



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Sara Pereira Braga**

**Efeitos da restrição calórica sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em camundongos nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL)**

**Florianópolis  
2023**

**Sara Pereira Braga**

**Efeitos da restrição calórica sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em camundongos nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

**Florianópolis  
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Braga, Sara Pereira

Efeitos da restrição calórica sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em camundongos nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) / Sara Pereira Braga ; orientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, 2023.

170 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Nocautes do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>). 4. Restrição calórica. 5. Alterações metabólicas e comportamentais. I. Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Nome completo da autora: Sara Pereira Braga

**Título:** Efeitos da restrição calórica sobre parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em camundongos nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL)

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 24 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr<sup>a</sup>. Laureane Nunes Masi  
CFS/CCB/UFSC (Membro Titular - Interno)

Prof.(a) Dr<sup>a</sup>. Jade de Oliveira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (Membro Titular - Externo)

Prof.(a) Dr<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem  
Universidade de Brasília - UnB (Membro Titular - Externo)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira  
Orientador

Florianópolis, 2023

## AGRADECIMENTOS

A conclusão dessa etapa da minha formação vem acompanhada de muito aprendizado, crescimento e gratidão pelas pessoas e situações que contribuíram para que essa conquista fosse alcançada. Expresso minha profunda gratidão a Deus pelo dom da vida, por Sua constante presença e por guiar meu caminho. Sua misericórdia, bondade, fidelidade, amor e cuidado têm sido fonte inesgotável de força e paz.

Minha gratidão ao meu orientador, o Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira. Sua atenção, paciência e direcionamento foram cruciais. O professor é para mim um exemplo, sempre pronto a compreender as individualidades de cada membro do grupo. Com brandura e sabedoria, sempre mostrou possibilidades, manifestou seu apoio e trouxe confiança para que eu fizesse minhas escolhas. Sinto-me privilegiada de trabalhar e aprender com o senhor. Obrigada pela confiança!

Aos colegas do Neuroscience Coworking Lab – Wellington Barros, Eslen Delanogare, Adriano Machado, Lucas Antônio, Talissa Dezanetti, Julia Kasprowics, Roberto Bayestorff, Peterson Rezer - agradeço pela amizade, companheirismo, pelas conversas descontraídas e pelo apoio constante na realização deste trabalho. À Scheila, minha gratidão pela disponibilidade e paciência em me ensinar e colaborar nos experimentos e execução do ELISA. Desejo muito sucesso na vida de cada um de vocês.

Ao Prof. Dr. Alex Rafacho, obrigada por abrir as portas do seu laboratório para que eu realizasse experimentos. Gratidão ao Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos, que foi meu parecerista designado pelo programa, acompanhou o desenvolvimento desse trabalho por meio do relatório anual e Mini-simpósio, que com suas sugestões e reflexões contribuiu para a lapidação desse estudo e na minha formação.

Também expresso meu agradecimento ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da UFSC, seus docentes e pós-graduandos, pela troca de conhecimento, ideias e apoio constante. Sou grata aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo e auxílio financeiro que tornaram esta jornada acadêmica possível. Gratidão à UFSC pelo acolhimento desde o mestrado, pela oportunidade de capacitação e pelo espaço físico.

À minha família, a base de tudo, minha gratidão. Minha mãe, que mesmo com as dificuldades que a vida lhe impôs, me incentivou a estudar e deu o suporte que precisei em cada momento. Meu pai, tia Sheila, Victor e meus irmãos Lucas, Thamara e Kayo, foram abrigo nos momentos difíceis e se alegraram com minhas conquistas. Eles transformaram meus sonhos e objetivos em metas compartilhadas e me deram total apoio ao longo dessa jornada. Aos amigos que compartilharam essa caminhada comigo - Ruth, Jessyca, Priscila, Sarah, Ailton e Renato - obrigado pelos momentos de diálogo, pelos sorrisos, pelos conselhos sábios e pelo apoio incansável. Gratidão ao senhor Zeferino e a senhora Ione, cuja amizade e cuidado em Florianópolis foram inestimáveis.

Por fim, minha sincera gratidão a todos que, embora não tenham sido mencionados diretamente, torceram por mim e que desempenharam algum papel na concretização deste trabalho. Muito obrigada!

*“É justo que muito custe o que muito vale”*

*Santa Teresa D'Ávila*

## RESUMO

O consumo de dietas ricas de gorduras e carboidratos pode favorecer o surgimento de sobrepeso e obesidade, considerados um dos maiores problemas de saúde pública, sendo fator de risco importante para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2, aterosclerose, hipertensão, dislipidemias, doença de Alzheimer e depressão. Modificações no estilo de vida demonstram melhorias nos parâmetros metabólicos e comportamentais induzidos pela dieta hiperlipídica. Neste sentido, a restrição calórica se configura como uma intervenção dietética que se propõe a reduzir a ingestão calórica sem causar deficiência de nutrientes, possuindo vários benefícios já descritos na literatura científica. O presente estudo se propôs a investigar o efeito da restrição calórica nas alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas induzidas por dieta hiperlipídica e nocautes do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). O primeiro protocolo experimental desse estudo utilizou camundongos C57Bl/6, machos e fêmeas, com idade de 3-4 meses ao início do experimento, tratados com dieta padrão para roedores ou dieta hiperlipídica, por 12 semanas. Após esse período os animais dos grupos restrição foram submetidos à restrição calórica de 30% com suas respectivas dietas por período de 4 semanas. Foram realizados testes comportamentais para avaliar memória e comportamento do tipo depressivo e ensaios bioquímicos. Nossos resultados mostraram que a dieta experimental foi capaz de aumentar a glicemia de jejum, colesterol plasmático e colesterol e triglicérido hepático, além de resultar em prejuízo na memória espacial de curto prazo. A intervenção com restrição calórica reduziu parâmetros metabólicos como massa corporal, gordura visceral e glicemia de jejum, entretanto quatro semanas de restrição não foi suficiente para melhorar/reverter parâmetros comportamentais prejudicados pela dieta rica em gorduras. No segundo protocolo experimental, utilizamos camundongos C57Bl/6 e nocautes para o receptor de LDL (LDL<sup>-/-</sup>), fêmeas, com 10 meses de idade no início do experimento. Os camundongos LDL<sup>-/-</sup> foram divididos em grupo controle, grupo restrição calórica de 30%, grupo metformina na água de beber e grupo restrição calórica associada a metformina. Nossos resultados mostraram que os LDL<sup>-/-</sup> submetidos à RC tiveram redução da massa corporal, gordura visceral e aumento dos níveis de colesterol plasmático. A associação entre RC e metformina levou a uma redução mais pronunciada da gordura visceral e elevou o consumo hídrico dos camundongos LDL<sup>-/-</sup>. Os dados comportamentais mostraram alteração na locomoção espontânea, prejuízo na memória de reconhecimento e memória aversiva dos LDL<sup>-/-</sup> e a intervenção com RC e metformina não foram suficientes para reverter tal comprometimento. Tomados em conjunto, nossos resultados mostraram



que, nos cenários de alterações metabólicas induzidos por dieta hiperlipídica e alteração gênica do receptor de LDL, os efeitos de uma restrição calórica de 30%, por um período de quatro semanas, foram mais evidentes nos desfechos metabólicos do que comportamentais.

**Palavras chaves:** obesidade, dieta hiperlipídica, alterações metabólicas, alterações comportamentais, nocautes do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>), restrição calórica.

## ABSTRACT

The consumption of diets rich in fats and carbohydrates can favor the onset of overweight and obesity, considered one of the major public health problems and a significant risk factor for the development of type 2 diabetes, atherosclerosis, hypertension, dyslipidemia, Alzheimer's disease, and depression. Lifestyle modifications have shown improvements in metabolic and behavioral parameters induced by a hyperlipidic diet. In this sense, calorie restriction is proposed as a dietary intervention aiming to reduce calorie intake without causing nutrient deficiency, with several benefits already described in the scientific literature. The present study aimed to investigate the effect of calorie restriction on metabolic, behavioral, and neurochemical changes induced by a hyperlipidic diet and low-density lipoprotein receptor (LDLr) knockouts. The first experimental protocol of this study used C57Bl/6 mice, males and females, aged 3-4 months at the beginning of the experiment, treated with a standard rodent diet or a hyperlipidic diet for 12 weeks. After this period, the animals in the restriction groups underwent 30% calorie restriction with their respective diets for a period of 4 weeks. Behavioral tests were conducted to assess memory and depressive-like behavior, along with biochemical assays. Our results showed that the experimental diet increased fasting blood glucose, plasma cholesterol, and hepatic cholesterol and triglycerides, resulting in impaired short-term spatial memory. Calorie restriction intervention reduced metabolic parameters such as body mass, visceral fat, and fasting blood glucose. However, four weeks of restriction were not sufficient to improve/reverse behavioral parameters impaired by the high-fat diet. In the second experimental protocol, we used C57Bl/6 mice and LDL receptor knockouts (LDLr<sup>-/-</sup>), females, aged 10 months at the start of the experiment. LDLr<sup>-/-</sup> mice were divided into a control group, a 30% calorie restriction group, a metformin in drinking water group, and a calorie restriction combined with metformin group. Our results showed that LDLr<sup>-/-</sup> mice subjected to calorie restriction had reduced body mass, visceral fat, and increased plasma cholesterol levels. The combination of calorie restriction and metformin led to a more pronounced reduction in visceral fat and increased water consumption in LDLr<sup>-/-</sup> mice. Behavioral data showed alterations in spontaneous locomotion, impairment in recognition memory, and aversive memory in LDLr<sup>-/-</sup> mice, and the intervention with calorie restriction and metformin was not sufficient to reverse such impairment. Taken together, our results demonstrated that, in scenarios of metabolic changes induced by a hyperlipidic diet and genetic alteration of the LDL receptor, the effects of 30% calorie restriction for a period of four weeks were more evident in metabolic outcomes than in behavioral outcomes.

**Keywords:** obesity, hyperlipidic diet, metabolic changes, behavioral alterations, low-density lipoprotein receptor (LDLr<sup>-/-</sup>) knockouts, calorie restriction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mortalidade atribuída à obesidade, 2019.....	19
Figura 2: Principais características dos adipócitos. ....	21
Figura 3: Mecanismos relacionados a fisiopatologia da obesidade .....	24
Figura 4: Inflamação resultante de obesidade como fator desencadeador de resistência à insulina .....	26
Figura 5: Relação entre obesidade, sensibilidade à insulina e diabetes tipo 2 ao longo do tempo. ....	27
Figura 6: Estágios da doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD).....	33
Figura 7: Interação dos mecanismos protetores da RC em organismos.....	53
Figura 8: Divisão dos grupos experimentais.....	70
Figura 9: Desenho experimental- bloco 1.....	71
Figura 10: Desenho experimental – bloco 2 .....	72
Figura 11: Consumo calórico ao longo das 16 semanas de protocolo experimental. ....	80
Figura 12: Variação da massa corporal, eficácia calórica e média da temperatura corporal ao longo das 16 semanas de protocolo experimental. ....	82
Figura 13: Gordura visceral (%). ....	83
Figura 14: Efeito do tratamento com HFD e RC na glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos.....	84
Figura 15: Teste de tolerância à glicose (mg/dL). ....	85
Figura 16: Teste de tolerância à insulina (mg/dL). ....	87
Figura 17: Análise de variáveis plasmáticas (mg/dL) de camundongos submetidos a intervenção crônica com HFD e RC. ....	90
Figura 18: Análise de variáveis hepáticas (mg/dL) de camundongos tratados de HFD e RC. ....	90
Figura 19: Efeito do tratamento com HFD e RC nos níveis de citocinas hepáticas (pg/ml). ....	91
Figura 20: Efeito do consumo crônico de HFD e RC na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos C57Bl/6. ....	92
Figura 21: Influência da alimentação crônica com HFD e RC na alternância forçada no labirinto em T. ....	94
Figura 22: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC na memória aversiva de curto e longo prazo. ....	96
Figura 23: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC no teste de borrifagem de sacarose. ....	96
Figura 24: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC no teste de suspensão pela cauda. ....	97
Figura 25: Evolução da massa corporal dos animais ao longo de 4 semanas de intervenção.....	98
Figura 26: Peso da gordura visceral dos animais após 4 semanas de intervenção.....	99
Figura 27: Ingestão hídrica per capita ao longo de 4 semanas de intervenção. ....	100
Figura 28: Análise plasmática após 4 semanas de intervenção.....	102
Figura 29: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos C57Bl/6 e LDLr <sup>-/-</sup> .....	103
Figura 30: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina memória de reconhecimento em camundongos C57Bl/6 e LDLr <sup>-/-</sup> .....	104
Figura 31: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 e LDLr <sup>-/-</sup> .....	105
Figura 32: Impacto da restrição calórica e tratamento com metformina na memória aversiva de curto e longo prazo. ....	106
Figura 33: Níveis de TNF- $\alpha$ e IL 1- $\beta$ no hipocampo e IL 1- $\beta$ no córtex pré-frontal de camundongos submetidos a restrição calórica e/ou tratamento com metformina. ....	107
Figura 34: Síntese dos principais resultados encontrados no protocolo experimental 1.....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas aos animais .....	69
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS- Organização Mundial Da Saúde

IMC- Índice De Massa Corporal

AT- Tecido Adiposo

WAT- Tecido Adiposo Branco

BAT- Tecido Adiposo Marrom

TNF- $\alpha$ - Fator De Necrose Tumoral- $\alpha$

IL-6- Interleucina- 6

IL-8- Interleucina-8

IL-4- Interleucina-4

IL-10- Interleucina-10

IL-13- Interleucina-13

IL-19- Interleucina-19

MCP-1- Proteína quimioatraente de monócitos-1

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP

ER- Retículo endoplasmático

FAAs/AGL- Ácidos graxos livres

NEFAs- Ácidos graxos não esterificados, do inglês *Non-esterified fatty acids*

RBP4- Proteína 4 de ligação ao retinol

PI(3)K- Fosfatidilinositol-3-OH quinase

PPAR- $\alpha$ - Receptor- $\alpha$  ativado por proliferadores de peroxissoma

JNK- Quinase amino-terminal c-Jun

IKK- $\beta$ - I $\kappa$ B quinase- $\beta$

NF- $\kappa$ B- Fator nuclear- $\kappa$ B

SOCS- Proteínas de sinalização de citocinas

iNOS- Sintase do óxido nítrico induzível

DAG- Diacilglicerol

Acetil-CoA- Acetil-coenzima A

IRS-1- Substrato-1 do receptor de insulina

IRS-2- Substrato-2 do receptor de insulina

DM2- Diabetes tipo 2

TG- Triglicerídeos

HDL- Lipoproteínas de alta densidade

LDL- Lipoproteínas de baixa densidade

2-MAG- 2- Monoacilglicerol

Apo-B48- Apolipoproteína B48

NPC1L1- Proteína Niemann-Pick C1-like 1

VLDL- Lipoproteínas de densidade muito baixa

SREBP2- Proteína de ligação do elemento regulador do esterol hepático

HMG-CoA redutase- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

LPL- Lipoproteína lipase

ApoC-II- Apolipoproteínas C-II

ApoE- Apolipoproteínas E

Apo-AI- Apolipoproteína AI

LCAT- Lecitina colesterol aciltransferase

MAFLD- Doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica, do inglês *metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*

NAFLD- Doença hepática gordurosa não alcoólica

NASH- Esteato-hepatite não alcoólica

RI- Resistência à insulina

PKC $\delta$ - Proteína quinase C $\delta$

HFD- Dieta hiperlipídica, do inglês *high fat diet*

SNC- Sistema nervoso central

IGFs- Fatores de crescimento semelhantes à insulina

HPA- Sistema hipotálamo-hipófise-adrenal

IFN- $\alpha$ - Interferon  $\alpha$

GTP-CH1- Enzima GTP-ciclohidrolase 1

IDO- Indoleamina 2,3-dioxigenase

DIO- Obesidade induzida por dieta, do inglês *diet-induced obesity*

RC- Restrição calórica

mTOR- Rapamicina quinase

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina

PGC-1 $\alpha$ - do inglês, *peroxisome proliferator active receptor gamma coactivator 1 alpha*

SIRT- Sirtuínas

NAD<sup>+</sup>- Nicotinamida adenina dinucleotídeo

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro

eNOS- Óxido nítrico sintase endotelial

CREB- Proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato de adenosina cíclica

$\beta$ -HB-  $\beta$ -hidroxibutirato

ATF4- Fator de transcrição ativador 4

ATP- Trifosfato de adenosina

5-HT- Serotonina

GABA- Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

NMDA- Receptores N -metil- d -aspartato

SM- Síndrome metabólica

GH- Hormônio do crescimento

LDLr<sup>-/-</sup>- Camundongo nocaute para receptor de LDL

TGO- Transaminase oxalacética

TGP- Transaminase pirúvica

ipGTT- Teste intraperitoneal de tolerância a glicose



ipITT- Teste intraperitoneal de tolerância à insulina

CEUA- Comitê de Ética para o uso de Animais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1. Obesidade: definição e prevalência.....	18
1.2. Fisiopatologia da obesidade .....	20
1.3. Obesidade e resistência à insulina .....	24
1.5. Obesidade e fígado gorduroso .....	31
1.6. Alterações metabólicas relacionadas a obesidade e sobrepeso: impacto na cognição .....	33
1.7. Alterações metabólicas relacionadas a obesidade e sobrepeso: prejuízos na emocionalidade..	36
1.8. Diferenças entre os sexos no contexto da obesidade e sobrepeso .....	40
1.9. Manejo da obesidade .....	43
1.10. Restrição calórica: história, definição .....	44
1.11. Restrição calórica no contexto de alterações metabólicas.....	46
1.12. Restrição calórica no contexto de alterações neurológicas .....	53
1.13. Modelos para estudo de doenças relacionadas à obesidade e de restrição calórica.....	59
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	64
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	66
3. 1. Objetivo geral: .....	66
3. 2. Objetivos específicos: .....	66
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	68
<b>5. RESULTADOS</b> .....	80
5.1. Protocolo 1: Efeitos da restrição calórica nas alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFD.....	80
5.2. Protocolo 2 - Efeito da restrição calórica nas alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas em modelo experimental de hipercolesterolemia familiar de camundongos nocaute do receptor de LDL de meia-idade. ....	97
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	108
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	136
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	138

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial passou por grandes mudanças nos padrões alimentares nas últimas décadas, substituindo as dietas tradicionais por dietas compostas por produtos processados com alto teor de açúcar e gordura (Moubarac et al, 2014; Poti et al., 2017), fato que está intimamente relacionado ao aumento de obesidade e sobrepeso na população mundial. O sobrepeso e a obesidade, resultado de um balanço energético positivo, são considerados um dos maiores problemas de saúde pública, sendo fator de risco importante para o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2, aterosclerose, hipertensão, dislipidemia (Engin, 2017; Ashwell, 2014). De forma mais recente, estudos epidemiológicos têm sugerido uma relação entre obesidade e alterações neuropsiquiátricas, como doença de Alzheimer e depressão (Sack et al., 2017; Spencer et al., 2017; Luppino et al., 2010). Isso justifica a necessidade de se estudar abordagens terapêuticas que visem a prevenção e tratamento das alterações relacionadas a obesidade induzida por dieta. Uma alternativa não farmacológica está relacionada a mudanças no estilo de vida, que podem modificar positivamente parâmetros metabólicos e comportamentais induzidos pela dieta (Hatzidis, et al., 2017). Neste sentido, a restrição calórica é uma intervenção dietética que se propõe a reduzir a ingestão calórica sem causar deficiência de nutrientes (Ribarič, 2012) e possui vários benefícios já descritos na literatura, como diminuição da massa corporal, pressão arterial, níveis de insulina e glicose plasmáticos, melhora a sensibilidade à insulina, aumenta gliconeogênese e melhora o perfil lipídico (Huffman et al., 2022; Most e Redman, 2020). Entretanto, o quanto as alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de dietas hipercalóricas, ou condição genética que leva a aumento do colesterol, são duradouras ou passíveis de reversão por meio de mudanças dietéticas, ainda permanecem inconclusivas. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da restrição calórica (RC) nos desfechos metabólicos, comportamentais e neuroquímicos no contexto de disfunção metabólica induzida por consumo crônico de dieta hiperlipídica (HFD) em camundongos da linhagem C57Bl/6 e em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, camundongos nocautes do receptor de LDL. Abaixo será discorrido acerca do referencial teórico pertinente às alterações metabólicas e comportamentais relacionadas a obesidade e sobrepeso, bem como a utilidade da restrição calórica no contexto obesogênico.

