms, making the cell or the organism more resistant to toxic stimuli. In general, intermittent fasting seems to act by mechanisms associated with cell survival and inflammatory response, thereby involving nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) modulation. However, little is known about the molecular mechanisms involved, as well as the involvement of hormesis in signaling pathways important to neurogenesis and neuroprotection, such as the cyclic AMP response element (CREB) and WNT, and its correlation with inflammatory signaling. The present work investigates the effects of intermittent fasting on memory and learning, the signaling mechanisms associated with WNT proteins, CREB and NF-κB transcription factors and gene expression regulated by these transcription factors in rat hippocampus in absence or presence of an inflammatory stimulus, represented by intravenous administration of lipopolysaccharide (LPS). The results showed that intermittent fasting improved performance in Barnes maze and inhibitory avoidance behavioral tests even when treated with LPS. Also, intermittent fasting induced both increase of phosphorylated CREB and canonical WNT signaling pathway, and changes in inflammatory mRNA markers levels, such as, decreasing of toll-like receptor-4 (*Tlr-4*), induced nitric oxide synthase (*iNos*) and cyclooxygenase 2 (*Cox-2*). In addition, intermittent fasting can also increase interleukin (IL)-10/tumor necrosis factor (TNF) ratio levels when compared to control group. Taken together, our results suggest that intermittent fasting dietary restriction induces a prevalence of protective signaling cascades in the central nervous system (CNS).

Key words: Intermittent fasting. Neuroprotection. Inflammation. Hippocampus. Cognition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
βA	beta-amilóide
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CBP	Proteína ligadora de CREB
CREB	Elemento de resposta ao AMPc
DA	Doença de Alzheimer
DAMP	Padrão molecular associado a dano celular
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FZ	Receptor Frizzled
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSP	Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)
IKK	IκB cinase
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEF	Fator intensificador do linfócito
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
NEMO	Modulador essencial do NF-κB
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
RED	Restrição de energia da dieta
RNAm	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
TCF	Célula T específica
Trk	Cinase relacionada a tropomiosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 A restrição de energia da dieta 13
1.2 A dieta intermitente 15
1.3 O fator de transcrição CREB 17
1.4 O fator de transcrição NF-κB 17
1.5 As proteínas da família WNT 19
1.6 Os receptores do tipo Toll – 4 (TLR-4) 19
2 OBJETIVOS 22
3 MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 Animais 23
3.2 Dieta intermitente 23
3.3 Administração de LPS 24
3.4 Teste comportamental: Labirinto de Barnes 26
3.5 Teste comportamental: Esquiva Inibitória 27
3.6 Teste de atividade locomotora: Campo Aberto 27
3.7 Extração de proteínas citosólicas e nucleares 28
3.8 Ensaio de Western Blot 29
3.9 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética para o NF-κB (*gel shift*) 30
3.9.1 Marcação da sonda 30
3.9.2 Reação de Ligação e corrida do gel 30
3.9.3 Ensaio de super-shift do NF-κB 31
3.10 Determinação da concentração de proteínas 31
3.11 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real 31
3.12 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA) 32
3.13 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 34
4.1 Peso dos animais antes e após a dieta intermitente 34
4.2 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS nos testes comportamentais: labirinto de Barnes, esquiva inibitória e campo aberto 35
4.3 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre a via canônica da proteína WNT 39
4.4 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o fator de transcrição CREB 41
4.5 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o fator de transcrição NF-κB 43

4.6 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Cox-2*.... 49
4.7 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Nosi* 50
4.8 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Tlr-4*..... 51
4.9 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre as citocinas TNF e IL-10..... 52
4.10 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre a neurotrofina BDNF..... 54
5 DISCUSSÃO 55
6 CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 71
ANEXOS 92
Anexo A – Sequencia do RNAm do gene *Cox-2* 92
Anexo B – Sequencia do RNAm do gene *Nos2* 93
Anexo C – Sequencia do RNAm do gene *Tlr4* 94
Anexo B – Sequencia do RNAm do gene *Hprt1* 95

1 INTRODUÇÃO

1.1 A restrição de energia da dieta

O termo hormese é definido como um fenômeno dose-resposta bifásico caracterizado por estimulação em baixas doses e inibição em altas doses (1, 2). A hormese é uma resposta de compensação adaptativa do organismo a um estímulo estressor ambiental moderado que os torna mais resistentes frente a uma situação de estresse mais intenso (3). Entende-se por estímulo estressor não apenas a exposição a substâncias tóxicas, mas também qualquer outro estímulo com consequências potencialmente deletérias para o organismo, como, por exemplo, o aumento ou diminuição de temperatura, o exercício físico e a restrição de energia da dieta (RED) (1).

A RED sem desnutrição atrasa o surgimento de várias alterações fisiológicas que ocorrem durante o envelhecimento e promove um aumento da expectativa de vida em animais de várias espécies (4, 5) como roedores (6), peixes (7), drosófilas (8), vermes (9), leveduras (10) e primatas (11), podendo provavelmente ocorrer também em humanos, embora ainda não confirmado.

Além do aumento da expectativa de vida, muitos estudos têm demonstrado diversos efeitos benéficos da RED sobre a saúde. Por exemplo, a RED pode atenuar ou prevenir a incidência de câncer de ocorrência espontânea (12), induzido quimicamente (13) ou por radiação (14). A RED também protege as células do cérebro (15) e do coração (16) em modelos de derrame cerebral e infarto do miocárdio. Além disso, a RED inibe o desenvolvimento de doenças autoimunes em várias linhagens de roedores (17) e atrasa o surgimento e progressão de dermatite alérgica espontânea (18) ou quimicamente induzida (19). Ainda, a RED aumentou a resistência a neurotoxinas em modelos experimentais de doença de Huntington, doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP) (20-22). Corroborando com estas evidências, dados epidemiológicos sugerem que as incidências de DA e DP são menores em países com menor consumo de comida por pessoa (por exemplo, Japão e China) em comparação com países onde esse consumo é maior (por exemplo, Estados Unidos e Canadá) (23) e que indivíduos com baixa ingestão calórica diária parecem ter um risco menor de desenvolver DA e DP (24, 25).

A RED em camundongos atenuou os déficits no aprendizado e memória relacionados à idade (26) e diminuiu os níveis de estresse oxidativo em vários órgãos incluindo o cérebro (27). Em humanos, a RED reduziu a inflamação e o estresse oxidativo em asmáticos (28).

Esses e outros efeitos benéficos e protetores da RED são provavelmente mediados por mecanismos horméticos (29).

Dois mecanismos gerais têm sido propostos para a RED e seus efeitos benéficos; um deles é a diminuição do estresse oxidativo e da produção de radicais livres (30) e o outro é a indução de uma resposta de estresse celular moderada que aumenta a capacidade das células de lidar com situações de estresse mais graves (31).

Além da associação entre a RED e o estresse oxidativo, estudos têm demonstrado outro possível mecanismo da RED, onde se observa uma inibição da resposta inflamatória e da inflamação relacionada à idade (32, 33). A RED modula a atividade e a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF, interleucina (IL)-1β e IL-6 (32, 34, 35). Estudos têm mostrado que o envelhecimento está associado a um aumento da inflamação cerebral (36, 37). Além disso, a inflamação sistêmica pode estar associada a doenças coronarianas, diabetes, esclerose múltipla, DA e DP (38). De fato, estudos recentes demonstram uma forte associação entre neurodegeneração e inflamação (revisão em 39); por exemplo, tem sido observada a presença de processos inflamatórios (ativação de microglia e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias) no SNC de pacientes com DA (40). Da mesma forma, dados tanto epidemiológicos quanto clínicos têm descrito a importância da terapia anti-inflamatória para retardar a progressão da doença, amenizando os sintomas graves da DA (41, 42). Em muitos indivíduos, uma dieta mal adaptada é a maior causa desta inflamação crônica (38, 43).

Várias alterações bioquímicas e moleculares têm sido observadas em animais mantidos em RED que são consistentes com mecanismos de hormese nos efeitos benéficos da restrição. Proteínas de choque térmico protetoras têm sido encontradas em concentrações elevadas em vários tecidos de animais submetidos à RED como, por exemplo, a proteína de choque térmico (HSP)-70 em células do fígado de ratos (44). Em outro estudo, a dieta intermitente aumentou as concentrações desta e de outra proteína de choque térmico, a proteína-78 regulada pela glicose, em sinapses de cérebros de ratos (45). Uma classe de moléculas citoprotetoras estimulada pela RED são as enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e glutationa peroxidase (46). Além disso, cérebros de ratos mantidos em uma dieta de calorias reduzidas exibiram quantidades maiores de vitamina E e coenzima Q10 quando comparados com cérebros de animais com alimentação *ad libitum* (47). Quando roedores ou macacos foram mantidos em RED, concentrações de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) estavam aumentadas em várias regiões do cérebro (48, 49).

Contudo, apesar de uma extensa literatura que demonstra efeitos benéficos da RED na saúde, a RED pode não induzir uma resposta benéfica adaptativa em todas as células. Por exemplo, a concentração de HSP-70 não aumentou em motoneurônios da medula espinhal em modelo de camundongos com esclerose lateral amiotrófica mantidos em RED (50). As células envolvidas na cicatrização de feridas não respondem adaptativamente à RED e, de fato, tem sido demonstrado que a RED pode prejudicar a cicatrização de feridas em roedores (51). Dependendo da magnitude da restrição de energia, a RED pode não ser benéfica ou pode até mesmo causar efeitos adversos em órgãos reprodutores, como infertilidade, irregularidades menstruais, perda de libido, hipertensão, depressão e irritabilidade particularmente nas fêmeas de mamíferos em geral (52, 53). Assim, apesar dos efeitos benéficos da RED listados na literatura, estudos de dose-resposta da RED ainda não foram realizados em muitas células e órgãos, e, portanto, um melhor entendimento dos seus efeitos e mecanismos moleculares é importante para que se possam desenvolver protocolos de RED adequados para a saúde humana. Há poucos estudos sobre os efeitos da RED em humanos, mas informações disponíveis até o momento sugerem que a RED reduz o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e aterosclerose, além de induzir muitas das respostas adaptativas que ocorrem em animais de laboratório em restrição (54, 55). Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos horméticos da RED poderá também trazer novos avanços no tratamento ou até mesmo na prevenção de doenças neurodegenerativas.

1.2 A dieta intermitente

Os efeitos benéficos da RED foram relatados em vários protocolos experimentais diferentes. Em um dos protocolos de RED, a restrição calórica, é feita a restrição das calorias totais consumidas diariamente (12, 56). Uma forma comum de restrição calórica é limitar o consumo diário de alimento, ocorrendo então uma restrição total de nutrientes a longo prazo (57). Assim, a quantidade de comida fornecida ao animal é ajustada diariamente a 60-80% do consumo diário do grupo alimentado *ad libitum* (18).

Outro protocolo muito utilizado de RED é a dieta intermitente, na qual os animais alternam entre dias em que são alimentados *ad libitum* e dias de jejum, quando não têm acesso ao alimento (58). Nesse protocolo ocorre uma restrição na frequência de consumo alimentar, e não na quantidade total de alimento ingerido. Já foi demonstrado que pequenos períodos de jejum são efetivos para a proteção contra os estímulos estressores ambientais. Por exemplo,

camundongos mantidos por 2 dias apenas com água apresentam uma maior resistência contra estresse oxidativo (59) e alergia quimicamente induzida (60).

A dieta intermitente promove efeitos benéficos semelhantes ao da restrição calórica; ambos os protocolos diminuem os riscos de doenças cardiovasculares, aumentam a expectativa de vida e diminuem a produção de radicais livres, além de melhorarem a atividade dos mecanismos protetores (61, 62). Além disso, o aumento da resistência ao estresse oxidativo durante a dieta intermitente pode contribuir para os efeitos beneficiais desse protocolo (63).

Nossos ancestrais consumiam alimentos com frequência muito menor do que hoje em dia, por vezes passando diversos dias sem acesso ao alimento, o que indica que eles eram adaptados à dieta intermitente (64). Apesar da falta de evidências científicas, profissionais da saúde costumam dizer que é mais saudável o consumo de pequenas refeições com maior frequência do que o consumo de grandes refeições com menor frequência (64). No entanto, há um estudo que aponta que a frequência de alimentação e os períodos de jejum não exercem maiores impactos sobre o consumo calórico de pessoas obesas (65).

O jejum é obrigatório para todos os muçulmanos adultos saudáveis durante o mês do Ramadan. A dieta do Ramadan é considerada intermitente, já que o consumo de água e comida só é permitido do pôr ao nascer do Sol, intercalando com períodos de jejum (66). Durante esse mês, são observados uma perda de massa corpórea dos indivíduos, além do aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e redução dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e apoproteína A1 (67), alterações essas que são consideradas protetoras para o sistema cardiovascular (68, 69). Os efeitos da dieta intermitente também foram relatados em um estudo com indivíduos não obesos que se mantiveram em jejum de meia noite à meia noite sucessiva em dias alternos por 22 dias. Como resultado, os indivíduos em dieta intermitente tiveram perda de 2,5% do peso inicial total e 4,1% da massa gorda inicial (70). Entretanto, estudos mais detalhados e a longo prazo são necessários para avaliar os efeitos benéficos deste tipo de dieta em humanos.

De maneira geral, pode-se dizer que a dieta intermitente promove diversos efeitos benéficos ao organismo, mesmo se o período de jejum for seguido por um período de acesso livre ao alimento de forma que o consumo total calórico não seja alterado. De qualquer modo, tanto o protocolo de restrição da quantidade (restrição calórica) quanto da frequência de alimentação (dieta intermitente) protegem contra várias doenças, provavelmente por mecanismos horméticos que aumentam a resistência celular contra estímulos estressores (29).

1.3 O fator de transcrição CREB

O CREB é um fator de transcrição nuclear constitutivamente expresso que regula a transcrição de genes envolvidos no funcionamento e na sobrevivência neuronais (71-73). Este fator de transcrição, quando ativado, é fosforilado no sítio de serina 133 em resposta a múltiplas vias de sinalização (74, 75). A forma fosforilada de CREB se liga a coativadores, proteína ligadora de CREB (CBP) e p300 resultando na facilitação da expressão dos seus genes alvos (76).

Estudos em várias espécies mostraram que para a formação da memória de longa duração é essencial que ocorra a ativação do fator de transcrição CREB e a indução da transcrição de genes dependentes de CREB, como *c-fos* e *Bdnf* (revisão em 77, 78). Muitos estudos em roedores demonstraram que a consolidação da memória espacial aumenta os níveis de CREB fosforilado no hipocampo dorsal (79-85). Do mesmo modo, a expressão gênica mediada por CREB é aumentada no hipocampo durante a potenciação de longa duração (LTP) (86). São observados deficiências na memória espacial de ratos após infusão intra-hipocampal de oligonucleotídeos antisense de CREB (87). Além disso, estudos mostraram alterações na fosforilação de CREB na região CA1 do hipocampo correlacionadas com o dano da memória espacial que ocorre durante o envelhecimento (83).

Apesar da importância da fosforilação do CREB ser bem documentada para a formação de memória de longa duração e da existência de estudos que correlacionam a RED com melhora cognitiva, pouco se sabe sobre os efeitos da dieta intermitente sobre a modulação do CREB.

1.4 O fator de transcrição NF-κB

O fator de transcrição NF-κB é um heterodímero constituído de combinações de diferentes subunidades. Na literatura, o termo NF-κB inicialmente foi usado para designar a combinação p50/RelA (p65). Além dessas, outras subunidades foram posteriormente descritas, tais como a cRel, RelB e p52, mostrando que diferentes tipos de combinações são capazes de ativar diferentes genes. As subunidades p50 e p52 formam dímeros inibitórios da transcrição, se ligando a regiões promotoras sem exercer atividade e bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo que possuem a subunidade RelA ou RelB (88).

O NF-κB é encontrado em uma variedade de tipos celulares incluindo neurônios e microglia (89) e sua ativação pode ser induzida por substâncias secretadas por células da glia e neurônios ativados durante a resposta imune (90) e por agentes como o peptídeo beta-amilóide (βA) (91, 92), cocaína (93) e LPS (94, 95).

Nas células não estimuladas, os dímeros de NF-κB são mantidos em um estado inativo no citoplasma pela associação às proteínas inibitórias da famílias IκB (96). A ativação do NF-κB é controlada pelo complexo da IκB cinase (IKK) que consiste em duas subunidades catalíticas (IKKα e IKKβ) (97-100) e a subunidade regulatória NEMO (modulador essencial do NF-κB, também conhecida como IKKγ) (101, 102). Após a estimulação celular, o complexo IKK fosforila duas serinas N-terminais específicas das proteínas IκB resultando em sua poliubiquitinação e degradação pelo proteossoma 26S, permitindo que o NF-κB migre para o núcleo e module a transcrição de genes alvos tais como *Nosi*, *Cox-2*, *Il-1β*, *Tnf*, *IκBα*, além de genes relacionados à neuroproteção como o *Bdnf* (103).

As neurotrofinas controlam a sobrevivência celular, diferenciação e sinaptogênese, além de exercerem importantes funções na plasticidade sináptica no SNC. As respostas fisiológicas das neurotrofinas são mediadas pela ativação de duas classes distintas de receptores transmembrana, os receptores da família da cinase relacionada a tropomiosina (Trk) e a $p75^{NTR}$ (revisão em 104, 105). Os efeitos do BDNF dependem de sua ligação ao receptor TrkB e subsequente ativação de tirosinas cinases presentes no citoplasma. Dessa forma, essa neurotrofina exerce uma importante função na proteção neuronal, podendo proteger os neurônios de danos oxidativos resultantes de vários tipos de injúrias (106).

A grande relevância do NF-κB decorre da enorme quantidade de genes implicados em vários processos celulares que são regulados por esse fator de transcrição. Uma vez que a regulação da expressão destes genes tem consequências notáveis para o funcionamento cerebral, o NF-κB é também reconhecido como um importante modulador dos processos de desenvolvimento, de plasticidade, neurodegenerativos e inflamatórios (88, 107-109).

Em linhas gerais, a RED parece atuar, dentre outras, em vias associadas à modulação de fatores de transcrição como o NF-κB. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares da RED envolvendo a via de sinalização deste fator de transcrição.

1.5 As proteínas da família WNT

WNTs são glicoproteínas secretadas que se ligam aos receptores Frizzled (FZ), que são, por sua vez, proteínas transmembranas (110). O complexo WNT-FZ ativa uma proteína citoplasmática denominada Dishevelled (DVL) (111).

Após a ativação da DVL, pode ocorrer a ativação de diferentes cascatas de sinalização que podem ser amplamente divididas em duas categorias: a via canônica dependente de β-CATENINA e a via não-canônica independente de β-CATENINA (112). Na via canônica, na ausência de WNT a GSK-3β é ativa e fosforila a β-CATENINA, promovendo a sua degradação por proteassomas; por outro lado, na presença da WNT, a atividade da GSK-3β é inibida possibilitando o acúmulo e translocação de β-CATENINA para o núcleo celular para formar o complexo fator de transcrição β-CATENINA-célula T específica (TCF) e fator intensificador (*enhancer*) do linfócito (LEF) que por sua vez, ativa a transcrição de genes alvos (revisão em 113).

Em doenças neurodegenerativas, tumores e em processos inflamatórios tem havido muitas evidências com relação a efeitos benéficos/maléficos mediados pela sinalização WNT (114). Alterações na sinalização da via canônica da WNT têm sido associadas à formação de tumores, doenças degenerativas e inflamação. No entanto, os mecanismos moleculares ainda são pouco conhecidos. Em drosófila (115) observou-se que a expressão de WNT-5a pode ser modulada pelo NF-κB, e uma vez expressa, a WNT-5a, através da interação com o receptor FZ, pode levar à ativação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1β e IL-8. Recentemente, foi demonstrado em macrófagos humanos um aumento nos níveis de WNT-5a em pacientes com sepse (116).

Atualmente já são bem estabelecidos que as proteínas da família WNT são importantes mediadores da comunicação intercelular e que a sinalização mediada por estas proteínas é crucial para o desenvolvimento embrionário de vários sistemas, inclusive o SNC, regulando o desenvolvimento de circuitos neuronais e plasticidade neuronal no animal adulto (117-120).

1.6 Os receptores do tipo Toll - 4 (TLR-4)

O TLR-4 é um receptor que pertence à família de receptores TLRs de proteínas de superfície celular. Esses receptores são importantes mediadores da imunidade inata, respondendo a diversos produtos microbiais e ligantes endógenos induzidos por dano tecidual

(121). Além disso, são bastante homólogos à proteína Toll da drosófila (122, 123), onde inicialmente foram descobertos dando origem a seu nome, e à família do receptor de IL-1 no homem (124).

Os TLRs estão presentes em diversas células do sistema imune de mamíferos, incluindo células B (125), mastócitos (126), células NK (127), células T reguladoras (128), macrófagos, monócitos, células dendríticas (129), neutrófilos (130) e basófilos (131), além de estarem presentes em células não imunes como células epiteliais (131) e endoteliais (132). Do mesmo modo, os TLRs podem ainda ser encontrados no SNC, onde, até recentemente, se acreditava que sua expressão se limitava somente a microglia (133), astrócitos (134) e oligodendrócitos (135). Entretanto, hoje já se sabe que neurônios, assim como células tronco neuronais, também expressam TLRs (136).

Atualmente são conhecidos 11 tipos de TLRs em humanos e 13 tipos em camundongos, todos eles apresentando pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõe as proteínas que os formam (137). Devido a essas diferenças, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) presentes em diversos microorganismos patogênicos, como, por exemplo, o LPS, lipoproteínas, flagelina, peptideoglicanos, DNA, RNA, entre outros (138, 139). Cada receptor reconhece classes específicas de patógenos; por exemplo, o TLR-4 reconhece predominantemente o LPS de bactérias gram-negativas (140).

Além dos PAMPs que ativam diferentes TLRs, já foram também identificados ligantes endógenos de padrão molecular associado a dano celular (DAMPs), e outros produtos da inflamação tecidual. Vários ligantes endógenos já foram escritos, como o ácido hialurônico de baixo peso molecular, fibrinogênio, β-defensinas e HSPs (141, 142). É importante ressaltar que as sinalizações resultantes da ativação de TLRs por PAMPs e DAMPs parecem ser diferentes, o que pode ser devido à necessidade de diferenciar entre a ativação de TLR induzida por patógenos que requer uma intervenção imune e a ativação de TLRs por dano tecidual que requer um balanço entre a intervenção imune e o reparo do dano no tecido (143-145).

Quando ativado, o TLR-4 inicia cascatas de sinalização que envolvem a ativação de fatores de transcrição como o NF-κB ou AP-1, por exemplo; ambos ativam genes de citocinas inflamatórias, como TNF e IL-1β, além de genes associados a processos de proliferação celular e apoptose (146).

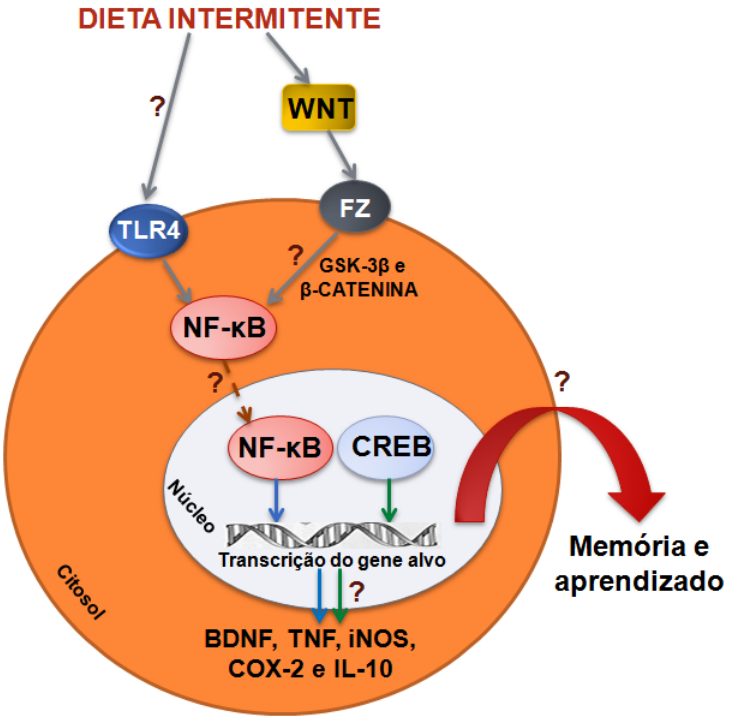
O TLR-4 é classicamente estudado em relação à imunidade; porém, atualmente vários estudos têm mostrado um importante papel fisiológico desse receptor decorrente de sua

ativação endógena, como o envolvimento na neurogênese (147), no estresse oxidativo (revisão em 148) e no desenvolvimento de desordens metabólicas como a obesidade (149-157).

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta intermitente na memória e no aprendizado e nos mecanismos de sinalização associados à proteína WNT, aos fatores de transcrição CREB e NF-κB, e expressão de genes regulados por esses fatores de transcrição no hipocampo de ratos na ausência e na presença de um estímulo inflamatório, representado pela administração intravenosa de LPS. Foram avaliados:

1) A sinalização canônica da WNT através da expressão protéica, por western blot, de β-CATENINA e GSK-3β total e fosforilado;
2) O fator de transcrição NF-κB através da expressão protéica de RelA nuclear por western blot e realização do ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (*gel shift*) para o NF-κB.
3) O fator de transcrição CREB através da expressão protéica, por western blot, de CREB nuclear total e fosforilado;
4) O processo cognitivo (aprendizagem e memória), através dos testes do labirinto de Barnes e esquiva inibitória;
5) BDNF e as citocinas inflamatórias IL-10 e TNF pelo método de ELISA e
6) A expressão gênica de *Nosi*, *Cox-2* e *Tlr-4* por RT-PCR em tempo real.