## 1.1.Obesidade: definição e prevalência

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define obesidade como um acúmulo excessivo de tecido adiposo, que pode ser prejudicial à saúde. O Índice de Massa Corporal (IMC), que leva em consideração o peso (kg)/altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>) pode ser usado para definir se um indivíduo é considerado abaixo do peso, saudável, acima do peso ou obeso (Hannah Ritchie e Max Roser, 2017). A OMS define uma faixa normal de IMC como 18,5 a 24,9, sendo que um IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> é considerado sobrepeso e um IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> é classificado como obeso. A obesidade grave é definida com IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>.

A obesidade é uma condição multifatorial oriunda de um balanço energético positivo, ou seja, a ingestão dietética excede o gasto energético (Andreson, 2015). O excesso de energia é convertido em triglicerídeos que são armazenados principalmente em depósitos do tecido adiposo, que expande seu tamanho, aumentando assim a massa corporal (Chooi et al., 2019). A dieta tem sido apresentada como o ponto crítico ao excesso de peso (Engin, 2017) que, somado ao sedentarismo, decorrente da modernização dos estilos de vida, resulta em balanço energético positivo.

A obesidade afeta negativamente quase todas as funções fisiológicas do corpo e constitui uma ameaça à saúde pública. Isso porque o excesso de massa corporal está relacionado com aumento no risco de desenvolvimento de diversas condições patológicas, tais como diabetes mellitus (Singh et al., 2013), doenças cardiovasculares (Czernichow et al., 2011), vários tipos de cânceres (Lauby-Secretan et al., 2016), distúrbios musculoesqueléticos (Anandacoomarasamy et al., 2008) e problemas de saúde mental (Anstey et al., 2011). Todos esses aspectos com efeitos negativos sobre a qualidade de vida, produtividade do indivíduo e com altos custos para serviços de saúde.

Cerca de 600 milhões de adultos no mundo têm obesidade e a OMS estima que até 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso. O *Global Burden of Disease*<sup>1</sup> fornece dados abrangentes sobre mortalidade em diferentes países, estratificado por faixa etária,

---

<sup>1</sup> O estudo *Global Burden of Disease* (GBD) é o maior e mais detalhado esforço científico já realizado para quantificar os níveis e tendências na saúde. Liderado pelo Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (IHME) da Universidade de Washington, contou com a participação de mais de 9.000 investigadores, em cerca de 160 países na atualização mais recente, publicada em 2020. O GBD cria uma plataforma para comparar a magnitude de doenças, lesões e fatores de risco entre grupos etários, sexos, países, regiões e tempo. Iniciado em 1991, teve a primeira publicação em 1993 e desde 2010, o jornal *The Lancet*, em parceria com o IHME, publica em uma versão especial as estimativas de saúde global do estudo GBD (Murray, 2022).

sexo e tempo. O estudo quantifica a perda de saúde devido a doenças, lesões e fatores de risco, para que os sistemas de saúde possam ser melhorados e as disparidades eliminadas (Murray, 2022). De acordo com dados publicados em 2020, cerca de 4,7 milhões de pessoas morreram prematuramente como resultado da obesidade. Na figura 1, é apresentado um mapa que mostra a proporção de mortes atribuídas à obesidade em todos os países. Em muitos países da Europa Oriental, Ásia Central, Norte da África e América Latina, mais de 15% das mortes foram atribuídas à obesidade em 2017. Isso provavelmente resulta da alta prevalência de obesidade somado a serviços de saúde mais precários em relação a países de alta renda com níveis de obesidade igualmente altos (Vos et al., 2020).

No Brasil, dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel, 2019) mostram que a obesidade aumentou 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019. A ocorrência é semelhante entre homens (18,7%) e mulheres (20,7%) e diminuiu com o aumento da escolaridade.

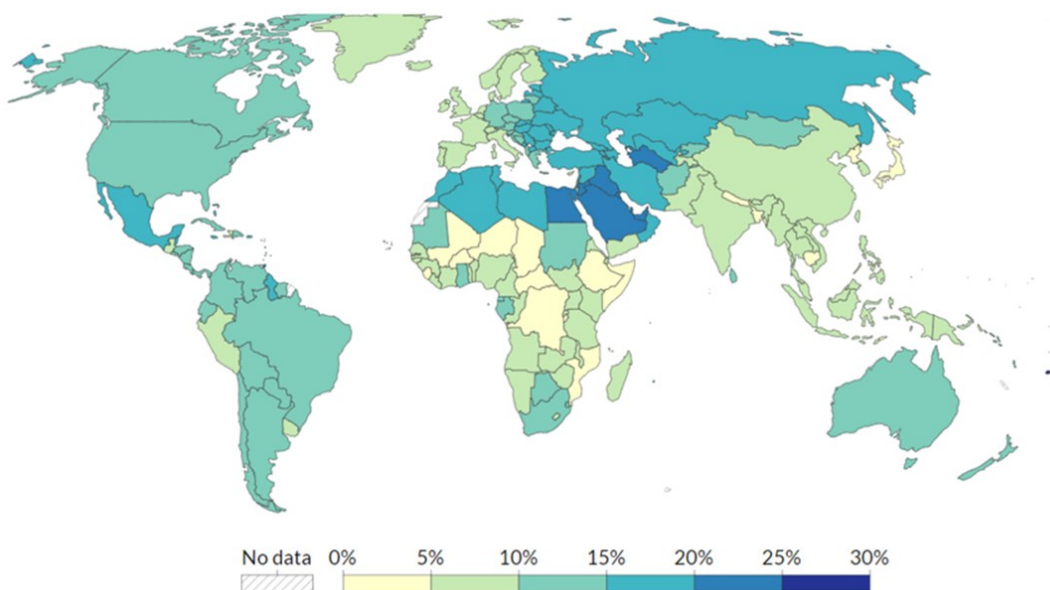


Figura 1: Mortalidade atribuída à obesidade, 2019.

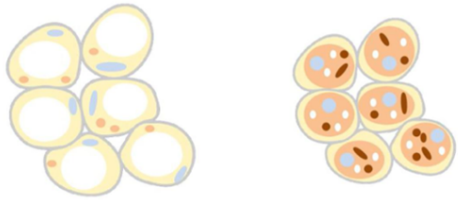
O gráfico mostra a parcela do total de mortes, por qualquer causa, com a obesidade como um fator de risco até 2019 (Retirado de Hannah Ritchie e Max Roser, 2017; IHME, 2019).

## 1.2. Fisiopatologia da obesidade

A obesidade se desenvolve como resultado de desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (Gadde et al., 2018; Andreson, 2015). Quando a ingestão de energia é maior do que a necessária, o excedente será armazenado na forma de gordura no tecido adiposo (AT, do inglês *Adipose tissue*) e nos órgãos (Haas et al., 2012; Belaj e Eller 2012). O AT é composto por adipócitos, células do sistema imunológico, células endoteliais (vasos sanguíneos e linfáticos) e células-tronco/estromais. Coletivamente, esses tipos de células facilitam as funções associadas ao tecido como órgão endócrino, depósito de energia e principal participante do metabolismo energético (Ibrahim, 2010; Lenz et al., 2020).

O AT pode ser classificado como tecido adiposo branco (WAT, do inglês *White adipose tissue*), um órgão endócrino ativo e importante para o armazenamento de lipídios, e tecido adiposo marrom (BAT, do inglês *brown adipose tissue*) responsável por produção de calor mediante estimulação  $\beta$ -adrenérgica ou exposição ao frio, processo conhecido como termogênese (Gaspar et al., 2021). O BAT representa apenas 1%–2% da gordura corporal de um humano adulto, mas é vital para manter a homeostase e apresenta efeitos benéficos sobre a glicemia (Becher et al., 2021). A figura 2 sintetiza as principais características do WAT e do BAT.

Em humanos, o WAT pode ser dividido em dois depósitos principais: WAT visceral e WAT subcutâneo (El Hadi et al., 2019). O WAT visceral é mais resistente à diferenciação em adipócitos e mais sensível à morte celular do que o WAT subcutâneo. Em termos gerais, em resposta ao excesso de ingestão alimentar, o WAT subcutâneo é mais propenso a hiperplasia dos adipócitos. O WAT visceral por sua vez, se expande predominantemente por hipertrofia de adipócitos, sendo também o depósito de gordura que sofre maior morte celular e processos inflamatórios (Hildebrandt et al., 2023).



	TECIDO ADIPOSITO BRANCO (WAT)	TECIDO ADIPOSITO MARROM (BAT)
LOCALIZAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subcutâneo (SAT)</li> <li>• Visceral (VAT)</li> <li>• Gonadal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interscapular</li> <li>• Cervical</li> <li>• Paravertebral</li> <li>• Supraclavicular</li> <li>• Perirenal</li> </ul>
MORFOLOGIA	Células esférica	Células elípticas e menores que o WAT
COMPOSIÇÃO CELULAR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gota lipídica única</li> <li>• Poucas mitocôndrias</li> <li>• Núcleo periférico achatado</li> <li>• Pequeno retículo endoplasmático</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Múltiplas gotículas lipídicas pequenas</li> <li>• Grande número de mitocôndrias</li> <li>• Núcleo central oval</li> </ul>
FUNÇÃO	Armazenar energia	Gasto de energia e produção de calor (termogênese sem tremores)

Figura 2: Principais características dos adipócitos.

Visão geral das principais características dos adipócitos branco e marrom. Adaptado de El Hadi et al., 2019.

No contexto de sobrepeso ou obesidade há hiperplasia e hipertrofia do AT (Jin et al., 2023), resultando em expansão do WAT e um desequilíbrio na produção e liberação de adipocinas, com elevação de citocinas pró-inflamatórias em detrimento a anti-inflamatórias, o que leva a associação de tal condição com estado inflamatório crônico de baixo grau (Jin et al., 2023; Khan et al., 2020; Lu et al., 2019). Esta inflamação de baixo grau é reconhecida como um fator importante que promove consequências decorrentes da obesidade (Khan et al., 2020), podendo resultar em lipotoxicidade, inflamação sistêmica e síndromes metabólicas (Hildebrandt et al., 2023).

Indivíduos com excesso de massa corporal possuem maior infiltração de macrófagos no AT, o que altera o fenótipo dos macrófagos M2, considerados anti-inflamatórios e relacionados ao reparo tecidual, para macrófagos do tipo M1, pró-inflamatórios e especializados em combate às infecções (Lu et al., 2019). Estudos mostram que, no contexto de obesidade, mais de 50% das células imunes do tecido adiposo são macrófagos, enquanto menos de 10% das células imunes no tecido adiposo de indivíduos considerados magros são macrófagos (Weisberg et al., 2003; Lumeng et al., 2007).

Esses macrófagos recrutados secretam citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8). Somado a esse processo, ocorre diminuição da abundância e secreção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), interleucina-19 (IL-19) pelos adipócitos, o que leva a aumento da produção de mais adipocinas pró-inflamatórias (She et al., 2022).

Embora muitos fatores pareçam estar envolvidos no aumento do recrutamento de macrófagos para o WAT durante a obesidade, o principal é atribuído à morte dos adipócitos. Isso porque os macrófagos geralmente são encontrados ao redor de adipócitos mortos, formando a típica estrutura em forma de coroa (Hildebrandt et al., 2023). Embora, inicialmente, essas células inflamatórias sejam essenciais para expansão e remodelação do tecido saudável, quando mantidos, como ocorre no cenário obesogênico, podem levar a fibrose e à adipogênese prejudicada (Pellegrinelli et al., 2016). Tais eventos resultam em um ciclo vicioso de inflamação, morte celular e desequilíbrio metabólico que, juntos, causam síndromes metabólicas. Notavelmente, esta condição também promove um microambiente pro-tumorigênico que induz ou suporta o crescimento tumoral em cânceres que estão ligados à obesidade, como carcinomas de mama, fígado e cólon (Quail e Dannenberg, 2019; Hildebrandt et al., 2023).

Os adipócitos não desempenham papel apenas no armazenamento de lipídios, mas também no metabolismo e na inflamação através da secreção de citocinas e adipocinas, como a leptina e a adiponectina (Ghaben e Scherer et al., 2019). A leptina é considerada o hormônio da saciedade e possui funções pró-inflamatórias (Francisco et al., 2018; Obradovic et al., 2021). A adiponectina, em contraste, tem propriedades anti-inflamatórias exercidas por meio de regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e IL-6 (Luo e Liu et al., 2016; Nguyen, 2020). Em indivíduos com obesidade, os níveis plasmáticos de leptina aumentam enquanto de adiponectina tendem a diminuir (Hildebrandt et al., 2023). As adipocinas regulam o gasto de energia, bem como o metabolismo da glicose e lipídios por meio do regulador metabólico, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Herzig e Shaw, 2020). A AMPK é um sensor de energia intercelular, que é sensível às relações AMP:ATP e promove a conservação de energia desligando o anabolismo (gliconeogênese, síntese de ácidos graxos) e ativando vias catabólicas ( $\beta$ -oxidação, produção de ATP).



Ainda, outros fatores parecem corroborar com o processo inflamatório desencadeado pela obesidade, como é o caso do estresse de retículo endoplasmático e hipóxia tecidual. O retículo endoplasmático (ER) é uma organela crítica responsável por funções metabólicas vitais (Di Conza et al., 2020). O estresse do RE refere-se a uma condição na qual proteínas dobradas de forma incorreta se acumulam no RE e levam a condições de estresse (Rashid et al., 2015). Evidências de estudos clínicos e não clínicos mostram que a obesidade induz estresse elevado do RE no tecido adiposo, que por sua vez prejudica as funções do RE e leva à disfunção metabólica dentro da célula (Lemmer et al., 2021; Wen et al., 2022). Já a hipóxia do tecido parece estar relacionada a fatores como aumento do consumo de oxigênio do AT e suprimento insuficiente aos adipócitos.

A percepção do excesso de nutrientes pelo AT induz a liberação de epinefrina e norepinefrina das terminações nervosas no tecido adiposo, que se ligam aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos adipócitos. A ativação de vias catabólicas mediadas pelo metabolismo lipídico mitocondrial aumenta a lipólise e acelera a termogênese, o que leva a um aumento no consumo de oxigênio no tecido adiposo (Poekes et al., 2015; Böhm et al., 2020; Singh et al., 2021). Ao mesmo tempo, a rápida expansão dos adipócitos causa suprimento local insuficiente de sangue e oxigênio, juntamente com aumento da distância de difusão do  $O_2$  (Wang et al., 2022). A disfunção do AT no contexto da obesidade é caracterizada por anormalidade na proliferação e hipertrofia dos adipócitos, vascularização inadequada, infiltração de células imunes, deposição ectópica de lipídios em outros tecidos e órgãos (por exemplo, fígado, depósitos viscerais abdominais, músculo esquelético, pâncreas), disfunção mitocondrial, estresse de RE e aumento da produção de proteínas fibróticas da matriz extracelular (Blüher, 2013; Crewe e Scherer, 2017; Boudina e Graham, 2014; Ko et al., 2021; Wang et al., 2022).

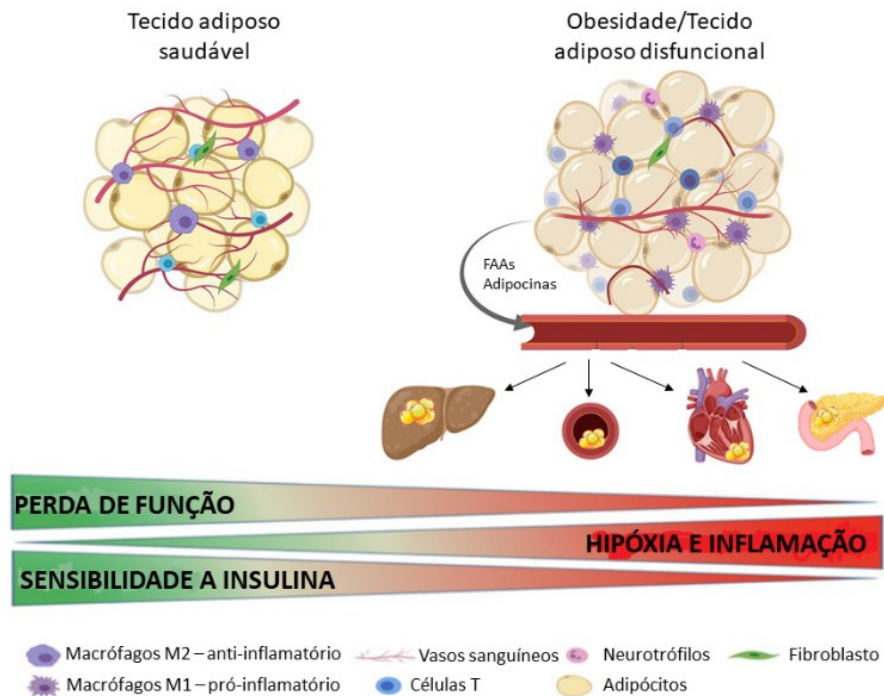


Figura 3: Mecanismos relacionados a fisiopatologia da obesidade

O tecido adiposo (AT) é composto por várias células, incluindo adipócitos, células imunes (por exemplo, macrófagos, células T e neutrófilos), fibroblastos e células endoteliais. Durante o desenvolvimento da obesidade, o AT se expande rapidamente. Devido à diminuição da vascularização tecidual, aumento da hipóxia e inflamação, o AT pode se tornar disfuncional. O AT disfuncional libera altos níveis de ácidos graxos livres (FAAs) e adipocinas (por exemplo, leptina) para a corrente sanguínea, atingindo outros órgãos como fígado, coração e grandes artérias. Em última análise, isso pode resultar em um maior acúmulo de gordura nesses tecidos e alterar sua função, por exemplo, os órgãos são menos sensíveis à insulina ou exibem um aumento na infiltração/inflamação das células imunes. Adaptado de Herold e Kalucka, 2021.

### 1.3. Obesidade e resistência à insulina

A insulina é um hormônio anabólico produzido, armazenado e secretado a partir das células-β especializadas do pâncreas, um dos tipos de células que compõem as ilhotas pancreáticas de Langerhans. A glicose é o estímulo primário da secreção de insulina, mas em alguns casos a liberação de hormônios também pode ser modulada por nutrientes circulantes, como aminoácidos e ácidos graxos (Page e Johnson, 2018).

A obesidade é um fator crítico para o surgimento de alterações metabólicas, como à resistência à insulina. O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFAs, do inglês *Non-esterified fatty acids*), glicerol, hormônios, incluindo leptina e adiponectina, e citocinas pró-inflamatórias (Hotamisligil e Wellen, 2005; Scherer et al., 2006). Na obesidade, a produção de muitos desses produtos é aumentada. A proteína 4 de ligação ao retinol (RBP4) induz a resistência à insulina por meio da redução da sinalização da fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI(3)K) no músculo e aumento da expressão da enzima gliconeogênica fosfoenolpiruvato carboxicinase no fígado por meio de um mecanismo dependente de retinol. Por outro lado, a adiponectina atua como um sensibilizador de insulina, estimulando a oxidação de ácidos graxos em uma proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e receptor- $\alpha$  ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\alpha$ ) (Kahn et al., 2006).

Além de fatores derivados de adipócitos, aumento da liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e produtos adicionais de macrófagos e outras células do tecido adiposo povoado também pode ter um papel no desenvolvimento da resistência à insulina (Hotamisligil e Wellen, 2005). O TNF- $\alpha$  e a IL-6 estimulam vias como da quinase amino-terminal c-Jun (JNK) e I $\kappa$ B quinase- $\beta$  (IKK- $\beta$ )/fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), resultando na regulação de potenciais mediadores de inflamação que podem levar à resistência à insulina (McArdle et al., 2013).

As vias que envolvem as proteínas de sinalização de citocinas (SOCS) (Mooney et al., 2001) e da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) também parecem estar envolvidas na mediação da resistência à insulina induzida por citocinas (Perreault e Marette, 2001). A secreção dessas proteínas pró-inflamatórias, particularmente MCP-1 por adipócitos, células endoteliais e monócitos, aumenta o recrutamento de macrófagos e, assim, contribui para acentuação do processo inflamatório (Kahn et al., 2006).

A liberação de NEFAs pode ser o fator mais crítico na modulação da sensibilidade à insulina. Níveis aumentados de NEFA são observados na obesidade e no diabetes tipo 2, e estão associados à resistência à insulina observada em ambos (Hotamisligil e Wellen, 2005). O aumento de NEFAs intracelulares pode resultar em competição com a glicose pela oxidação do substrato, levando à inibição serial da atividade da piruvato desidrogenase, fosfofrutoquinase e hexoquinase II. Também foi proposto que o aumento da entrega de NEFA ou a diminuição do metabolismo intracelular de ácidos graxos resulta em um aumento no conteúdo intracelular de metabólitos de ácidos graxos,

como diacilglicerol (DAG), acetil-coenzima A (Acetil-CoA) e ceramidas, que, por sua vez, ativam uma cascata serina/treonina quinase levando à fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e do substrato-2 do receptor de insulina (IRS-2) em resíduos de serina e diminui a fosforilação em resíduos de tirosina, e uma capacidade reduzida dessas moléculas de ativar PI(3)K (Wen et al., 2022). Posteriormente, os eventos da sinalização do receptor de insulina são diminuídos (Kahn et al., 2006; Page e Johnson, 2018), conforme apresentado na figura 4.

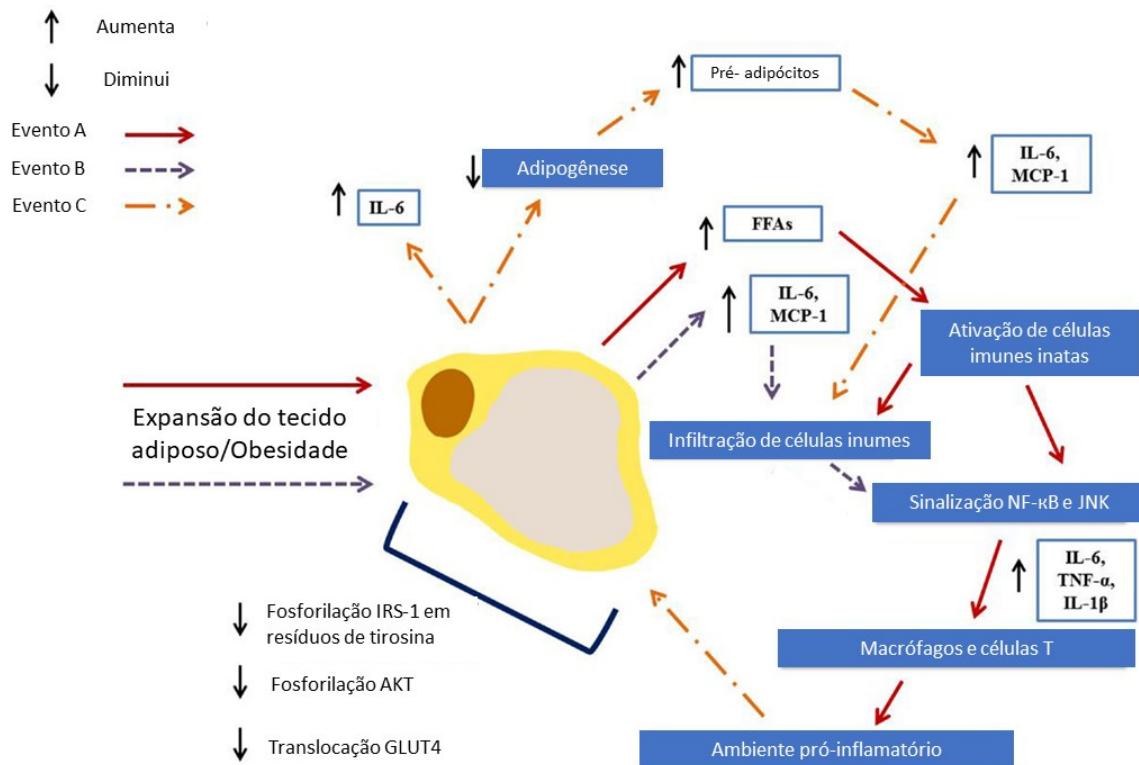


Figura 4: Inflamação resultante de obesidade como fator desencadeador de resistência à insulina

A expansão dos adipócitos resulta em circulação elevada de FFAs (A) e secreção aumentada de adipocinas (B). Estes, por sua vez, resultam na infiltração de células imunes e na ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, conduzindo a infiltração adicional e a polarização de macrófagos do tecido adiposo e células T em direção a um fenótipo pró-inflamatório. Esse ambiente, então, leva a mais secreções de adipocinas (C) e dificulta a adipogênese, resultando em maior número de pré-adipócitos que, por sua vez, secretam mediadores pró-inflamatórios. Juntos, esses eventos levam a um prejuízo na sinalização da insulina e, finalmente, a um estado de resistência à insulina. Adaptado de McArdle et al., 2013.

A obesidade e a resistência à insulina são preditores em potencial para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Czech, 2017), apesar da literatura mostrar que resistência leve à insulina em um estágio muito inicial do diabetes tipo 2, pode se comportar como protetora, evitando a sobrecarga de glicose nos tecidos, conforme apresentado na figura 4 (Page e Johnson, 2018). Para que a obesidade e a resistência à insulina sejam associadas ao diabetes tipo 2, as células  $\beta$  devem ser incapazes de compensar totalmente a diminuição da sensibilidade à insulina (Chavakis et al., 2023; Prentki et al., 2006). Os mecanismos pelos quais a resistência sistêmica à insulina contribui para a falência das células  $\beta$  não são totalmente claros, embora a exaustão causada pela hipersecreção de insulina seja uma possibilidade. Também é provável que a glicotoxicidade, a lipotoxicidade, e a combinação das mesmas, contribuam significativamente para a falência das células  $\beta$  e instalação do diabetes tipo 2 (Page e Johnson, 2018).

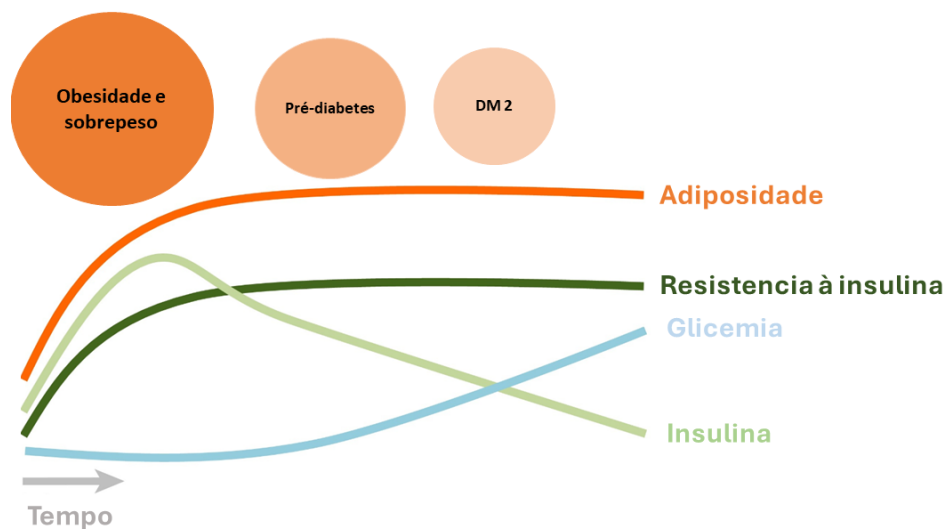


Figura 5: Relação entre obesidade, sensibilidade à insulina e diabetes tipo 2 ao longo do tempo.

Desregulação da insulina na obesidade e diabetes tipo 2. O aumento da secreção de insulina ocorre como um mecanismo de compensação para a resistência à insulina e parece estar correlacionado com o início do aumento da adiposidade. A hipersecreção de insulina leva à eventual falência das células  $\beta$ . Sem intervenção, isso eventualmente resulta em secreção reduzida de insulina e, em um cenário clínico, mudança de pré-diabetes para diabetes tipo 2. Abreviaturas: DM2, diabetes tipo 2. Adaptado de Page e Johnson, 2018.

#### 1.4. Obesidade e dislipidemia

A dislipidemia é definida por níveis anormais de lipídios, por exemplo, colesterol, triglicerídeos e/ou lipoproteínas específicas, na circulação. Na maioria dos casos, a dislipidemia é decorrente do estilo de vida ou doença (Højland Ipsen et al., 2016). O fenótipo dislipidêmico, comumente associado à obesidade, é caracterizado por aumento dos níveis de triglicerídeos (TG), diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e uma mudança nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para uma composição mais pró-aterogênica (pequenas e densas LDL) (Franssen et al., 2011). A falha em manter a homeostase lipídica no cenário obesogênico e a inflamação metabólica associada podem promover inflamação sistêmica, predispondo a doença cardiovascular ou afetar a resposta imune em condições inflamatórias, no entanto, os mecanismos não são claros (Chavakis et al., 2023).

Os lipídios plasmáticos clinicamente mais relevantes são o colesterol e os TGs. Os papéis fisiológicos do colesterol incluem: (1) constituinte da membrana celular; (2) precursor da síntese de hormônios esteroides, ácidos biliares e oxisteróis; e (3) modificador de moléculas de sinalização neuronal (Berberich e Hegele, 2022). O colesterol plasmático é derivado principalmente da síntese hepática, com aproximadamente 15% a 20% provenientes da dieta (Altmann et al., 2004). Os TGs são uma fonte de energia para o tecido muscular e adiposo. As lipoproteínas circulantes em nosso plasma são moléculas agregadas compostas por um núcleo lipídico com diferentes concentrações de triglicerídeos e ésteres de colesterol embalados dentro de uma monocamada fosfolipídica com colesterol livre disperso e apolipoproteínas de superfície (Hegele, 2009; Helkin et al., 2016).

O metabolismo lipídico fisiológico pode ser dividido em (1) metabolismo lipídico exógeno, (2) endógeno e (3) transporte reverso do colesterol, crucial para o retorno do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021; Helkin et al., 2016).

Os lipídios exógenos são as gorduras absorvidas da nossa dieta. Os lipídios ingeridos, principalmente triglicerídeos (TGs), são transformados em ácidos graxos (FAs) e 2-monoacilglicerol (2-MAG) pela lipase pancreática no lúmen intestinal (Kindel, Lee e Tso, 2010). Em seguida, ácidos graxos de cadeia longa, MAGs, colesterol e outras moléculas derivadas da digestão de lipídios são reesterificados dentro dos enterócitos, formando TGs, fosfolipídios e ésteres de colesterol. A fim de solubilizar TGs e os ésteres de colesterol, os enterócitos empacotam lipídios em quilomícrons positivos para apolipoproteína B48 (Apo-B48) liberados na linfa e na circulação (Xiao et al., 2019;

Hegele, 2009). A absorção do colesterol dietético ocorre com a ajuda da proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (Helkin et al., 2016). Alguns produtos da digestão lipídica luminal são solúveis em água e, portanto, transportados prontamente através do enterócito por meio de transportadores de membrana para entrar no sangue portal, esses produtos incluem glicerol, ácidos graxos de cadeia curta e média (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021).

Outra parte do metabolismo de lipídios se refere aos lipídios endógenos, formados sob influência da insulina (Sanders e Griffin, 2016). TGs endógenos e outros lipídios são liberados como lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) pelos hepatócitos. Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos ou ingestão calórica adicional, quando os estoques de glicogênio hepático já foram repostos, o excesso de glicose é convertido em piruvato (Mashima, Seimiya, e Tsuruo, 2009). O piruvato dentro da mitocôndria se converte em Acetil-CoA, para entrar no ciclo do ácido cítrico e se combina com o oxaloacetato formando citrato que, por sua vez, volta ao citoplasma. O citrato citossólico mais uma vez forma Acetil-CoA, e por enzimas ativadas por insulina, acetil-CoA se converte em malonil-CoA, que eventualmente acaba sendo convertida em ácidos graxos (Mashima, Seimiya, e Tsuruo, 2009; Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021). O glicerol citoplasmático, produzido a partir da glicólise paralela, liga-se ao ácido graxo e forma os TGs (Cifarelli e Abumrad, 2018). O éster de colesterol é formado em outras etapas: no caso de diminuição do colesterol hepático, a proteína de ligação do elemento regulador do esterol hepático (SREBP2) induz os receptores de LDL à superfície para ligar a apoB-100 de lipoproteínas como o LDL-C. Além disso, o SREBP2 induz a 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) para a síntese de colesterol de novo (Berberich e Hegele, 2022). Tal processo trata-se de lipogênese de novo, onde há geração de lipídios endógenos (TG) pela síntese de novo de ácidos graxos durante o estado nutricional de energia excessiva (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021).

Para que os ácidos graxos cheguem aos tecidos periféricos, a lipoproteína lipase (LPL) presente na superfície endotelial atua nas VLDL e nos quilomícrons para liberar os ácidos graxos. No entanto, a LPL não pode agir em moléculas imaturas de quilomícron ou VLDL. O HDL participa do processo de amadurecimento do VLDL e quilomícrons fornecendo as apolipoproteínas C-II (ApoC-II) e E (ApoE) (Wolska et al., 2017). Em seguida, conectando-se ao ApoC-II, o LPL é capaz de atuar no VLDL e nos quilomícrons para causar a liberação de seu conteúdo de ácidos graxos de seus TGs (Berberich e Hegele, 2022). No entanto, durante o estado alimentado, o organismo armazena a

energia dos ácidos graxos. Nesse cenário, os adipócitos, sob a orientação de genes ativados por insulina, causam ativação da LPL na superfície das células endoteliais dos adipócitos (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021). Desta forma, a LPL capta os ácidos graxos, armazenando os TGs no interior dos adipócitos (Berberich e Hegele, 2022).

O terceiro braço do metabolismo lipídico é o transporte reverso do colesterol, mediado em parte por partículas HDL positivas para apolipoproteína AI (Apo-AI) que captam o colesterol da periferia, incluindo macrófagos e células espumosas nas paredes dos vasos sanguíneos. O HDL-C leva o colesterol ao fígado para eventual excreção na bile e nas fezes (Tall et al., 2008; Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021). A síntese de HDL inicia-se pela produção nos hepatócitos e enterócitos de Apo-AI, inicialmente desprovida de lipídios (pré- $\beta$ -HDL). Em seguida, um transportador garante o efluxo de fosfatidilcolina e colesterol para o pré- $\beta$ -HDL para formação da estrutura discoide do HDL, um processo denominado maturação do HDL (März et al., 2017). A lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), com a ajuda do cofator Apo-AI, fornece a esterificação do colesterol em ésteres de colesterol hidrofóbicos, permitindo o sequestro de colesterol dos tecidos periféricos para o núcleo lipídico do HDL. Isso muda a forma de HDL de discoide para sua forma esférica madura (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021). O HDL continua a circular e a captar o colesterol de vários tecidos periféricos pela ação do LCAT e, eventualmente, o HDL devolve o colesterol ao fígado (Zannis, Chroni e Krieger, 2006).

No contexto da obesidade, os adipócitos secretam altos níveis de adipocinas pró-inflamatórias e FFA, levando a inflamação, dislipidemia e acúmulo de gordura ectópica. Estudos demonstraram correlação entre dislipidemia e IMC (Dias et al., 2018). Quanto maior o IMC, mais grave é o comprometimento do metabolismo lipídico. Tanto a obesidade quanto o sobrepeso estão associados à dislipidemia: um total de 60 a 70% dos pacientes com obesidade e 50 a 60% dos pacientes com sobrepeso são dislipidêmicos (Bays et al., 2013), enquanto pacientes em uso de terapia hipolipidêmica apresentam melhora nos sintomas de dislipidemia e nas anormalidades cardiometabólicas associadas à dislipidemia. Portanto, a dislipidemia tem impactos significativos na obesidade e na patogênese das doenças cardiovasculares (Su e Peng, 2020).

Os mecanismos que contribuem para a dislipidemia em indivíduos com obesidade incluem incremento da síntese de VLDL pelo fígado, comprometimento da LPL e lipólise, regulação negativa do receptor de LDL, reduções no HDL (Trandafir et al., 2022; Klop, Elte e Castro Cabezas,



2013). Finalmente, a disfunção dos adipócitos principalmente do WAT visceral, com hipertrofia dos adipócitos, inflamação do tecido adiposo, liberação de adipocitocinas e secreção excessiva de FFA são todos os principais fatores envolvidos no desenvolvimento de dislipidemia e doença cardiometabólica (Zwartjes, Gerdes e Nieuwdorp, 2021).

### **1.5. Obesidade e fígado gorduroso**

A obesidade induz alterações morfológicas e metabólicas em tecidos periféricos, incluindo o fígado e o músculo esquelético (Sun et al., 2023). A doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD, do inglês *metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*) é um distúrbio metabólico complexo que parece ser uma das condições hepáticas mais prevalentes no mundo ocidental (Utzschneider e Kahn, 2006). Essa condição também é conhecida na literatura como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e sua forma agressiva de esteato-hepatite não alcoólica (NASH), porém esforços estão em andamento para renomear como MAFLD, que enfatiza o papel da síndrome metabólica, obesidade e diabetes tipo 2 em contribuir para a carga de doença hepática (Eslam et al., 2020; Chen et al., 2023). A obesidade é o principal fator de risco para NAFLD e NASH, cerca de 50% dos pacientes com NAFLD e 80% dos pacientes com NASH apresentam obesidade (Chen et al., 2023).

A MAFLD está ligada à obesidade, resistência à insulina (RI) e diabetes tipo 2 (Sun et al., 2023). Esta condição representa vários estados patogênicos de esteatose a esteato-hepatite, que pode evoluir para cirrose e insuficiência hepática, conforme apresentado na figura 6. No contexto de obesidade, o fígado exibe RI. O efeito inibitório da insulina na gliconeogênese hepática é interrompido enquanto sua ação sobre a lipogênese *de novo* é aumentada, resultando em hiperglicemia crônica e hipertrigliceridemia (Schwarz et al., 2003; Brown e Goldstein, 2008).

A RI resulta principalmente de fatores adquiridos como a obesidade e, especificamente, o acúmulo de gordura ectópica em órgãos viscerais como o fígado (Bjorntorp, 1990; Berraondo e Martínez, 2000; Utzschneider e Kahn, 2006). A resistência à insulina é caracterizada principalmente pelo aumento da lipólise no tecido adiposo disfuncional e redução da captação de glicose (Samuel e Shulman, 2018). A disfunção do tecido adiposo compreende a inflamação local e a ação prejudicada

da insulina, resultando em aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol (Samuel e Shulman, 2018; Francque et al., 2021). Uma maior captação hepática de FFA contribui para o acúmulo de triglicerídeos no fígado e liberação de VLDL via esterificação de ácidos graxos, enquanto a captação de glicose contribui em menor extensão via lipogênese *de novo*, favorecendo o surgimento de esteatose e dislipidemia. Aumentos nos metabólitos lipídicos hepáticos, como diacilgliceróis e ceramidas, interferem na sinalização da insulina e, assim, levam à resistência hepática à insulina (Samuel e Shulman, 2018). A resistência à insulina está fortemente associada à MAFLD, mas sua correlação com a gravidade da doença ainda não está totalmente estabelecida. Além disso, três quartos das pessoas com obesidade e diabetes tipo 2 têm NAFLD (Dai et al., 2017), mas não está claro se o acúmulo de gordura no fígado é consequência ou causa da resistência à insulina. Apesar disso, o aumento da entrega de ácidos graxos plasmático do tecido adiposo para o fígado é responsável por aproximadamente 60% de toda a incorporação de ácidos graxos nos triglicerídeos hepáticos (Francque et al., 2021), destacando o importante papel do tecido adiposo no acúmulo de lipídios hepáticos, resistência à insulina, aumento da secreção de VLDL, e, portanto, ligando a patogênese da MAFLD a um aspecto chave da dislipidemia aterogênica da síndrome metabólica.

O aumento de FFA hepáticos pode induzir a RI hepática ao promover a translocação da proteína quinase C (PKC) $\delta$  do citosol para a membrana, levando a uma atividade deficiente da fosfatidilinositol (PI)3-quinase associada ao IRS (Lam et al., 2002). Pacientes com MAFLD exibem lipogênese *de novo* elevada, o que reflete a incapacidade da insulina de impedir a lipogênese (Donnelly et al., 2005). A hiperinsulinemia associada à MAFLD pode estimular a proteína de ligação ao receptor de esterol do fator de transcrição lipogênica (SREBP)-1c e inibir a atividade do fator de transcrição Foxo2, promovendo síntese aumentada de ácidos graxos e redução da  $\beta$ -oxidação (Wolfrum et al., 2004; Tamura et al., 2005; Gonzalez-Baró et al., 2007).

O desenvolvimento de danos hepáticos em pessoas com NASH requer fatores extra-hepáticos e intra-hepáticos (Loomba, Friedman e Shulman, 2021), o que destaca o envolvimento de sistemas de múltiplos órgãos na doença. A disfunção adiposa crônica cria um desequilíbrio entre a liberação de citocinas sensibilizadoras de insulina anti-inflamatórias (como adiponectina) e citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF) que ativam vias inflamatórias e contribuem para a resistência à insulina no fígado (Francque et al., 2021).