Esquema 1. Representação esquemática dos objetivos do estudo dos efeitos comportamentais e bioquímicos da dieta intermitente na vigência de um estímulo inflamatório no hipocampo de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). O protocolo experimental está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob nº 89 nas fls. 60 do livro 02.

Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de farmacologia – ICB, USP/SP com aproximadamente 2 meses de idade. Em nosso biotério os animais foram mantidos em grupos de 5 em gaiolas plásticas, por aproximadamente 1 mês antes do início dos experimentos. A temperatura ambiente foi mantida constante (22 ± 2 ºC). Os animais foram mantidos sob um ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 7 – 19 h).

Durante o período que os animais estiveram em nosso biotério foi mantido o fornecimento de água e ração *ad libitum* antes do início da dieta intermitente.

3.2 Dieta intermitente

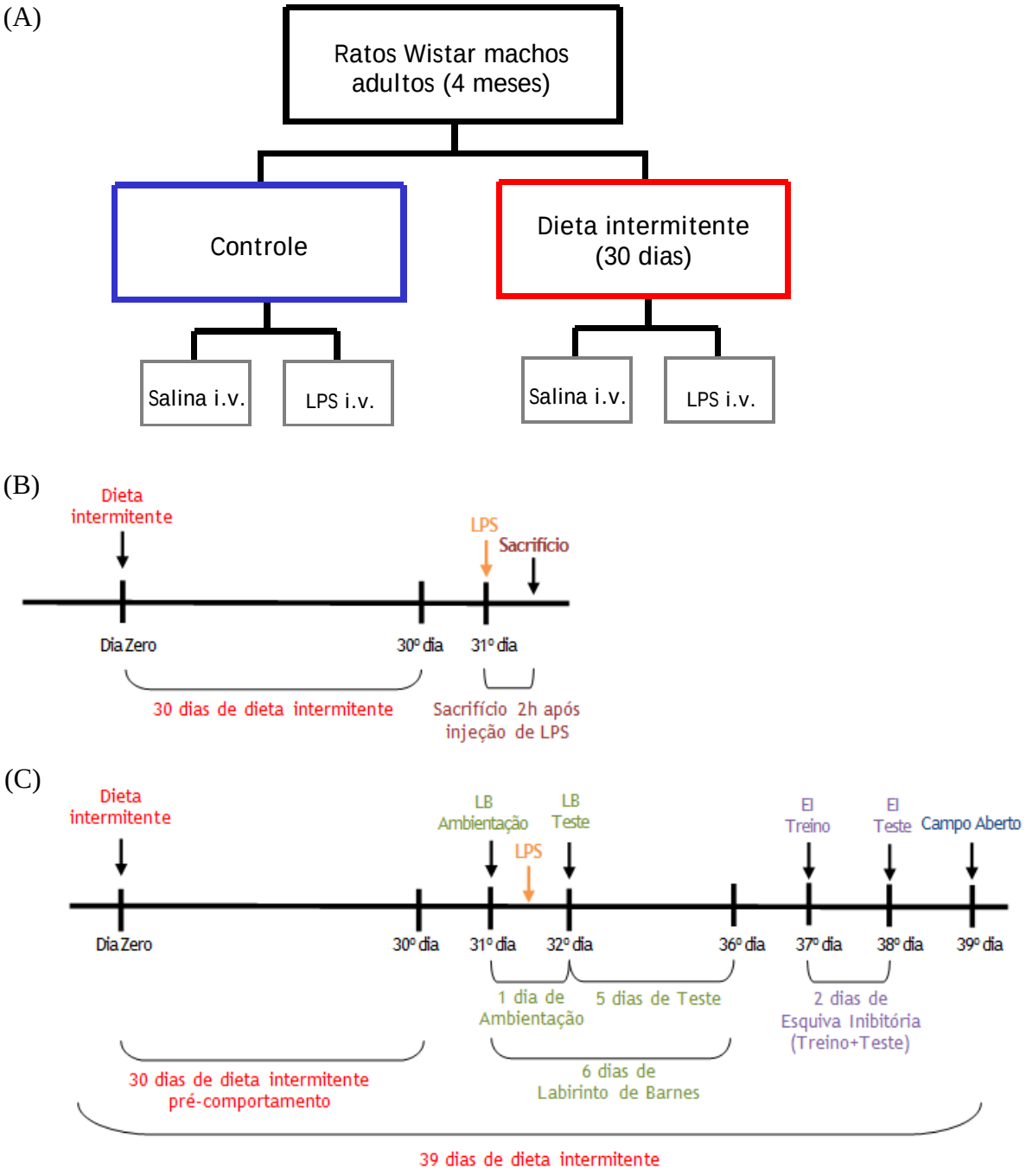
Os animais foram divididos em 4 grupos, com 5 animais cada um, por experimento: 5 ratos controle+salina; 5 ratos controle+LPS; 5 ratos dieta+salina e 5 ratos dieta+LPS (Esquema 2A). O protocolo de RED empregado foi a dieta intermitente, ou seja, 1 dia com ração, no dia seguinte sem ração, no outro com, e assim sucessivamente, por um período de 30 dias com água *ad libitum*, de acordo com Mattson e Wan (2005) (61). A dieta começou quando os animais completaram 3 meses e durou até completarem 4 meses. No dia que antecedia o sacrifício os ratos ficavam com ração. Portanto, a injeção de LPS realizada no dia seguinte foi após os animais terem tido 24 horas contato com a ração para retirar qualquer efeito do jejum agudo. O grupo controle recebeu ração e água *ad libitum* durante todo o experimento (Esquema 2).

3.3 Administração de LPS

Ao término dos 30 dias do protocolo de dieta intermitente, vinte e quatro horas após a última exposição à comida, os animais receberam uma administração intravenosa de salina estéril livre de pirógenos, ou de LPS (Escherichia Coli O111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em salina correspondendo a uma dose de 1 mg/kg (Esquema 2B). Todas as administrações foram feitas pela manhã, entre 9 h e 10 h.

Nos ensaios bioquímicos (Esquema 2B), decorridos 120 minutos após a administração de LPS (158), os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi rapidamente coletado em tubos de centrifugação tipo falcon de 50 mL. Estes foram centrifugados a 3.000 x g por 10 minutos e o soro foi coletado e estocado à -80 °C até o dia dos ensaios. Ainda, o cérebro foi rapidamente retirado em solução fria de tampão salina-fosfato. A estrutura cerebral hipocampo foi dissecada sobre uma placa gelada, imersa em nitrogênio líquido durante a coleta e posteriormente estocada a –80 ^{o}C até o dia dos ensaios.

Nos ensaios comportamentais (Esquema 2C), os ratos receberam injeção intravenosa de salina ou LPS (1mg/kg) no primeiro dia após o término da ambientação no labirinto de Barnes, sendo nos 5 dias subsequentes submetidos aos testes do labirinto de Barnes e nos dias seguintes do término deste, submetidos sucessivamente ao treino e teste da esquiva inibitória e ao campo aberto.



Esquema 2. *Representação esquemática do delineamento experimental.* (A) Ratos machos adultos foram divididos em 4 grupos: Controle com injeção i.v. de salina, controle com injeção i.v. de LPS (1mg/kg), submetidos à dieta intermitente com injeção i.v. de salina e submetidos à dieta intermitente com injeção i.v. de LPS. Em B e C, consideramos o dia zero aquele em que se iniciou a dieta. (B) Para os experimentos bioquímicos, os animais foram submetidos ao protocolo de dieta intermitente por 30 dias e no 31º dia foram tratados com salina ou LPS e sacrificados após 2 horas. (C) Para os experimentos comportamentais, após 30 dias do início da dieta intermitente, os animais foram ambientados no labirinto de Barnes (LB) no 31º dia e passaram por 5 dias de teste no LB até o 36º dia. Nos dias consecutivos, foram submetidos ao treino da esquiva inibitória (EI), ao teste da EI e por último ao teste do campo aberto, no 37º, 38º e 39º dia respectivamente.

3.4 Teste comportamental: Labirinto de Barnes

A memória espacial foi avaliada utilizando-se o teste do labirinto de Barnes, de acordo com Babovic et al. (2008) (159) e Gortz et al. (2008) (160) (Figura 1). O equipamento foi posicionado a um metro do chão e era constituído por uma prancha branca de 1 metro de diâmetro, com 16 orifícios (9,5 cm de diâmetro cada), dispostos radialmente. Ao redor de todo o perímetro da prancha foi colocada uma parede escura com quatro figuras amarelas para orientação espacial dos animais e, sobre o centro da arena, foi colocada uma lâmpada fluorescente de 21 W. Sob um dos 16 orifícios foi colocada uma caixa escura, usada como escape para o animal. No dia da ambientação, cada rato foi colocado no centro da prancha iluminada, dentro de uma câmara de acrílico, por 1 minuto. Após esse tempo, o animal foi liberado e o tempo para que ele encontrasse a caixa de escape foi registrado. O tempo máximo permitido para exploração do ambiente foi de 5 minutos. Se o animal não encontrasse a caixa, era gentilmente encaminhado a ela pelo experimentador. Uma vez na caixa, o animal era deixado por um minuto.

Nos cinco dias consecutivos (testes), cada rato foi colocado por um minuto na câmara de acrílico e, em seguida, liberado para exploração do ambiente até encontrar a caixa escura, ou por um máximo de 5 minutos. O teste foi feito 2 vezes no mesmo dia, uma vez de manhã e uma a tarde.

O local da caixa de escape foi o mesmo para cada rato, porém, a cada animal, esse local foi alterado e o labirinto foi limpo utilizando-se uma solução de álcool a 5%.

Os ratos receberam injeção intravenosa de salina ou LPS (1 mg/kg) no primeiro dia, após o término da ambientação (Esquema 2C).

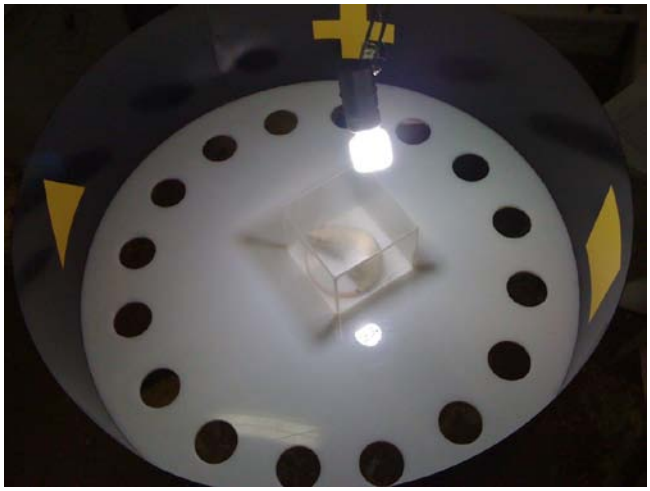


Figura 1. Labirinto de Barnes

3.5 Teste comportamental: Esquiva Inibitória

Para avaliação da memória gerada por estímulo aversivo utilizou-se o teste da esquiva inibitória (Figura 2).

O equipamento de esquiva inibitória (Ugo Basile, Comerio, VA, Itália) consiste de uma gaiola dividida em dois compartimentos iguais, sendo um iluminado e outro escuro, separados por uma porta-guilhotina. Os animais foram colocados individualmente na parte iluminada da gaiola e foi medida a latência, em segundos, para que os mesmos passassem para o compartimento escuro. Estando no lado escuro, o animal recebeu um choque de 0,5 mA por 2 segundos, deflagrado pelas barras metálicas localizadas no chão desse compartimento. A latência máxima permitida para cada animal foi de 300 segundos.

Foi realizado um treino e um teste para avaliação da memória de longa duração (24 horas após o treino). O treino foi realizado no dia seguinte ao último dia do teste do labirinto de Barnes (Esquema 2C).

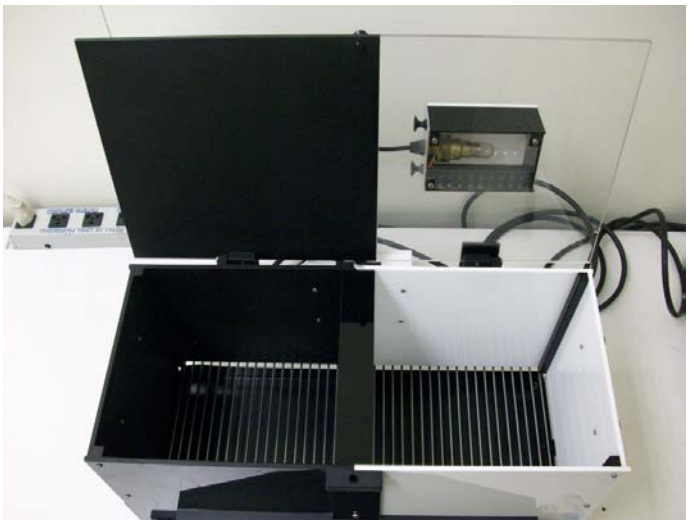


Figura 2. Esquiva inibitória.

3.6 Teste de atividade locomotora: Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea dos animais foi medida no aparelho actômetro (Ugo Basile) (Figura 3). Esse equipamento consiste de uma caixa de acrílico transparente (35 cm x 23 cm x 20 cm) contendo um conjunto de sensores horizontais que registram a atividade locomotora, e outro conjunto de sensores verticais que registram a exploração vertical (*rearing*). Cada animal foi colocado individualmente no centro da caixa e a atividade

motora foi registrada, imediatamente, durante o período de 5 minutos. Entre cada animal, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool 5%, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo rato anterior.

Figura 3. Actômetro utilizado para o teste de campo aberto.

3.7 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

O método utilizado foi descrito em Rong e Baudry (1996) (161). As estruturas (aproximadamente 100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em homogeneizadores vidro-vidro com tampão fosfato-salina (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,27 mM; Na_2HPO_4 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases e fosfatase (PMSF 0,5 M; leupeptina 2,5 μg/mL; antipaína 2 μg/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e EDTA 0,1 mM. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 30 segundos à 4 ^{0}C. O sobrenadante foi reservado para os ensaios de western blot e de ELISA (para BDNF, TNF e IL-10). O *pellet* foi ressuspendido em 400 μL de tampão de lise (HEPES 10 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μg/mL; antipaína 2 μg/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado em gelo durante 10 minutos. Foi adicionado em seguida 10 μL de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 12.000 x g por 30 segundos a 4 ^{0}C, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 100 μL de tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; $MgCl_2$ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μg/mL; antipaína 2 μg/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado 20 minutos em gelo, centrifugando-se o extrato a 12.000 x g por 20

minutos a 4 ^{0}C. O sobrenadante, correspondente ao extrato nuclear, foi recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando as amostras a –80 ^{0}C para posterior preparação de amostras de western blot e *gel shift*.

3.8 Ensaio de Western Blot

As amostras para o ensaio de western blot serão preparadas como descrito no item anterior (3.7). O ensaio de western blot usado é baseado no descrito por Laemmli (1970) (162). As proteínas foram ajustadas na quantidade de 10 µg com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromophenol blue; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 ^{o}C. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida [37,5:1], 1% SDS) para que haja a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS. O gel foi corrido por volta de 2 horas a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 2 horas a 80 V. Para a transferência foi usado um tampão contendo 25 mM de tris-base; 192 mM de glicina; 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada), lavadas com água bidestilada até retirar todo o excesso da solução corante e deixadas durante a noite (*overnight*) a 4 ^{o}C numa solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água), 1% de BSA e 0,1% de Tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (1:1.000) diluído em TBS-T durante a noite (*overnight*) a 4 °C. Os anticorpos primários utilizados foram anti-RelA (sc-372, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-CREB (sc-58, Santa Cruz), anti-pCREB (sc-7978, Santa Cruz), anti-β-CATENINA (MAB2081, Millipore, Temecula, CA, EUA), anti-GSK-3β (AB9258, Millipore), anti-pGSK-3α/β (9331L, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) e anti-β-ACTINA (SC-1616, Santa Cruz) como controle endógeno. As membranas foram então lavadas 5 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (1:2.000) por 2 horas. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-camundongo 1:5.000

(Sigma-Aldrich) ou anti-coelho 1:10.000 (Sigma-Aldrich). A revelação foi feita através de kit de quimioluminescência ECL Immobilon (Millipore).

3.9 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (*gel shift*) para o NF-κB

3.9.1 Marcação da sonda

Os oligonucleotídeos do NF-κB contendo a sequência 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C – 3' foram marcados com a adição de γ-^{32}P adenosina trifosfato (ATP) numa solução contendo Tampão T_4 cinase (Tris-HCl 700 mM, pH 7,6; $MgCl_2$ 100 mM e DTT 50 mM), T_4 cinase e água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/µL de T_4 cinase, 1 µL de γ-^{32}P ATP (3Ci/mmol), 1 µL de tampão T_4 Kinase Buffer (10 X) em 10 µL de volume de reação). Após incubação à 37 ^{o}C por 10 minutos, o excesso de γ-^{32}P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) em um tubo de microcentrífuga, centrifugando-se por 1 minuto a 735 x g. A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação, o eluato foi recolhido e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 30.000 cpm/µL.

3.9.2 Reação de Ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 µL de tampão de ligação 5x ($MgCl_2$ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 µg/µL; glicerol 20%), extrato nuclear (10 µg de proteína) e H_2O q.s.p. para 20 µL de volume final. O tubo foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 µL), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 µL de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% (acrilamida/bisacrilamida [37,5:1]). Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 x TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel foi corrido por volta de 2 horas a 160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do gel ao filme em cassete a –80 ^{o}C. Além dos ensaios de *gel shift*, foi realizado também o ensaio de competição adicionando-se quantidades

de oligonucleotídeo não-marcado 5, 10 e 20 vezes em excesso e um oligonucleotídeo não-específico (TFIID) não-marcado 20 vezes em excesso para o NF-κB.

3.9.3 Ensaio de super-shift do NF-κB

O protocolo é idêntico ao descrito no item acima, adicionando-se anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF-κB durante a incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo contendo a sequência específica para o NF-κB. Foram utilizados anticorpos (1 μL) contra as subunidades: p50, RelA e cRel (Millipore).

3.10 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem foi realizada através do método de Bradford (1976) (163) utilizando reagente da Bio-Rad e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.11 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real

O RNA total do tecido foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 3 μg foram tratados com DNAse I e submetidos à transcrição reversa utilizando oligo$(dT)_{20}$ e a transcriptase reversa MMLV de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen).

Os transcritos foram amplificados utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Cox-2*, *Nosi*, *Tlr-4* e *Hprt* como controle endógeno. Como controle negativo, reações foram realizadas na ausência de cDNA. Cada reação foi realizada em triplicata contendo 3 μL de cDNA diluído 10 vezes, 6 μL de Power SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA) e 300 nM de oligonucleotídeos iniciadores. A condição da reação foi: 95 °C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 10 segundos e 72 °C por 30 segundos. Uma análise de curva de *melting* de 76 °C a 84 °C foi realizada no final de cada reação para controle de qualidade. O *cycle threshold* (Ct) e a eficiência dos pares de oligonucleotídeos iniciadores foram estabelecidos automaticamente de acordo com algoritmos do sistema do termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System

(Applied Biosystems). A expressão gênica relativa foi determinada utilizando o teste de randomização e recolocação *Pair Wise* P(H1) (164) realizado no programa REST 2009. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão indicadas na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de RT-PCR em tempo real, para amplificação da região codificadora de *Cox-2*, *Nosi*, *Tlr-4* e do controle endógeno *Hprt*.

Cox-2 (Anexo A)	*Direto*	5'ACATTCCCTTCCTTCGGAAT 3'
	Reverso	5'AAGGGCCCTGGTGTAGTAGG 3'
Nosi (Anexo B)	*Direto*	5'AAAATGGTTTCCCCCAGTTC 3'
	Reverso	5'GTCGATGGAGTCACATGCAG 3'
Tlr-4 (Anexo C)	*Direto*	5'GGATGATGCCTCTCTTGCAT 3'
	Reverso	5'TGATCCATGCATTGGTAGGTAA 3'
Hprt (Anexo D)	*Direto*	5'CTCATGGACTGATTATGGACAG 3'
	Reverso	5'GCAGGTCAGCAAAGAACTTATA 3'

3.12 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA)

As concentrações de BDNF, TNF e IL-10 foram medidas em amostras de hipocampo e soro sanguíneo por meio do ensaio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada proteína analisada. As placas foram incubadas por 18 horas a 4 °C, e lavadas com PBST (0,05% Tween 20 em PBS). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de gelatina a 3% em PBST a 37 °C x 3 h. Logo depois, as placas foram lavadas com PBST e 100 µL das amostras ou dos padrões de BDNF ou das citocinas recombinantes foram adicionados. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4 °C. Após lavagem, 100 µL dos respectivos anticorpos biotinilados específicos para cada proteína analisada foram acrescentados por 1 h a temperatura ambiente. Após a lavagem das placas, 100 µL de estreptavidina-peroxidase foram adicionados por 30 minutos. As reações foram reveladas pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0,2 M por poço. A leitura da

reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com o BDNF ou citocinas recombinantes.

3.13 Análise estatística

Os dados decorrentes do ensaio de *gel shift* e de western blot foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa *ImageJ* (National Institute of Health, EUA). Estes dados receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*.

Os dados decorrentes dos ensaios de ELISA receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*.

Os dados obtidos no ensaio de RT-PCR em tempo real foram analisados pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise* P(H1) (164) realizado no programa *REST 2009* (Qiagen, Duesseldorf, ALE).

Os dados adquiridos no teste comportamental do labirinto de Barnes receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de duas vias (tratamento X tempo) com medidas repetidas (dias de teste) seguido pelo pós-teste de *Bonferroni* para comparações múltiplas.

Os dados dos experimentos realizados em esquiva inibitória e campo aberto foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns* para dados não-paramétricos.

Todos os gráficos estão representados como a média dos valores ± o erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Com exceção dos resultados obtidos por RT-PCR em tempo real, os outros dados foram analisados utilizando o programa *Prism* versão 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Peso dos animais antes e após a dieta intermitente

Primeiramente, avaliamos as alterações de peso dos animais submetidos à dieta intermitente (dias alternos com e sem ração e água *ad libitum*) em relação ao grupo controle. Os animais do grupo controle e submetidos à dieta intermitente foram pesados antes e após o tratamento e observamos que ratos em dieta intermitente tiveram aumento de massa corpórea após os 30 dias de dieta (Δ = 26,1 ± 3,0 g), porém esse aumento foi menor que o do grupo controle (Δ = 57,1 ± 3,0 g) (Figura 4).

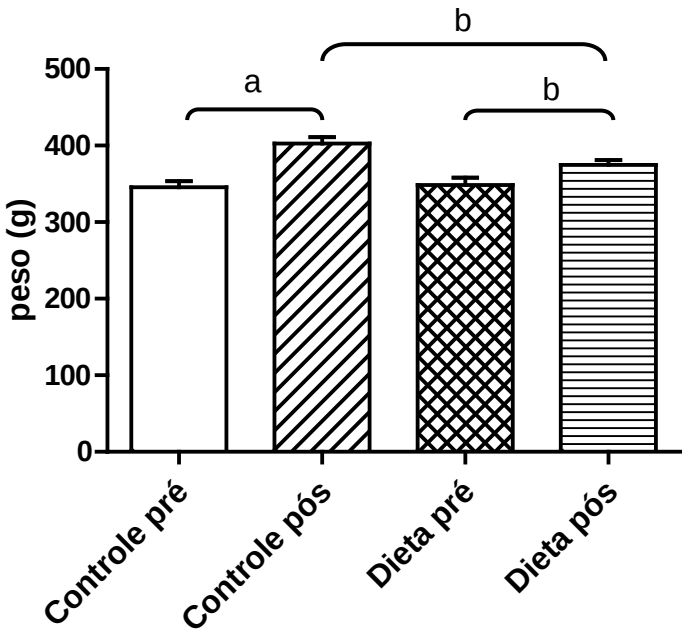


Figura 4. *Peso dos grupos de animais antes e após a dieta.* Os dados representam as médias de massa corpórea dos grupos ± E.P.M., n=15. (a) p<0,001; (b) p<0,05. (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

4.2 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS nos testes comportamentais: labirinto de Barnes, esquiva inibitória e campo aberto

Avaliamos a influência da dieta intermitente na ausência e presença de LPS no desempenho no labirinto de Barnes. No teste comportamental do labirinto de Barnes a aprendizagem espacial é refletida numa redução da latência de escape ao longo dos dias de teste. Todos os grupos aprenderam a localizar o orifício de escape durante o decurso dos 5 dias de teste, como pode ser constatado pela significância do efeito do tempo pelo teste ANOVA de duas vias e pelos gráficos (Figura 5) observando-se redução da latência de escape com o passar dos dias.

Quando comparamos o grupo dieta com o grupo controle, o teste de variância ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo da dieta [$F(1,77) = 6,635$; $p = 0,0196$] e do tempo [$F(4,77) = 14,64$; $p < 0,0001$], mas não houve interação tratamento X tempo [$F(4,77) = 0,3569$, $p = 0,8384$] estatisticamente significativa (Figura 5A).