As células de Kupffer são os macrófagos residentes no fígado (Wen et al., 2022) e sua ativação, em combinação com o recrutamento de macrófagos pró-inflamatórios derivados de monócitos, leucócitos e neutrófilos da circulação, caracteriza alterações relacionadas às alterações imunológicas que ocorre no fígado frente a NASH. Paralelamente ao acúmulo de macrófagos, ocorre maior polarização pró-inflamatória (macrófagos M1) às custas de macrófagos anti-inflamatórios e reparadores (M2), provavelmente devido à alta abundância de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-1R, TNF- $\alpha$  (McArdle et al., 2013). Juntos, o desequilíbrio das células de Kupffer M1/M2 (M1 > M2) e a liberação de mediadores inflamatórios pelas células de Kupffer são críticos para a patogênese da MAFLD (Wen et al., 2022).

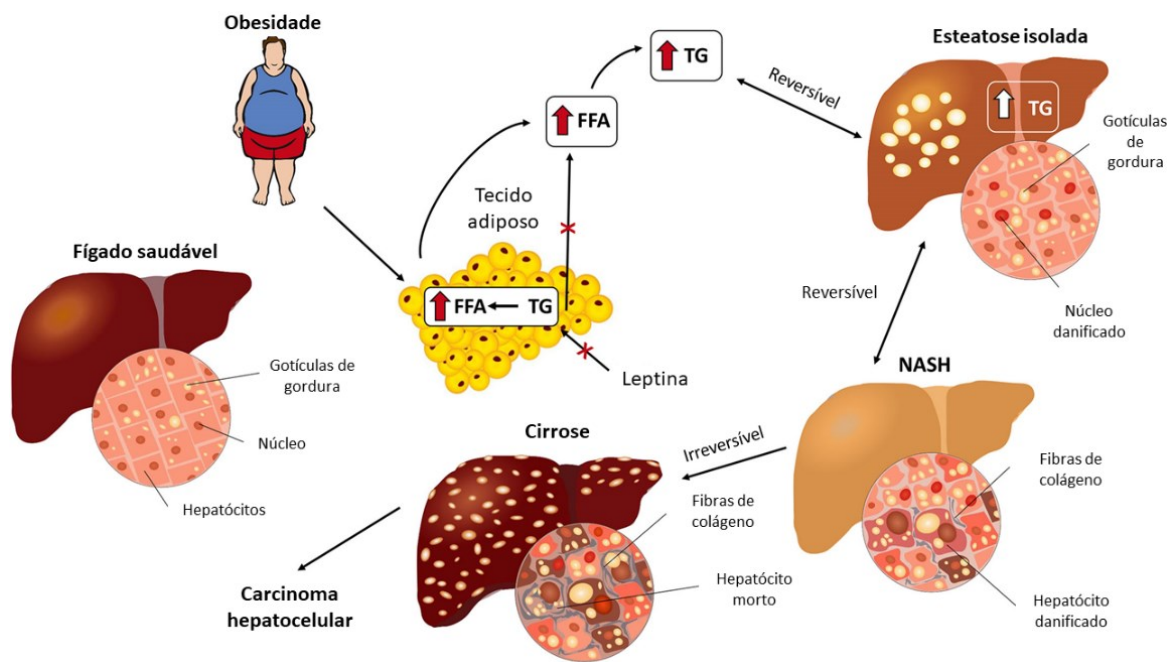


Figura 6: Estágios da doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (MAFLD).

Como a obesidade e dislipidemia podem contribuir para desencadear MAFLD e a progressão da doença hepática. Adaptado de Kořínková et al., 2020.

## 1.6. Alterações metabólicas relacionadas a obesidade e sobrepeso: impacto na cognição

Evidências apontam para uma conexão entre desregulação metabólica e declínio da função cerebral. Pesquisas mostram que o diabetes tipo 2, uma das possíveis consequências metabólicas do

excesso de peso, é considerado um importante fator de risco para incidência e gravidade de comprometimento cognitivo (Haan, 2006; Stolk et al., 1997; Cukierman et al., 2005; Roberts et al., 2014) e que glicemia aumentada se correlaciona com diminuição da capacidade cognitiva e alterações na microestrutura do hipocampo de mulheres aparentemente saudáveis (Kerti et al., 2013). Ainda, o estudo de Crane e colaboradores acompanhou 2067 voluntários e mostrou que a chance de desenvolver demência era maior nos indivíduos com glicemia aumentada, independente de terem diabetes ou não (Crane et al., 2013).

As evidências da associação entre lipídios no sangue (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e TG) e o risco de demência têm sido inconsistentes (Barter et al., 2007; Reitz et al., 2010; Nakamura et al., 2023). A associação entre o colesterol total e o risco de demência parece variar com a idade na medição (meia-idade [ $<65$  anos] ou mais tarde [ $\geq 65$  anos]) e a duração do acompanhamento (OMS, 2019; Anstey, Lipnicki, e Low, 2008; Anstey, Ashby-Mitchell e Peters, 2017; Hersi et al., 2017). Alguns estudos não relataram nenhuma associação ou uma associação inversa com os níveis de colesterol total medidos mais tarde na vida, enquanto os estudos que mostraram uma associação positiva examinaram o efeito dos níveis de colesterol total na meia-idade com um acompanhamento mais longo (Nakamura et al., 2023; Iwagami et al., 2021). O estudo do tipo coorte transversal, de Iwagami e colaboradores, publicado em 2021 teve como objetivo examinar a associação entre níveis de lipídios no sangue e ocorrência de demência (vascular e não vascular, incluindo doença de Alzheimer) por idade ( $<65$  anos vs.  $\geq 65$  anos) na primeira medição de lipídios no sangue e duração de acompanhamento ( $<10$  anos vs.  $\geq 10$  anos), com foco no colesterol LDL. Para a pesquisa foi utilizado um banco de dados do Reino Unido e contou com dados de mais de 1,8 milhão de pessoas com medições de colesterol total e quase 1 milhão de pessoas com medições de colesterol LDL acompanhadas por mais de duas décadas. Os pesquisadores observaram associações positivas modestas entre colesterol total e colesterol LDL e risco de demência e as associações foram mais fortes para medições de colesterol total e colesterol LDL na meia-idade ( $<65$  anos) e com acompanhamento mais longo ( $\geq 10$  anos) (Iwagami et al., 2021).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa buscou avaliar temporalidade do aparecimento e grau das alterações metabólicas e comportamentais induzidas dieta hiperlipídica (HFD) ao longo de 12 semanas de exposição da dieta, em camundongos de meia-idade. Observamos que após 4 semanas de exposição a HFD os animais apresentam prejuízos metabólicos relacionados a glicose e aumento

da locomoção espontânea, com 8 semanas aumento da massa corporal, da glicose basal e comportamento anedônico e com 12 semanas o agravo das alterações metabólicas é acompanhado de prejuízo na memória espacial (Braga et al., 2021). Esses dados evidenciam que excesso de disponibilidade de nutrientes pode ser prejudicial à função cerebral (Pani, 2015) e que a medida em que há progressão dos prejuízos metabólicos induzidos por HFD, há também progressão das alterações comportamentais induzidas pela mesma dieta em roedores de meia-idade (Braga et al., 2021).

No contexto da obesidade, o tecido adiposo produz citocinas inflamatórias como IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , MCP1, resultando em uma inflamação crônica de baixo grau (Guillemot-Legrís e Muccioli, 2017). Tal inflamação sistêmica aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, decorrente de disfunção endotelial, favorecendo neuroinflamação e aumento do estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) (Castanon et al., 2015; Salas-Venegas et al., 2022). A resposta neuroinflamatória durante a obesidade ocorre em diferentes estruturas do SNC, como cerebelo, amígdala, corpo estriado córtex cerebral, hipotálamo e hipocampo (Guillemot-Legrís e Muccioli, 2017; Jais e Brüning, 2017; Van Dyken e Lacoste, 2018; Milanova et al., 2021).

O prejuízo na permeabilidade da barreira hematoencefálica facilita o acesso das moléculas pró-inflamatórias sistêmicas ao tecido cerebral, permitindo interação com a microglia, o macrófago residente (Salas-Venegas et al., 2022), que responde aos sinais inflamatórios vindos da periferia com secreção de mais citocinas inflamatórias, ativando astrócitos e favorecendo a neuroinflamação que pode levar a danos neuronais (Erion et al., 2014; González-Olmo et al., 2021).

Além de prejudicar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, a inflamação periférica também afeta a vias de sinalização da insulina em tecidos sensíveis à insulina, incluindo o cérebro (Vinuesa et al., 2021). No hipotálamo, a sinalização da insulina modula o metabolismo, a ingestão alimentar e o balanço energético (Lee e Mattson, 2014), enquanto em estruturas extra-hipotalâmicas, como o hipocampo, as ações da insulina estão associadas a funções neurotróficas e neuromodulatórias. A sinalização do receptor de insulina no cérebro é importante para o desenvolvimento neuronal, regulação da glicose, comportamento alimentar, massa corporal e processos cognitivos, como funcionamento executivo, aprendizado e memória (Kellar e Craft, 2020). Os receptores de insulina são abundantemente expressos em neurônios e células gliais (Frolich et al., 1998) e, juntamente com fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e

receptores, regulam funções como diferenciação de neurônios, crescimento dendrítico, sobrevivência neuronal, desenvolvimento de circuitos, plasticidade sináptica e tráfico de receptores de neurotransmissores pós-sinápticos (Kleinridders et al., 2014; Gralle, 2017), desempenhando um papel fundamental na memória e na aprendizagem (Blazquez et al., 2014; Ferrario e Reagan, 2017). A resistência cerebral à insulina é uma causa de desregulação da bioenergética cerebral e leva a transporte axonal prejudicado, apoptose e neuroinflamação, ainda tem sido associada à modulação da produção de amiloide e fosforilação da tau (Nguyen et al., 2020). Particularmente, o comprometimento da sinalização hipocampal da insulina está associado a prejuízos na memória e outras funções executivas (Vinuesa et al., 2021).

Além disso, outros mecanismos biológicos parecem estar envolvidos no surgimento de condições neurodegenerativas associadas a alterações metabólicas, como disfunção mitocondrial (de Oliveira et al., 2011), dano oxidativo (Wu et al., 2004), disfunção vascular (Li et al., 2010), neurogênese reduzida e perda de integridade dendrítica (Stranahan et al., 2008).

### **1.7. Alterações metabólicas relacionadas a obesidade e sobrepeso: prejuízos na emocionalidade**

Transtornos de humor e obesidade são as duas queixas de saúde comuns e muitas vezes ocorrem simultaneamente (Fulton et al., 2022). O excesso de peso está associado ao aumento da ansiedade e depressão em 13 países diferentes, concentrado naqueles com obesidade mais grave e em mulheres em uma pesquisa em larga escala dentro da World Mental Health Surveys (Scott et al., 2008). Em 25 estudos incluídos em uma meta-análise, a frequência de ansiedade ocorreu em uma razão de chance de 1,30 em indivíduos com obesidade e 1,10 naqueles com sobrepeso e os efeitos foram semelhantes entre homens e mulheres (Amiri e Behnezhad, 2019). Uma meta-análise um pouco mais antiga encontrou tamanhos de efeito semelhantes em 16 estudos, com uma razão de chance de 1,4 para a associação entre obesidade e ansiedade (Garipey et al., 2010). Um estudo com mais de 36.000 canadenses, mostrou relação entre depressão e obesidade concomitante com uma razão de chances de 1,46 em mulheres, embora não relacionada à obesidade em homens neste estudo (McIntyre et al., 2006). Ainda, a literatura aponta para a associação entre IMC elevado como preditor de sintomas depressivos e ansiosos (Zhao et al., 2009; Milaneschi et al., 2019) e que a chances de desenvolver

depressão aumentam em função do número de comprometimentos metabólicos coexistentes, como é característico na síndrome metabólica (Jokela et al., 2014; Tang, Wang e Lian, 2017).

A depressão é uma condição debilitante com contribuições genéticas, epigenéticas e ambientais, podendo se manifestar de várias maneiras, modulando funções homeostáticas, como apetite e sono, que por sua vez podem alterar ainda mais o humor (Fulton et al., 2022). A ansiedade acompanha a depressão na maioria dos casos e é indicativa de um pior prognóstico de saúde mental. A depressão melancólica, a forma mais comum, caracteriza-se por hipofagia, insônia e anedonia. Além da anedonia, as características do subtipo atípico de depressão incluem hiperfagia, letargia e hipersonia. Indivíduos com obesidade, particularmente aqueles que apresentam atributos da síndrome metabólica (obesidade abdominal, hiperglicemia, hipertensão, triglicérides elevados), tendem a desenvolver o subtipo atípico (Milaneschi et al., 2017). Esta forma de depressão tem ligações mais fortes com inflamação periférica (Rudolf et al., 2014) e central (Woelfer et al., 2019). Indivíduos com depressão atípica geralmente têm pior prognóstico no curso da doença (Fulton et al., 2022), em parte porque podem apresentar uma resposta prejudicada aos antidepressivos (Henkel et al., 2006). Como a depressão atípica é preditiva de excessos e ganho de peso, e os riscos metabólicos podem ser intensificados por tratamentos antidepressivos que estimulam o ganho de peso, um ciclo vicioso pode promover a progressão da doença.

Existem vários fatores biológicos que ligam a obesidade e a depressão, incluindo disfunção no sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, efeitos das adipocitocinas, via da quinurenina, inflamação crônica, alterações na microbiota intestinal e outros (Singh, 2014; Capuron et al., 2017; Ambrósio et al., 2018). Juntos, esses mecanismos regulam não apenas várias funções cerebrais, incluindo humor e respostas hedônicas à ingestão de alimentos, mas também motivação, gasto de energia e saciedade (McEwen e Morrison, 2013). Entre esses fatores, a inflamação parece ter um papel central nos mecanismos associados ao padrão cíclico de co-ocorrência de depressão e obesidade. No entanto, é importante destacar que essas condições podem ocorrer de forma independente ou em combinação e a inflamação periférica não é observada em todos os pacientes (Castanon et al., 2014; Ambrósio et al., 2018).

O papel da produção desregulada e/ou ação cerebral de citocinas na indução de distúrbios neuropsiquiátricos tem sido amplamente documentado (Capuron e Miller, 2011; Dantzer et al., 2008; Lasselin e Capuron, 2014). As citocinas, liberadas localmente por células imunes inatas, ativas

em condições de lesão tecidual, infecção ou inflamação, são capazes de atuar sistemicamente em órgãos distantes, incluindo o cérebro (Capuron e Miller, 2011; Dantzer et al., 2008). A ativação da comunicação imune-cérebro acaba induzindo a produção de citocinas cerebrais por células endoteliais e gliais ativadas, particularmente microglia (Castanon et al., 2004; Salas-Venegas et al., 2022). As citocinas inflamatórias produzidas localmente ativam o sistema neuroendócrino, em particular, o eixo HPA, prejudicam o metabolismo e a função dos neurotransmissores e alteram a plasticidade neural e os circuitos cerebrais. Essas alterações, por sua vez, levam a alterações comportamentais, que incluem fraqueza, apatia, mal-estar, anorexia, fadiga, alteração na cognição e de humor, coletivamente referidas como comportamento doentio e contribuindo para a defesa do hospedeiro (Capuron e Miller, 2011; Dantzer et al., 2008). Essa resposta comportamental adaptativa deve ser adaptada ao estímulo e limitada no tempo. No entanto, às vezes pode se tornar anormal e desencadear sinais neuropsiquiátricos, em particular quando a inflamação cerebral permanece cronicamente ativada ou mal regulada (Borsini et al., 2015; Dantzer et al., 2008), como no contexto obesogênico. A maioria das evidências que sustentam esses achados vem de estudos clínicos envolvendo pacientes recebendo citocinas, em particular interferon (IFN)- $\alpha$ , como tratamento para câncer ou hepatite C. Embora não tenham antecedentes psiquiátricos, até 45% desses pacientes desenvolvem depressão durante a terapia com IFN- $\alpha$ , a menos que recebam um tratamento antidepressivo profilático (Capuron et al., 2011; Musselman et al., 2001).

Dados clínicos e pré-clínicos sugerem que a depressão induzida por citocinas pode comprometer a neurotransmissão monoaminérgica, particularmente, serotonina, glutamato e dopamina, provavelmente devido à ativação induzida por inflamação de enzimas específicas em monócitos, macrófagos e microglia (Capuron e Miller, 2011; Capuron et al., 2011; Dantzer et al., 2008). Uma dessas enzimas é a GTP-ciclohidrolase 1 (GTP-CH1) (Felger e Miller, 2012), que produz neopterin em detrimento da tetrahidrobiopterina, ou BH4, um cofator essencial para a biossíntese de dopamina e serotonina (Capuron et al., 2011). Consistente com a hipótese de que alterações induzidas por inflamação na via GTP-CH1 contribuem para o desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos, níveis reduzidos de BH4 são relatados em pacientes com distúrbios psiquiátricos (Capuron, Lasselin, e Castanon, 2017), e fadiga, diminuição da motivação e anedonia em pacientes tratados com IFN- $\alpha$  e primatas não humanos correlacionam-se com alterações significativas de BH4 (Felger et al., 2013). A ativação do GTP-CH1 também prejudica a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), levando à geração de radicais livres, estresse oxidativo e reduzindo a disponibilidade de BH4 ao



promover sua oxidação. Outra enzima ativada por citocinas e cujo envolvimento em sintomas neuropsiquiátricos induzidos por inflamação tem sido documentado é a Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Esta enzima é a primeira enzima a degradar o triptofano, o aminoácido essencial precursor da serotonina, ao longo da via da quinurenina (Dantzer et al., 2008; Capuron, Lasselín, e Castanon, 2017). Ao consumir triptofano, a ativação da IDO pode reduzir a síntese de serotonina. A associação de sintomas neuropsiquiátricos com níveis aumentados de quinurenina ou relação quinurenina/triptofano alterada foi demonstrada em várias condições associadas à inflamação, incluindo pacientes tratados com IFN- $\alpha$ , obesidade, envelhecimento ou doença de Alzheimer (Capuron et al., 2011; Capuron, Lasselín, e Castanon, 2017). De fato, dados mostram que indivíduos obesos exibem níveis circulantes mais baixos de triptofano, juntamente com níveis maiores de quinurenina em comparação com controles magros (Brandacher et al., 2007). Embora a ativação da via da quinurenina tenha sido relatada principalmente como um componente para iniciação e propagação da obesidade e complicações médicas relacionadas, incluindo doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (Mangge et al., 2014), também é possível que contribua para o desenvolvimento de comorbidades depressivas, através dos efeitos neurotóxicos dos metabólitos da quinurenina.

Estudos pré-clínicos começaram a descrever a causalidade dos eventos e a identificar alguns mecanismos subjacentes. A ocorrência de sinais comportamentais (de humor e cognitivos) em modelos de obesidade induzida por dieta (DIO, do inglês *diet-induced obesity*) ou roedores geneticamente obesos (db/db) foi associada a maior expressão hipocampal e cortical de citocinas inflamatórias (Castanon et al., 2015; Dinel et al., 2011, 2014; Erion et al., 2014; Kanoski e Davidson, 2011; Pistell et al., 2010). Curiosamente, a expressão hipocampal de IL-1 $\beta$  em camundongos obesos db/db está relacionada à adiposidade e seu bloqueio previne o comprometimento cognitivo ao normalizar a densidade da coluna dendrítica e a disfunção sináptica (Erion et al., 2014). Da mesma forma, camundongos DIO exibem ativação exacerbada do eixo HPA em resposta a um desafio imunológico, juntamente com aumento da neuroinflamação e comportamento do tipo depressivo (Andre et al., 2014). Esses resultados suportam a noção de que os fatores inflamatórios e o eixo HPA, que estão inter-relacionados e altamente ativados na obesidade (Dinel et al., 2014), podem atuar em conjunto nesse contexto para promover alterações de humor (Dey et al., 2014). Por fim, vale ressaltar que, além das vias discutidas acima, alterações do eixo intestino-cérebro podem representar outro mecanismo de comorbidades neuropsiquiátricas induzidas por inflamação, dado o

papel desse eixo no desenvolvimento de sinais neuropsiquiátricos após estresse crônico (Capuron, Lasselin, e Castanon, 2017). O transplante de microbiota intestinal de camundongos obesos para magros é capaz de induzir alterações neurocomportamentais na ausência de obesidade e apoia essa noção (Bruce-Keller et al., 2015). Em conjunto, esses dados apontam para a inflamação cerebral como um ator importante no desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos relacionados à obesidade e destaca a participação de várias vias/sistemas que não são necessariamente específicos da condição de obesidade, mas que ainda podem modular ou retransmitir o impacto cerebral dos processos inflamatórios (Capuron, Lasselin, e Castanon, 2017; Marx et al., 2021).

### **1.8. Diferenças entre os sexos no contexto da obesidade e sobrepeso**

Existe resposta diferencial na adiposidade e na prevalência de doenças associadas à obesidade entre homens e mulheres. Nos homens com obesidade, a ocorrência de doenças cardíacas e infarto do miocárdio é maior, enquanto nas mulheres, a obesidade está mais associada ao acidente vascular encefálico isquêmico (Hu et al., 2022). Ao comparar homens e mulheres com o mesmo IMC, observou-se que as mulheres têm um teor de gordura corporal 10% maior. Além disso, as mulheres apresentam maior volume de gordura subcutânea, enquanto os homens apresentam maior volume de gordura intra-abdominal ou visceral (Griffin et al., 2010). Ainda assim, existem dados limitados para explicar a origem dessas diferenças, mas vários estudos propuseram o papel do estrogênio nas respostas diferenciais dependentes do sexo no metabolismo. A diminuição dos níveis de estrogênio em mulheres na menopausa está associada à perda de gordura subcutânea e ao acúmulo de gordura abdominal (Lizcano e Guzmán, 2014). Em apoio à importância do estrogênio, o aumento da adiposidade após ooforectomia (procedimento cirúrgico de remoção de ovários) e a depuração do estrogênio ovariano foram observados em roedores (Stubbins et al., 2012) e macacos (Sullivan et al., 2005; Chen et al., 2021).

Diferenças sexuais no sistema imunológico e macrófagos, que podem contribuir para diferenças sexuais em doenças associadas à obesidade foram relatadas em humanos e em resposta a DIO em modelos animais de roedores (Palmer e Clegg, 2015; Bupp, 2015). Camundongos machos alimentados com HFD têm ganho de tecido adiposo mais pronunciado, maior propensão a resistência à insulina e maior recrutamento e ativação de macrófagos, que apresentam características mais

inflamatórias e mais migratórias quando comparados a camundongos fêmeas (Chen et al., 2021). Ainda, estudos revelaram que os marcadores de estresse oxidativo são maiores em homens com obesidade em comparação com mulheres com obesidade da mesma idade. Embora seja difícil determinar se essas interações são aditivas ou sinérgicas, a maioria dos biomarcadores redox depende não apenas da idade e do sexo, mas também das interações idade-sexo ou idade-obesidade (Choromańska et al., 2021).

Também tem sido documentado as diferenças entre os sexos no comprometimento cognitivo associado a distúrbios metabólicos (Ferretti et al., 2018). A literatura mostra que a prevalência e os efeitos dos fatores de risco para demência, sejam eles cerebrovasculares, metabólicos e socioeconômicos são diferentes entre homens e mulheres. Ainda, homens e mulheres com doença de Alzheimer exibem diferentes sintomas cognitivos e psiquiátricos, e as mulheres apresentam declínio cognitivo mais rápido após o diagnóstico de comprometimento cognitivo leve ou demência (Anstey et al., 2021). Ademias, as taxas e padrões de atrofia cerebral diferem ao longo da doença entre os sexos, sendo a atrofia cerebral é mais rápida nas mulheres do que nos homens. Apesar disso, não há diferença entre os sexos nos níveis de beta-amilóide, medidos com imagem cerebral e com bioquímica do líquido cefalorraquidiano (Jack et al., 2015; Ferretti et al., 2018). Hu et al. (2021) informaram que em uma população chinesa mais velha, o IMC e a circunferência do quadril estão positivamente relacionados à função cognitiva em mulheres, enquanto nenhuma associação foi encontrada em homens. Por outro lado, o estudo de Espeland et al. (2021), que avaliou mulheres e homens com idade média de 68 anos, com DM2 e sobrepeso ou obesidade, observou vantagens cognitivas em mulheres com DM2 e sobrepeso/obesidade em relação aos homens durante o envelhecimento. Embora ainda existam poucos estudos, a obesidade parece afetar homens e mulheres de maneira diferente, portanto, os resultados relacionados ao declínio cognitivo, demência e outras doenças podem ser diferentes (Salas-Venegas et al., 2022).

Diferenças entre homens e mulheres em relação a transtornos como depressão e ansiedade associados a obesidade também são encontradas (Zhao et al., 2009; Scott et al., 2008). Por exemplo a frequência de diagnóstico dessas doenças é o dobro em mulheres obesas quando comparado aos homens com obesidade, porém essa distinção diminui em condições de obesidade grave ( $IMC \geq 40$ ) (Fulton et al., 2022). Embora as diferenças sexuais nos transtornos de ansiedade e na depressão sejam bem caracterizadas, apenas mais recentemente é que a descrição dos mecanismos subjacentes

a essa questão estão sendo publicados (Bangasser e Cuarenta, 2021). A adiposidade serve como um melhor preditor de depressão do que a massa corporal em mulheres do que em homens (Ul-Haq et al., 2014). As mulheres com depressão são mais propensas a ter aumento do apetite e ganho de peso do que os homens (Kokras e Dalla, 2017), um resultado associado aos efeitos do estresse para estimular a ingestão de alimentos palatáveis (Dallman, 2010). Em ambos os sexos, o estado de humor deprimido está mais associado a deficiências metabólicas, como inflamação, hipertensão e resistência à insulina do que à massa corporal propriamente (Jokela et al., 2014). Correspondentemente, a prevalência de depressão é quase duas vezes maior em pessoas com diabetes tipo 2 (Wang et al., 2019) e mais de três vezes maior em pessoas com diabetes tipo 1 do que naqueles sem, com taxas maiores em mulheres diabéticas do que em homens (Roy and Lloyd, 2012). O diabetes está associado a uma probabilidade 48% maior de sintomas de ansiedade e a um risco 20% maior de desenvolver um transtorno de ansiedade (Garipey et al., 2010). De maneira consistente, indivíduos obesos caracterizados como metabolicamente saudáveis (pressão arterial, proteína C-reativa, triglicerídeos e glicemia normais) não apresentam risco aumentado ou um risco elevado modesto (Hamer et al., 2012; Jokela et al., 2014) de diagnóstico de depressão em comparação com controles não obesos. No entanto, a estigmatização da obesidade e a autoimagem ruim ainda podem contribuir para estados de humor deprimido para esses indivíduos, problema mais evidente nas mulheres (Fulton et al., 2022).

As intervenções dietéticas são as principais estratégias no controle da obesidade, ainda que sua eficácia seja variável na população em geral e entre os participantes de pesquisas (Aronica et al., 2020). Parte dessa variabilidade reflete diferenças biológicas de sexo, como composição corporal e metabolismo, e parte reflete fatores socioculturais de gênero, que podem influenciar comportamentos alimentares, como preferências e adesão à dieta. Em termos de diferenças biológicas entre os sexos, os homens tendem a perder mais peso com uma intervenção dietética porque, em média, eles têm maior tamanho corporal, maior proporção de massa muscular e gasto energético total. Eles também tendem a acumular mais gordura intra-abdominal do que as mulheres, o que está associado a maior risco de síndrome metabólica e melhor resposta a dietas com baixo teor de carboidratos (Wu e O'Sullivan, 2011; Aronica et al., 2020). Em termos de diferenças comportamentais de gênero, as mulheres são mais propensas a tentar perder peso várias vezes e participar de mais estudos de perda de peso do que os homens (Arganini et al., 2012). Eles também expressam uma maior preferência por produtos com baixo teor de gordura e uma maior preocupação

com alimentos ricos em gordura, o que pode facilitar a adesão a uma dieta com baixo teor de gordura (Aronica et al., 2020).

## **1.9. Manejo da obesidade**

Como discutido anteriormente, a obesidade é um importante fator contribuinte para o surgimento de alterações metabólicas e comportamentais, portanto é importante que sejam adotadas medidas validas para prevenir e tratar obesidade e seus prejuízos ao organismo. O tratamento da obesidade é complexo e tem como objetivo a perda da massa corporal e melhora dos hábitos alimentares (Kořínková et al., 2020). Os indivíduos que vivem com obesidade devem receber planos de cuidados individualizados que abordem as causas profundas da obesidade e que forneçam suporte para mudança comportamental, por exemplo, nutrição, atividade física e terapias adjuvantes, que podem incluir intervenções psicológicas, farmacológicas e cirúrgicas (Fandiño et al., 2004; WHO, 2014).

O uso de medicamentos no tratamento de obesidade representa uma abordagem útil, como adjuvante da perda de peso e manutenção da perda de massa corporal, principalmente quando associada a dieta balanceada e atividade física. O uso desses medicamentos deve ser reservado a pacientes com  $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$  ou  $IMC > 27 \text{ kg/m}^2$  associado a complicações relacionadas a adiposidade. A farmacoterapia aumenta a magnitude da perda de peso além do que as mudanças de comportamento de saúde podem alcançar sozinhas e é importante na prevenção do reganho de peso (Wharton et al., 2020).

Outra abordagem para tratamento da obesidade é a cirurgia bariátrica, também conhecida como cirurgia metabólica. É considerada para pessoas com  $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$  ou  $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$  com pelo menos 1 doença relacionada à obesidade instalada, como hipertensão ou dislipidemia (WHO, 2014). A decisão sobre o tipo de cirurgia deve ser feita em colaboração com uma equipe multidisciplinar, ponderando as expectativas do paciente, condição médica e benefícios e riscos esperados da cirurgia (Wharton et al., 2020).

Várias estratégias farmacológicas e cirúrgicas estão disponíveis para tratar a obesidade, entretanto intervenções no estilo de vida, que induzem um balanço energético negativo fornecem a base para o tratamento do sobrepeso e da obesidade e fazem parte da recomendação padrão (Tucker et al., 2021). Existem diferentes abordagens de estilo de vida, porém nutrição, atividade física e

comportamento são os principais componentes. As intervenções comportamentais destinam-se a melhorar a adesão às recomendações de estilo de vida. Isso pode incluir automonitoramento, estabelecimento de metas, controle de estímulos (por exemplo, redução da disponibilidade de alimentos tentadores), redução do estresse, melhora da quantidade e qualidade do sono e/ou terapia psicológica (Curry et al., 2018; Tucker et al., 2021). Ao diminuir a ingestão de energia e aumentar a atividade física acompanhada de técnicas de mudança comportamental, pode-se chegar a um déficit energético diário que favorece a perda de peso (Wiechert e Holzapfel, 2021), que desencadeia uma cascata de mecanismos adaptativos metabólicos e neuro-hormonais (Wharton et al., 2020). O balanço energético muda com a perda de massa corporal, tornando necessário ajustar a ingestão e o gasto de energia durante o controle de peso (Garvey et al., 2016).

As intervenções no estilo de vida constituem a pedra angular do tratamento da obesidade, mas a adesão é um desafio para muitas pessoas com sobrepeso e obesidade e os sucessos a longo prazo são modestos devido a barreiras significativas por parte dos indivíduos afetados e dos profissionais de saúde responsáveis pelo tratamento (Lemstra et al., 2016; Zhang et al., 2014).

### **1.10. Restrição calórica: história, definição**

A restrição calórica (RC) se trata de uma estratégia de intervenção na alimentação que pode ser válida no cenário da obesidade e alterações induzidas pelo excesso de adiposidade (Van Cauwenberghe, 2016). RC, também denominada restrição alimentar, é por definição uma estratégia dietética caracterizada por redução na ingestão calórica, sem causar desnutrição e com manutenção de um consumo normal de vitaminas, minerais e biomoléculas essenciais (Ribarič, 2012).

As pesquisas mais importantes sobre RC iniciaram por volta de 1929 com um estudo de McCay e seus colegas da Universidade de Cornell que mostrava o efeito da RC em peixes (McCay et al., 1929) e em 1935 apresentaram os efeitos em ratos (McCay et al., 1935). Nesse estudo, foram utilizados ratos para determinar o efeito do crescimento retardado na expectativa de vida. O protocolo deste estudo envolveu três grupos: um grupo de crescimento normal sem intervenção e outros dois grupos que foram mantidos em restrição calórica de 40% por 700 ou 900 dias. Eles observaram que além do crescimento mais lento, que era esperado, a RC prolongou a vida útil dos animais. Deve-se notar que McCay e colaboradores acreditavam que era o crescimento retardado o

responsável pela extensão da vida e não a redução na ingestão de energia em si. De fato, esta hipótese foi mantida por cerca de 40 anos ou mais após as publicações.

No entanto, não se deve concluir que a RC não tenha sido explorada antes dos estudos de McCay e colaboradores. Em 1914, Francis Peyton Rous, ganhador do Nobel de 1966, relatou que a redução da ingestão de alimentos inibiu a ocorrência de cânceres espontâneos em roedores (Rous, 1914). Alguns anos depois, Osborne e Mendel, renomados nutricionistas de Yale, relataram que retardar o crescimento de ratas, diminuindo a ingestão de alimentos, levou à extensão da vida e da capacidade de reprodução em idades mais avançadas quando comparados a animais não restritos (Osborne et al. 1917). No mesmo ano, foi relatado que a redução da disponibilidade de alimentos prolonga a vida da *Drosophila* (Loeb e Northrop 1917). Duas outras descobertas importantes foram relatadas no final da década de 1930. Um era o aumento da longevidade de *Daphnia longispina* induzida pela redução da ingestão de alimentos (Ingle et al., 1937) e o outro foi o trabalho adicional do grupo McCay fornecendo evidências de que o fator responsável por trás do crescimento lento foi provavelmente a redução na ingestão calórica (McCay et al. 1939). De fato, nos anos seguintes, o termo restrição calórica (RC) começou a ser amplamente utilizado para se referir a restrição alimentar global.

Além dos experimentos em roedores, sabe-se que a RC pode retardar muitos processos do envelhecimento fisiológico e a instalação e progressão de doenças relacionadas a idade em outros organismos, como macacos e humanos. O estudo de Colman e colaboradores (2009) dividiu macacos rhesus em dois grupos, um que recebia dieta apropriada para a espécie de forma *ad libitum* e outro que recebia a mesma dieta, porém com RC de 30%. Os animais foram acompanhados ao longo de 20 anos e os pesquisadores observaram que os animais do grupo restrito tinham taxa de sobrevivência aumentada em cerca de 80%, aparência física mais jovem, menor incidência de doenças como neoplasias, doenças cardiovasculares, diabetes e atrofia cerebral quando comparados ao grupo controle.

O estudo pioneiro em mostra que a RC reduz a massa corporal, frequência cardíaca, temperatura corporal e pressão arterial foi conduzido por Keys e colaboradores no final de 1940. Eles estudaram os efeitos de 6 meses de uma redução de 40% no consumo de alimentos de 32 homens magros, entretanto causando desnutrição, algo que a RC não se propõe. Apesar dos efeitos

nos parâmetros metabólicos, a dieta neste estudo era pobre em qualidade e teve efeitos psicológicos adversos. A literatura mostra que os protocolos de RC geralmente incluem uma redução consistente de 20 a 40% na ingestão calórica abaixo da ingestão de energia *ad libitum* (Van Cauwenberghe, 2016), e restrições acima de 55 a 60% (animais recebendo 40 a 45% da ingestão basal) parece desencadear efeitos negativos na vida útil (Speakman e Mitchell, 2011). Em um estudo epidemiológico publicado posteriormente, Keys também mostrou ligação da baixa ingestão de alimentos com diminuição nos níveis de colesterol plasmático e incidência reduzida de ataques cardíacos (Keys, 1980). Nos anos 1990 e início dos anos 2000, foi documentado que uma RC de 20%, por um período de 2 a 6 anos em adultos saudáveis foi capaz de reduzir os fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes (Walford et al. 2002; Fontana et al. 2004).

O primeiro estudo envolvendo humanos e RC, conduzido por um período mais longo, foi iniciado em 26 de setembro de 1991, liderado por Roy Walford. A amostra era composta por oito humanos adultos e saudáveis, sendo 4 mulheres e 4 homens e tiveram sua alimentação restrita por 2 anos, sendo aplicado 20% de restrição. Os resultados encontrados incluíam diminuição da massa corporal, pressão arterial, colesterol plasmático e glicemia (Walford et al. 1992; Walford et al., 2002). Esses resultados foram consistentes com aqueles relatados para macacos em RC, indicando conservação de espécies em resposta a RC (Balasubramanian et al., 2017).

### **1.11. Restrição calórica no contexto de alterações metabólicas**

A RC diminui massa corporal, pressão arterial, níveis de insulina e glicose plasmáticos, melhora a sensibilidade à insulina, aumenta gliconeogênese e a oxidação da glicose diminui às custas do aumento da oxidação de gorduras e proteínas (Most e Redman, 2020). Além disso, a RC melhora o perfil lipídico com uma diminuição nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, colesterol LDL e na proporção entre colesterol total e colesterol HDL e aumento de HDL (Huffman et al., 2022). Os mecanismos desses benefícios da RC parecem incluir a inibição do anabolismo, melhora do metabolismo energético mitocondrial e conversão da utilização de substratos. Esses processos estão relacionados com a redução da dependência do metabolismo da glicose e aumento da oxidação de ácidos graxos (Zhang et al., 2022; Sergeeva et al., 2023).



A literatura tem mostrado os benefícios da RC em prevenir alterações decorrentes do consumo de HFD. Ding e colaboradores mostraram que uma RC (30%) impediu parcialmente a esteatose hepática não alcoólica desencadeada por HFD em ratos Wistar, além de aumentar marcadores de autofagia enquanto diminuía os marcadores de estresse do retículo endoplasmático no fígado e atenuava o distúrbio do metabolismo lipídico (Ding et al., 2017). Ainda a RC diminuiu o estresse oxidativo, fator associado ao envelhecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes e câncer, além de atenuar biomarcadores associados a inflamação (Sergeeva et al., 2023; Brady et al., 2022).

No contexto do diabetes tipo 2 instalado, a RC trouxe melhorias na qualidade de vida, peso e função hepática, bem como diminuição nos níveis de lipídios, glicose e hemoglobina glicada, melhorou a resistência à insulina do músculo esquelético e a função das células  $\beta$  (Taylor, 2019). Em pacientes obesos com diabetes tipo 2, a restrição calórica diminuiu a taxa de filtração glomerular, que está associada a uma melhora na hiperfiltração glomerular (Ruggenti et al., 2022). Em indivíduos com fígado gorduroso, uma dieta restrita levou a perda de peso e reduções no tecido adiposo visceral e na fração de gordura do fígado, além de reduzir os níveis de triglicérides, colesterol total e LDL, enzimas hepáticas, glicose em jejum, insulina e índice HOMA-IR, níveis de alanina aminotransferase e gama-glutamil transferase (Sergeeva et al., 2023), o que reflete uma melhora nas alterações cardiometabólicas relacionadas à obesidade envolvidas no desenvolvimento de esteatose hepática (Ristic-Medic et al., 2020). Este resultado sugere que a RC pode melhorar os fatores de risco para doenças hepáticas e metabólicas (Dorling et al., 2021). Os mecanismos moleculares que explicam os efeitos da RC no organismo parecem envolver modulação na sinalização da rapamicina quinase (mTOR), da proteína serina/treonina quinase ativada por AMP (AMPK) e sirtuínas, do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e promoção de autofagia (Liu, Li e Ma, 2021) (figura 7).

A proteína rapamicina quinase mTOR (figura 7) é o núcleo catalítico de dois complexos proteicos distintos, mTORC1 e mTORC2, cada um dos quais é composto por subunidades proteicas distintas que fosforilam diferentes substratos (Liu e Sabatini, 2020). Resumidamente, a mTORC1 responde a uma ampla gama de estímulos ambientais, incluindo a disponibilidade de aminoácidos, glicose, oxigênio, colesterol e insulina/IGF1, enquanto a mTORC2 é principalmente um efetor da sinalização PI3K. A mTORC1 é agudamente sensível à droga rapamicina, enquanto a mTORC2,

devido à sua estrutura, é inibido por altos níveis de rapamicina (Green, Lamming e Fontana, 2021). A mTORC1 integra numerosos sinais ambientais que indicam quando as condições são favoráveis para os processos anabólicos que controla, que incluem biogênese ribossômica, tradução de proteínas, autofagia, lipogênese e biogênese de nucleotídeos (Wu et al., 2022).