A comparação do grupo tratado com LPS com o grupo controle pelo mesmo teste mostrou um efeito significativo do tempo [$F(4,81) = 9,355$; $p < 0,0001$], porém não houve efeito do tratamento [$F(1,81) = 0,3942$; $p = 0,5380$] e nem interação tratamento X tempo [$F(4,81) = 0,9350$; $p = 0,4487$] estatisticamente significativa (Figura 5B).

O teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas não mostrou um efeito significativo do tratamento entre os grupos dieta sem LPS e dieta tratado com LPS [$F(1,77) = 0,01194$; $p = 0,9143$] e nem interação tratamento X tempo [$F(1,77) = 0,4127$; $p = 0,7989$], apesar de mostrar um efeito significativo do tempo [$F(1,77) = 27,16$; $p < 0,0001$] (Figura 5C).

A comparação do grupo dieta tratado com LPS com o controle pelo mesmo teste mostrou um efeito significativo do tratamento [$F(1,81) = 7,677$; $p = 0,0126$] e do tempo [$F(4,81) = 14,64$; $p < 0,0001$] entre os grupos, apesar de não ter ocorrido interação tratamento X tempo [$F(4,81) = 0,7364$; $p = 0,5702$] estatisticamente significativa (Figura 5D).

Por fim, quando comparamos o grupo submetido à dieta tratado com LPS com o grupo tratado com LPS, o teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento [$F(1,81) = 7,090$; $p = 0,0159$] e tempo [$F(4,81) = 9,635$; $p < 0,0001$]. No entanto, não houve interação tratamento X tempo [$F(4,81) = 1,435$; $p = 0,2312$] estatisticamente significativa (Figura 5E).

O pós-teste de *Bonferroni* não revelou diferenças significativas entre os grupos.

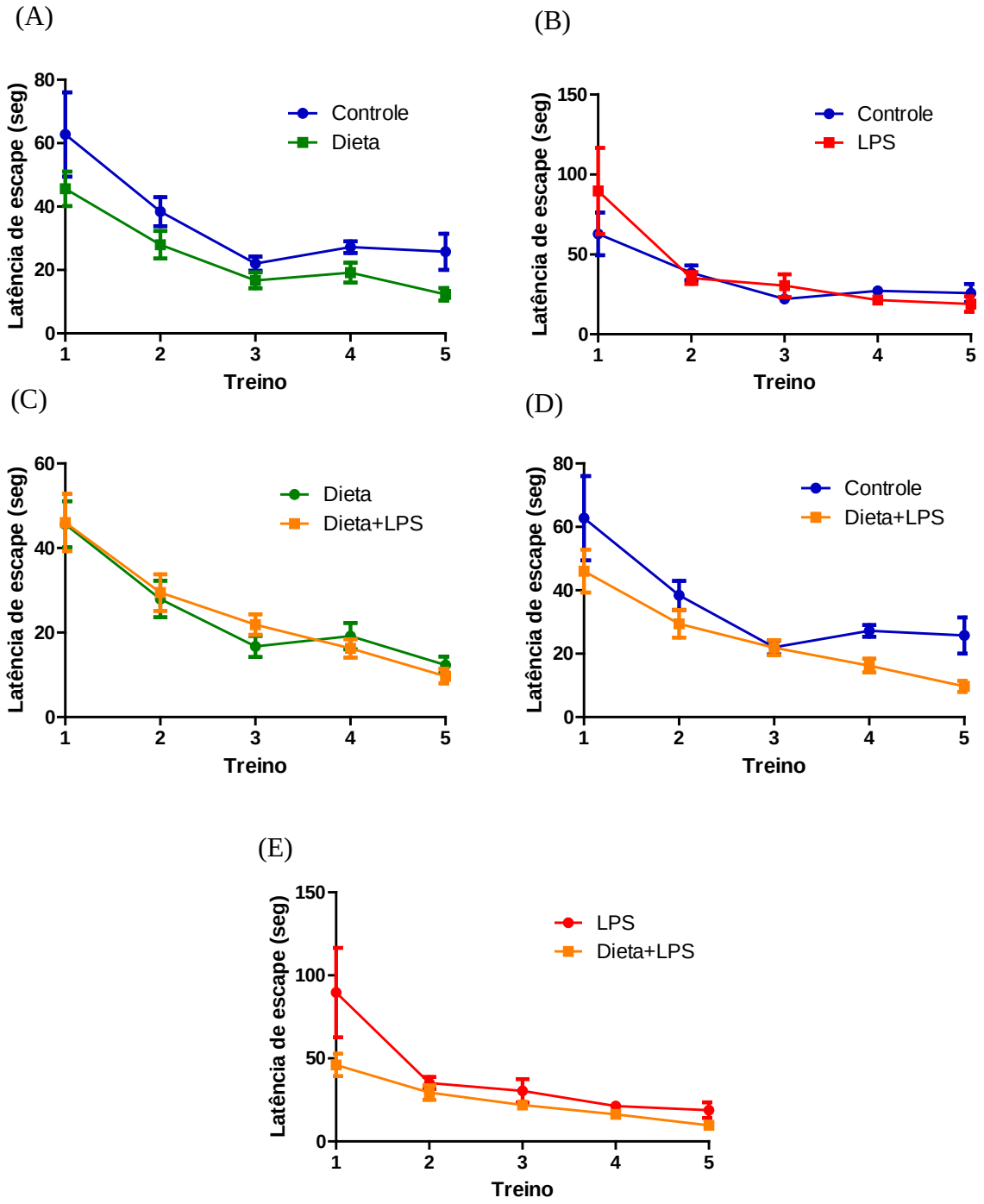


Figura 5. *Efeitos da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na memória espacial avaliada no labirinto de Barnes.* Em A a comparação dos grupos controle e dieta, em B a comparação dos grupos controle e LPS, em C a comparação dos grupos dieta e dieta tratado com LPS, em D a comparação dos grupos controle e dieta tratado com LPS e em E a comparação dos grupos LPS e dieta tratado com LPS. Os dados representam as médias de latência de escape (tempo em segundos que o animal leva para encontrar o orifício correto contendo a caixa de escape) dos grupos ± E.P.M., n=10. Os gráficos representam os dados ao longo dos 5 dias de teste (ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

Após os 5 dias de teste do labirinto de Barnes, fizemos avaliação da memória gerada por estímulo aversivo através do teste da esquiva inibitória. No treino, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão comportamental, não apresentando diferenças estatísticas; por isso, todos os grupos foram plotados juntos no gráfico na barra "treino" (Figura 6). Contudo, a análise da memória de longa duração no teste 24 horas após o treino mostrou diferença estatística significativa de desempenho entre os grupos. Os grupos controle, dieta, e dieta com LPS apresentaram tempos de latência significativamente maiores do que durante o treino, mostrando que esses animais exibiram um aprendizado (lembraram do estímulo doloroso do choque) quando comparado com os resultados obtidos no teste; essa significância não foi observada no grupo tratado com LPS não submetido à dieta intermitente (Figura 6).

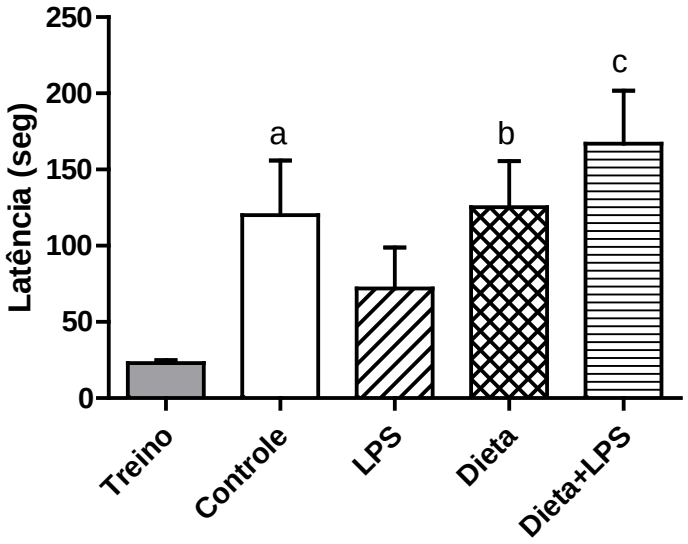


Figura 6. *Efeitos da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na memória avaliada em equipamento de esquiva inibitória.* Os dados representam as médias de latência (tempo em segundos que o animal leva para passar para a parte escura da gaiola) dos grupos ± E.P.M., n=12. (a) $p<0,05$ vs Treino, (b) $p<0,01$ vs Treino e (c) $p<0,001$ vs Treino (*Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*).

Por último, fizemos como controle o teste de campo aberto com os animais. Este teste mostrou que ocorreu um aumento da atividade locomotora horizontal e da exploração vertical (*rearing*) dos animais tratados com LPS em relação ao grupo controle. Por outro lado, o grupo Dieta+LPS não difere do grupo Dieta em seu comportamento locomotor, apesar de podermos observar uma tendência de aumento da atividade locomotora no grupo Dieta+LPS em relação ao grupo Dieta (Figura 7).

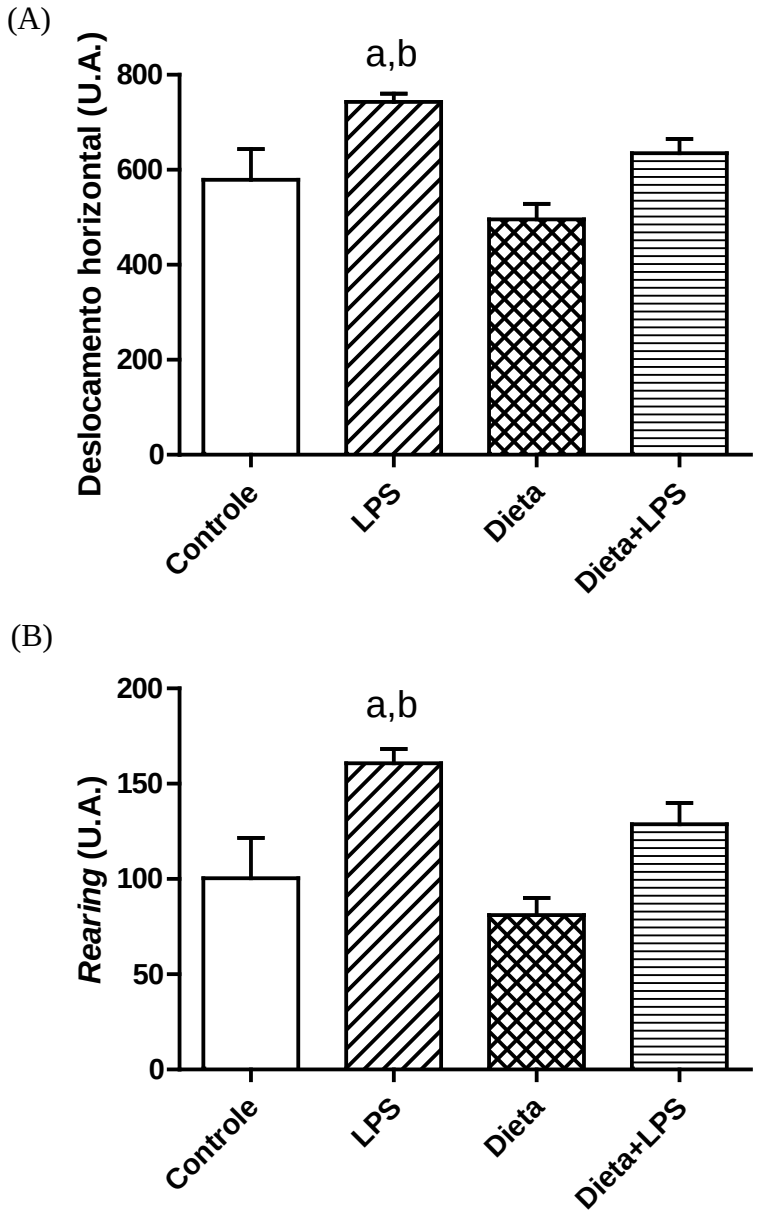


Figura 7. *Atividade locomotora avaliada no campo aberto*. (A) Deslocamento horizontal dos grupos (unidades arbitrárias). (B) Exploração vertical (*Rearing*) dos grupos (unidades arbitrárias). Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs Controle, (b) $p<0,05$ vs Dieta (*Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de *Dunns*).

4.3 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre a via canônica da proteína WNT

Com relação à sinalização da via da proteína WNT, fizemos ensaios de western blot em hipocampo para avaliar a modulação da via pela dieta e pelo estímulo inflamatório. Como podemos notar, os níveis de β-CATENINA e de GSK-3β fosforilado estão aumentados de maneira significativa no hipocampo de ratos que receberam 1 mês de dieta em comparação ao grupo controle, com alimentação contínua (Figura 8A, 8B, 8E e 8F). Além disso, podemos observar um aumento na expressão de GSK-3β fosforilado em relação a GSK-3β total nos grupos tratados com LPS (Figura 8A e 8B), embora o estímulo inflamatório não tenha sido capaz de produzir nenhuma alteração nos níveis de β-CATENINA (Figura 8E e 8F). A banda superior da figura 6B referente à GSK-3α não foi quantificada já que esta enzima não participa da sinalização da via da WNT. Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos nos níveis de GSK-3β total (Figura 8C e 8D).

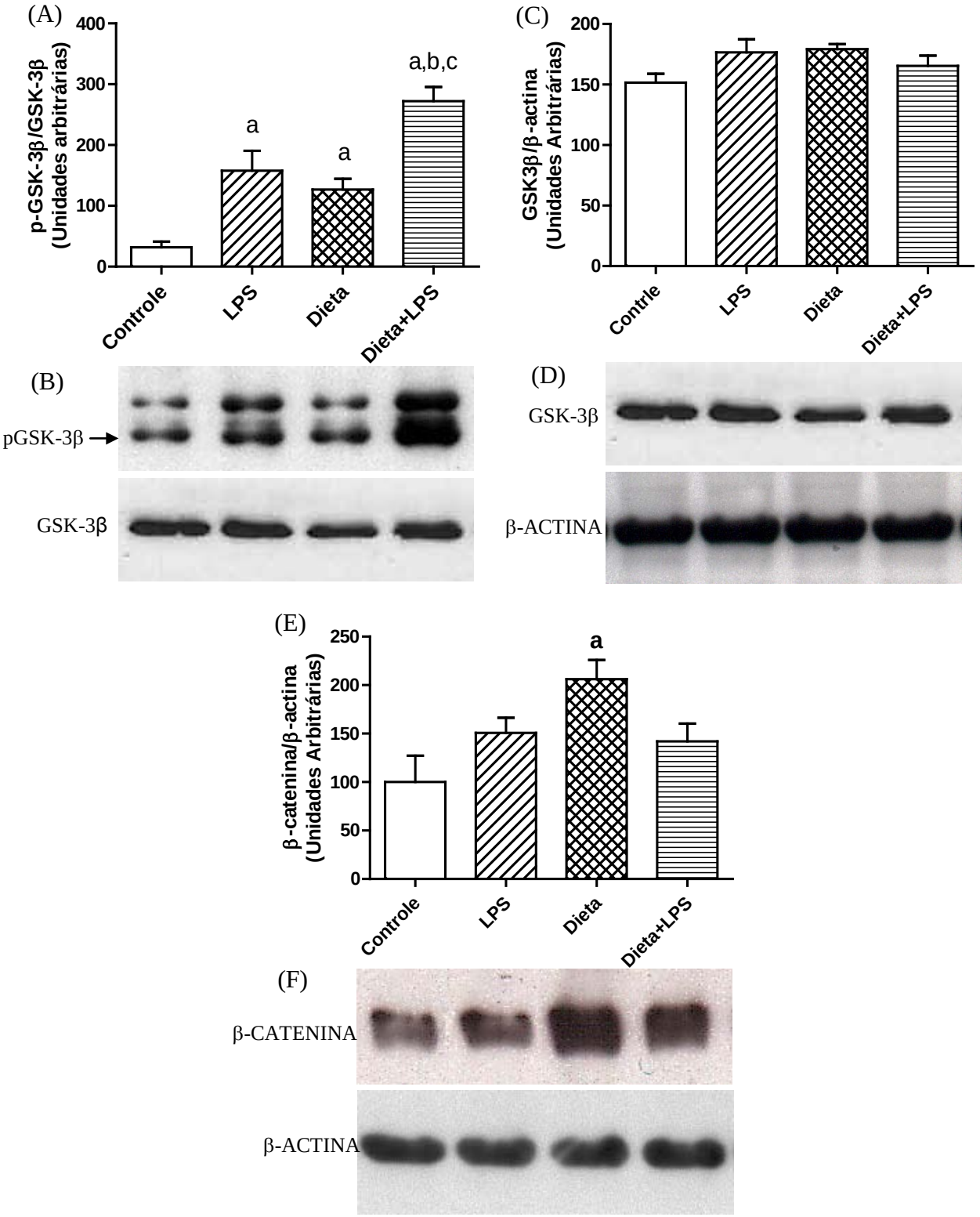


Figura 8. *Efeito da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na sinalização da WNT.* As proteínas citosólicas (10 μg) foram extraídas do hipocampo de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) e usadas para o ensaio de western blot. (A) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda do GSK-3β fosforilado (ser9, banda inferior) em relação ao GSK-3β total representados em B. (C) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda do GSK-3β total em relação a β-ACTINA representados em D. (E) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda da β-CATENINA representada em F. β-ACTINA foi utilizada como controle interno. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs Controle, (b) $p<0,05$ vs Dieta, (c) $p<0,05$ vs LPS (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

4.4 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o fator de transcrição CREB

Com relação ao fator de transcrição CREB, notamos que somente a dieta na ausência do estímulo do LPS aumentou os níveis de CREB fosforilado em relação ao CREB total quando comparado com o grupo controle (Figura 9A e 9B). Não foram observadas variações significativas entre os grupos nos níveis de CREB total (Figura 9C e 9D).

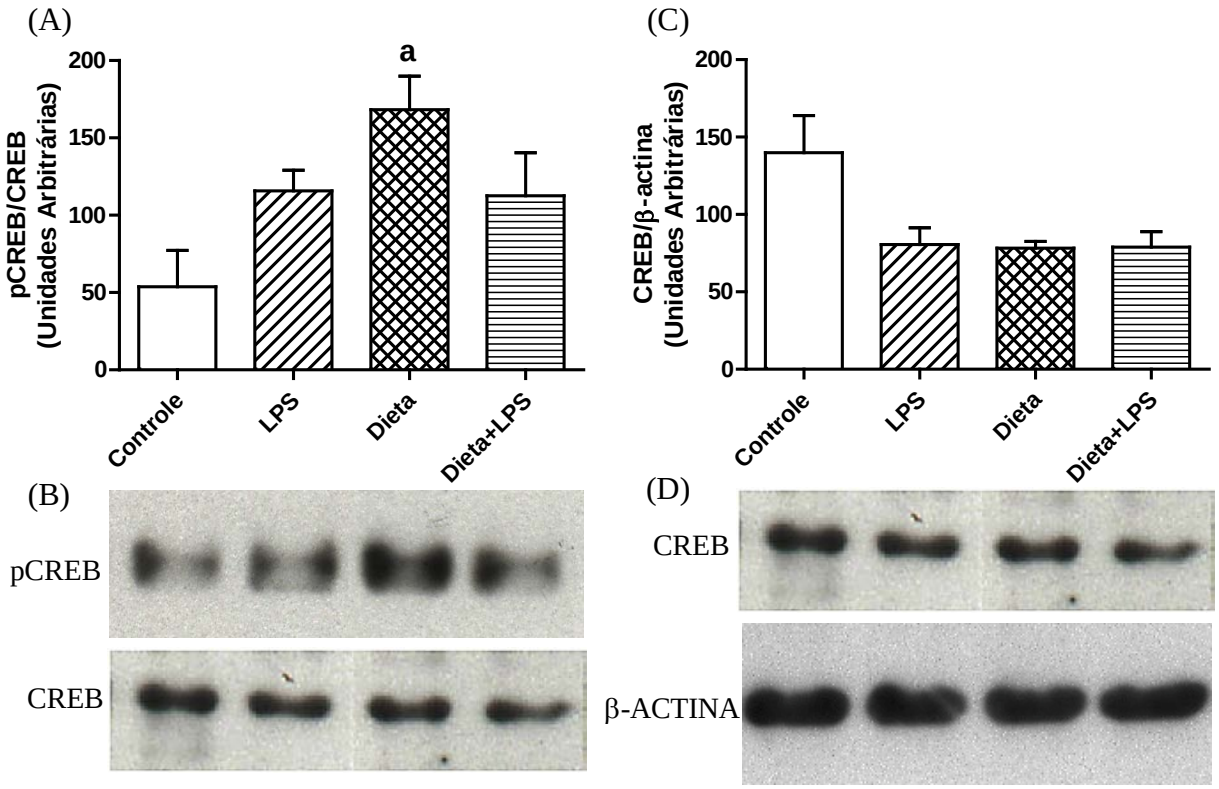


Figura 9. *Efeito da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS sobre o fator de transcrição CREB.* As proteínas nucleares (10 μg) foram extraídas do hipocampo de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) e usadas para o ensaio de western blot. (A) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda do CREB fosforilado em relação a CREB total representados em B. (C) Análise densitomérica (unidades arbitrárias) da banda do CREB total em relação ao controle interno β-ACTINA representados em D. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs Controle (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

4.5 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o fator de transcrição NF-κB

Já com relação ao fator de transcrição NF-κB no hipocampo, observamos que o LPS ativou este fator de transcrição tanto no grupo controle quanto no submetido à dieta intermitente. Isso foi observado tanto por *gel shift* (Figura 10) quanto por western blot (Figura 11) com a análise nuclear da subunidade RelA deste fator de transcrição. A dieta por si só ativou o NF-κB por *gel shift* (Figura 10). Por western blot, embora não seja estatisticamente significativa, a dieta demonstra uma tendência a aumentar a translocação de RelA para o núcleo (Figura 11).

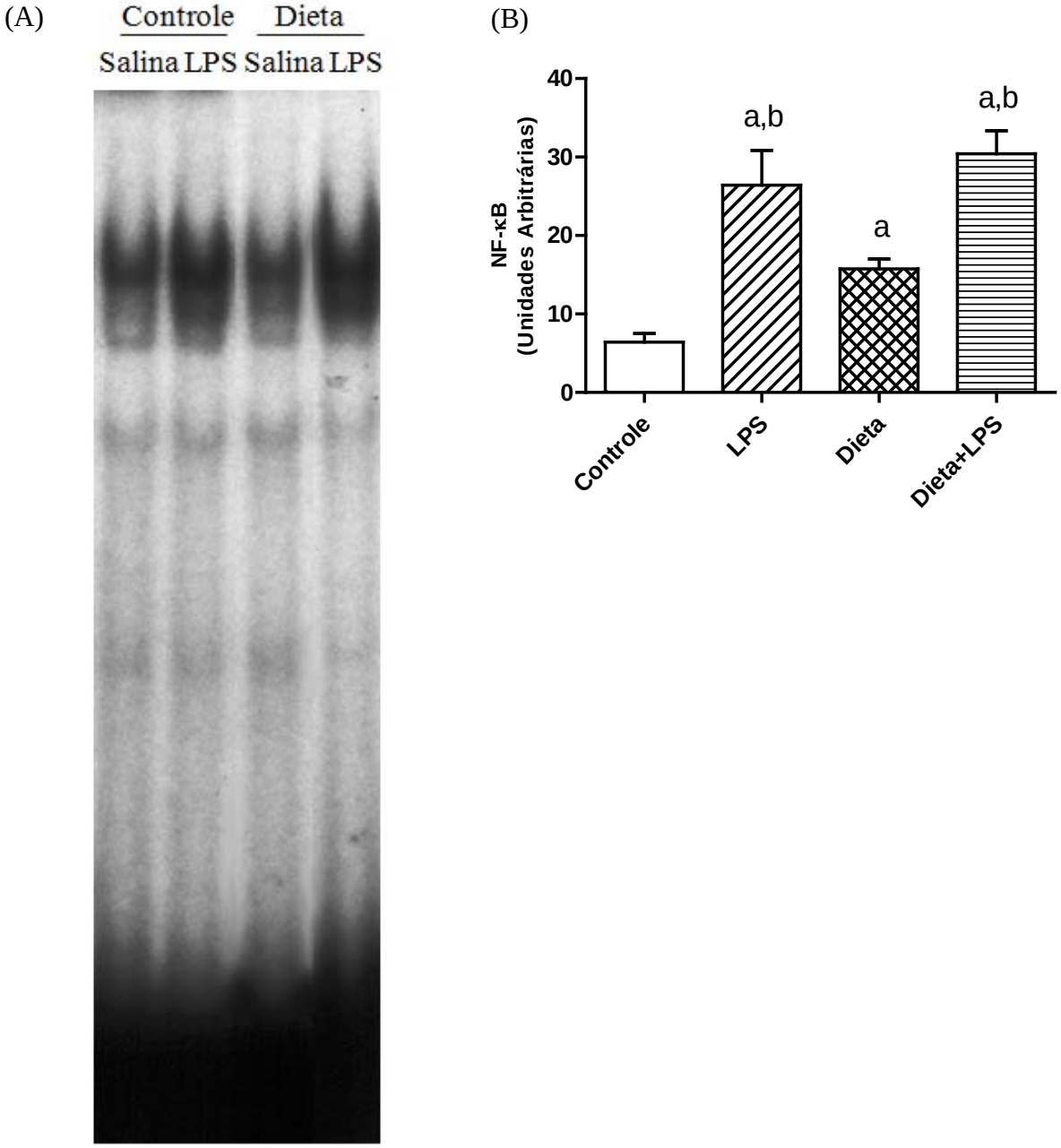


Figura 10. *Efeito da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na atividade de ligação do fator de transcrição NF-κB.* (A) Ensaio de *gel shift*. (B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda do NF-κB representada em A. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs Controle; (b) $p<0,05$ vs Dieta (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

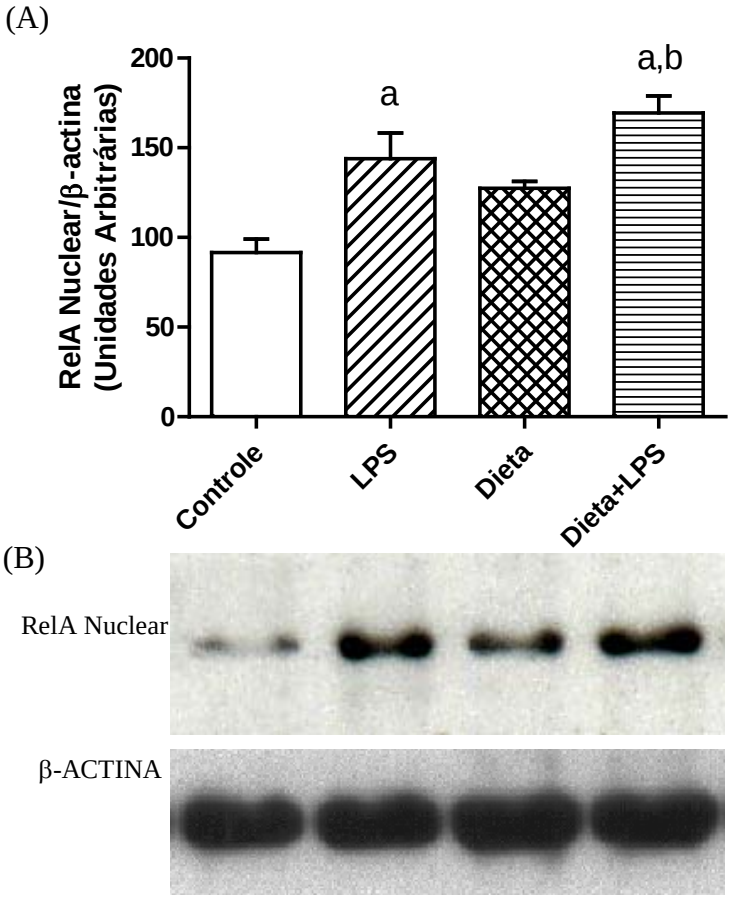


Figura 11. *Efeito da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na translocação nuclear do NF-κB.* As proteínas nucleares (10 μg) foram extraídas do hipocampo de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) e usadas para o ensaio de western blot. (A) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da banda do RelA nuclear representada em B. β-ACTINA foi utilizada como controle interno. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs Controle (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

Para determinação do complexo representado no *gel shift* correspondente à interação DNA/NF-κB, realizamos o ensaio de competição com a amostra de hipocampo dos ratos tratados com LPS, que demonstrou que o complexo 1 desapareceu na presença de excesso de oligonucleotídeo não-marcado radioativamente (5, 10 e 20 vezes de excesso molar) mas não pelo oligonucleotídeo contendo a sequência para o fator TFIID (20 vezes de excesso molar), demonstrando a especificidade da ligação do NF-κB no complexo 1. Os complexos 2 e 3 foram considerados como interação DNA/proteína inespecífica de afinidade mais baixa (Figura 12A).

Além disso, os estudos de *super-shift* nas amostras dos animais tratados com LPS (Figura 12B) e dos animais submetidos à dieta tratados ou não com LPS (Figura 13) usando anticorpos RelA, p50 e cRel mostraram a presença do dímero p50/RelA o qual é o mais envolvido na alteração induzida pelo LPS. A dieta intermitente na ausência do LPS também ativa o dímero p50/RelA (Figura 13A), mas a ativação induzida pela dieta é menor do que a obtida pelo LPS nos grupos submetidos à dieta normal ou intermitente (Figura 12 e 13B).

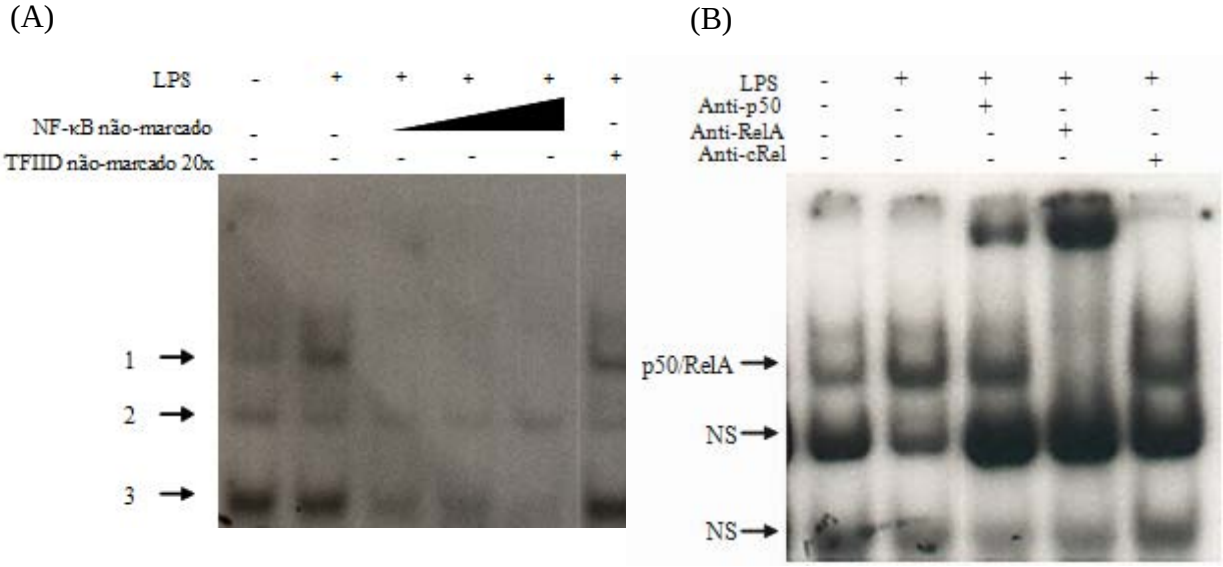


Figura 12. *Ensaio de competição e super-shift para o fator de transcrição NF-κB em hipocampo de ratos tratados com LPS.* Em (A) foram realizados estudos de competição usando o extrato nuclear do hipocampo na ausência e na presença de oligonucleotídeo não-marcado específico (sequência consenso do NF-κB com 10 vezes de excesso molar) e oligonucleotídeo não-específico (sequência consenso do TFIID: 5, 10 e 20 vezes de excesso molar). Em (B) a composição dos complexos observados no *gel shift* foram determinadas através da incubação do extrato nuclear na ausência ou na presença dos anticorpos contra as subunidades p50, RelA e cRel.

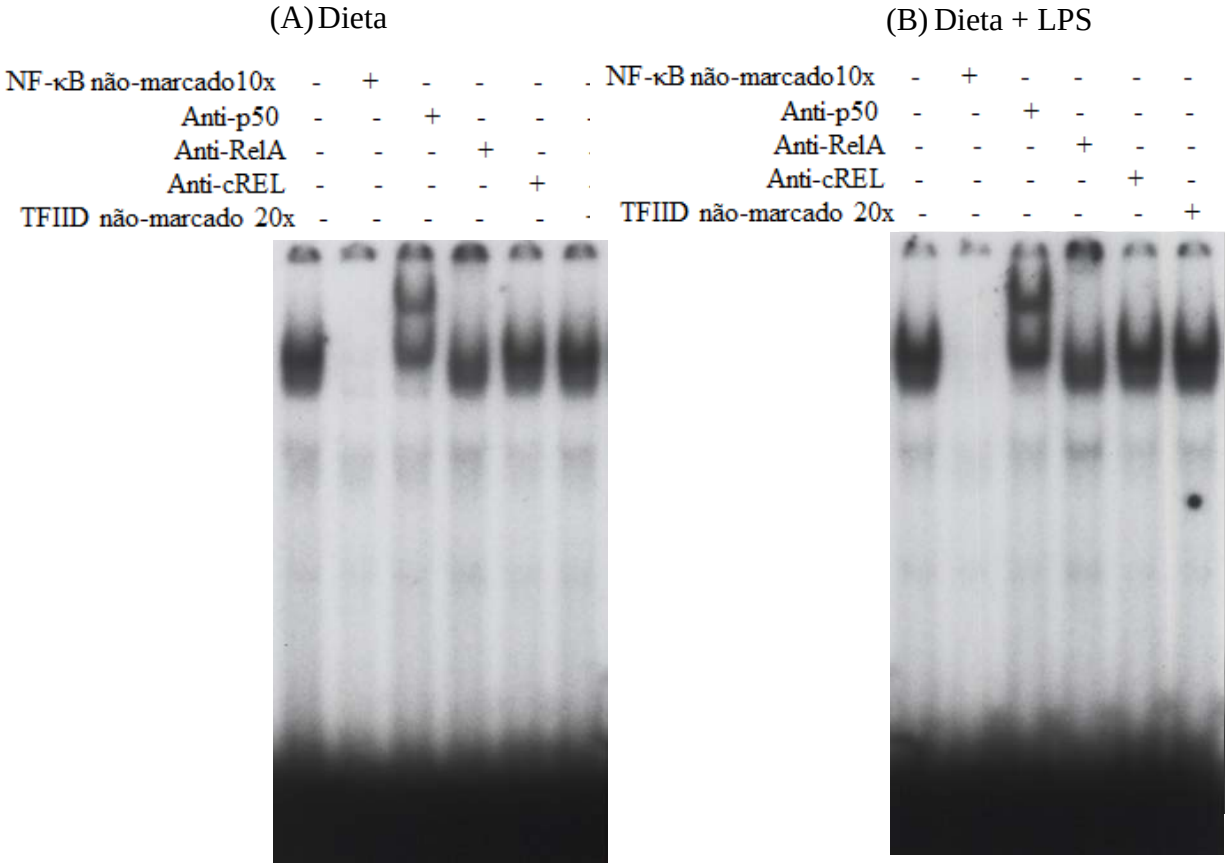


Figura 13. *Ensaio de competição e super-shift para o fator de transcrição NF-κB em hipocampo de ratos submetidos à dieta intermitente na presença e ausência de LPS.* Foram realizados estudos de competição usando o extrato nuclear do hipocampo na ausência e na presença de oligonucleotídeo não-marcado específico (sequência consenso do NF-κB com 10 vezes de excesso molar) e oligonucleotídeo não-específico (sequência consenso do TFIID: 20 vezes de excesso molar). A composição dos complexos observados no *gel shift* foi realizada com extrato nuclear incubado na ausência ou na presença dos anticorpos contra as subunidades p50, RelA e cRel. Em (A) experimento realizado com hipocampo dos animais submetidos à dieta, em (B) experimento realizado com hipocampo dos animais submetidos à dieta tratados com LPS.

4.6 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Cox-2*

O ensaio de RT-PCR em tempo real revelou uma diminuição significativa da expressão gênica de *Cox-2* no hipocampo dos animais submetidos à dieta intermitente quando comparados com o grupo controle (Figura 14).

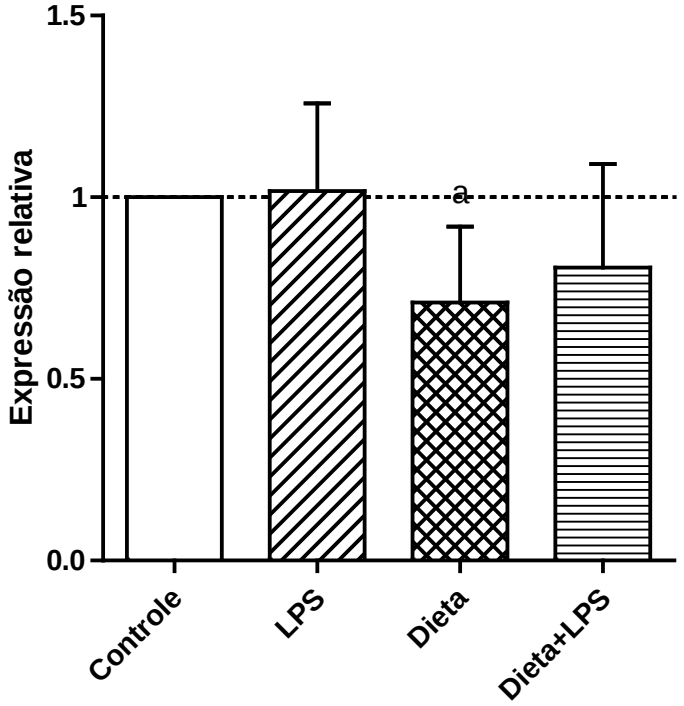


Figura 14. *Efeitos da dieta intermitente na presença e ausência de LPS nas alterações dos níveis de RNAm de Cox-2 através de RT-PCR em tempo real no hipocampo de ratos.* Todos os dados foram normalizados pelos níveis de expressão de RNAm do controle endógeno *Hprt* dentro da mesma amostra e são representados em relação a expressão de RNAm do hipocampo do rato não submetido à dieta (grupo controle), cuja expressão foi considerada igual a 1. Os dados estão representados como média ± E.P.M, n=5. (a) p=0,040 vs. controle pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise* P(H1) (164) realizado no programa REST 2009.

4.7 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Nosi*

Os grupos de animais tratados com LPS tanto submetidos quanto não submetidos à dieta intermitente apresentaram um aumento significativo da expressão gênica de *Nosi* em relação ao grupo controle. Porém, o grupo da dieta tratado com LPS apresentou um aumento significativamente menor do que o apresentado pelo grupo tratado com LPS sem a dieta (Figura 15).

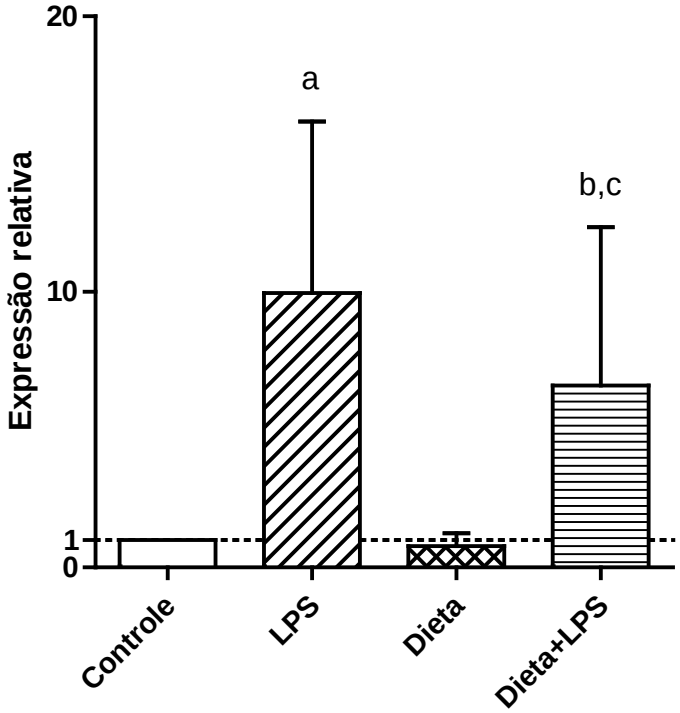


Figura 15. *Efeitos da dieta intermitente na presença e ausência de LPS nas alterações dos níveis de RNAm de Nosi através de RT-PCR em tempo real no hipocampo de ratos.* Todos os dados foram normalizados pelos níveis de expressão de RNAm do controle endógeno *Hprt* dentro da mesma amostra e são representados em relação a expressão de RNAm do hipocampo do rato não submetido à dieta (grupo controle), cuja expressão foi considerada igual a 1. Os dados estão representados como média ± E.P.M, n=5. (a) p=0,015 vs. controle, (b) p=0,013 vs. controle e (c) p=0,045 vs. LPS pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise* P(H1) (164) realizado no programa REST 2009.

4.8 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o RNAm de *Tlr-4*

Quanto à expressão gênica de *Tlr-4*, a dieta intermitente reduz significativamente os níveis de RNAm deste gene no hipocampo de ratos. Além disso, o grupo dos animais submetidos à dieta tratados com LPS apresentou expressão gênica de *Tlr-4* significativamente menor em relação ao grupo controle (Figura 16).

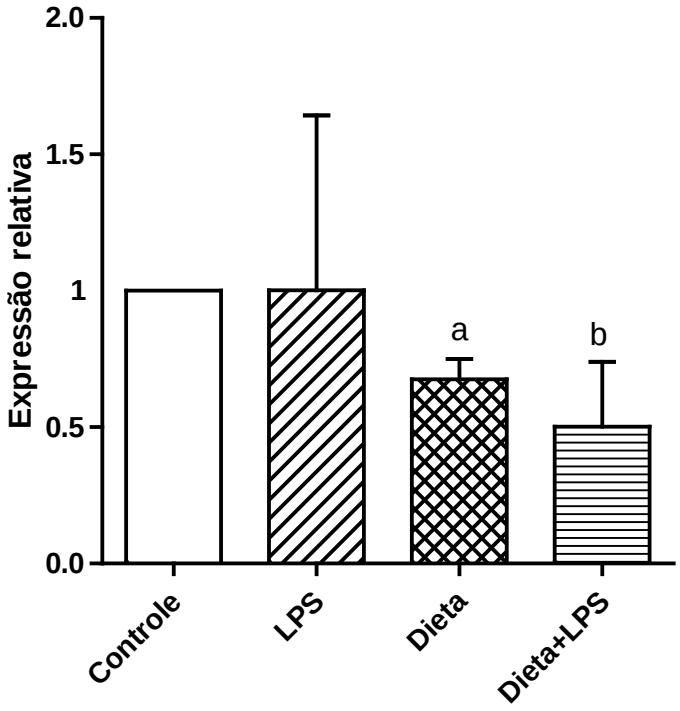


Figura 16. *Efeitos da dieta intermitente na presença e ausência de LPS nas alterações dos níveis de RNAm de Tlr-4 através de RT-PCR em tempo real no hipocampo de ratos.* Todos os dados foram normalizados pelos níveis de expressão de RNAm do controle endógeno *Hprt* dentro da mesma amostra e são representados em relação a expressão de RNAm do hipocampo do rato não submetido à dieta (grupo controle), cuja expressão foi considerada igual a 1. Os dados estão representados como média ± E.P.M, n=5. (a) p=0,008 vs. controle e (b) p=0,004 vs. controle pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise* P(H1) (164) realizado no programa REST 2009.

4.9 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre o TNF e IL-10

O ensaio de ELISA para IL-10 no hipocampo revelou um aumento dessa citocina anti-inflamatória nos grupos submetidos à dieta tratados ou não com LPS em relação ao grupo controle e ao grupo LPS (Figura 17A). Quanto à citocina TNF, não observamos diferenças significativas entre os grupos no hipocampo (Figura 17B). A razão IL-10/TNF indica um balanço protetor de citocinas nos grupos submetidos à dieta, na medida em que essa razão foi significativamente maior nesses grupos (Figura 17C).

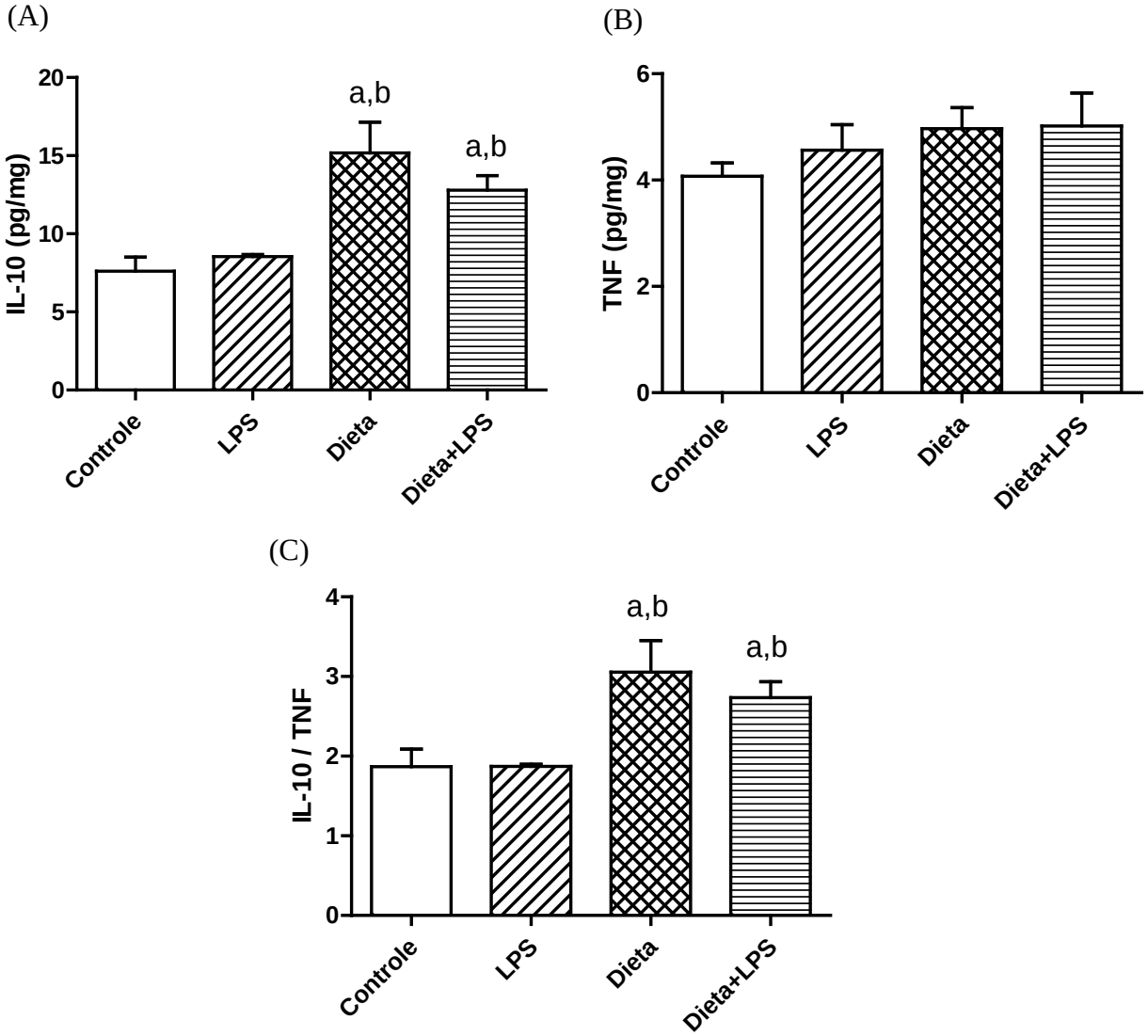


Figura 17. *Efeito da dieta intermitente na presença e ausência de LPS sobre os níveis das citocinas TNF e IL-10 e da relação IL-10/TNF no hipocampo de rato.* As proteínas citosólicas foram extraídas do hipocampo de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) e usadas para o ensaio de ELISA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,05$ vs. controle, (b) $p<0,05$ vs. LPS (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

Quanto ao TNF periférico, observamos que os grupos tratados com LPS apresentaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos desta citocina em relação ao grupo controle, porém esse aumento foi menor nos animais submetidos à dieta (Figura 18).

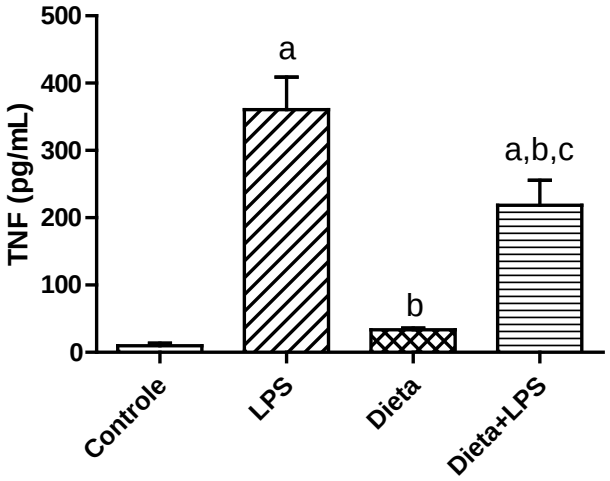


Figura 18. *Efeito da dieta intermitente na presença e ausência de LPS na expressão da citocina TNF plasmática em ratos.* O soro de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) foi isolado e usadas para o ensaio de ELISA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5. (a) $p<0,01$ vs. Controle, (b) $p<0,01$ vs. LPS, (c) $p<0,01$ vs. Dieta (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

4.10 Efeitos da dieta intermitente na ausência ou vigência de LPS sobre a neurotrofina BDNF

O ensaio de ELISA para BDNF no hipocampo não revelou diferença significativa dos níveis dessa neurotrofina entre os grupos, embora possamos observar uma tendência de redução de BDNF no grupo tratado com LPS em relação aos outros grupos que não é observada no grupo submetido à dieta tratado com LPS (Figura 19) O ensaio será posteriormente repetido para avaliar uma possível significância de diferença entre os grupos.