A inibição da atividade mTOR por meio de modificação genética e tratamento com rapamicina prolonga a vida útil em espécies como leveduras, vermes, *Drosophila* e camundongos (Liu e Sabatini, 2020; Harrison et al., 2009). Posteriormente, descobriu-se que a restrição alimentar prejudica a atividade do mTOR e impacta favoravelmente muitos distúrbios relacionados à idade em humanos (Wu et al., 2022). Por exemplo, dietas com RC aumentam a longevidade, melhoram a função cognitiva, reforçam a função cardíaca, melhoram a patogênese metabólica e reduzem a incidência de câncer (Dorling et al., 2020; Sowah et al., 2022; O'Flanagan et al., 2017; Madeo et al., 2019). Da mesma forma, descobriu-se que os inibidores de mTOR, como a rapamicina e o maleato de perhexilina, imitam o efeito promotor da saúde da RC (Madeo et al., 2019; Wu et al., 2022). No entanto, a aplicação em larga escala da rapamicina tem sido impedida devido a uma série de efeitos colaterais, que incluem a desregulação da glicemia e da homeostase lipídica, bem como a imunossupressão. Estes efeitos secundários são provavelmente mediados pela inibição da mTORC2, que é interrompida pelo tratamento com rapamicina (Wu et al., 2022; Green, Lamming e Fontana, 2021). Dada a semelhança dos efeitos benéficos da inibição da mTORC1 e RC, é amplamente aceito que a mTORC1 tem um papel na resposta à RC (Wu et al., 2022).

Além da sinalização reduzida da mTOR, diminuição da sinalização da insulina/IGF-1 também tem sido apontado como parte do mecanismo da RC (Lamming, 2014). A insulina e os IGFs, IGF-1 e IGF-2, são peptídeos estruturalmente semelhantes com papéis importantes no controle do metabolismo e do crescimento em resposta a sinais nutricionais e ao estado nutricional. O IGF-1 e o IGF-2 são produzidos principalmente no fígado e, em menor extensão, localmente nos tecidos alvo, onde exercem ações autócrinas e parácrinas (Klement e Fink, 2016). Ambos têm efeitos biológicos semelhantes que são causados pela ligação ao receptor de IGF-1 (IGF-1R), enquanto o IGF-2R é específico para IGF-2 e acredita-se que não tenha nenhum papel fisiológico, exceto servir para degradar o IGF-2 (Cianfarani et al., 2012). A sinalização através desses receptores modula a via PI3K/Akt/mTOR e pode regular processos relacionados ao envelhecimento (Vitale et al., 2019).

A RC acarreta alterações hormonais e em roedores suprimiu os níveis circulantes de IGF-1 e insulina proporcionalmente ao nível de restrição, aumentou a sensibilidade à insulina e a resistência ao estresse e à toxicidade, e reduziu o risco de câncer (Dunn et al., 1997; Berrigan et al., 2002; Vitale et al., 2019). A maioria dessas características observadas em camundongos do tipo selvagem durante a RC se assemelham àquelas relatadas em camundongos com interrupção genética da sinalização de GH/IGF-1/insulina (Vitale et al., 2019). Em humanos, ensaios clínicos randomizados mostraram que a RC não atenua os níveis séricos de IGF-1, a menos que a ingestão de proteínas seja reduzida (Redman et al., 2009; Fontana et al., 2016). No entanto, uma meta-análise, que avaliou o efeito da restrição alimentar em biomarcadores bem reconhecidos do envelhecimento saudável, mostrou uma diminuição nos níveis circulantes de IGF-1 em humanos (Lettieri-Barbato et al., 2016). Esta adaptação hormonal que ocorre em organismos em RC pode ter um papel relevante na melhora da saúde e prolongamento da vida através de vários mecanismos, como redução da taxa metabólica, proliferação celular, estresse oxidativo e atenuação de processos inflamatórios de baixo grau (Vitale et al., 2019).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), atua como sensor de estresse mitocondrial e status de nutrientes e pode ser ativada sob condições de proporção elevada de AMP/ATP intracelular, incorporando um detector de status de energia celular (Sarbassov et al., 2006; Green, Lamming e Fontana, 2021) (figura 7). Essa proteína é formada por um complexo que consiste em uma subunidade catalítica alpha ( $\alpha$ ) e outras duas subunidades regulatórias beta e sigma ( $\beta$  e  $\gamma$ ). A ativação da AMPK ocorre devido a fosforilação, em resíduo de treonina, da subunidade catalítica  $\alpha$  em resposta a aumento intracelular de AMP, ADP, cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio e dano celular (Liu e Sabatini, 2020; González et al., 2020). Uma vez ativa, por meio de fosforilação de proteínas alvo, a AMPK inibe de vias anabólicas, como síntese de proteínas, e estimula vias catabólicas, como a glicólise e oxidação de ácidos graxos, restaurando o equilíbrio metabólico, uma resposta oportuna a baixos níveis de energia celular (Lin e Hardie, 2018; Wu et al., 2022).

A importância da AMPK na regulação da homeostase metabólica faz dessa enzima alvo terapêutico e fármacos que induzem ativação da AMPK tem sido usado no tratamento de diversas doenças (López-Lluch e Navas, 2016). Um exemplo é a metformina, uma das drogas mais prescritas para o tratamento de diabetes, considerado mimético da RC (Foretz et al., 2023; Wu et al., 2022). Seu mecanismo de ação é via ativação da AMPK, levando ao aumento indireto da proporção de

AMP/ATP nas células e resultando em efeitos como diminuição do nível de glicose no sangue, retardo da progressão de tumores e reversão de comprometimento cognitivo (Madeo et al., 2019; Boccardi et al., 2019). Além da ativação farmacológica, foi relatado que tanto o jejum intermitente quanto a RC são capazes de ativar AMPK e promover melhorar na saúde e funções em várias espécies, como *C. elegans*, *Drosophila* e roedores (Weir et al., 2017; Wu et al., 2022; Green, Lamming e Fontana, 2021).

Após detectar a disponibilidade de energia, a AMPK regula outras vias, como mTOR (regulador negativo) e SIRT1 (regulador positivo). O PGC-1 $\alpha$  (do inglês, *peroxisome proliferator active receptor gamma coactivator 1 alpha*), é um coativador transcricional de fatores de transcrição de receptores nucleares, como PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (Martinez-Redondo et al., 2015). Esta família de fatores de transcrição de receptores nucleares regula genes envolvidos em um amplo espectro de funções fisiológicas, incluindo o metabolismo lipídico e tem sido implicada no diabetes e na síndrome metabólica (Balasubramanian et al., 2016). A AMPK fosforila diretamente o PGC-1 $\alpha$ , resultando em ativação, promovendo assim a utilização de lipídios como combustível. Evidências sugerem que os efeitos benéficos da RC são, pelo menos em parte, dependentes da sinalização da mTORC1. Curiosamente, a AMPK é um regulador negativo de mTOR, sugerindo que há uma convergência de sinalização em condições de RC para diminuir simultaneamente a sinalização de crescimento, por meio de mTOR e fatores relacionados, e aumentar o metabolismo lipídico, por meio de PGC-1 $\alpha$  e PPAR $\alpha$  (López-Illuch e Navas, 2016; Green, Lamming e Fontana, 2021).

As sirtuínas (figura 7) são uma família de enzimas que influenciam uma série de atividades celulares, incluindo regulação do metabolismo, determinação do destino celular e remodelação da cromatina (Bonkowski e Sinclair, 2016; Imai e Guarente, 2014). Uma sirtuína consiste em sete subunidades (SIRT1-7) com localizações intracelulares distintas, as SIRT1, SIRT6 e SIRT7 estão distribuídas nos núcleos das células; SIRT2 está principalmente no citoplasma, mas tem capacidade de entrar e sair do núcleo e SIRT3, SIRT4 e SIRT5 residem nas mitocôndrias (Wu et al., 2022). A maioria dos membros da família sirtuína remove grupos acetil para aumentar a atividade de proteínas-alvo. A atividade enzimática das sirtuínas requer nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) como co-substrato (Balasubramanian et al., 2017). Esse requisito conecta intimamente a família das sirtuínas ao metabolismo, pois elas respondem a mudanças na disponibilidade de NAD,

como vias de regeneração e reciclagem de NAD e fluxo no metabolismo redox (Green, Lamming e Fontana, 2021).

Entre as sirtuínas, a SIRT1 é a mais estudada (Cantó e Auwerx, 2009). Mais de uma dúzia de substratos já foram descritos para SIRT1 (Feige e Auwerx, 2008), entre os quais estão outros reguladores do envelhecimento, como fatores de transcrição da família FOXO (Bordone e Guarente, 2005). A SIRT1 desempenha um papel importante na homeostase energética nos principais tecidos metabólicos (Cohen et al., 2004; López-Lluch e Navas, 2016), o que é potencialmente uma manifestação de sua capacidade de vincular o estado metabólico aos resultados transcricionais. A RC aumenta a expressão de SIRT1 em múltiplos tecidos em ratos e em células humanas (López-Lluch e Navas, 2016), e humanos em RC apresentam níveis regulados positivamente de SIRT1 no músculo esquelético (Civitarese et al., 2007). SIRT3 e SIRT5 também são induzidas por RC em camundongos (López-Lluch e Navas, 2016). Por outro lado, a supernutrição por dieta rica em gordura reduz a expressão de SIRT1 no tecido adiposo de camundongos (Chalkiadaki, A. e Guarente, 2012), e os níveis de SIRT1 são mais baixos no tecido adiposo de humanos com obesidade (Pedersen et al., 2008), bem como na doença de Alzheimer (Lutz et al., 2014; Green, Lamming e Fontana, 2021). O papel das sirtuínas de mamíferos foi investigado principalmente em camundongos nos quais as sirtuínas são deletadas ou superexpressas, seja em tecidos específicos ou de modo global (Green, Lamming e Fontana, 2021). A deleção de SIRT1 em todo o corpo bloqueia a capacidade da RC de prolongar a vida útil e camundongos geneticamente modificados para superexpressar SIRT1 são magros e metabolicamente ativos, com níveis reduzidos de colesterol e insulina circulantes e melhor tolerância à glicose (Bordone et al., 2007). Embora a superexpressão de SIRT1 em todo o corpo não aumente a expectativa de vida de roedores (Green, Lamming e Fontana, 2021; Herranz et al., 2010), a superexpressão específica do hipotálamo causou uma extensão significativa da expectativa de vida tanto em homens quanto em mulheres (Satoh et al., 2013). Os mecanismos moleculares pelos quais as sirtuínas regulam o metabolismo foram ativamente investigados. A SIRT1 desacetila e ativa o coativador transcricional PGC1 $\alpha$  e regula positivamente a transcrição do componente mTORC2, melhorando a homeostase da glicose (Anderson et al., 2008; Rodgers et al., 2005), ainda através da ativação da AMPK, reforça a inibição da mTOR, promovendo o catabolismo lipídico e a gliconeogênese (Green, Lamming e Fontana, 2021). A SIRT3 é essencial para a redução do dano oxidativo mediada pela RC, através do aumento do sistema de defesa antioxidante da glutatona mitocondrial, não apenas na célula coclear, mas também no neocórtex e no fígado

(Someya et al., 2010). Curiosamente, um polimorfismo no gene SIRT3 tem sido associado a homens centenários numa população europeia (Rose et al., 2003).

Ainda, a RC pareceu influenciar a autofagia (figura 7), processo pelo qual proteínas e organelas danificadas, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos, são alvo de degradação mediada por lisossomos. Este processo de degradação é útil para remover componentes celulares danificados e para fornecer intermediários metabólicos necessários para a síntese e metabolismo de proteínas (Antonioli et al., 2017; Hurley e Young, 2017). Este processo celular é induzido por uma série de fatores estressores às células, incluindo a retirada de nutrientes, um indutor clássico da autofagia. Sob estresse celular, incluindo depleção de nutrientes, a atividade da SIRT1 é aumentada, as proteínas da autofagia são desacetiladas e, subsequentemente, a autofagia é induzida (Lee, 2019). Embora o aumento na atividade da sirtuína seja provavelmente multifatorial, a relação entre a RC e o aumento nos níveis de NAD<sup>+</sup> é claramente uma hipótese atraente que conecta a privação de nutrientes, a ativação da sirtuína e a indução da autofagia (Kroemer et al., 2010; Boya et al., 2013). A autofagia induzida por sirtuínas tem diversos benefícios ao organismo, como manutenção da função renal, proteção contra doenças cardiovasculares, danos hepáticos, mantendo a função hepática básica, bloqueia processos inflamatórios, atenua senescência celular, é um alvo potencial do tratamento de câncer e desempenha função protetoras ao SNC (Lee, 2019). Tomados em conjunto, esses estudos identificam papéis para reguladores metabólicos sensíveis a nutrientes na resposta a RC e apontam para a importância central da integridade metabólica na saúde (Liu, Li e Ma, 2021), a figura 7 mostra a integração dos mecanismos descritos acima.

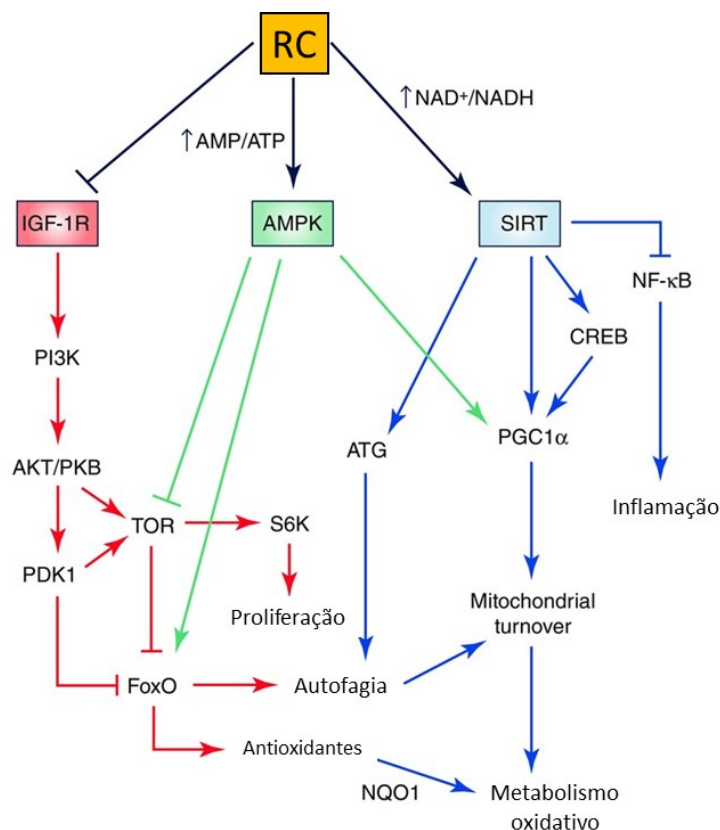


Figura 7: Interação dos mecanismos protetores da RC em organismos.

Quase todos os organismos estudados mostram mecanismos semelhantes em resposta à RC. Basicamente, o RC induz mecanismos envolvidos na eficácia energética e inibe mecanismos envolvidos no consumo e proliferação de energia menos eficiente. Assim, a RC inibe a sinalização dependente de IGF-I que ativa o TOR e a síntese protéica e inibe o FoxO, bloqueando a expressão antioxidante e a autofagia. Por outro lado, o equilíbrio entre AMP e ATP e  $NAD^+$  e o NADH serve como sinal para ativar AMPK e sirtuínas, respectivamente. Esses sensores e reguladores de nutrientes bloqueiam o sinal dependente de IGF-I e TOR ao mesmo tempo em que ativam mecanismos para aumentar a produção de energia mais eficiente através do metabolismo oxidativo e mecanismos para aumentar a proteção celular através de antioxidantes e renovação de organelas através da autofagia. Ao mesmo tempo, a RC, através das sirtuínas, pode bloquear os mediadores da inflamação. Esta regulação ocorre em diferentes níveis e muitos mediadores podem produzir uma resposta redundante, como a ativação da autofagia, bloqueando a inibição da FoxO dependente de TOR ou induzindo a atividade de proteínas relacionadas à autofagia. Adaptado de López-Lluch e Navas, 2016.

## 1.12. Restrição calórica no contexto de alterações neurológicas

Devido ao crescimento constante da população idosa nas sociedades atuais em todo o mundo (Pressley et al., 2003), a procura de novas estratégias de prevenção e tratamento para manter funções cerebrais ao longo da vida é de grande importância, tanto do ponto de vista econômico quanto médico (Martin et al., 2006). Estudos sugerem que fatores de estilo de vida modificáveis, incluindo o tipo de dieta e a quantidade de energia ingerida, podem exercer efeitos benéficos no cérebro (Witte

et al., 2009). Em modelos animais de doenças neurodegenerativas, a RC protegeu os neurônios do hipocampo, do estriado e do córtex e melhorou o declínio funcional (Patel et al., 2005; Wang et al., 2005). Em observações longitudinais em humanos, descobriu-se que uma dieta restrita, consumida por residentes da cidade de Okinawa, no Japão, contribuiu para o envelhecimento saudável e a longevidade (Willcox et al., 2007). Por outro lado, foi demonstrado que a obesidade como resultado da alta ingestão de energia aumenta o risco de declínio cognitivo (Knecht et al., 2008).

Em roedores, o envelhecimento cerebral e a neurodegeneração estão intimamente correlacionados com o metabolismo energético celular, e a RC pode elevar rapidamente as concentrações de metabólitos cerebrais e esses efeitos podem persistir por um longo período (Yanckello et al., 2019). A inflamação crônica é uma característica patológica comum de vários distúrbios metabólicos (Hotamisligil e Erbay, 2008) e pode resultar em perturbação das funções neuronais e à aceleração da neurodegeneração (Heneka et al., 2013). Os efeitos antiinflamatórios da RC foram demonstrados tanto em modelos animais quanto em pacientes humanos (Mercken et al., 2013). Por exemplo, camundongos geneticamente obesos desenvolvem patologias semelhantes à doença de Alzheimer e declínio cognitivo (Takeda et al., 2010). No entanto, a intervenção CR pode prevenir a síntese e deposição de proteínas beta-amilóide (A $\beta$ ) através da facilitação da proteólise de A $\beta$  (Wang et al., 2005). Benefícios semelhantes foram observados em lesões cerebrais agudas, como acidente vascular cerebral ou epilepsia (Ciobanu et al., 2017). A RC também atenua a neuroinflamação no hipotálamo e no hipocampo de roedores, reduz níveis de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo e no plasma, maior expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e preservação e atenuação de prejuízo da memória espacial (Vasconcelos et al., 2014; Pani, 2015; Rojic-Becker et al., 2019; Weiss e Fontana 2011). Além disso, pesquisas recentes demonstraram o papel potencial do eixo intestino-cérebro em doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla (Fang, 2016; Cattaneo et al., 2017; Shahi et al., 2017). Em particular, a RC pode afetar a composição da microbiota intestinal (Rangan et al., 2019), que medeiam a homeostase energética periférica, bem como a sinalização central do apetite. Além disso, as citocinas e os subprodutos metabólicos das populações microbianas intestinais podem afetar os comportamentos cognitivos através do nervo aferente vagal ou da rede neuroendócrina (Zhou et al., 2019). Em suma, a RC pode regular a progressão da neurodegeneração através de vias centrais e periféricas.



Além da supressão da neuroinflamação apresentada acima, a RC também ajuda a manter a permeabilidade e funções normais da barreira hematoencefálica, principalmente melhorando a homeostase vascular cerebral e o eixo intestino-cérebro. Estudos recentes revelaram um efeito benéfico da RC na saúde vascular cerebral (Zhang et al., 2021). As dietas hipocalóricas ajudam a manter a homeostase dos vasos sanguíneos, o que inclui a redução do estresse oxidativo, o aumento da bioatividade do óxido nítrico e a supressão da inflamação vascular. Estudos sobre os mecanismos moleculares mostraram que citocinas e vias críticas, como AMPK, mTOR e vias da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), participaram da manutenção da homeostase vascular (Liu et al., 2014). A RC atenua a perda neuronal, a indução da heme oxigenase-1 e a degradação da barreira hematoencefálica induzida pelo metabolismo oxidativo prejudicado (Calingasan e Gibson, 2000).

Tanto a RC de longo quanto de curto prazo potencializa a expressão de eNOS em células vasculares endoteliais (Minamiyama et al., 2007). Essas informações dos vasos periféricos indicam os efeitos benéficos da RC nos vasos cerebrais. Em um modelo de camundongo com dieta rica em gordura, o tratamento com RC aliviou significativamente o vazamento da barreira hematoencefálica (Kim et al., 2016). Outro modelo de camundongo idoso mostrou que a RC preservou significativamente o fluxo sanguíneo cerebral aos 20 meses de idade, quando a função cerebrovascular deveria estar comprometida em condições normais de alimentação (Parikh et al., 2016). Estas informações ilustram o papel potencialmente importante da RC na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica e das funções cerebrovasculares. No geral, a integridade e o funcionamento normal da barreira hematoencefálica aumentam a estabilidade do microambiente cerebral, o que alivia os sintomas das doenças neurodegenerativas (Zhang et al., 2021).

Ainda existem relatos que mostram que a RC melhor o humor, bem-estar psicológico e a qualidade de vida relacionada à saúde em geral, podendo ser uma alternativa de tratamento coadjuvante para depressão (De Cabo e Mattson, 2019; Iwge et al., 2021). Alguns ensaios clínicos avaliaram o humor e/ou a ansiedade sob regimes de restrição calórica, e a maioria, mas não todos, relataram melhora do humor e/ou ansiedade (Fond et al., 2013; Igwe et al., 2021). Embora haja uma escassez de ensaios clínicos randomizados sobre os efeitos da RC na depressão, o ensaio clínico randomizado CALERIE 2, foi conduzido em três instituições de pesquisa acadêmica, com uma amostra de adultos saudáveis sem obesidade que receberam uma dieta com restrição calórica de 25% ou uma dieta *ad libitum* por 2 anos (Martin et al., 2016). O grupo de RC teve maior perda de peso

do que o grupo *ad libitum*, melhora na qualidade de vida, melhora do humor, diminuição da tensão, melhora do desejo sexual e melhor qualidade do sono. Não foram observados efeitos negativos na qualidade de vida relacionada à saúde (Martin et al., 2016). Os fatores que contribuem para melhora dos sintomas depressivos em indivíduos em RC parecem envolver ácidos graxos livres, corpos cetônicos, proteína de ligação ao elemento de resposta ao monofosfato de adenosina cíclica (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), citocinas, orexina, grelina, leptina, espécies reativas de oxigênio e autofagia (Igwe et al., 2021).

Dietas que reduzem a ingestão calórica diária podem produzir níveis elevados de corpos cetônicos, além de resultar na mudança do uso de glicose como fonte de combustível para a utilização de ácidos graxos e corpos cetônicos (Harvie et al., 2011). Há uma depleção dos estoques de glicogênio hepático e hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres (AGL), que são liberados na circulação, transportados para os hepatócitos e metabolizados em corpos cetônicos, como acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB) (De Cabo e Mattson, 2019). Além de serem fontes de combustível, os AGL e os corpos cetônicos são potentes agentes sinalizadores que regulam muitas proteínas e outras moléculas conhecidas por terem efeitos na saúde (Igwe et al., 2021; de Cabo e Mattson, 2019). A ativação por AGLs dos fatores de transcrição receptor- $\alpha$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\alpha$ ) e fator de transcrição ativador 4 (ATF4) leva à produção e liberação de FGF2. Os corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$ -HB podem ser metabolizados em acetil CoA, e gerar trifosfato de adenosina (ATP) quando entra no ciclo do ácido tricarbóxico. Em camundongos, foi relatado que a RC ativa CREB (Fusco et al., 2012) e estimula a produção de BDNF no cérebro, levando à neurogênese aprimorada no hipocampo (Igwe et al., 2021). Estudos em camundongos mostraram que  $\beta$ -HB pode ativar CREB e fator nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B), um complexo proteico envolvido no controle da transcrição do DNA, produção de citocinas e sobrevivência celular, bem como a expressão de BDNF em neurônios (Huang et al., 2018; de Cabo e Mattson, 2019). Nos últimos anos, tem havido evidências crescentes sugerindo que a depressão é um distúrbio neurodegenerativo, aumentando à medida que os pacientes envelhecem (Setiawan et al., 2018). Como mencionado acima, o BDNF e o FGF2 são fatores neurotróficos e o BDNF pode aumentar a neurogênese no hipocampo. A hipótese neurotrófica da depressão afirma que a depressão é o resultado de níveis insuficientes de BDNF em certas áreas do cérebro (Gardner e Boles, 2011).

Os efeitos da RC nas mitocôndrias de modelos animais incluem a redução da produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a estimulação da biogênese mitocondrial (de Cabo e Mattson, 2019). Aumentos nas proteínas de choque térmico em ratos com restrição calórica (Manchishi et al., 2018) e uma redução de citocinas pró-inflamatórias em humanos com alimentação restrita (Faris et al., 2012) também foram relatados. Li et al. (2014) relataram que a RC aguda em camundongos leva a um efeito semelhante ao antidepressivo que é acompanhado por um aumento nos glicocorticóides. Foi proposto que, num esforço para se proteger destes glicocorticóides, há uma ativação de mecanismos celulares de resistência ao estresse no SNC que poderia resultar num aumento da neurogênese, síntese de fatores neurotróficos, e efeitos sobre neurotransmissores (Igwe et al., 2021). Os neurotransmissores afetados pela RC incluem serotonina (5-HT), dopamina, glutamato e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), todos os quais foram relatados como envolvidos na etiologia da depressão (Luscher et al., 2011; Albert et al., 2012; Ohgi et al., 2015; Belujon e Grace, 2017).

Muitos dos medicamentos antidepressivos atuam para neutralizar a diminuição da disponibilidade de 5-HT. Aumento da disponibilidade de triptofano cerebral (precursor de 5-HT) e 5-HT foi encontrado após restrição calórica em ratos (Knott et al., 1973; Ishida et al., 1997; Dhahbi et al., 2004). Cui e colaboradores (2018) relataram que os efeitos semelhantes aos antidepressivos produzidos pelo jejum agudo (9 h) em camundongos são exercidos por receptores 5-HT<sub>2A</sub>, e que com estes efeitos há uma sensibilidade particular à atividade neural no córtex pré-frontal. O estudo também indicou a mediação dos efeitos antidepressivos pela atividade na via CREB-BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal (Cui et al., 2018). No entanto, existe alguma controvérsia sobre os efeitos da RC no 5-HT. Um estudo em ratos com ciclo de restrição alimentar e realimentação utilizando vários níveis de acesso a alimentos palatáveis, descobriu que a RC estava associada a uma redução acentuada dos níveis de 5-HT e dopamina no córtex pré-frontal e induziu comportamentos semelhantes aos da depressão (Chandler-Laney et al., 2007). Jahng e colaboradores (2007) relataram que a restrição calórica crônica (5 semanas) em ratos jovens levou a comportamentos semelhantes a depressão, ansiedade e à diminuição da expressão do transportador de recaptação 5-HT. Kolta et al. (1989) estudaram o efeito da restrição calórica de longo prazo (19 meses) sobre os níveis de aminas cerebrais em ratos idosos de ambos os sexos e descobriram que, em comparação com o grupo que recebeu uma dieta restrita, tanto machos quanto fêmeas apresentaram níveis diminuídos de 5-HT e dopamina no núcleo caudado e no hipotálamo. Magnusson (1997) estudou os efeitos da RC

nos receptores ionotrópicos de glutamato em camundongos durante o envelhecimento e concluiu que a restrição calórica causou efeitos de preservação da memória devido a uma influência nos receptores N -metil- d -aspartato (NMDA). Em um estudo com ratos idosos, Lin e colaboradores (2015) relataram que ratos em RC melhoraram o fluxo sanguíneo cerebral em comparação com controles da mesma idade e exibiram maior reciclagem de glutamato-glutamina entre neurônios e astrócitos. No que diz respeito ao GABA, foi relatado que o jejum intermitente em camundongos aumenta a neurotransmissão inibitória GABAérgica (Liu et al., 2019), o que pode neutralizar convulsões e excitotoxicidade. Foi relatado que a restrição calórica resulta no aumento da expressão da descarboxilase do ácido glutâmico, a enzima responsável pela formação de GABA a partir do glutamato, no cérebro de ratos (Cheng et al., 2004).

Também foi relatado que a RC tem efeitos sobre a orexina, a grelina e a leptina no contexto dos transtornos de humor. O sistema de sinalização da orexina está envolvido na excitação, regulação do metabolismo, ingestão alimentar e mediação da recompensa (Igwe et al., 2021). O neuropeptídeo grelina é um regulador de energia e ativa os neurônios de orexina no hipotálamo lateral. A leptina, um hormônio peptídico secretado pelo tecido adiposo, atua no cérebro para regular a ingestão de alimentos e o gasto de energia, mantém a massa gorda, e mutações recessivas em seu gene podem resultar em obesidade em ratos de laboratório e em humanos (Friedman, 2009). Evidências pré-clínicas indicam que a leptina exerce efeitos antidepressivos (Milaneschi et al., 2019; Zou et al., 2019; Qin et al., 2020) e que esse efeito pode envolver modulação de neurotransmissores (5-HT e dopamina), citocinas, fatores neurotróficos, via P13K-AKT-mTOR e eixo HPA. Há controvérsia sobre os níveis de leptina no plasma de pacientes deprimidos em comparação com controles, com diminuições, aumentos e nenhuma alteração relatada (Igwe et al., 2021) e essa controvérsia pode ser devido a heterogeneidade dos sintomas na depressão (Milaneschi et al., 2017). Um estudo conduzido com pacientes com obesidade concluiu que níveis mais elevados de leptina plasmática estavam associados a sinais de depressão do subtipo atípico (Milaneschi et al., 2017). Em estudos com animais, observou-se que comportamentos semelhantes à depressão estavam associados a baixos níveis de leptina, e foi sugerido que a leptina tinha um efeito semelhante ao antidepressivo (Lu et al., 2006). No entanto, outros estudos não encontraram associação entre diminuição dos níveis de leptina e depressão (Milaneschi et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Existem ainda, evidências que indicam alterações no sistema imunológico, particularmente no que diz respeito ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e depressão (Lima Giacobbo et al., 2019). Dogan e colaboradores (2017) estudaram camundongos fêmeas colocados em dieta *ad libitum* ou em RC intermitente ou crônica por mais de um ano. Os pesquisadores descobriram que os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram mais baixos nos camundongos com RC intermitente e crônica do que naqueles do grupo dieta *ad libitum* (Dogan et al., 2017). Além disso, a diminuição foi maior com a RC intermitente do que com a RC crônica. Uma revisão de estudos de RC concluiu que as citocinas inflamatórias são aumentadas durante o envelhecimento, mas são suprimidas pela RC (Bang et al., 2019; Igwe et al., 2021).

### **1.13. Modelos para estudo de doenças relacionadas à obesidade e de restrição calórica**

Globalmente, a obesidade atingiu proporções epidêmicas, afetando adultos, crianças e adolescentes (Ng et al., 2014). Além disso, a obesidade pode causar e/ou exacerbar progressivamente um amplo espectro de doenças crônicas, incluindo dislipidemias, síndrome metabólica, pré-diabetes, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa, doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e prejuízos no SNC relacionados a memória e depressão (Pi-Sunyer, 2009; Di Angelantonio et al., 2016; GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017), além de representar um risco aumentado de mortalidade por todas as causas (Preguiça et al., 2020). Mudanças no estilo de vida, como RC e atividade/exercício físico regular, se mostram eficazes na redução da obesidade e das complicações associadas (Webb et al., 2017; Foright et al., 2018).

Para desenvolver estratégias que possam prevenir, reverter ou melhorar os efeitos nocivos da obesidade e distúrbios associados é necessário entender como tais prejuízos ocorrem e os mecanismos vinculados (Bastías-Pérez et al., 2020). Para atingir estes objetivos, os investigadores contam com diversos modelos animais que abrangem múltiplas espécies e abordagens científicas estratégicas. O primeiro modelo animal amplamente utilizado para pesquisa metabólica foi o cão, com estudos pioneiros no início do século 20, incluindo o trabalho de Ivan Pavlov com o Prêmio Nobel (concedido em 1904) sobre secreções gástricas e a posterior descoberta da insulina por Frederick Banting e Charles Best (Prêmio Nobel) em 1923 (Banting et al., 1992). Nas últimas duas décadas, pesquisas que utilizaram pequenos roedores, especialmente camundongos, estiveram na

vanguarda dos avanços científicos sobre obesidade e prejuízos associados à obesidade. Por exemplo, estudos com roedores levaram à descoberta das ações centrais no equilíbrio energético da leptina (Zhang et al., 1994) e da grelina (Kojima et al., 1999).

Pequenos roedores, incluindo ratos e especialmente camundongos, são o modelo animal pré-clínico mais utilizado para estudar distúrbios metabólicos (Kleinert et al., 2018). Sendo mamíferos, a fisiologia de camundongos e ratos está mais próxima da dos humanos do que das espécies não-mamíferas. Nas últimas décadas, a popularidade dos modelos de camundongos aumentou a tal ponto que atualmente cerca de 60% de todas as pesquisas pré-clínicas em animais são conduzidas em *Mus musculus* (European Commission, 2013). Este aumento no uso pode ser explicado em parte pelas muitas ferramentas genéticas moleculares disponíveis para desenvolver mutações direcionadas ou não direcionadas, desde trocas de nucleotídeos únicos até rearranjos cromossômicos, para ensaios funcionais de genes em camundongos. Além disso, métodos e dispositivos padronizados para fenotipagem de camundongos são abundantes e aprimorados. Finalmente, os camundongos são de tamanho pequeno, têm produção reprodutiva de aproximadamente 6 a 12 filhotes (dependendo da respectiva linhagem de camundongo), têm um ciclo reprodutivo moderadamente curto, atingindo a maturidade sexual dentro de 4 a 8 semanas após o nascimento, e têm um período de gestação de apenas 3 semanas. Todas essas características fazem dos camundongos uma escolha econômica viável para os pesquisadores (Kleinert et al., 2018).

Os distúrbios metabólicos manifestados em humanos após consumo crônico de HFD são, de modo semelhante, observados em roedores (Woods et al., 2003). Animais que receberam HFD apresentam diminuição na sensibilidade à insulina, aumento da concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos e da massa corporal (Buettner et al., 2007), aumento na massa de tecido adiposo visceral e alterações que resultam em aumento de secreção de adipocitocinas (Xu, et al., 2003). Ainda, consistente com os achados clínicos, diversos estudos demonstram que animais expostos às dietas hiperlipídicas, ou hipercalóricas, apresentam prejuízos relacionados à aprendizagem e memória dependentes do hipocampo (Stranahan, et al., 2008; Moreira, et al., 2014; Cordner e Tamashiro, 2015). Embora o modelo de obesidade induzida por dieta (DIO) recapitule grande parte da patogênese da obesidade humana, apresenta deficiências. Os estudos DIO são demorados, dispendiosos e, embora a proposta pareça simples, vários fatores como variedade de

linhagem e cepas, sexo, idade, tipo de dieta e tempo de exposição à dieta influenciam o resultado e a interpretação dos resultados (Kleinert et al., 2018).

Há diferenças genéticas entre as cepas de camundongos que influenciam sua suscetibilidade a DIO e doenças metabólicas associadas. A linhagem de camundongos C57BL/6J é amplamente utilizada como modelo para DIO porque é propensa a desenvolver obesidade grave, adiposidade elevada, intolerância à glicose e resistência moderada à insulina (Kleinert et al., 2018). Outras linhagens, incluindo camundongos SWR/J e A/J, são menos suscetíveis à DIO e complicações relacionadas (Leibowitz et al., 2005), tornando-os modelos especialmente intrigantes para estudar a resistência à obesidade humana. Além da influência da linhagem, camundongos machos são mais suscetíveis à DIO, desenvolvendo obesidade mais cedo e em maior extensão do que camundongos fêmeas (Stubbins et al., 2012; Yang et al., 2014). Por outro lado, em ratos, a progressão da DIO é mais compatível entre machos e fêmeas (Nadal-Casellas et al., 2015; Kleinert et al., 2018). A idade é outro fator que tem um efeito considerável nos resultados da pesquisa sobre DIO. Nos seres humanos, a massa corporal aumenta com a idade e atinge o pico aos 55 anos em homens e mulheres. O envelhecimento por si só está associado a uma redistribuição tanto da massa magra como da massa gorda, com o último aumento a partir dos 30 anos de idade (Villareal et al., 2005). O envelhecimento também afeta os parâmetros metabólicos dos roedores. Análogo ao que ocorre em humanos, a massa corporal do camundongo C57BL/6J, aumenta com a idade, atingindo um pico de aproximadamente 9 meses (Van Der Heijden et al., 2015), e camundongos C57BL/6J mais velhos (22 meses) reduziram massa magra e aumento da massa gorda em comparação com camundongos jovens de 3 meses de idade (Houtkooper et al., 2011). Outra consideração importante é a idade no início do estudo de intervenção dietética, tempo de exposição e tipo de dieta (Nishikawa et al., 2007). As dietas podem divergir no teor de gordura, principalmente 10%, 45% e 60% de gordura, tipo de gordura, geralmente é utilizado gordura saturada ou trans e associação de HFD com outros componentes como frutose na água de beber (Gajda, 2008; Bastías-Pérez et al., 2020).

Além da indução da obesidade por meio da dieta, outra forma de estudar essa condição e as doenças associadas é com modelos de roedores geneticamente modificados. Na década de 1960, Coleman e colaboradores do Laboratório Jackson descobriram e isolaram dois grupos de camundongos mutantes, mas gravemente obeso (ob), e o grupo mais moderadamente obeso, mas gravemente diabético (db) (Coleman et al., 1969; Coleman et al., 1973), sendo o contexto genético

desses animais a falta de produção de leptina (ob/ob) ou a falta de detecção de leptina (db/db) (Coleman et al., 1978), ambos usados até hoje como modelos pré-clínicos para estudo da obesidade, diabetes e demais distúrbios relacionados. Esses camundongos apresentam obesidade de início precoce que é promovida por hiperfagia e gasto energético reduzido, à medida que a termogênese sem tremores do tecido adiposo marrom é reduzida. Além disso, camundongos ob/ob desenvolvem hiperinsulinemia, hiperglicemia leve e resistência à insulina. Essas manifestações são provavelmente secundárias à obesidade. São inférteis, têm níveis aumentados de corticosterona circulante, sofrem de hipotireoidismo e têm níveis insuficientes de hormônio de crescimento (GH), o que resulta num crescimento linear atrofiado (Kleinert et al., 2018). O estudo de Kim e colaboradores (2016) mostrou que RC em camundongos geneticamente obesos foi capaz de reverter a resistência à insulina, a esteatose hepática, o aumento de massa corporal e a adiposidade em relação aos camundongos controle do estudo, ainda melhorou a autofagia, a biogênese mitocondrial, a deposição de colágeno e o estresse do retículo endoplasmático.

Além dos modelos genéticos apresentados acima, a literatura descreve outros modelos para estudo de diversas comorbidades, como é o caso do camundongo nocaute para receptor de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), modelo para hipercolesterolemia familiar humana (De Bem et al., 2021). Além de níveis elevados de colesterol plasmático, esses animais apresentam déficits de aprendizado e memória (De Oliveira et al., 2011, 2020) associado a prejuízo na permeabilidade da barreira hematoencefálica, neuroinflamação, disfunção sináptica e neuronal e neurogênese prejudicada (De Bem et al., 2021).

Para o estudo a RC e seus efeitos na melhora da saúde, modelos animais também são usados. Os regimes de RC normalmente incluem uma redução consistente de 20-40% da ingestão calórica abaixo da ingestão energética *ad libitum* (Kim et al., 2016). Na maioria dos modelos de roedores de RC, os carboidratos, lipídios e proteínas são reduzidos enquanto a ingestão de nutrientes essenciais é preservada. Os efeitos da RC foram avaliados em animais de diferentes idades e por diferentes durações. Outra forma de estudar os efeitos da RC é por meio de fármacos miméticos da RC.

O conceito de miméticos da restrição calórica foi desenvolvido para descrever substâncias farmacologicamente ativas que imitam alguns dos inúmeros efeitos da RC (Ingram et al., 2009; Hofer et al., 2021). No cerne da definição, os compostos que mimetizam RC deveriam, em princípio, aumentar a expectativa de vida e/ou saúde e melhorar doenças associadas à idade em organismos modelo, daí muitas vezes o uso simultâneo do termo “substâncias anti-envelhecimento.” Além disso,



devem ser capazes de induzir a autofagia, um mecanismo de reciclagem celular regulador da homeostase que degrada proteínas, estruturas celulares ou organelas obsoletas, danificadas ou desnecessárias (Madeo et al., 2019; Yin, Pascual e Klionsky 2016), bem como reduzir o estado de acetilação de proteínas (Marino et al., 2014). O indutor mais fisiológico da autofagia é a privação de nutrientes e energia, como ocorre nos cenários de RC e jejum. (Hofer et al., 2021). Fármacos como o resveratrol, rapamicina e metformina são considerados como miméticos da RC (Van Cauwenberghe et al., 2016). A metformina é o medicamento considerado de primeira linha de escolha para reduzir os níveis de glicose no sangue em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Também tem outros efeitos clinicamente benéficos, como reduções na massa corporal, do conteúdo de gordura hepática, aumenta a sensibilidade à insulina, indução da glicólise, supressão da gliconeogênese no fígado e diminuição da incidência de câncer em pacientes com diabetes que tomam a droga (Ma et al., 2022; Martin-Montalvo et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Existe uma associação entre a crescente expansão do consumo de alimentos processados e ultraprocessados, abundantes em gorduras, açúcares e carboidratos e dos problemas de saúde relacionados a esse tipo de alimentação, e.g., obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Engin, 2017; Ashwell, 2014). Além disso, há relação entre uma dieta rica em gorduras e carboidratos e prejuízos comportamentais, tanto relacionados à cognição quanto a emocionalidade em estudos clínicos e pré-clínicos (Spencer et al., 2017; Luppino et al., 2010). Faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes e, neste sentido, abordagens farmacológicas e não farmacológicas vêm sendo utilizadas com relativo sucesso no manejo da obesidade e doenças relacionadas.