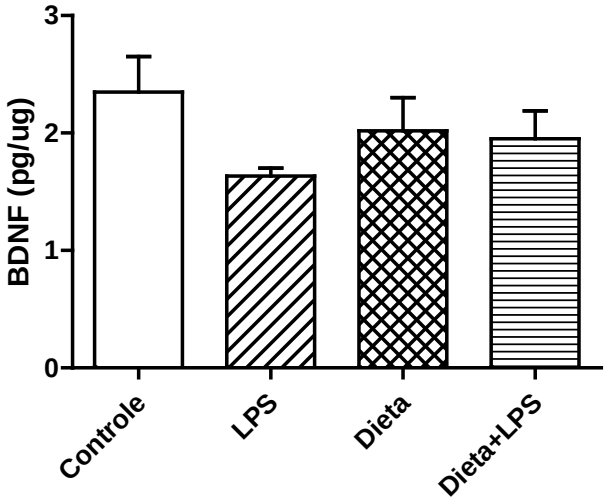


Figura 19. *Efeito da dieta intermitente na presença ou ausência de LPS na expressão de BDNF no hipocampo de rato.* O homogenato do hipocampo de ratos controle e dieta tratados com salina ou LPS (1 mg/kg i.v.) foram usadas para o ensaio de ELISA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=5 (ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Kewls*).

5 DISCUSSÃO

Para a avaliação da possível interferência da dieta intermitente frente a um estímulo inflamatório sobre o processo de consolidação da memória de longa duração e aprendizagem dos animais, foram escolhidas duas tarefas que exploram de forma diferente a consolidação da memória em roedores: o labirinto de Barnes e a esquiva inibitória.

O teste do labirinto de Barnes explora o instinto natural de pequenos roedores de procurar um local escuro e seguro quando este é colocado sob uma arena amplamente iluminada (165). É uma tarefa cognitiva dependente do hipocampo que requer uma memória de referência espacial (166-168). O aprendizado ocorre quando as pistas ambientais são apresentadas ao animal e seu desempenho neste teste é prejudicado quando estas pistas são removidas, onde é observado que os animais não apresentam melhora de latência de escape ao longo dos dias de teste (169, 170).

A originalidade e elegância do labirinto de Barnes devem-se ao fato deste teste não necessitar de um estímulo estressor grande para eliciar o comportamento do animal (171). A principal característica que distingue o labirinto de Barnes do labirinto aquático de Morris é o estresse (172-174). Ambos os labirintos aumentam os níveis de hormônios do estresse quando comparados com controles não testados, contudo os níveis plasmáticos de corticosterona é significativamente maior após o labirinto aquático de Morris quando comparado com o Labirindo de Barnes (174). Desta forma, o labirinto de Barnes demanda menos desgaste físico do animal e é menos propenso a gerar variáveis ao experimento como o estresse.

No teste realizado com labirinto de Barnes, o teste ANOVA de duas vias mostrou que, apesar de todos os grupos de animais terem consolidado a memória ao longo dos dias de teste, houve um efeito significativo da dieta com ou sem LPS na melhora de desempenho dos animais neste teste. Esta diferença pode ser observada nos gráficos desde o primeiro dia de teste, mostrando que os animais em dieta intermitente já apresentaram a consolidação de memória espacial durante a ambientação que é o primeiro contato que os animais têm com o labirinto de Barnes antes dos testes. Entretanto, o pós-teste de *Bonferroni* não indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que indica que os grupos não diferem pontualmente em um dado dia de teste, mas sim que a diferença ocorre no conjunto dos dados obtidos de cada grupo.

Um segundo teste realizado nos animais foi o de esquiva inibitória, com o qual é possível estudar a memória gerada por um estímulo aversivo (175). Diferente do labirinto de Barnes, esse modelo possui um grande reforço da memória gerado pelo choque deflagrado

pelas grades do aparelho nas patas dos animais. Segundo Izquierdo (176), a maioria das informações que adquirimos diariamente se extingue por falta de reforço, ou pelo processo natural de esquecimento, que pode evitar a sobrecarga de certas regiões cerebrais, além de filtrar as informações (177). A esquiva inibitória, por utilizar o choque para reforço da memória, é um modelo experimental marcante para os animais. Da mesma forma, em humanos, eventos marcantes fazem com que os indivíduos se recordem dos acontecimentos automaticamente. Exemplos são os casos de lembranças positivas do passado ou, ao contrário, situações muito negativas que gerem distúrbio de estresse pós-traumático (178).

Observamos diferenças significativas entre os grupos no teste da esquiva inibitória, onde o grupo controle sem LPS e os grupos dieta com e sem LPS apresentaram tempos de latência significativamente maiores do que durante o treino, mostrando que esses grupos consolidaram a memória do estímulo aversivo. Isso não foi observado no grupo controle com LPS, o que pode ser devido ao efeito deletério do LPS na formação de memórias. Diferente do observado no labirinto de Barnes, na esquiva inibitória o componente emocional tem grande importância, porque estímulos emocionais, sejam prazerosos ou aversivos, são geralmente mais significativos para a sobrevivência das espécies (178). Esse efeito protetor da dieta observado mais pronunciadamente neste teste pode ser devido, nesse caso, à intensidade emocional promovida pelo teste, que pode ter ajudado a pronunciar a diferença de capacidade de aquisição de memória entre os grupos.

Já foi demonstrado que a administração de LPS prejudica a formação de memórias dependentes do hipocampo, como o medo contextual (179) e memória espacial (180). Além disso, o LPS ou a ativação de citocinas pró-inflamatórias também reduz a neurogênese (181, 182), aumenta a apoptose no cérebro (183) e induz mudanças patológicas encontradas na DA (184). Tanto os resultados do labirinto de Barnes quanto da esquiva inibitória indicam que a dieta parece ter revertido o efeito deletério do LPS sobre a memória, já que os animais submetidos à dieta e estimulados com LPS recordaram do estímulo aversivo do choque e apresentaram um melhor desempenho do que o grupo controle no labirinto de Barnes.

Da mesma forma, foi mostrado que o LPS reduz os níveis de RNAm de *Bdnf* no hipocampo, uma neurotrofina que desempenha um importante papel na memória e aprendizado (185). De fato, apesar da diferença entre os grupos não ser significativa, os nossos resultados mostraram uma tendência do LPS causar uma redução nos níveis de BDNF hipocampal quando comparados com o grupo controle, o que não é observado nos grupos submetidos à dieta intermitente tratados com LPS. Isso pode estar relacionado com o melhor desempenho dos animais em dieta tratados com LPS em relação aos animais tratados com

LPS sem a dieta. Esse experimento será posteriormente replicado para tentar mostrar esse efeito de reversão da diminuição do BDNF pelo LPS nos animais em dieta intermitente. Ainda, será feito western blot de TrkB, o receptor do BDNF, para avaliar com mais precisão a influência desta neurotrofina nos resultados observados.

Os resultados obtidos nos testes comportamentais sugerem ainda que a dieta possa estar alterando vias de sinalização associadas à formação de memória, como, por exemplo, a do CREB e que estas alterações podem estar sendo capazes de reverter o efeito deletério da inflamação no processo de formação da memória. Essa hipótese é corroborada pelo nosso resultado de western blot de CREB fosforilado (forma ativa), que está aumentado no grupo submetido à dieta intermitente. Os membros da família de fatores de transcrição CREB são importantes para a formação de memória de longa duração (186, 187). Estudos mostraram que o bloqueio da proteína CREB por oligodeoxinucleotídeos ou por nocaute genético prejudica a formação de memória espacial (87, 188), enquanto o aumento de expressão de CREB resulta numa melhora da formação de memória de longa duração (189). Da mesma forma, estímulos como a exposição a novos ambientes, o condicionamento de medo contextual, a esquiva inibitória e o labirinto radial levam ao aumento de CREB fosforilado.

Além da participação na formação de memória, o CREB desempenha um importante papel na neurogênese. Camundongos sem a sinalização do CREB apresentam falhas na neurogênese embriogênica, mostrando claramente a importância do CREB neste processo (190). Ainda, há evidências da importância do CREB na neurogênese do animal adulto. Foi mostrado que a proliferação celular na zona subventricular do hipocampo de camundongos adultos é aumentada pela administração crônica de rolipram, um inibidor da fosfodiesterase específica para AMPc que aumenta a sinalização do CREB, enquanto que a neurogênese nessa área diminuiu em ratos transgênicos que expressam um mutante dominante negativo de CREB (MCREB) no hipocampo (191).

Além da via do CREB, a dieta ainda pode estar exercendo seus efeitos benéficos sobre a memória através da modulação da via WNT. Quando descoberta, a proteína WNT estava associada ao aparecimento de tumores em vertebrados; entretanto, recentemente a via de sinalização da WNT tem merecido destaque e atenção, principalmente no que se refere a doenças neurodegenerativas, em especial a DA (192). Na literatura, tem sido descrito que, em cultura de neurônios do hipocampo de ratos, a toxicidade do peptídeo βA promove alterações no funcionamento dos componentes da sinalização WNT, como, por exemplo, a diminuição dos níveis de β-CATENINA (193, 194) e ativação da GSK-3β (195), que pode favorecer a hiperfosforilação da proteína TAU, fator que desempenha um importante papel na patogenia

da DA (196). Chong e Maiese (197) demonstraram que a super-expressão da WNT-1 na cultura primária neuronal de hipocampo de ratos protegeu as células contra o estresse oxidativo e a toxicidade do peptídeo βA. Alvarez et al. (194) observaram que a proteína WNT-3a protegeu a cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos contra a toxicidade do peptídeo βA. Estudos mostram ainda que o aumento da atividade da PKC, que pode ser controlada pela sinalização WNT, leva a uma diminuição na produção do peptídeo βA (198, 199). Além disso, Lee et al. (200) demonstraram a importância da sinalização WNT no funcionamento das atividades fisiológicas do hipocampo em ratos, reforçando outros trabalhos na literatura que têm evidenciado a presença da sinalização WNT no hipocampo (193, 194). Da mesma forma, estudo recente realizado em nosso laboratório demonstrou que a proteina WNT protegeu as células PC12 contra a toxicidade induzida pela estaurosporina (normalmente utilizado para induzir apoptose), ácido 3-nitropropiônico (3-NP) (inibidor da succinato desidrogenase 3 utilizado como modelo para induzir doença de Huntington) e FeSO4 (agente neurotóxico), e que provavelmente parte deste efeito parece estar associado ao fator de transcrição NF-κB (201).

Diante destas evidências, decidimos investigar os efeitos da dieta intermitente na sinalização WNT no SNC. Os nossos resultados demonstraram um aumento na expressão protéica de β-CATENINA e de GSK-3β inibido por fosforilação (ser9) no hipocampo de ratos em dieta intermitente, o que indica uma provável ativação da via induzida pela dieta. Dados da literatura demonstraram que a ativação da via WNT por lítio e rosiglitazona reduziu a perda de memória e a neurodegeneração em ratos modelo de DA, onde a ativação da via por essas drogas foi demonstrada pelo aumento de β-CATENINA e pela inibição de GSK-3β (202). A sinalização WNT foi identificada como uma via endógena que regula a neurogênese hipocampal, como evidenciado pela expressão de receptores e componentes sinalizadores da via em células tronco do hipocampo adulto (203-205). Além disso, a inibição da via WNT abole quase completamente a neurogênese e diferenciação hipocampal *in vivo* (206). O aumento da neurogênese/sobrevivência na zona subgranular do hipocampo foi proposto como o mecanismo que causa a melhora de desempenho em testes de memória (207). A partir desses dados da literatura, é possível sugerir que o melhor desempenho dos ratos submetidos à dieta no teste comportamental possa ter correlação com a ativação da via WNT nesses animais, o que sugere uma possível participação da sinalização canônica da WNT nos efeitos mediados pela RED.

Para a avaliação da atividade locomotora espontânea e da resposta a novos ambientes, os ratos foram submetidos ao teste do campo aberto. A atividade locomotora horizontal e a exploração vertical (*rearing*) dos animais tratados com LPS durante um período de 5 minutos de teste foi significativamente maior em relação ao grupo controle. Essa maior atividade locomotora não gerou uma possível melhora de desempenho destes animais na execução dos testes comportamentais, já que este grupo apresentou um pior desempenho no teste da esquiva inibitória em relação aos outros grupos e não apresentou melhora de desempenho no teste do labirinto de Barnes em relação ao grupo controle.

Os TLRs são proteínas que ficam na membrana celular que reconhecem lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucléicos que são expressos por diferentes grupos de microorganismos. Após o reconhecimento de substâncias como o LPS, os TLRs podem induzir citocinas inflamatórias, moléculas co-estimuladoras, interferons do tipo I (INFs), e quimocinas (208). Em humanos, há 10 tipos de TLRs, mas há ao menos 13 tipos descritos em mamíferos (209).

Além da ativação dos fatores de transcrição NF-κB ou AP-1, hoje também se sabe que o desencadeamento da sinalização dos TLRs leva à modulação de diversas vias intracelulares que ditam a magnitude, tipo e duração da resposta inflamatória (210). Uma dessas vias é a PI3K/AKT. Ambas PI3K e AKT foram identificadas como cinases envolvidas na habilidade dos TLRs de mediar a fosforilação e inativação de GSK-3β (serina 9) (211, 212). De maneira resumida, a ligação do LPS ao TRL ativa a via PI3K-AKT, onde o AKT ativado pode fosforilar GSK-3β (ser9), e esta fosforilação resulta na sua inativação (revisão em 210). Nossos resultados mostraram que o GSK-3β em sua forma fosforilada (ser9) está aumentado em relação a GSK-3β total no hipocampo dos ratos estimulados com LPS tanto dos ratos em dieta normal quanto nos ratos em dieta intermitente, corroborando os dados da literatura que indicam a inativação desta enzima por fosforilação frente à ativação dos TLRs. Portanto, acreditamos que o aumento dos níveis de GSK-3β fosforilado nos animais tratados com LPS não têm correlação com a via canônica da WNT, mas sim como resultado da sinalização do TLR-4, já que nesses grupos não foi observado um aumento dos níveis de β-CATENINA.

Foi mostrado que o TLR-4 modula a proliferação e diferenciação de células tronco neurais. Camundongos deficientes em TLR-4 exibiram neurogênese aumentada (147). No entanto, as células formadas morrem e não conseguem formar neurônios maduros, mostrando que há uma redução da sobrevivência neuronal em animais deficientes em TLR-4. Por outro lado, esses camundongos exibiram um nível basal maior de neurônios e menor de glia no

hipocampo quando comparado ao animal selvagem, o que pode indicar que durante a neurogênese as células tronco neurais diferenciam-se mais em neurônios, enquanto que no animal adulto essas células são mais proliferativas mas não formam neurônios maduros (147). Esse estudo sugere que a redução da sinalização associada ao TLR-4 favoreça a neurogênese, porém a ausência da sinalização pode ser prejudicial. Isso sugere que a redução da expressão de *Tlr-4* observada nos ratos submetidos à dieta possa estar associada a uma maior neurogênese nesses animais o que pode estar associado ao melhor desempenho dos mesmos nos testes comportamentais em relação ao grupo controle, apesar de o possível papel modulatório do TLR-4 sobre a cognição ainda não ter sido determinado.

Além do envolvimento com a neuroplasticidade, estudos recentes sugerem que o TLR-4 exerce um papel importante no desenvolvimento de desordens metabólicas como a obesidade. Ainda, recentemente foi demonstrado que este receptor está envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina associado à obesidade (149-152) e foi demonstrado que ácidos graxos saturados podem estimular diretamente a sinalização inflamatória dependente do TLR-4, atuando como ligantes desse receptor (149, 153-156). Corroborando com essas evidências, camundongos deficientes em TLR-4 não desenvolvem resistência à insulina associada à obesidade (149-151) e pessoas obesas com diabetes tipo 2 apresentam níveis de expressão gênica e proteica de TLR-4 significativamente elevados no músculo, o que se correlaciona com a severidade da resistência à insulina nesses indivíduos (157). Ainda, foi mostrado que os níveis de ligantes de TLR-4 são elevados em pacientes com diabetes tipo 1 levando a um aumento da atividade desse receptor e enfatizando o estado pró-inflamatório desta doença (213). Outro estudo demonstrou que a alimentação rica em gordura aumenta a proporção de bactérias gram-negativas que contém LPS na microbiota intestinal, além de aumentar os níveis plasmáticos de LPS em camundongos. Esse estado é definido como endotoxemia metabólica e resulta em um aumento do tônus inflamatório mediado pela ativação do TLR-4, em ganho de peso e em diabetes (214-216). Do mesmo modo que ocorre com diversos outros tecidos, o SNC também é susceptível a excesso de nutrientes da dieta. Foi mostrado que uma dieta rica em gordura é capaz de gerar um estado pró-inflamatório local no hipotálamo de ratos (217), e vários estudos indicam o TLR-4 como um regulador chave da resistência à insulina e à leupeptina no SNC (218-220).

A despeito dos diversos estudos correlacionando o TLR-4 com os efeitos negativos do excesso de ingestão de alimentos, pouco se sabe sobre a influência desse receptor sobre os efeitos da RED. O que se sabe é que a RED, ao contrário do alto consumo calórico, diminui a resistência à insulina e seus níveis plasmáticos em roedores, macacos e humanos (221-223).

Como a resistência à insulina envolve a participação do TLR-4, sua diminuição determinada pela RED também deve envolver a participação desse receptor. Além disso, recentemente um estudo mostrou que pacientes obesos com diabetes tipo 2 tiveram uma redução da expressão de RNAm de *Tlr-2* e *Tlr-4* em monócitos periféricos após 2 semanas de restrição calórica (224). Sabe-se ainda que macrófagos de camundongos em RED estimulados com LPS in vitro apresentam expressão reduzida de *Tlr-4* (225). Porém, ainda não há estudos que indiquem o efeito da RED no SNC frente a um estímulo inflamatório sobre o TLR-4. Nosso estudo mostrou que a dieta intermitente reduz a expressão de *Tlr-4* em ratos mesmo na presença de um estímulo inflamatório.

Os TLRs também vêm sendo correlacionados com o estresse oxidativo; por exemplo, vários estudos *in vivo* demonstraram a importância da sinalização do TLR-4 na mediação de danos por estresse oxidativo em situações de isquemia/reperfusão e choque hemorrágico (revisão em 148). Durante situações de estresse oxidativo ocorre a liberação de moléculas associadas a dano tecidual, que podem acionar cascatas inflamatórias tanto pela ativação de TLRs quanto por serem liberados como consequência da sinalização dos TLRs amplificando ainda mais a inflamação, já que a ativação de TLRs nessas situações induz a produção de mais espécies reativas de oxigêno (EROs). Assim, a redução de expressão de *Tlr-4* observada nos ratos submetidos à dieta tratados ou não com LPS neste trabalho pode indicar uma proteção desses animais contra o estresse tanto de origem oxidativa quanto de origem infecciosa, diminuindo a sinalização deletéria associada a esse receptor. Ligantes originados de patógenos como o LPS e ligantes associados à dano tecidual originado de estresse oxidativo são igualmente efetivos na ativação do sistema imune, e estresse tanto oxidativo quanto originado de infecções compartilham a mesma sinalização via TLRs (226-228).

Vale salientar ainda que pretendemos realizar posteriormente ensaio de western blot para verificar se essas alterações observadas no RNAm de *Tlr-4* de fato também ocorrem na expressão de proteína. Além disso, avaliaremos se as alterações observadas nesse receptor ocorrem na glia ou neurônio por imunohistoquímica, uma vez que o TLR-4 neuronal responde a estímulos inflamatórios de forma diferente do TLR-4 das células da glia (136), o que permitirá um maior entendimento das alterações geradas pela dieta intemitente.

Os maiores mecanismos de sinalização ativados pelo TLR incluem as cascatas que levam à ativação do fator de transcrição NF-κB (revisão em 109). Experimentos envolvendo plasticidade e LTP sugerem a participação do NF-κB na atividade sináptica e na plasticidade neuronal (88, 229, 230). Além disso, tem sido demonstrado em culturas de neurônios do hipocampo e do cerebelo de camundongos que níveis basais da atividade sináptica ativam o

NF-κB (231, 232). Foi relatado também que o aumento da atividade do NF-κB aumenta a resistência ao estresse oxidativo em células neuronais, evidenciando uma ação neuroprotetora para este fator de transcrição por suprimir o sinal de morte celular (108). Da mesma forma, vários estudos evidenciaram que o NF-κB medeia, pelo menos em parte, os efeitos neurotropetores da ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) nos neurônios do cerebelo e que o BDNF é um alvo chave do NF-κB envolvido na neuroproteção do NMDA (92, 233, 234). Ainda, estudos do nosso laboratório mostraram que o BDNF mediado pelo NF-κB promove resistência à toxicidade do peptídeo βA em cultura de células do cerebelo (92) assim como a resistência de células PC12 à morte celular induzida por cocaína (93).

Por outro lado, há estudos que relacionam a ativação do NF-κB com processos neurodegenerativos, como lesões obtidas por estimulações dopaminérgicas, DP (235) e DA (236). Do mesmo modo, foi demonstrado também que o efeito neurotóxico induzido pelo glutamato em culturas de células primárias granulares cerebelares e em fatias de tecido hipocampal de ratos, é antagonizado pela aspirina e pelos metabólitos do salicilato, e o sítio de ação destas drogas envolve a inibição específica da indução de NF-κB pelo glutamato, o que sugere uma ação neurodegenerativa para o NF-κB (237). Além disso, dados da literatura demonstram que a ativação da resposta imune periférica pela administração de LPS em ratos e camundongos, com consequente ativação do NF-κB e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e TNF pode ocasionar dano cognitivo, ocasionando prejuízo no aprendizado e na memória (238-240), uma vez que os receptores de citocinas pró-inflamatórias estão bem concentrados em áreas associadas à aprendizagem e memória como o hipocampo (241, 242).

Ainda, há estudos que indicam um papel dual do NF-κB no SNC em doenças neurodegenerativas. Foi mostrado que a ativação do NF-κB em neurônios promove sua sobrevivência, enquanto a ativação em células gliais e imunes medeiam processos patológicos e inflamatórios (243).

Em um primeiro momento, nós analisamos as alterações induzidas pela dieta intermitente na ativação do fator NF-κB. Os nossos resultados mostraram que quando os animais foram, no final dos 30 dias de dieta normal, desafiados com uma injeção intravenosa de LPS e sacrificados 2 horas depois, eles apresentaram um aumento da atividade do NF-κB, o que reforça os dados de trabalhos anteriores do laboratório (158, 244); no entanto, o grupo submetido à dieta intermitente apresentou o mesmo padrão de ativação deste fator de transcrição no hipocampo após a injeção de LPS. O que nos chamou a atenção foi que a

própria dieta intermitente, por si só, aumenta a atividade deste fator de transcrição. Este resultado pode estar relacionado com o melhor desempenho dos animais submetidos à dieta intermitente nos testes comportamentais, uma vez que o NF-κB desempenha um importante papel nos processos de plasticidade sináptica, aprendizado e memória (243). O NF-κB é envolvido na LTP de transmissões sinápticas no hipocampo, sendo assim importante para a consolidação de memória de longa duração (245). Da mesma forma, estudos mostraram que a ausência da subunidade p50 piora o desempenho de camundongos no teste comportamental da esquiva ativa, enquanto que camundongos sem a subunidade RelA apresentam memória espacial prejudicada (232). Ainda, é muito provável que o NF-κB coopere com a atividade de outros fatores de transcrição envolvidos com a plasticidade neuronal, como por exemplo o CREB. Isso foi comprovado em um estudo que mostrou que o NF-κB controla a formação de memória espacial e a plasticidade sináptica através da regulação da expressão de PKA, e consequentemente regulando a via do CREB (246). De fato, os nossos resultados mostraram que além da atividade do NF-κB aumentada, o grupo de animais submetidos à dieta intermitente apresentou um aumento da forma ativa de CREB no hipocampo.

Acreditamos que a ativação do fator de transcrição NF-κB observada nos animais em dieta esteja relacionada mais com a sua atividade neuronal do que na glia. Isso porque observamos nos animais submetidos à dieta intermitente uma redução na expressão gênica do TLR-4, que está envolvido com a sinalização pró-inflamatória do NF-κB na glia. A ativação de NF-κB neuronal está relacionada com processos protetores e que favorecem a sobrevivência neuronal, enquanto que a sua indução em células da glia promove a liberação de neurotoxinas que superam o seu efeito protetor e facilita a morte celular (88). Da mesma forma, foi mostrado que o TNF é tóxico para os neurônios apenas na presença de microglia ou de meio condicionado de microglia (247). Para confirmarmos esta hipótese, posteriormente realizaremos ensaios de imunohistoquímica para analisar a co-localização neuronal do NF-κB nos animais submetidos à dieta intermitente.

Os ensaios de western blot mostraram a translocação da subunidade RelA componente do dímero ativo p50/RelA para o núcleo nos grupos que receberam o estímulo de LPS e uma tendência de aumento de RelA no núcleo dos animais submetidos à dieta intermitente. A ativação induzida pelo LPS está mais associada ao dímero p50/RelA, que é um ativador de genes que podem ser transcritos em resposta a atividade sináptica e fornece um mecanismo de sinalização que provavelmente desempenha uma função importante na resposta inflamatória (248). Uma vez que houve ativação do fator de transcrição NF-κB, e como ele pode mediar

ações pró- e anti-inflamatórias e pró- e anti-apoptóticas analisamos alteração de genes modulados por esse fator.

Os nossos resultados sugerem que a ativação do NF-κB observada não esteja atuando no sentido pró-inflamatório, na medida em que a expressão de genes pró-inflamatórios ativada por esse receptor como o *Cox-2* e *Nosi* está reduzida nos animais submetidos à dieta. Ainda, a expressão gênica do receptor *Tlr-4*, cuja ativação culmina com o acionamento da sinalização inflamatória do NF-κB, está reduzida nos animais submetidos à dieta tratados ou não com LPS.

Nesse estudo foram ainda avaliados os marcadores tanto anti- quanto pró-inflamatórios que são conhecidos como mediadores da resposta inflamatória: o TNF e a IL-10. A citocina pró-inflamatória TNF desempenha um papel central no desencadeamento e manutenção do processo inflamatório (249). Já a citocina IL-10 demonstra uma propriedade anti-inflamatória potente através da inibição da produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF (250). A IL-10 também atua como um antagonista natural do TNF, promovendo a inibição da sinalização do NF-κB através da preservação da proteína inibitória IκB (251). Ainda, a IL-10 também é capaz de inibir a produção de EROs em macrófagos isolados (252) e sugere-se que essa citocina também modula o dano agudo nos pulmões mediado por estresse oxidativo induzido pelo TNF (253, 254). Foi demonstrado também que IL-10 promove proteção contra a disfunção do endotélio durante o diabetes através da inibição do aumento de superóxido (O_2^-) em vasos sanguíneos (255). Desta forma, a IL-10 vem sendo considerada como uma citocina protetora no metabolismo humano (256). Sabe-se que a obesidade é caracterizada por um quadro inflamatório sistêmico, onde se observa um aumento de citocinas como o TNF e IL-1β, enquanto ocorre a diminuição de citocinas protetoras como a IL-10 (257, 258). Por outro lado, foi demonstrado que a RED promove a diminuição dos níveis de IL-1β e TNF e aumento de IL-10 em ratos e humanos (259-261).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à quantidade de TNF no hipocampo, foi observado que os grupos submetidos à dieta intermitente tratados ou não com LPS apresentaram um aumento nos níveis de IL-10 hipocampal e também da razão IL-10/TNF, mostrando um balanço do equilíbrio dessas citocinas no sentido protetor e anti-inflamatório. Portanto, demonstramos que esse efeito benéfico da dieta é mantido mesmo após o estímulo inflamatório, sugerindo um papel protetor desse protocolo contra a neuroinflamação.

Sabe-se que o *Il-10* é um dos genes responsivos ao CREB (262). Como foi observado um aumento da forma ativa de CREB nos animais submetidos à dieta não tratados com LPS, isso pode estar relacionado à tendência de um maior aumento dos níveis de IL-10 observado nos animais submetidos à dieta sem LPS quando comparado com os animais em dieta com LPS.

A ausência de alteração dos níveis de TNF hipocampal nos grupos tratados com LPS pode ser possivelmente devida ao tempo que os animais foram sacrificados após a administração de LPS ser insuficiente para se observar um aumento, uma vez que estamos trabalhando no intervalo de tempo que gera o pico de ativação do NF-κB e não da expressão de proteínas reguladas por este fator de transcrição (158). Além disso, reforçando os dados obtidos nesse estudo, recentemente foi mostrado que ratos administrados por via intraperitoneal com a mesma dosagem de LPS e após o mesmo intervalo deste estudo não apresentaram aumento de RNAm de *Tnf* no hipocampo após o mesmo período de 2 horas (263). Posteriormente realizaremos uma avaliação do decurso temporal após a administração de LPS para identificarmos se com um maior intervalo após a injeção de LPS podemos observar a alteração de TNF no hipocampo.

Quanto à avaliação do TNF no soro sanguíneo, observamos que os grupos tratados com LPS tanto com quanto sem dieta apresentaram aumento nos níveis de TNF, o que corrobora dados da literatura (264); porém, o aumento no grupo dieta com LPS foi menor do que no grupo sem dieta, o que demonstra um efeito protetor da dieta contra a inflamação periférica.

A COX-2 é a primeira enzima na via biossintética que leva à produção de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclinas, que são importantes mediadores inflamatórios. Existem duas isoformas de COX: a COX-1, que é constitutiva e expressa em praticamente todos os tecidos, e a COX-2, que é induzível (265-267). Ao contrário da COX-1 que medeia a síntese de prostaglandinas necessárias para a homeostase dos tecidos, a expressão de *Cox-2* aumenta em resposta a vários estímulos, incluindo sinais inflamatórios, mitógenos, citocinas e fatores de crescimento que podem ocorrer em casos de presença de infecção, inflamação e processos neoplásicos (268). Neste trabalho observamos que a dieta intermitente é capaz de reduzir a expressão gênica de *Cox-2* no hipocampo de ratos.

Dados da literatura demonstraram que várias citocinas podem alterar a expressão de *Cox-2 in vivo*. Citocinas pró-inflamatórias como o TNF (269, 270), IL-1α (270, 271) e IFN-γ (272, 273) podem induzir a expressão de *Cox-2*, enquanto citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (274), IL-4 (275) e IL-13 (276, 277) podem inibir a sua indução. Isso nos leva a supor

que a queda da expressão de *Cox-2* pode estar correlacionada com o aumento de IL-10 observado no hipocampo dos animais submetidos à dieta. Essa possível modulação por IL-10 pode ocorrer tanto de modo direto (via inibição da produção de mRNA de *Cox-2*) como indireto (via regulação de citocinas pró-inflamatórias que podem induzir a expressão gênica de *Cox-2*). A segunda hipótese é justificada pelo fato de que a IL-10 é capaz de inibir citocinas inflamatórias como TNF e IL-1α (278, 279) que por sua vez são capazes de induzir o aumento dos níveis de RNAm de *Cox-2* (280). Além disso, estudos anteriores mostraram que IL-10 *in vitro* pode inibir a indução de COX-2 em monócitos e neutrófilos humanos (274, 275). Consistente com esses resultados, outro estudo mostrou que células do baço de camundongos nocaute para IL-10 tratadas com LPS apresentaram um grande aumento de RNAm e proteína de COX-2 quando comparados com células originadas do animal selvagem (281).

Outra hipótese seria de que a diminuição da expressão de *Cox-2* seja em parte devida à redução dos níveis de RNAm de *Tlr-4* observada nos animais submetidos à dieta, já que dados da literatura demonstram que a COX-2 é um dos produtos resultantes da sinalização do receptor TLR-4 (282). Ainda, Fukata et al. (283) demonstraram que a COX-2 é regulada pela sinalização do receptor TLR-4 em modelo de inflamação intestinal de camundongos.

A obesidade é associada a um estado inflamatório crônico com a liberação de imunomoduladores pelo tecido adiposo, como citocinas e prostaglandinas produzidas pela COX-2 que promovem inflamação e tumorigênese (284, 285). A RED é capaz de diminuir os níveis de moléculas pró-inflamatórias enquanto exerce um aumento dos níveis de moléculas anti-inflamatórias (23, 286-288). Já foi mostrado que a expressão de *Cox-2* mediada pelo NF-κB é maior em gliomas mais agressivos do que em mais brandos (289). Ainda, microglias associadas a câncer cerebral produzem uma grande quantidade de prostaglandina E, que é mediada pela expressão de *Cox-2* (290, 291). Um inibidor seletivo de COX-2 parece ser tão efetivo quanto o tratamento clássico com a dexametasona no prolongamento da sobrevivência em um modelo de câncer cerebral de ratos (292). Além disso, foi mostrado que a RED diminui a expressão de *Cox-2* em modelo de astrocitoma em camundongos (293). Quanto ao câncer de pâncreas, que tipicamente super-expressa COX-2 (294, 295), foi mostrado que a RED exerce um efeito protetor contra a natureza pró-carcinogênica da pancreatite aguda, através da diminuição da progressão da lesão e diminuição do crescimento tumoral em um modelo de pancreatite neoplásica acionada por COX-2 (296).

Apesar de a dieta intermitente não ter promovido alterações nos níveis de RNAm de *Cox-2* frente à inflamação no nosso modelo experimental, a redução dos níveis de RNAm de

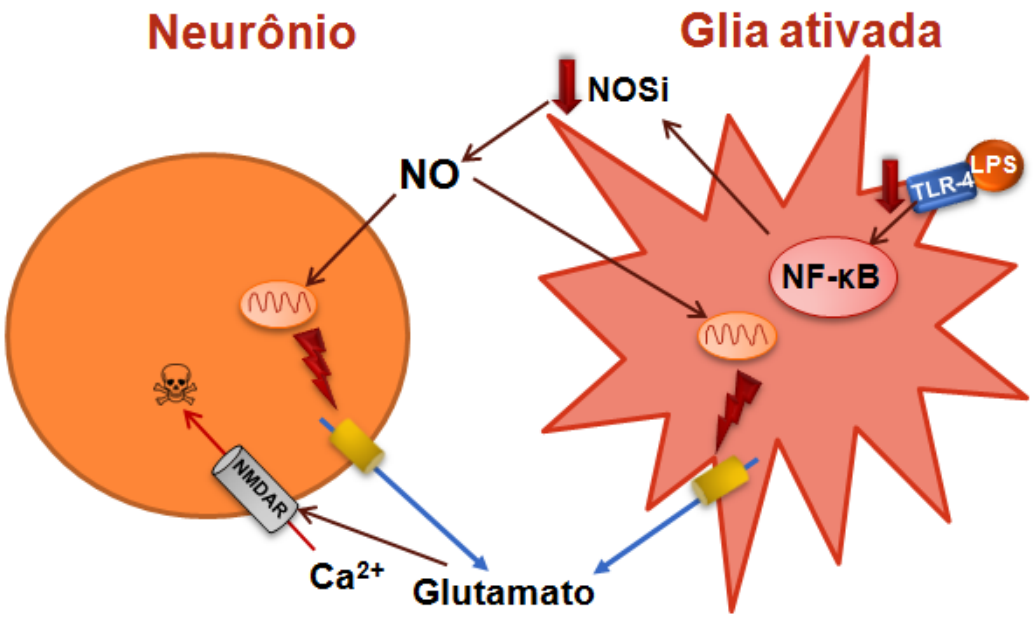
Cox-2 observada no grupo de ratos submetidos à dieta sem o estímulo inflamatório sugere um possível papel protetor antineoplásico nesses animais. Ainda, os resultados obtidos nesse trabalho relacionados a outros marcadores inflamatórios que mostram o aumento da razão dos níveis de IL-10/TNF e a diminuição dos níveis de RNAm de *Nosi* apontam para um efeito anti-inflamatório da dieta intermitente corroborando com essa idéia, já que a inflamação é um componente crítico da progressão tumoral (revisão em 297).

O neurotransmissor gasoso óxido nítrico (NO) exerce múltiplas ações na regulação fisiológica normal do SNC (298-300). A sua importância na cognição já foi bem documentada (298, 299). Por exemplo, o NO é associado com a regulação de processos de memória e aprendizado (299, 301) já que pode agir como um mensageiro que induz e mantém a LTP e a depressão de longa duração (LTD) (299-302). Sabe-se que baixas concentrações de NO exercem efeitos citoprotetores por diversos mecanismos (299, 300). Porém, a produção excessiva de NO pode resultar num quadro de neurotoxicidade que também é relacionado com dano cognitivo (300, 303-305). Devido às suas propriedades de radical livre, o NO pode gerar EROs que podem induzir estresse oxidativo causando a deterioração das funções fisiológicas do SNC (306).

O NO é produzido por 3 isoformas da enzima NOS, que catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO. A NOS endotelial e neuronal são isoenzimas constitutivas, enquanto a NOSi é a isoforma que é induzida por estímulo imunológico ou inflamatório, gerando níveis patológicos de NO (300, 305). Nossos resultados mostraram que a dieta intermitente foi capaz de reduzir o aumento da expressão de *Nosi* induzida pelo estímulo inflamatório do LPS. Esse resultado pode indicar que o melhor desempenho observado nos animais tratados com LPS submetidos à dieta intermitente nos testes comportamentais pode estar relacionada à redução dos níveis de NOSi e consequentemente dos níveis patológicos de NO no hipocampo desses animais.

Os neurônios são notavelmente sensíveis à morte celular induzida por NO (307, 308). Um dos mecanismos pelo qual se sugere que o NO causa neurotoxicidade é através da potente e reversível inibição da respiração mitocondrial causando uma liberação aguda de glutamato dos terminais nervosos. O glutamato é um neurotransmissor predominantemente excitatório do SNC de mamíferos que regula os processos de plasticidade e transmissão sináptica (309). A sinalização glutamatérgica é essencial para a memória espacial dependente do hipocampo (310). Porém, níveis extracelulares elevados de glutamato e a ativação excessiva de receptores glutamatérgicos podem levar a uma elevação exacerbada dos níveis intracelulares de cálcio causando uma disfunção neuronal e morte celular (311, 312).

Sabe-se que a neuroinflamação causada pela administração de LPS gera um aumento dos níveis de glutamato (313). O LPS se liga ao complexo de receptor CD14/TLR4 da microglia (314), e essa, quando ativada, gera produtos que são mediadores chaves do processo neuroinflamatório e contribuem para o dano neuronal (315, 316). A ativação da microglia pela infusão de LPS pode gerar modificações patológicas, bioquímicas e comportamentais que são similares àquelas observadas em muitas doenças neurodegenerativas associadas à neuroinflamação (317). Ainda, o aumento da atividade glutamatérgica induzida por atividade neuronal associada à exploração espacial poderia levar a um excesso de influxo de cálcio ainda maior (318). A neuroinflamação parece envolver um ciclo de retroalimentação positivo entre a microglia ativada e o dano neuronal (319). Como os animais em dieta intermitente apresentaram um melhor desempenho dos testes comportamentais e uma redução de marcadores inflamatórios, acreditamos que a dieta intermitente possa estar atuando prevenindo a ativação excessiva do receptor NMDA que resulta no influxo excessivo de cálcio nos neurônios interrompendo esse ciclo de retroalimentação e consequentemente diminuindo a ativação da glia.

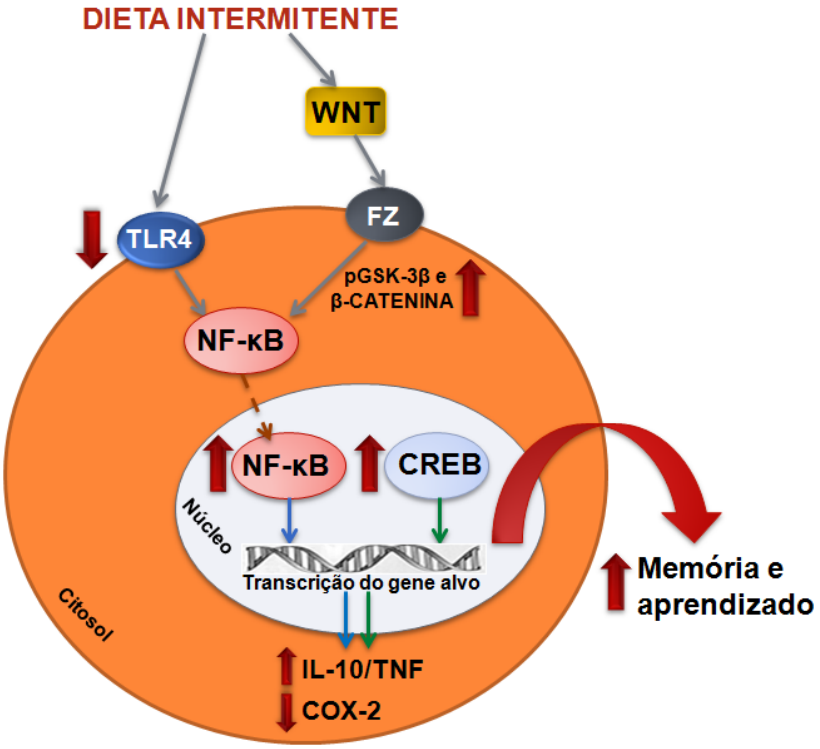


Esquema 3: Na vigência do estímulo inflamatório induzido pelo LPS ocorre a ativação das células da glia via receptor TLR-4 que culmina com a ativação da sinalização inflamatória do fator de transcrição NF-κB com a consequente ativação da transcrição do gene-alvo *Nosi*. A NOSi promove o aumento dos níveis de NO que, quando em excesso, provoca uma disfunção da respiração mitocondrial e um prejuízo na produção de ATP. Dessa forma, o transportador de glutamato que utiliza ATP para promover a recaptação deste neurotransmissor da fenda sináptica passa a liberar glutamato para o meio extracelular, que por sua vez ativa os receptores NMDA. A ativação desses receptores causa o influxo de cálcio nos neurônios que pode resultar em um quadro de exitotoxicidade glutamatérgica. Os nossos resultados sugerem que a dieta intermitente possa provavelmente reduzir esse quadro de excitotoxicidade através da diminuição da sinalização inflamatória associada ao TLR-4 e da redução da expressão de *Nosi* observada no nosso modelo experimental.

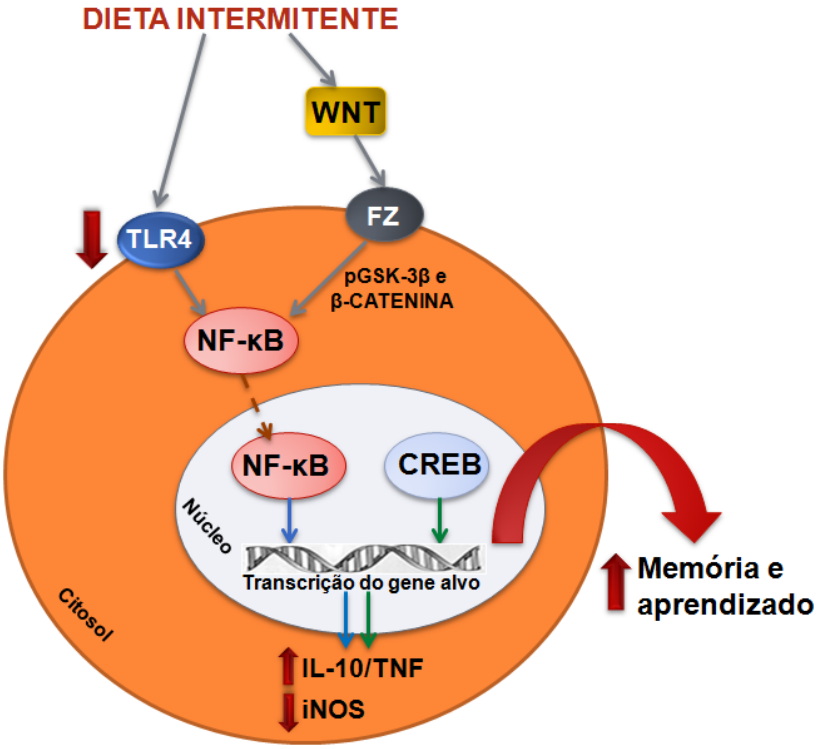
6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que a dieta intermitente atua no sentido protetor contra a inflamação no nosso modelo experimental. Isso foi demonstrado pela melhora do desempenho dos animais no teste do labirinto de Barnes onde os animais em dieta intermitente apresentaram melhor desempenho mesmo quando tratados com LPS, pela reversão do efeito deletério induzido pelo LPS na memória no teste da esquiva inibitória e pela alteração de diversos marcadores inflamatórios no hipocampo de ratos submetidos à dieta, tais como, a diminuição dos níveis de RNAm do *Tlr-4*, *Nosi* e *Cox-2* e aumento da razão de IL-10/TNF desses animais em relação ao grupo controle. Apesar de ser ter sido observado um aumento na atividade de ligação do NF-κB nuclear, esse fator de transcrição pode não estar levando neste caso ao aumento da neuroinflamação, já que o receptor TLR-4 que ativa sua sinalização inflamatória está com uma expressão gênica reduzida assim como a dos genes dos marcadores inflamatórios *Nosi* e *Cox-2* cujas expressões são ativadas por esse fator de transcrição.

(A) Dieta vs. Controle



(B) Dieta+LPS vs. LPS



Esquema 4: Representação esquemática dos resultados do estudo dos efeitos comportamentais e bioquímicos da dieta intermitente na vigência de um estímulo inflamatório no hipocampo de ratos. Em A, representação dos resultados do grupo submetido à dieta intermitente em relação ao grupo controle. Em B, representação dos resultados do grupo submetido à dieta intermitente tratado com LPS em relação ao grupo tratado com LPS sem a dieta intermitente.

REFERÊNCIAS*

1. Calabrese EJ. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. Ageing Res Rev. 2008 Jan;7(1):8-20.

2. Calabrese EJ. Hormesis and medicine. Br J Clin Pharmacol. 2008 Nov;66(5):594-617.

3. Calabrese EJ. Overcompensation stimulation: a mechanism for hormetic effects. Crit Rev Toxicol. 2001 Jul;31(4-5):425-70.

4. Weindruch R, Sohal RS. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. N Engl J Med. 1997 Oct 2;337(14):986-94.

5. Frame LT, Hart RW, Leakey JE. Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease. Environ Health Perspect. 1998 Feb;106 (Suppl 1):313-24.

6. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. Nutrition. 1989 May-Jun;5(3):155-71; discussion 72.

7. Comfort A. Effect of Delayed and Resumed Growth on the Longevity of a Fish (Lebistes Reticulatus, Peters) in Captivity. Gerontologia. 1963;49:150-5.

8. Partridge L, Green A, Fowler K. Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in Drosophila melanogaster. Journal of Insect Physiology. 1987;33(10):745-9.

9. Klass MR. Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span. Mech Ageing Dev. 1977 Nov-Dec;6(6):413-29.

10. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. Science. 2000 Sep 22;289(5487):2126-8.

11. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. Science. 2009 Jul 10;325(5937):201-4.

12. Chen RF, Good RA, Engelman RW, Hamada N, Tanaka A, Nonoyama M, et al. Suppression of mouse mammary tumor proviral DNA and protooncogene expression: association with nutritional regulation of mammary tumor development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2385-9.

13. Birt DF, Yaktine A, Duysen E. Glucocorticoid mediation of dietary energy restriction inhibition of mouse skin carcinogenesis. J Nutr. 1999 Feb;129(2S Suppl):571S-4S.

14. Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, Sado T. Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2615-9.

15. Yu ZF, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: evidence for a preconditioning mechanism. J Neurosci Res. 1999 Sep 15;57(6):830-9.

---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted of Biomedical Journal: sample references. Avaible from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

16. Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. Circulation. 2005 Nov 15;112(20):3115-21.

17. Kubo C, Gajar A, Johnson BC, Good RA. The effects of dietary restriction on immune function and development of autoimmune disease in BXSB mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):3145-9.

18. Fan W, Kouda K, Nakamura H, Takeuchi H. Effects of dietary restriction on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Dec;226(11):1045-50.

19. Nakamura H, Kouda K, Tokunaga R, Takeuchi H. Suppressive effects on delayed type hypersensitivity by fasting and dietary restriction in ICR mice. Toxicol Lett. 2004 Feb 2;146(3):259-67.

20. Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. Ann Neurol. 1999 Jan;45(1):8-15.

21. Duan W, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. J Neurosci Res. 1999 Jul 15;57(2):195-206.

22. Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, et al. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2007 Apr;26(1):212-20.

23. Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD, et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. Free Radic Biol Med. 2007 Mar 1;42(5):665-74.

24. Wachsman JT. The beneficial effects of dietary restriction: reduced oxidative damage and enhanced apoptosis. Mutat Res. 1996 Feb 19;350(1):25-34.

25. Yu BP, Chung HY. Stress resistance by caloric restriction for longevity. Ann N Y Acad Sci. 2001 Apr;928:39-47.

26. Grant WB. Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. J Alzheimers Dis. 1999 Nov;1(4-5):197-201.

27. Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study. Ann Neurol. 1996 Jan;39(1):89-94.

28. Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. Arch Biochem Biophys. 1996 Sep 1;333(1):189-97.

29. Mattson MP. Dietary factors, hormesis and health. Ageing Res Rev. 2008 Jan;7(1):43-8.

30. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science. 1996 Jul 5;273(5271):59-63.

31. Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont EM, et al. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 30;93(9):4159-64.

32. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. Antioxid Redox Signal. 2006 Mar-Apr;8(3-4):572-81.

33. Jolly CA, Muthukumar A, Avula CP, Troyer D, Fernandes G. Life span is prolonged in food-restricted autoimmune-prone (NZB x NZW)F(1) mice fed a diet enriched with (n-3) fatty acids. J Nutr. 2001 Oct;131(10):2753-60.

34. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. Ann N Y Acad Sci. 2001 Apr;928:327-35.

35. Kim HJ, Yu BP, Chung HY. Molecular exploration of age-related NF-kappaB/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney. Free Radic Biol Med. 2002 May 15;32(10):991-1005.

36. Ye SM, Johnson RW. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. J Neuroimmunol. 1999 Jan 1;93(1-2):139-48.

37. Richwine AF, Godbout JP, Berg BM, Chen J, Escobar J, Millard DK, et al. Improved psychomotor performance in aged mice fed diet high in antioxidants is associated with reduced ex vivo brain interleukin-6 production. Brain Behav Immun. 2005 Nov;19(6):512-20.

38. Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, Estruch R, de la Torre R, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. Arch Intern Med. 2007 Jun 11;167(11):1195-203.

39. DeLegge MH, Smoke A. Neurodegeneration and inflammation. Nutr Clin Pract. 2008 Feb;23(1):35-41.

40. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 2000 May-Jun;21(3):383-421.

41. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, et al. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10016-20.

42. Aisen PS. Inflammation and Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. Gerontology. 1997;43(1-2):143-9.

43. Mitrou PN, Kipnis V, Thiebaut AC, Reedy J, Subar AF, Wirfalt E, et al. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. Arch Intern Med. 2007 Dec 10;167(22):2461-8.

44. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. Mol Cell Biol. 1993 May;13(5):2909-18.

45. Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. J Neurochem. 2000 Jul;75(1):314-20.

46. Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. Biochem Soc Symp. 2004(71):157-76.

47. Hyun DH, Emerson SS, Jo DG, Mattson MP, de Cabo R. Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 26;103(52):19908-12.

48. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. Journal of Neurochemistry. 2002;82(6):1367-75.

49. Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, et al. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 28;101(52):18171-6.

50. Mattson MP, Cutler RG, Camandola S. Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. Neuromolecular Med. 2007;9(1):17-20.

51. Reiser K, McGee C, Rucker R, McDonald R. Effects of aging and caloric restriction on extracellular matrix biosynthesis in a model of injury repair in rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1995 Jan;50A(1):B40-7.

52. Martin B, Pearson M, Kebejian L, Golden E, Keselman A, Bender M, et al. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. Endocrinology. 2007 Sep;148(9):4318-33.

53. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. Mech Ageing Dev. 2006 Jan;127(1):1-7.

54. Holloszy JO, Fontana L. Caloric restriction in humans. Exp Gerontol. 2007 Aug;42(8):709-12.

55. Redman LM, Martin CK, Williamson DA, Ravussin E. Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes. Physiol Behav. 2008 Aug 6;94(5):643-8.

56. Johnson BC, Gajjar A, Kubo C, Good RA. Calories versus protein in onset of renal disease in NZB x NZW mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Aug;83(15):5659-62.

57. Lueker CE, Meyer JH, Smith JD. Influence of food and energy restriction and subsequent recovery on body composition and food utilization of rats. J Nutr. 1956 Sep 10;60(1):121-8.

58. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. Mech Ageing Dev. 1990 Jul;55(1):69-87.

59. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, et al. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 17;105(24):8215-20.

60. Nakamura H, Kouda K, Fan W, Watanabe T, Takeuchi H. Suppressive effects on allergic contact dermatitis by short-term fasting. Toxicol Pathol. 2001 Mar-Apr;29(2):200-7.

61. Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. J Nutr Biochem. 2005 Mar;16(3):129-37.

62. Masoro EJ. Dietary restriction-induced life extension: a broadly based biological phenomenon. Biogerontology. 2006 Jun;7(3):153-5.

63. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev. 2005 Sep;126(9):913-22.

64. Mattson MP. The need for controlled studies of the effects of meal frequency on health. Lancet. 2005 Jun 4-10;365(9475):1978-80.

65. Taylor MA, Garrow JS. Compared with nibbling, neither gorging nor a morning fast affect short-term energy balance in obese patients in a chamber calorimeter. Int J Obes Relat Metab Disord. 2001 Apr;25(4):519-28.

66. Al Suwaidi J, Bener A, Suliman A, Hajar R, Salam AM, Numan MT, et al. A population based study of Ramadan fasting and acute coronary syndromes. Heart. 2004 Jun;90(6):695-6.

67. Lamri-Senhadji MY, El Kebir B, Belleville J, Bouchenak M. Assessment of dietary consumption and time-course of changes in serum lipids and lipoproteins before, during and after Ramadan in young Algerian adults. Singapore Med J. 2009 Mar;50(3):288-94.

68. Adlouni A, Ghalim N, Benslimane A, Lecerf JM, Saile R. Fasting during Ramadan induces a marked increase in high-density lipoprotein cholesterol and decrease in low-density lipoprotein cholesterol. Ann Nutr Metab. 1997;41(4):242-9.

69. Roky R, Houti I, Moussamih S, Qotbi S, Aadil N. Physiological and chronobiological changes during Ramadan intermittent fasting. Ann Nutr Metab. 2004;48(4):296-303.

70. Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. Am J Clin Nutr. 2005 Jan;81(1):69-73.

71. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. Trends Neurosci. 2010 May;33(5):230-40.

72. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. J Neurochem. 2011 Jan;116(1):1-9.

73. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron. 2002 Aug 15;35(4):605-23.

74. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annu Rev Biochem. 1999;68:821-61.

75. Pugazhenthi S, Boras T, O'Connor D, Meintzer MK, Heidenreich KA, Reusch JE. Insulin-like growth factor I-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12 cells. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated pathway. J Biol Chem. 1999 Jan 29;274(5):2829-37.

76. Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, et al. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature. 1994 Jul 21;370(6486):223-6.

77. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. Annu Rev Neurosci. 1998;21:127-48.

78. Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003 Apr 29;358(1432):805-14.

79. Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. Behav Brain Res. 2002 Jul 18;133(2):135-41.

80. Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci. 2003 Apr 15;23(8):3547-54.

81. Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL. Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience. 2007 Dec 19;150(4):743-53.

82. Kogan I, Richter-Levin G. Activation pattern of the limbic system following spatial learning under stress. Eur J Neurosci. 2008 Feb;27(3):715-22.

83. Porte Y, Buhot MC, Mons N. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiol Aging. 2008 Oct;29(10):1533-46.

84. Porte Y, Buhot MC, Mons NE. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem. 2008;15(12):885-94.

85. Sung JY, Goo JS, Lee DE, Jin DQ, Bizon JL, Gallagher M, et al. Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. Learn Mem. 2008 Apr;15(4):183-8.

86. Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. Nat Neurosci. 1998 Nov;1(7):595-601.

87. Guzowski JF, McGaugh JL. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2693-8.

88. Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. Cell Death Differ. 2006 May;13(5):852-60.

89. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):3981-92.

90. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? Nat Rev Neurosci 2002;3(3):216-27.

91. Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. J Neurosci Res 2007 Oct 29; [Epub ahead of print] 2007.

92. Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. J Neurosci Res. 2008 Mar;86(4):845-60.

93. Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, et al. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. Mol Brain. 2009;2:3.

94. Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. Neuropharmacology 2003 Dec;45(8):1120-9. 2003;45(8):1120-9.

95. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. Int J Biochem Cell Biol 2006;38(10):1647-53.

96. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60.

97. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. Science. 1997 Oct 31;278(5339):866-9.

98. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. Science. 1997 Oct 31;278(5339):860-6.

99. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. Cell. 1997 Oct 17;91(2):243-52.

100. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. Nature. 1997 Aug 7;388(6642):548-54.

101. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. Cell. 1998 Jun 26;93(7):1231-40.

102. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. Nature. 1998 Sep 17;395(6699):297-300.

103. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell. 2002 Apr;109 (Suppl):S81-96.

104. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.

105. Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Duarte CB. Neurotrophin signaling and cell survival. In: Malva JO, Rego AC, Cunha RA, Oliveira CR, editors. Interaction between neurons and glia in aging and disease: Berlin: Springer; 2007. p. 137-72.

106. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. Mol Cell Biol. 2004 Dec;24(24):10941-53.

107. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci. 1997 Jun;20(6):252-8.

108. Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. J Clin Invest. 2001 Feb;107(3):247-54.

109. Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, et al. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. Exp Neurol. 2008 Sep;213(1):114-21.

110. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature. 1996 Jul 18;382(6588):225-30.

111. Wharton KA, Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. Dev Biol. 2003 Jan 1;253(1):1-17.

112. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. Growth Factors. 2005 Jun;23(2):111-6.

113. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. Exp Mol Med. 2006 Feb 28;38(1):1-10.

114. You J, Nguyen AV, Albers CG, Lin F, Holcombe RF. Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2008 Apr;53(4):1013-9.

115. Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in Drosophila development and immunity. Nature. 2005 Sep 29;437(7059):746-9.

116. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Mar;28(3):504-10.

117. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. Cell. 1992 Jun 26;69(7):1073-87.

118. Parr BA, McMahon AP. Wnt genes and vertebrate development. Current Opinion in Genetics & Development. 1994;4(4):523-8.

119. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev. 1997 Dec 15;11(24):3286-305.

120. Ciani L, Salinas PC. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. Nat Rev Neurosci. 2005 May;6(5):351-62.

121. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

122. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell. 1985 Oct;42(3):791-8.

123. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. Cell. 1985 Oct;42(3):779-89.

124. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell. 1988 Jan 29;52(2):269-79.

125. Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. Immunol Cell Biol. 2007 Aug-Sep;85(6):471-5.

126. Iwamura C, Nakayama T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. Curr Allergy Asthma Rep. 2008 Mar;8(1):7-13.

127. Eriksson M, Meadows SK, Basu S, Mselle TF, Wira CR, Sentman CL. TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. J Immunol. 2006 May 15;176(10):6219-24.

128. Sutmuller R, Garritsen A, Adema GJ. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. Ann Rheum Dis. 2007 Nov;66 (Suppl 3):iii91-5.

129. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. 2006 May;117(5):979-87.

130. Sabroe I, Whyte MK. Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. Biochem Soc Trans. 2007 Dec;35(Pt 6):1492-5.

131. Yoshimoto T, Nakanishi K. Roles of IL-18 in basophils and mast cells. Allergol Int. 2006 Jun;55(2):105-13.

132. Gibson FC, 3rd, Ukai T, Genco CA. Engagement of specific innate immune signaling pathways during Porphyromonas gingivalis induced chronic inflammation and atherosclerosis. Front Biosci. 2008;13:2041-59.

133. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol. 2004 Sep 15;173(6):3916-24.

134. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. Glia. 2003 Sep;43(3):281-91.

135. Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. J Neuroimmune Pharmacol. 2007 Dec;2(4):297-312.

136. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 21;104(34):13798-803.

137. Gangloff M, Weber AN, Gibbard RJ, Gay NJ. Evolutionary relationships, but functional differences, between the Drosophila and human Toll-like receptor families. Biochem Soc Trans. 2003 Jun;31(Pt 3):659-63.

138. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003;21:335-76.

139. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. J Mol Med. 2006 Sep;84(9):712-25.

140. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):24-32.

141. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. Immunol Cell Biol. 2006 Aug;84(4):333-41.

142. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. J Neurosci. 2008 Mar 5;28(10):2320-31.

143. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):3-10.

144. Liu Y, Chen GY, Zheng P. CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. Trends Immunol. 2009 Dec;30(12):557-61.

145. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, et al. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. Development. 2008 Jun;135(11):2001-11.

146. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med. 2007 Nov;13(11):460-9.

147. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, et al. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. Nat Cell Biol. 2007 Sep;9(9):1081-8.

148. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. Free Radical Biology and Medicine. 2010;48(9):1121-32.

149. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2006 Nov;116(11):3015-25.

150. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. Diabetologia. 2007 Jun;50(6):1267-76.

151. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007 Aug;56(8):1986-98.

152. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. Circ Res. 2007 Jun 8;100(11):1589-96.

153. Staiger H, Staiger K, Stefan N, Wahl HG, Machicao F, Kellerer M, et al. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. Diabetes. 2004 Dec;53(12):3209-16.

154. Senn JJ. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. J Biol Chem. 2006 Sep 15;281(37):26865-75.

155. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. J Biol Chem. 2007 Nov 30;282(48):35279-92.

156. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. Immunology. 2009 Feb;126(2):233-45.

157. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. Diabetes. 2008 Oct;57(10):2595-602.

158. Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. Neuropharmacology. 2003 Dec;45(8):1120-9.

159. Babovic D, O'Tuathaigh CM, O'Connor AM, O'Sullivan GJ, Tighe O, Croke DT, et al. Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. Neuroscience. 2008 Sep 9;155(4):1021-9.

160. Gortz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambree O, Keyvani K, Paulus W, et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. Behav Brain Res. 2008 Aug 5;191(1):43-8.

161. Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. J Neurochem. 1996 Aug;67(2):662-8.

162. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

163. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

164. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002 May 1;30(9):e36.

165. O'Tuathaigh CM, Babovic D, O'Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, et al. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. Neuroscience. 2007 Jun 15;147(1):18-27.

166. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol. 1979 Feb;93(1):74-104.

167. Barnes CA. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. Trends Neurosci. 1988 Apr;11(4):163-9.

168. Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. Cell. 1995 Jun 16;81(6):905-15.

169. Barnes CA, Nadel L, Honig WK. Spatial memory deficit in senescent rats. Can J Psychol. 1980 Mar;34(1):29-39.

170. Pompl PN, Mullan MJ, Bjugstad K, Arendash GW. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. J Neurosci Methods. 1999 Feb 1;87(1):87-95.

171. Kennard JA, Woodruff-Pak DS. Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. Front Aging Neurosci. 2011;3:9.

172. Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, Calogero AE, Listwak SJ, Aksentijevich S, et al. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. Brain Res. 1992 Jan 20;570(1-2):54-60.

173. Barrett GL, Bennie A, Trieu J, Ping S, Tsafoulis C. The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. Behav Neurosci. 2009 Jun;123(3):533-8.

174. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. Behav Brain Res. 2009 Mar 2;198(1):247-51.

175. Gold PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. Behav Neural Biol. 1986 Jul;46(1):87-98.

176. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem. 1997 Nov;68(3):285-316.

177. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2ª ed: Porto Alegre: Artmed; 2002.

178. Quevedo J, Martins MR, Izquierdo I. Alterações Cerebrais e Memória. In: Demência e Transtornos Cognitivos em Idosos, cap. 1. RJ: Guanabara Koogan; 2006.

179. Pugh CR, Kumagawa K, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. Brain Behav Immun. 1998 Sep;12(3):212-29.

180. Arai K, Matsuki N, Ikegaya Y, Nishiyama N. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. Jpn J Pharmacol. 2001 Nov;87(3):195-201.

181. Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 11;100(23):13632-7.

182. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. Science. 2003 Dec 5;302(5651):1760-5.

183. Nolan Y, Vereker E, Lynch AM, Lynch MA. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. Exp Neurol. 2003 Dec;184(2):794-804.

184. Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. Neurobiol Dis. 2003 Oct;14(1):133-45.

185. Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. Systemic interleukin-1 beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. Neuroscience. 1993 Mar;53(2):297-301.

186. Lamprecht R, Dudai Y. Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. Learn Mem. 1996 Jul-Aug;3(1):31-41.

187. Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. J Neurosci. 1997 Nov 1;17(21):8443-50.

188. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. Cell. 1994 Oct 7;79(1):59-68.

189. Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA, Jr., Neve RL, Nestler EJ, Davis M. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. J Neurosci. 2001 Apr 1;21(7):2404-12.

190. Dworkin S, Malaterre J, Hollande F, Darcy PK, Ramsay RG, Mantamadiotis T. cAMP response element binding protein is required for mouse neural progenitor cell survival and expansion. Stem Cells. 2009 Jun;27(6):1347-57.

191. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, et al. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. J Neurosci. 2002 May 1;22(9):3673-82.

192. Boonen RA, van Tijn P, Zivkovic D. Wnt signaling in Alzheimer's disease: up or down, that is the question. Ageing Res Rev. 2009 Apr;8(2):71-82.

193. De Ferrari GV, Chacon MA, Barria MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, et al. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. Mol Psychiatry. 2003 Feb;8(2):195-208.

194. Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC. Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. Exp Cell Res. 2004 Jul 1;297(1):186-96.

195. Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(16):7789-93.

196. Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, et al. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9637-41.

197. Chong ZZ, Maiese K. Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. Histol Histopathol. 2004 Apr;19(2):495-504.

198. Garrido JL, Godoy JA, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC. Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. FASEB J. 2002 Dec;16(14):1982-4.

199. Savage MJ, Trusko SP, Howland DS, Pinsker LR, Mistretta S, Reaume AG, et al. Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. J Neurosci. 1998 Mar 1;18(5):1743-52.

200. Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. Development. 2000 Feb;127(3):457-67.

201. Kawamoto EM, Gleichmann M, Yshii LM, de Sa Lima L, Mattson MP, Scavone C. Activation of Canonical Wnt signaling by Wnt 3a protein protects PC12 cells against oxidative and apoptotic insults. Braz J Med Biol Res. In press.

202. Toledo EM, Inestrosa NC. Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPswe/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. Mol Psychiatry. 2010 Mar;15(3):272-85.

203. Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 10;102(19):6990-5.

204. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, et al. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol Dis. 2006 Dec;24(3):516-24.

205. Marcus WL. Lithium: a review of its pharmacokinetics, health effects, and toxicology. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1994;13(2):73-9.

206. Chang EH, Savage MJ, Flood DG, Thomas JM, Levy RB, Mahadomrongkul V, et al. AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 28;103(9):3410-5.

207. Morris RG. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001 Sep 29;356(1413):1453-65.

208. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

209. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. Ann N Y Acad Sci. 2008 Nov;1143:1-20.

210. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk. J Dent Res. 2011 Apr;90(4):417-27.

211. Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. J Biol Chem. 2002 Aug 30;277(35):32124-32.

212. Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. J Immunol. 2003 Jul 15;171(2):717-25.

213. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. Diabetologia. 2009 Aug;52(8):1665-8.

214. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. Curr Opin Pharmacol. 2009 Dec;9(6):737-43.

215. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.

216. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007 Jul;56(7):1761-72.

217. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology. 2005 Oct;146(10):4192-9.

218. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. Cell Metab. 2009 Oct;10(4):249-59.

219. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 May;296(5):E1003-12.

220. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. J Neurosci. 2009 Jan 14;29(2):359-70.

221. Grassi G, Seravalle G, Colombo M, Bolla G, Cattaneo BM, Cavagnini F, et al. Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans. Circulation. 1998 May 26;97(20):2037-42.

222. Lane MA, Ball SS, Ingram DK, Cutler RG, Engel J, Read V, et al. Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points. Am J Physiol. 1995 May;268(5 Pt 1):E941-8.

223. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):6216-20.

224. Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, Haluzikova D, Horinek A, Matoulek M, et al. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Apr;96(4):E606-13.

225. Sun D, Muthukumar AR, Lawrence RA, Fernandes G. Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Sep;8(5):1003-11.

226. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):15107-12.

227. Lee KM, Yeo M, Choue JS, Jin JH, Park SJ, Cheong JY, et al. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against Helicobacter pylori-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. Helicobacter. 2004 Dec;9(6):632-42.

228. Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R, Nigam S. Candida albicans induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. J Immunol. 2003 Sep 15;171(6):3047-55.

229. Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A. Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: Regulation by synaptic activity. Mol Brain Res. 1996 Jun;38(2):179-90.

230. Mattson MP. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. Neurochem Res. 2005 Jun-Jul;30(6-7):883-93.

231. Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 26;92(20):9077-81.

232. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. Nat Neurosci. 2003 Oct;6(10):1072-8.

233. Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, et al. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. J Neurochem. 2001 Jul;78(2):254-64.

234. Jiang X, Tian F, Mearow K, Okagaki P, Lipsky RH, Marini AM. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. J Neurochem. 2005 Aug;94(3):713-22.

235. Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, et al. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7531-6.

236. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2642-7.

237. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. Science. 1996 Nov 22;274(5291):1383-5.

238. Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. Brain Behav Immun. 2008 Mar;22(3):301-11.

239. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. Behav Brain Res. 2001 Sep 28;124(1):47-54.

240. Sparkman NL, Buchanan JB, Heyen JR, Chen J, Beverly JL, Johnson RW. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. J Neurosci. 2006 Oct 18;26(42):10709-16.

241. Takao T, Culp SG, Newton RC, De Souza EB. Type I interleukin-1 receptors in the mouse brain-endocrine-immune axis labelled with [125I]recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. J Neuroimmunol. 1992 Nov;41(1):51-60.

242. Parnet P, Kelley KW, Bluthe RM, Dantzer R. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. J Neuroimmunol. 2002 Apr;125(1-2):5-14.

243. Camandola S, Mattson MP. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. Expert Opin Ther Targets. 2007 Feb;11(2):123-32.

244. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. J Neurosci. 2006 Apr 5;26(14):3813-20.

245. Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. Synapse. 2000 Feb;35(2):151-9.

246. Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, et al. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. Mol Cell Biol. 2006 Apr;26(8):2936-46.

247. Taylor DL, Jones F, Kubota ES, Pocock JM. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. J Neurosci. 2005 Mar 16;25(11):2952-64.

248. Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(8):1425-30.

249. Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. Arch Surg. 1998 May;133(5):558-67.

250. Bolger AP, Sharma R, von Haehling S, Doehner W, Oliver B, Rauchhaus M, et al. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. Am J Cardiol. 2002 Aug 15;90(4):384-9.

251. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):31868-74.

252. Dokka S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Jun;280(6):L1196-202.

253. Mulligan MS, Jones ML, Vaporciyan AA, Howard MC, Ward PA. Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. J Immunol. 1993 Nov 15;151(10):5666-74.

254. Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA. Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. J Immunol. 1995 Apr 1;154(7):3454-60.

255. Gunnett CA, Heistad DD, Faraci FM. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: role of superoxide. Diabetes. 2002 Jun;51(6):1931-7.

256. Fisman EZ, Motro M, Tenenbaum A. Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification: the bad, the good and the aloof. Cardiovasc Diabetol. 2003 Sep 12;2:11.

257. Gil A, Maria Aguilera C, Gil-Campos M, Canete R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. Br J Nutr. 2007 Oct;98 Suppl 1:S121-6.

258. Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, Taraborelli T, Guagnano MT, Michetti N, et al. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Oct;90(10):5876-9.

259. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. JAMA. 2003 Apr 9;289(14):1799-804.

260. Sharman MJ, Volek JS. Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. Clin Sci (Lond). 2004 Oct;107(4):365-9.

261. Ugochukwu NH, Figgers CL. Caloric restriction inhibits up-regulation of inflammatory cytokines and TNF-alpha, and activates IL-10 and haptoglobin in the plasma of streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr Biochem. 2007 Feb;18(2):120-6.

262. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prosch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. Eur J Immunol. 1999 Oct;29(10):3098-104.

263. Bay-Richter C, Janelidze S, Hallberg L, Brundin L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. Behav Brain Res. 2011 Sep 12;222(1):193-9.

264. Foster SJ, McCormick LM, Ntolosi BA, Campbell D. Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. Agents Actions. 1993;38:C77-9.

265. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. J Biol Chem. 1996 Dec 27;271(52):33157-60.

266. Endo T, Ogushi F, Sone S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down- regulated by IL-13, but not by IFN-gamma. The Journal of Immunology. 1996 March 15, 1996;156(6):2240-6.

267. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 1994 May 1, 1994;266(5):G822-G7.

268. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Cancer Res. 2001 Jun 1;61(11):4375-81.

269. Minghetti L, Walsh DT, Levi G, Perry VH. In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. J Neuropathol Exp Neurol. 1999 Nov;58(11):1184-91.

270. Vlahos R, Stewart AG. Interleukin-1alpha and tumour necrosis factor-alpha modulate airway smooth muscle DNA synthesis by induction of cyclo-oxygenase-2: inhibition by dexamethasone and fluticasone propionate. Br J Pharmacol. 1999 Mar;126(6):1315-24.

271. Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. Biochem Pharmacol. 2000 Jan 15;59(2):187-94.

272. Barrios-Rodiles M, Chadee K. Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN-gamma in human macrophages. J Immunol. 1998 Sep 1;161(5):2441-8.

273. Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor alpha in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem. 1999 Oct 8;274(41):29138-48.

274. Niiro H, Otsuka T, Tanabe T, Hara S, Kuga S, Nemoto Y, et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. Blood. 1995 Jun 15;85(12):3736-45.

275. Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. Blood. 1997 Mar 1;89(5):1621-8.

276. Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J, Jimenez W, Fresno M, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells--transcriptional inhibition by IL-13. Eur J Biochem. 1999 Feb;260(1):268-74.

277. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. Arthritis Rheum. 1999 Apr;42(4):710-8.

278. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J Biol Chem. 1995 Dec 29;270(52):31315-20.

279. Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. J Biol Chem. 1994 Apr 22;269(16):11769-75.

280. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 1991 Dec 1;147(11):3815-22.

281. Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA. Il-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. J Immunol. 2001 Feb 15;166(4):2674-80.

282. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):499-511.

283. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 Is Regulated by Toll-Like Receptor-4 (TLR4) Signaling: Role in Proliferation and Apoptosis in the Intestine. Gastroenterology. 2006;131(3):862-77.

284. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. Nat Rev Cancer. 2004 Aug;4(8):579-91.

285. Subbaramaiah K, Howe LR, Bhardwaj P, Du B, Gravaghi C, Yantiss RK, et al. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Mar;4(3):329-46.

286. Fenton JI, Nunez NP, Yakar S, Perkins SN, Hord NG, Hursting SD. Diet-induced adiposity alters the serum profile of inflammation in C57BL/6N mice as measured by antibody array. Diabetes Obes Metab. 2009 Apr;11(4):343-54.

287. Hursting SD, Smith SM, Lashinger LM, Harvey AE, Perkins SN. Calories and carcinogenesis: lessons learned from 30 years of calorie restriction research. Carcinogenesis. 2010 Jan;31(1):83-9.

288. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. FASEB J. 2004 Nov;18(14):1657-69.

289. Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre MP, Beliveau R. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. J Neuroinflammation. 2009;6:8.

290. Badie B, Schartner JM, Hagar AR, Prabakaran S, Peebles TR, Bartley B, et al. Microglia cyclooxygenase-2 activity in experimental gliomas: possible role in cerebral edema formation. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):872-7.

291. Temel SG, Kahveci Z. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytes and microglia in human oligodendroglioma and astrocytoma. J Mol Histol. 2009 Oct;40(5-6):369-77.

292. Portnow J, Suleman S, Grossman SA, Eller S, Carson K. A cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor compared with dexamethasone in a survival study of rats with intracerebral 9L gliosarcomas. Neuro Oncol. 2002 Jan;4(1):22-5.

293. Mulrooney TJ, Marsh J, Urits I, Seyfried TN, Mukherjee P. Influence of caloric restriction on constitutive expression of NF-kappaB in an experimental mouse astrocytoma. PLoS One. 2011;6(3):e18085.

294. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. Cancer. 2001 Jan 15;91(2):333-8.

295. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. Cancer Res. 1999 Mar 1;59(5):987-90.

296. Lashinger LM, Malone LM, McArthur MJ, Goldberg JA, Daniels EA, Pavone A, et al. Genetic reduction of insulin-like growth factor-1 mimics the anticancer effects of calorie restriction on cyclooxygenase-2-driven pancreatic neoplasia. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Jul;4(7):1030-40.

297. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010 Dec 1;49(11):1603-16.

298. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Prog Neurobiol. 2001 May;64(1):51-68.

299. Contestabile A, Monti B, Ciani E. Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. Curr Med Chem. 2003 Oct;10(20):2147-74.

300. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nat Rev Neurosci. 2007 Oct;8(10):766-75.

301. Susswein AJ, Katzoff A, Miller N, Hurwitz I. Nitric oxide and memory. Neuroscientist. 2004 Apr;10(2):153-62.

302. Edwards TM, Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. Neurosci Biobehav Rev. 2007;31(3):413-25.

303. Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem. 2006 Jun;97(6):1676-89.

304. Zanelli SA, Trimmer PA, Solenski NJ. Nitric oxide impairs mitochondrial movement in cortical neurons during hypoxia. J Neurochem. 2006 May;97(3):724-36.

305. Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog Neurobiol. 2005 Jun;76(2):126-52.

306. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Bao W, et al. Changes in the nitric oxide system contribute to effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. Rejuvenation Res. 2011 Feb;14(1):33-43.

307. Leist M, Fava E, Montecucco C, Nicotera P. Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. Eur J Neurosci. 1997 Jul;9(7):1488-98.

308. Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 20;1498(1):72-9.

309. Orrego F, Villanueva S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. Neuroscience. 1993 Oct;56(3):539-55.

310. Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, et al. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. Nat Neurosci. 2002 Sep;5(9):868-73.

311. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1988 Oct;1(8):623-34.

312. Newcomb R, Sun X, Taylor L, Curthoys N, Giffard RG. Increased production of extracellular glutamate by the mitochondrial glutaminase following neuronal death. J Biol Chem. 1997 Apr 25;272(17):11276-82.

313. Huang WT, Niu KC, Chang CK, Lin MT, Chang CP. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. Eur J Pharmacol. 2008 Sep 28;593(1-3):105-11.

314. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8514-9.

315. Barger SW, Harmon AD. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):878-81.

316. Barger SW, Basile AS. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. J Neurochem. 2001 Feb;76(3):846-54.

317. Rosi S, Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Worley PF, Barnes CA, Wenk GL. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. Neuroscience. 2006 Nov 3;142(4):1303-15.

318. Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. Neurology. 1992 Apr;42(4):733-8.

319. de Jong EK, Dijkstra IM, Hensens M, Brouwer N, van Amerongen M, Liem RS, et al. Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. J Neurosci. 2005 Aug 17;25(33):7548-57.

ANEXOS

Anexo A - Sequência do RNAm do gene *Cox-2*

NM_017232.3 Rattus norvegicus cyclooxygenase 2 (*Cox-2*), RNAm

ATGCTCTTCCGAGCTGTGCTGCTCTGCGCTGCCCTGGCGCTCAGCCATGCAGCAAATCCTTGCTGTTCCAACCCA
TGTCAAAACCGTGGTGAATGTATGAGCATAGGATTTGACCAATATAAATGTGACTGTACCCGGACTGGATTCTAC
GGTGAAAACTGTACTACGCCTGAGTTTCTGACAAGAATCAAATTACTGCTGAAGCCCACCCCAAACACAGTACAC
TACATCCTGACCCACTTCAAGGGAGTCTGGAACATTGTGAACAACATTCCCTTCCTTCGGAATTCAATCATGAGA
TACGTGTTGACGTCCAGATCACATTTGATTGACAGCCCACCAACTTACAATGTGCACTACGGTTACAAAAGTTGG
GAAGCTTTCTCCAACCTCTCCTACTACACCAGGGCCCTTCCTCCTGTGGCTGATGACTGCCCAACTCCCATGGGT
GTGAAAGGAAATAAGGAACTTCCTGATTCAAAAGAAGTTCTGGAAAAGGTTCTTCTGAGGAGAGAGTTCATCCCG
GATCCCCAAGGCACAAATATGATGTTCGCATTCTTTGCCCAGCACTTCACTCATCAGTTTTTCAAGACAGATCAG
AAGCGAGGACCTGGGTTCACCCGAGGACTGGGCCATGGAGTGGACTTAAATCATGTTTACGGTGAAACTCTAGAC
AGACAACATAAACTTCGACTTTTCCAGGATGGAAAATTGAAATATCAGGTCATCGGTGGAGAGGTGTATCCTCCC
ACAGTCAAAGACACTCAGGTAGACATGATCTACCCTCCCCACGTCCCTGAGCACCTGCGGTTCGCTGTGGGGCAG
GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCGGGTCTGATGATGTATGCTACCATCTGGCTTCGGGAGCACAACAGAGTGTGTGAT
ATACTCAAACAGGAGCATCCTGAGTGGGATGACGAGCGACTGTTCCAAACCAGCAGGCTCATACTGATAGGAGAG
ACGATCAAGATAGTGATCGAAGACTACGTGCAACACCTGAGCGGTTACCACTTCAAACTCAAGTTCGACCCAGAG
CTGCTTTTCAACCAGCAGTTCCAGTATCAGAACCGCATTGCCTCTGAATTCAACACACTCTATCACTGGCATCCG
CTGCTGCCGGACACCTTCAACATTGAAGACCAGGAGTACACTTTCAAACAGTTTCTCTACAACAACTCCATCCTC
CTTGAACACGGACTTGCTCACTTTGTTGAGTCATTCACCAGACAGATTGCTGGCCGGGTTGCTGGGGGAAGGAAT
GTTCCAATCGCTGTACAAGCAGTGGCAAAGGCCTCCATTGACCAGAGCAGAGAGATGAAATACCAGTCTCTCAAT
GAGTACCGCAAACGCTTCTCCCTGAAACCTTACACATCGTTTGAAGAACTTACAGGAGAGAAAGAAATGGCTGCA
GAGTTGAAAGCCCTCTACCATGACATCGATGCCATGGAACTGTATCCCGCCCTGCTGGTGGAAAAGCCTCGTCCA
GATGCTATCTTTGGGGAGACCATGGTAGAACTTGGAGCTCCATTCTCCTTGAAAGGCCTTATGGGTAATCCCATC
TGTTCTCCTCAATACTGGAAACCTAGCACCTTCGGAGGAGAAGTGGGTTTTAGGATCATCAACACTGCCTCAATT
CAGTCTCTCATCTGCAATAATGTGAAAGGGTGTCCCTTTGCCTCTTTCAATGTGCAAGACCCGCAGCCTACCAAG
ACAGCCACCATCAACGCAAGTGCCTCCCACTCCAGACTAGATGACATTAACCCTACAGTACTAATCAAAAGGCGT
TCAACTGAGCTGTAA

Em vermelho o oligonucleotídeo iniciador direto e em azul a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Cox-2*.

Anexo B - Sequência do RNAm do gene *Nos2*

MN_012611.3 Rattus norvegicus nitric oxide synthase 2, inducible (*Nos2*), RNAm

AGTTGAAGACTGAGACTCTGGCCCCACGGGACACAGTGTCGCTGGTTTGAAACTTCTCAGCCACCTTGGTGAGGG
GACTGGACTTTTAGAGACGCTTCTGAGGTTCCTCAGGCTTGGGTCTTGTTAGCCTAGTCAACTACAAGCCCCACG
GAGAACAGCAGAGTTGGTGCAGAAGCACAAAGTCACAGACATGGCTTGCCCCTGGAAGTTTCTCTTCAGAGTCAA
ATCCTACCAAGGTGACCTGAAAGAGGAAAAGGACATTAACAACAACGTGGAGAAAACCCCAGGTGCTATTCCCAG
CCCAACAACACAGGATGACCCTAAGAGTCACAAGCATCAAAATGGTTTCCCCCAGTTCCTCACTGGGACTGCACA
GAATGTTCCAGAATCCCTGGACAAGCTGCATGTGACTCCATCGACCCGCCCACAGCACGTGAGGATCAAAAACTG
GGGCAATGGAGAGATTTTTCACGACACCCTTCACCACAAGGCCACCTCGGATATCTCTTGCAAGTCCAAATTATG
CATGGGGTCCATCATGAACTCCAAGAGTTTGACCAGAGGACCCAGAGACAAGCCCACCCCAGTGGAGGAGCTTCT
GCCTCAAGCCATTGAATTCATTAACCAGTATTATGGCTCCTTCAAAGAGGCAAAAATAGAGGAACATCTGGCCAG
GCTGGAAGCCGTAACAAAGGAAATAGAAACAACAGGAACCTACCAGCTCACTCTGGATGAGCTCATCTTTGCCAC
CAAGATGGCCTGGAGGAACGCCCCTCGCTGCATCGGCAGGATTCAGTGGTCCAACCTGCAGGTCTTCGATGCCCG
GAGCTGTAGCACTGCATCAGAAATGTTCCAGCATATCTGCAGACACATACTTTACGCCACTAACAGTGGCAACAT
CAGGTCGGCCATTACTGTGTTCCCCCAGCGGAGCGATGGGAAGCATGACTTCCGGATCTGGAATTCCCAGCTCAT
CCGGTACGCTGGCTACCAGATGCCCGATGGCACCATCAGAGGGGATCCTGCCACCTTGGAGTTCACCCAGTTGTG
CATCGACCTGGGCTGGAAGCCCCGCTATGGCCGCTTCGATGTGCTGCCTCTGGTCCTGCAGGCTCACGGTCAAGA
TCCAGAGGTCTTTGAAATCCCTCCTGATCTTGTGCTGGAGGTGACCATGGAGCATCCCAAGTACGAGTGGTTCCA
GGAGCTCGGGCTGAAGTGGTATGCGCTGCCTGCCGTGGCCAACATGCTCCTGGAGGTGGGTGGCCTCGAGTTCCC
AGCCTGCCCCTTCAATGGTTGGTACATGGGCACCGAGATTGGAGTCCGAGACTTCTGTGACACACAGCGCTACAA
CATCCTGGAGGAAGTGGGCAGGAGCATGGGCCTGGAGACCCACACACTGGCCTCCCTCTGGAAAGACCGGGCTGT
CACCGAGATCAATGCAGCTGTGCTCCATAGTTTTCAGAAGCAGAATGTGACCATCATGGACCACCACACAGCCTC
AGAGTCCTTCATGAAGCACATGCAGAATGAGTACCGGGCCCGAGGAGGCTGCCCTGCAGACTGGATTTGGCTGGT
CCCTCCGGTGTCCGGGAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGTTGAACTACGTCCTATCTCCATTCTACTA
CTACCAGATCGAGCCCTGGAAGACCCACATCTGGCAGGATGAGAAGCTGAGGCCCAGGAGGAGAGAGATCCGGTT
CACAGTCTTGGTGAAAGCGGTGTTCTTTGCTTCTGTGCTAATGCGGAAGGTCATGGCTTCCCGCGTCAGAGCCAC
AGTCCTCTTTGCTACTGAGACAGGAAAGTCGGAAGCGCTAGCCAGGGACCTGGCTGCCTTGTTCAGCTACGCCTT
CAACACCAAGGTTGTCTGCATGGAACAGTATAAGGCAAACACCTTGGAAGAGGAACAACTACTGCTGGTGGTTAC
AAGCACATTTGGCAATGGAGACTGCCCCAGCAATGGGCAGACTCTGAAGAAATCTCTGTTCATGATGAAAGAACT
CGGGCATACCTTCAGGTATGCGGTATTTGGCCTGGGCTCCAGCATGTACCCTCAGTTCTGTGCCTTTGCTCATGA
CATCGACCAGAAACTGTCTCACCTGGGAGCCTCCCAGCTTGCCCCAACCGGAGAAGGGGACGAACTCAGCGGGCA
GGAGGACGCCTTCCGCAGCTGGGCTGTGCAAACCTTCCGGGCAGCCTGTGAGACGTTCGATGTTCGAAGCAAACA
TTGCATTCAGATCCCGAAACGCTACACTTCCAACGCAACATGGGAGCCAGAGCAGTACAAGCTCACCCAGAGCCC
AGAGTCTCTAGACCTCAACAAAGCTCTCAGCAGCATCCACGCCAAGAACGTGTTCACCATGAGGCTGAAATCCCT
CCAGAATCTGCAGAGTGAGAAGTCCAGCCGCACCACCCTCCTTGTTCAACTCACCTTCGAGGGCAGCCGAGGCCC
CAGCTACCTACCTGGGGAACACCTGGGGATTTTCCCAGGCAACCAGACGGCCCTGGTGCAAGGGATCTTGGAGCG
AGTTGTGGATTGTTCTTCGCCAGACCAAACTGTGTGCCTGGAGGTTCTAGATGAGAGTGGCAGCTACTGGGTCAA
AGACAAGAGGCTTCCCCCCTGCTCACTCAGGCAAGCCCTCACCTACTTCCTGGACATCACTACCCCTCCCACCCA
GCTGCAGCTCCACAAGCTGGCCCGCTTTGCCACGGAAGAGACGCACAGGCAGAGGTTGGAGGCCTTGTGTCAGCC
CTCAGAGTACAACGATTGGAAGTTCAGCAACAACCCCACGTTCCTGGAGGTGCTGGAAGAGTTCCCATCATTGCG
TGTGCCTGCTGCCTTCCTGCTGTTGCAGCTCCCCATTCTGAAGCCCCGCTACTACTCCATCAGCTCCTCCCAGGA
CCACACCCCCTCGGAGGTCCACCTCACTGTGGCTGTGGTCACCTATCGCACCCGAGATGGTCAGGGTCCCCTGCA
CCATGGCGTCTGCAGCACTTGGATCAATAACCTGAAGCCCGAAGACCCAGTGCCCTGCTTTGTGCGGAGTGTCAG
TGGCTTCCAGCTCCCTGAGGACCCCTCCCAGCCCTGCATCCTCATTGGGCCCGGTACAGGCATTGCCCCCTTCCG
AAGTTTCTGGCAGCAGCGGCTCCATGACTCTCAGCACAGAGGGCTCAAAGGAGGCCGCATGACCTTGGTGTTTGG
GTGCAGGCACCCAGAGGAGGACCACCTCTATCAGGAAGAAATGCAGGAGATGGTCCGCAAGGGAGTGTTGTTCCA
GGTGCACACAGGCTACTCCCGGCTGCCCGGAAAACCCAAGGTCTACGTTCAAGACATCCTGCAGAAAGAGCTGGC
CGACGAGGTGTTCAGCGTGCTCCACGGGGAGCAGGGCCACCTTTATGTTTGTGGCGATGTGCGCATGGCTCGGGA
TGTGGCTACCACTTTGAAGAAGCTGGTGGCCGCCAAGCTGAACTTGAGTGAGGAGCAGGTTGAGGATTACTTCTT
CCAGCTCAAGAGCCAGAAACGTTATCATGAGGATATCTTCGGTGCGGTCTTTTCCTATGGAGCAAAAAAGGGCAA
CACCTTGGAGGAGCCCAAAGGCACAAGACTCTGACACCCAGAAGAGTTACAGCATCTGGCCCTAAATAAAATGAC
AGTGAGGGGTTTGGAGAGACAGAAGTGCGATCCCCCCCAAACCCCTCACATCATCTCCCCTCCTCTACCCTACCA
AGTAGTATTGTACTATTGTGGACTACTGAATCTCTCTCCTCTC

Em vermelho o oligonucleotídeo iniciador direto e em azul a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Nos2*.

Anexo C - Sequência do RNAm do gene *Tlr4*

NM_019178.1 Rattus norvegicus toll-like receptor 4 (*Tlr4*), RNAm

TTCTAACTTCCCTCCTGAGATGGGCTTATTAATTCTAGAACAAAACCAAAAGTGAGAATGCTAAGGTTGGCACTC
TCACTTCCTCTTGCTCTCTAGCCAGTATACCTTTGAATACAATATTTACAGAGGGGCAACCGCTGGGAGAGAAGG
GGCAGGGGCCCCAGGGACTCTGCCCTGCCACCATTTACAGTTCGTCATGCTTTCTCACGGCCTCCGCTGGTTGCA
GAAAATGCCAGGATGATGCCTCTCTTGCATCTGGCTGGGACTCTGATCATGGCATTGTTCCTTTCCTGCCTGAGA
CCAGGAAGCTTGAATCCCTGCATAGAGGTACTTCCTAATATTACCTACCAATGCATGGATCAGAATCTCAGCAAA
ATCCCTCATGACATCCCTTATTCAACCAAGAACCTAGATCTGAGCTTCAACCCCCTGAAGATCTTAAGAAGCTAT
AGCTTCACCAATTTCTCACAACTTCAGTGGCTGGATTTATCCAGGTGTGAAATTGAGACAATTGAAGACAAGGCA
TGGCATGGCTTAAACCAGCTCTCAACCTTGGTACTGACAGGAAACCCTATCAAGAGTTTTTCCCCAGGAAGTTTT
TCTGGACTAACAAATTTAGAGAATCTGGTGGCTGTGGAGACAAAAATGACCTCTCTAGAGGGTTTCCATATTGGA
CAGCTTATATCCTTAAAGAAACTAAATGTGGCTCATAATCTTATACATTCCTTTAAGTTGCCTGAATATTTTTCT
AATCTGACAAACCTAGAACATGTGGATCTTTCTTATAACTATATTCAAACTATTTCTGTCAAAGACTTACAGTTT
CTACGTGAAAATCCCCAAGTCAATCTCTCTTTAGACCTGTCTTTAAACCCAATTGACTCCATTCAAGCCCAAGCC
TTTCAGGGAATTAGGCTCCATGAATTGACTCTAAGAAGTAATTTTAATAGCTCAAATGTACTGAAAATGTGCCTT
CAAAACATGACTGGTTTACATGTCCATCGGTTGATCTTGGGAGAATTTAAAAATGAAAGGAATCTGGAAAGTTTT
GACCGTTCTGTCATGGAAGGACTATGCAATGTGAGCATTGATGAGTTCAGGTTAACATATATAAATCATTTTTCA
GATGATATTTATAATCTCAATTGCTTGGCAAATATTTCTGCAATGTCTTTCACAGGTGTACATATAAAACACATA
GCAGATGTTCCTAGGCATTTCAAATGGCAATCCTTATCAATCATTAGATGTCATCTTAAGCCTTTTCCAAAGCTG
AGTCTACCTTTTCTTAAAAGTTGGACTTTAACTACCAACAGAGAGGATATCAGCTTTGGTCAGTTGGCTCTGCCA
AGTCTCAGATATCTAGATCTTAGTAGAAATGCCATGAGCTTTAGAGGTTGCTGTTCTTATTCTGATTTTGGAACA
AACAACCTGAAGTACTTAGACCTCAGCTTCAATGGTGTCATCCTGATGAGTGCCAACTTCATGGGTCTAGAAGAG
CTGGAATACCTGGACTTTCAGCACTCCACTTTAAAAAAGGTCACAGAATTCTCAGTGTTCTTATCTCTTGAAAAA
CTTCTTTACCTTGACATCTCTTACACTAATACCAAAATTGACTTTGATGGCATATTTCTTGGCTTGATCAGTCTC
AACACTTTAAAAATGGCTGGCAATTCTTTCAAAGACAACACCCTTTCAAATGTCTTTACAAACACAACAAACTTA
ACATTCCTGGATCTTTCTAAATGCCAACTGGAACAGATATCTAGGGGGGTATTTGACACACTCTACAGACTCCAG
TTATTAAACATGAGTCACAACAACCTACTGTTTCTGGATCCATCCCATTATAAACAGCTGTACTCCCTCAGGACT
CTTGATTGCAGTTTCAATCGCATAGAGACATCCAAAGGAATACTGCAACATTTTCCAAAGAGTCTAGCCGTCTTC
AATCTGACTAATAATTCTGTTGCTTGTATATGTGAATATCAGAATTTCTTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAAAATG
TTCTTGGTGAATGTTGAACAAATGAAATGTGCATCACCTATAGACATGAAGGCCTCCCTGGTGTTGGATTTTACG
AATTCCACCTGTTATATATACAAGACTATCATCAGTGTATCGGTGGTCAGTGTGCTTGTGGTAGCCACTGTAGCA
TTTCTGATATACCACTTCTATTTTCACCTGATACTTATTGCTGGCTGTAAAAAGTACAGCAGAGGAGAAAGCATC
TATGATGCATTTGTGATCTACTCGAGCCAGAATGAGGACTGGGTGAGAAACGAGCTGGTAAAGAATTTAGAAGAA
GGAGTGCCCCGCTTTCAGCTTTGCCTTCATTACAGGGACTTTATTCCTGGTGTAGCCATTGCTGCCAACATCATC
CAGGAAGGCTTCCACAAGAGCCGGAAAGTTATTGTGGTGGTGTCTAGACACTTTATCCAGAGCCGTTGGTGTATC
TTTGAATATGAGATTGCTCAGACATGGCAGTTTCTGAGTAGCCGCTCTGGCATCATCTTCATTGTCCTTGAGAAA
GTGGAGAAGTCCTTGCTGAGGCAGCAGGTCGAATTGTATCGCCTTCTTAGCAGAAACACCTACCTCGAGTGGGAG
GACAATGCTCTGGGGAGGCACATCTTCTGGAGAAGACTCAAAAAAGCCCTGTTGGATGGAAAAGCCTTGAATCCA
GATGAAACATCAGAGGAAGAACAAGAAGCAACAACTTTGACCTGAGGAGTACAAAACTCTGCGCCTAAAACCCAT
TATGTTTACAATTTCCGAATGCTACAGTTCATCTGGGTTTCTGCTGTGGACAGGGAGGCCAGGGAGCACGAGGCT
TCTAACCTCAACGACCTCACAGGGCACAAGGAAGTAGCAATGTGATGAAACCCCATACTTTCCATGTGTATCAGG
TGTATGAATTAAGCAACTCAGGCAAAGAATCATAATCAGCAAAGTTTACTCTTATAAAACCTAAGGAGAGGAGGC
TAAGGCCCAGTGAGAACAGAAAGGAACATCATTCTTCTCTGGATCTTTGAATATAAGCACAACATGTAGTGTGCT
GCAGTTACCTTAGAAGAGTTTTGATCATTTAAACTGAAGTGAATGTTTCCTTCCTTTCCCTTTTTCTATTGAATA
TAATTTAAATGGCACTGACTCTTTTTGAGAGACCCTCATTCAAATTTCTTCTTCCATTTTCTGTCAGTTTCTTTT
TTTTTAAATCTAGTTCTACAAGAAATATGACTGATACATGCTCAAAGATATCCTGGTCAATCCTTAGAATGCTAT
ATTTATAAAATAAAAATTTTTAGTGTACTTTTATTTTTTAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Em vermelho o oligonucleotídeo iniciador direto e em azul a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Tlr4*.

Anexo D - Sequência do RNAm do gene *Hprt1*

NM_012583.2 Rattus norvegicus hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), RNAm

GCGGTAGCACCTCCTCCGCCAGCTTCCTCCTCAGACCGCTTTTCCCGCGAGCCGACCGGTTCTGTCATGTCGACC
CTCAGTCCCAGCGTCGTGATTAGTGATGATGAACCAGGTTATGACCTAGATTTATTTTGCATACCTAATCATTAT
GCTGAAGATTTGGAAAAGGTGTTTATTCCTCATGGACTGATTATGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATGTC
ATGAAGGAGATGGGAGGCCATCACATTGTGGCCCTCTGTGTGCTGAAGGGGGGCTATAAGTTCTTTGCTGACCTG
CTGGATTACATTAAAGCGCTGAATAGAAATAGTGATAGGTCCATTCCTATGACTGTAGATTTTATCAGACTGAAG
AGCTACTGTAATGACCAGTCAACGGGGGACATAAAAGTTATTGGTGGAGATGATCTCTCAACTTTAACTGGAAAG
AACGTCTTGATTGTTGAAGATATAATTGACACTGGTAAAACAATGCAGACTTTGCTTTCCTTGGTCAAGCAGTAC
AGCCCCAAAATGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTGTTGGATACAGGCCAGACTTT
GTTGGATTTGAAATTCCAGACAAGTTTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAGCACTTCAGGGATTTGAAT
CATGTTTGTGTCATCAGCGAAAGTGGAAAAGCCAAGTACAAAGCCTAAAAGACAGCGGCAAGTTGAATCTACAAG
AGTCCTGTTGATGTGGCCAGTAAAGAACTAGCAGACGTTCTAGTCCTGTGGCCATCTACTTAGTAAAGCTTTTGC
ATGAACCTTCTATGAATTTTATGGTTTTTATTTTTAGAAATGTCTGTTGCTGCGTCCCTTTTGATTTGCACTATG
AGCCTGTAGGCAGCCTACCGTCAGGTAGATTGTCACTTCCCTTGTGAGACAGACAGATCTCTTAAATTACCACTG
TTAAATAATAATACTGAGATTGTATCTGTAAGAAGGATTTAAAAAGAAGCTGTATTAGTTTTTTAATTGGTATTT
TAATTTTTATATATTCAGGAGAGAAAGATGTGATATTGTTAATTTAGAATAGTCTAAAGCGCTCAGTTTCATATC
AGTAACAGCATCTAAGAGGTTTCCCCAGTGGAATAAACATGTTTCAGCAGTGTGAATCGTTGTCAACCGTTCCTT
TTAAATGCAAATAAATACATTCTAAAAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Em vermelho o oligonucleotídeo iniciador direto e em azul a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Hprt1*.