Mudança no estilo de vida é uma maneira importante de prevenir e retardar a progressão de doenças crônicas induzidas por consumo de dietas obesogênicas, como por exemplo, hiperlipídicas. Por exemplo, em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, que teve como um dos objetivos verificar se a troca de uma dieta rica em gordura por uma dieta mais saudável poderia reverter os prejuízos metabólicos e comportamentais induzidas por consumo crônico de dieta hiperlipídica, observamos que substituição reverteu as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela dieta hiperlipídica. Assim mostramos a importância de dietas mais equilibradas para ajudar no tratamento e controle de disfunções metabólicas e comportamentais no contexto de obesidade induzida por dieta (Braga et al., 2021).

Porém, pensando de forma mais translacional, é difícil viabilizar um cenário em que um indivíduo, mesmo que por motivos de saúde, mude totalmente sua alimentação de um dia para outro. Por isso começamos a nos questionar, se a manutenção da mesma dieta, consumida em menor quantidade traria benefícios ao organismo semelhantes à troca completa da dieta. Afinal, estudos sugerem que a restrição calórica (RC), que é uma intervenção dietética baseada na ingestão reduzida de energia sem comprometer a adequação dos nutrientes, pode resultar em benefícios metabólicos e comportamentais para o organismo. Porém o quanto a RC com a própria dieta rica em gorduras saturadas (HFD) pode reverter ou atenuar os prejuízos metabólicos e comportamentais induzidos por essa dieta e os eventuais mecanismos envolvidos permanece pouco compreendido.

Em modelos animais, os sistemas fisiológicos envolvidos na homeostase metabólica apresentam diferenças entre machos e fêmeas. Os pesquisadores costumam utilizar roedores machos em seus estudos porque eles parecem ser mais susceptíveis aos prejuízos induzidas por dieta comparado com as fêmeas. Ainda, as fêmeas são evitadas como sujeitos experimentais com base na preocupação de que o ciclo estral induz variabilidade nas características que complicam os projetos experimentais. Porém estudar machos e fêmeas representa uma oportunidade de compreender os fatores que influenciam os prejuízos causados por dieta obesogênica e a possibilidade de definição de recomendações e tratamentos mais personalizados. Além disso, o foco em um único sexo pode limitar o impacto dos resultados da investigação (Mauvais-Jarvis, Arnould e Reue, 2017; Clayton, 2016). Por isso, no presente estudo, utilizamos camundongos machos e fêmeas expostos a dieta hiperlipídica e avaliamos os dois sexos para ver se efeitos da RC também poderiam ser dependentes do sexo. Também testamos se a RC associada a um fármaco com efeitos considerados miméticos da RC poderia ter um efeito benéfico mais pronunciado, que a RC de forma isolado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Investigar os efeitos da restrição calórica (RC) nos desfechos metabólicos, comportamentais e neuroquímicos no contexto de disfunção metabólica induzida por consumo crônico de dieta hiperlipídica (HFD) em camundongos da linhagem C57Bl/6 e em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, camundongos noucate do receptor de LDL.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

##### 3.2.1. Avaliação de parâmetros metabólicos:

- a. Acompanhar a massa corporal semanalmente;
- b. Monitorar a temperatura corporal semanalmente;
- c. Acompanhar a ingestão alimentar diária e calcular a eficiência calórica;
- d. Mensurar o perfil lipídico mediante determinação de concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol total e triglicerídeos;
- e. Mensurar a massa do tecido adiposo;
- f. Mensurar os níveis plasmáticos de insulina, glicose, proteínas totais, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP);
- g. Avaliar a tolerância à glicose por meio do teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT);
- h. Avaliar a sensibilidade à insulina por meio do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT).
- i. Determinar níveis de TNF- $\alpha$  e IL 1- $\beta$  no fígado e hipocampo, e IL 1- $\beta$  no córtex pré-frontal;

##### 3.2.2. Avaliação de parâmetros comportamentais:

- a. Avaliar a locomoção espontânea no teste do campo aberto;
- b. Avaliar memória espacial de curto prazo por meio do teste do labirinto em T;
- c. Avaliar memória de reconhecimento no teste de reconhecimento de objetos;
- d. Avaliar memória de medo de curto e longo prazo com o modelo de esQUIVA inibitória;
- e. Avaliar resposta comportamental frente à estresse agudo inescapável no teste de suspensão pela cauda;

f. Avaliar o comportamento anedônico e autocuidado por meio do teste de borrifagem de sacarose.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Para o protocolo experimental 1, foram utilizados camundongos adultos, machos e fêmeas, da linhagem C57Bl/6, pesando entre 22-27 g, e com idade entre 3 e 4 meses ao início dos experimentos (n=62). No protocolo 2, por sua vez, utilizamos camundongos de meia-idade, fêmeas, da linhagem C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>), pesando entre 20-25g, com 10 meses de idade no início do protocolo experimental (n=43). Todos os animais foram provenientes da colônia de criação do laboratório Neuroscience Coworking Lab, UFSC, camundongos da linhagem C57Bl/6 do tipo selvagem e nocaute para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (designados LDLr<sup>-/-</sup>), descritos previamente (ISGHIBASHI et al., 1993), foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm) posicionadas dentro de estantes ventiladas da marca Insight, com condição controlada de temperatura (23 ± 1°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 06h00min às 18h00min), e com livre acesso a água e comida. Mantivemos dois ou três animais por gaiola-moradia, de acordo recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013). Para minimizar possíveis estressores e fornecer um local onde os animais possam se esconder, comportamento esse que lhes é natural, colocamos rolos de papel em todas as caixas. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), de acordo com a Lei Federal 11.794 de 2008, protocolo 7361231120.

### 4.2. Dieta

Foram utilizadas ração padrão para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes, Colombo, PR, Brasil) e ração hiperlipídica [dieta AIN 93, *high-fat* purificada, constituída por

proteínas (12 kJ%), carboidratos (27 kJ%) e lipídeos (61 kJ%), Pragsoluções, Jaú, São Paulo, Brasil], conforme apresentado na tabela 1.

Ingredientes (%)	Dieta padrão <sup>a</sup>	Dieta hiperlipídica <sup>b</sup>
Proteína	22.0	12.0
Gordura	4.0	61.0
Carboidrato	46.5	27.0
Celulose	5	5.0
Mix de minerais (MX) <sup>c</sup>	-	3.5
Mix de vitaminas (VX) <sup>c</sup>	-	1.0

<sup>a</sup> Informação disponibilizada pelo fabricante sobre as matérias-primas da ração: farelo de milho; farelo de trigo; refeição de grãos de soja; cálcio; fósforo; cinzas, MX e VX (por quilograma de dieta: 2,7 g de sódio; 0,08 g de flúor; 0,06 g de zinco; 0,06 g de manganês; 0,05 g de ferro; 0,01 g de cobre; 0,002 g de iodo; 0,0015 g de cobalto; 0,05 mg de selênio; 1,9 g de colina ; 0,06 g ácido nicotínico; 0,03 g vitamina E; 0,007 g piridoxina; 0,006 g riboflavina; 0,005 g tiamina; 0,003 g vitamina K3; 0,001 g ácido fólico; 2.000 UI vitamina D3; 1300 UI vitamina A; 0,05 mg biotina; 0,02 mg vitamina B12; 0,02 mg de ácido pantoténico); água; aminoácidos (por quilograma de dieta: 0,1 g de lisina e 0,3 g de metionina); e 0,1 g/kg de hidroxitolueno butilado antioxidante (BHT).

<sup>b</sup> Matérias-primas de rações (%): 21,35% caseína; 0,30 L-cistina; 4,0% de óleo de soja; 14,30% banha; 30,30% de amido de milho; 10,0% de maltodextrina; e 10,0% de sacarose.

<sup>c</sup> Conforme recomendado pela dieta de roedores AIN-93.

### 4.3. Desenhos experimentais

#### 4.3.1. Protocolo experimental 1: Efeitos da restrição calórica nas alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFD.

O primeiro desenho experimental foi utilizado para testar a hipótese de que uma intervenção com RC de 30% seria capaz de reverter ou atenuar as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo consumo crônico de HFD em camundongos.

Nesse sentido, camundongos da linhagem C57Bl/6, machos e fêmeas, com entre três e quatro meses de idade ao início dos experimentos, foram divididos inicialmente em dois grupos experimentais, um que recebeu dieta padrão para roedores (SD) e o outro dieta hiperlipídica (HFD), por 12 semanas, ambos *ad libitum*. Durante todo esse período foi mensurado, semanalmente, a massa corporal dos animais, temperatura corporal, consumo hídrico e calórico. Ao final do período de 12 semanas, dividimos cada grupo experimental em dois grupos para introduzir a RC em parte dos

animais. Ou seja, eram dois grupos iniciais e viraram 4. Considerando machos e fêmeas separadamente, temos 8 grupos, como apresentado na figura abaixo.

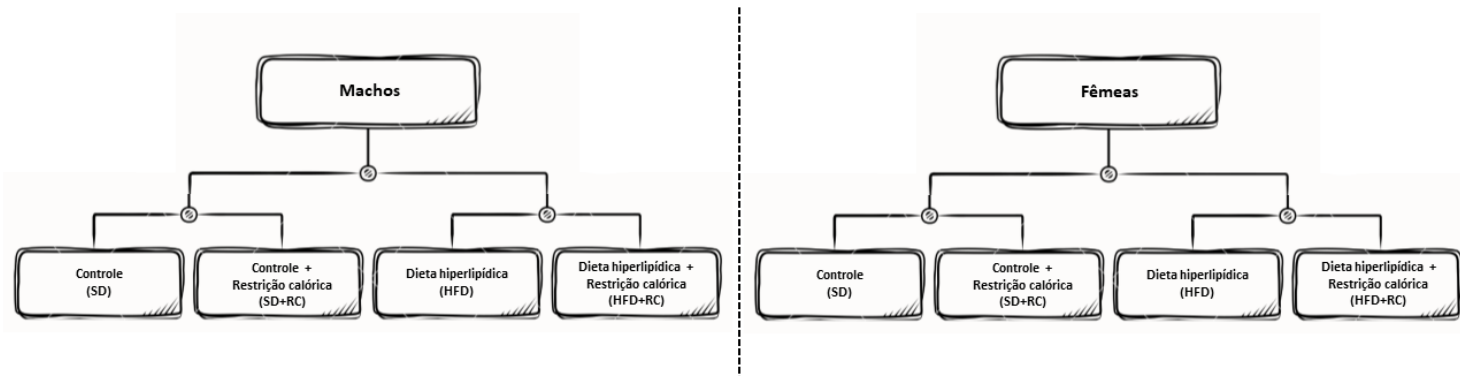


Figura 8: Divisão dos grupos experimentais.

Grupo controle (SD), que permaneceu recebendo dieta padrão para roedores *ad libitum*; Grupo Controle + Restrição calórica (SD+RC), que recebeu dieta padrão com restrição de 30%; Grupo HFD, que permaneceu recebendo dieta hiperlipídica *ad libitum*; Grupo HFD+RC, que foram tratados com HFD *ad libitum* e a mesma dieta com restrição de 30% respectivamente.

Após a divisão dos grupos, os animais permaneceram por 4 semanas nas intervenções, totalizando 16 semanas de protocolo experimental. Para determinar a quantidade de dieta que os grupos RC receberam, na 11ª semana, foi acompanhado a ingestão diária de alimentos para calcular o consumo médio. Deste valor encontrado foi retirado 30% e oferecido aos animais dos grupos restrição diariamente. Ao final do período de 4 semanas, submetemos os animais a uma bateria de testes comportamentais, sendo o primeiro deles o campo aberto, seguido do labirinto em T, borrifagem de sacarose, suspensão pela cauda e esQUIVA inibitória do tipo step down. Foi realizado um teste por dia e 24h após o último teste comportamental, os animais, em jejum calórico de seis horas, iniciado às 7h da manhã, foram submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) e no dia seguinte ao teste intraperitoneal de tolerância a insulina (ipITT). No dia seguinte ao ipITT, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue coletado por punção cardíaca para a realização das análises das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, colinesterase, TGO, TGP e insulina. Na sequência, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e rapidamente foram retirados o tecido adiposo visceral,



pâncreas e o fígado (Figura 9). O protocolo descrito foi realizado em duas levadas experimentais distintas.

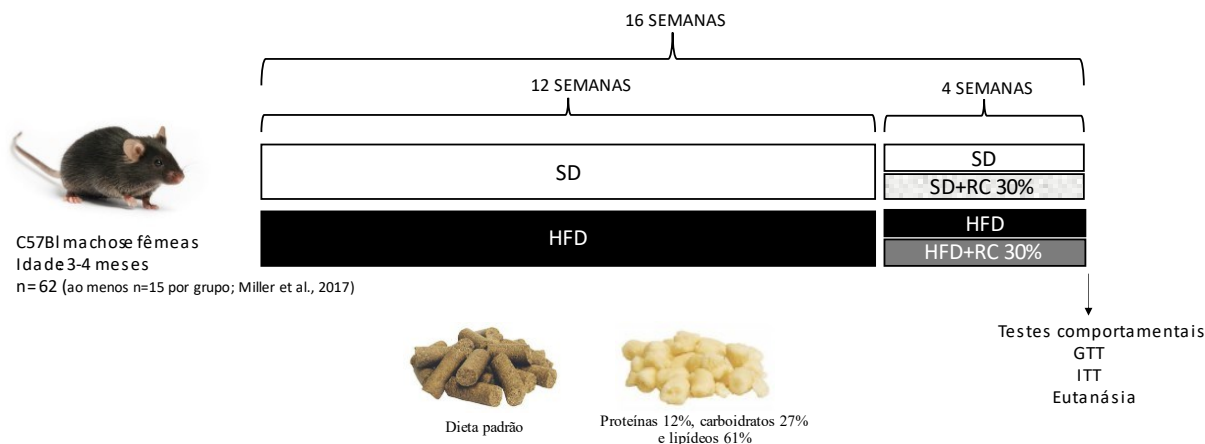


Figura 9: Desenho experimental- bloco 1.

#### 4.3.2. Protocolo experimental 2: Efeito da restrição calórica nas alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas em modelo experimental de hipercolesterolemia familiar de camundongos nocautes do receptor de LDL de meia-idade.

O segundo desenho experimental foi conduzido para testar a hipótese de que uma intervenção com RC de 30% isolada ou associada com o fármaco hipoglicemiante metformina seria capaz de reverter ou atenuar as alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela exposição a níveis elevados de colesterol ao longo da vida. Para isso, foram usadas camundongos fêmeas de linhagem nocaute do receptor de LDL ( $LDLr^{-/-}$ ), com dez meses de idade ao início dos experimentos. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo eles: 1) controle ( $LDLr^{-/-}$ ; n=8), 2) restrição calórica de 30% ( $LDLr^{-/-}$ +RC; n=8), 3) metformina ( $LDLr^{-/-}$ +MET; n=8) e 4) associação de restrição calórica e metformina ( $LDLr^{-/-}$ +RC+MET; n=9). Um grupo de animais da linhagem C57Bl/6 (n=10), do mesmo sexo e idade dos animais  $LDLr^{-/-}$ , foi mantido como controle do  $LDLr^{-/-}$  e não receberam nenhum tipo de intervenção. A metformina foi disponibilizada na água de beber, na concentração de 4mg/mL, com acesso *ad libitum* e a solução era trocada a cada dois dias para evitar oxidação do fármaco (Chaudhari et al., 2020). Para determinar a quantidade de dieta que o grupo RC recebeu, foi medida, antes do início do protocolo

experimental, a ingestão diária de alimentos, por um período de sete dias, para calcular o consumo médio. Do valor encontrado foi retirado 30% e oferecido aos animais dos grupos restrição diariamente. A ingestão hídrica e de alimentos foi mensurada diariamente ao longo de todo experimento. Ao final do período 4 semanas, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, sendo o primeiro teste o campo aberto, seguido pelo reconhecimento de objetos, labirinto em T e esquivas inibitórias. Foi feito um teste comportamental por dia e 24h após o último teste comportamental, os animais, em jejum calórico de seis horas, iniciado às 7h da manhã, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue coletado por punção cardíaca para a realização das análises das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, glicose e proteínas totais. Na sequência, com animais ainda em anestesia, foi retirado o tecido adiposo visceral. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o córtex pré-frontal e o hipocampo dissecados para determinação das concentrações de IL 1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nessas regiões (Figura 10).

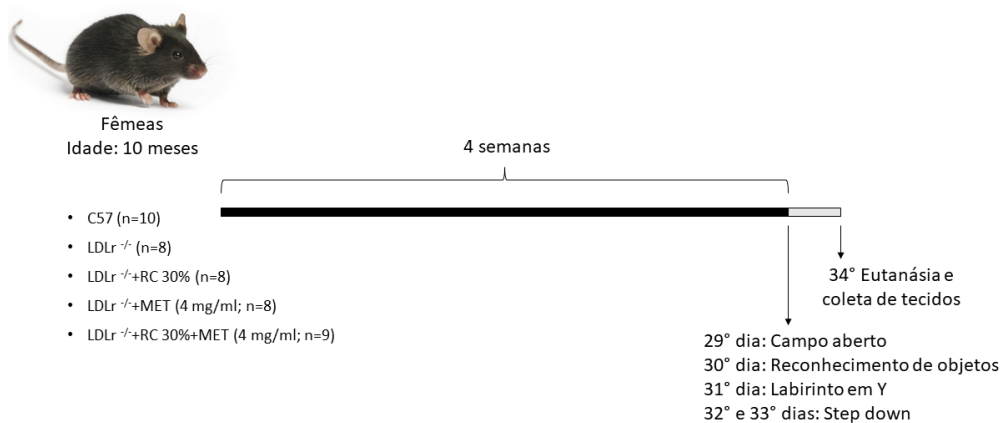


Figura 10: Desenho experimental – bloco 2

#### 4.4. Temperatura corporal, consumo calórico e eficiência calórica

Para medir a temperatura corporal, foi utilizado um termômetro infravermelho de superfície da marca Bioland e a medida foi realizada perianal. Para isso, cada animal foi posicionado em cima de uma grade metálica, a base da cauda fixada com dois dedos e as patas traseiras levemente elevadas, permitindo exposição da área ano-genital. Para minimizar os efeitos de confusão causados pela micção ou defecação, as medições de temperatura só foram realizadas quando a área de medição

estava limpa. As medições foram realizadas semanalmente, com tempo de leitura de aproximadamente 3–4 segundos com o termômetro mantido a 1–2 cm do local de leitura (Mei et al., 2018). A média da temperatura corporal ao longo do experimento foi calculada a partir do somatório obtido em cada semana, dividido pelo número de semanas do protocolo.

Para calcular o consumo calórico, a ração de cada caixa foi pesada em uma balança e o valor encontrado foi subtraído do peso original de ração disponibilizada, obtendo assim o consumo por caixa em cada semana do experimento, em gramas. Para transformar o valor do consumo de gramas/caixa para Kcal *per capita*, foi realizado o cálculo que considera as calorias cada macronutriente e o valor encontrado foi dividido pelo número de animais da caixa.

O consumo calórico obtido em Kcal foi utilizado para averiguar a eficiência calórica da dieta, dado que remete à quantidade de calorias que o organismo é capaz de estocar a partir do seu consumo e pode ser calculada por meio da fórmula: Eficiência calórica =  $\Delta$  massa (g)/consumo calórico (kcal).

#### 4.5. Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara (8h:00min -12h:00min), em uma sala com temperatura controlada (23°C, umidade entre 40% e 60%), com baixa intensidade de luz (12 lx), e foram gravados (webcam Microsoft VX 3000). Para minimizar a presença de pistas olfativas, os aparatos utilizados foram cuidadosamente higienizados com etanol a 10% antes de se iniciar cada protocolo experimental e a cada troca de animal ou tentativa. Além disso, apenas o pesquisador responsável pelo manuseio dos animais tinha ciência de qual grupo cada animal pertencia, sendo o avaliador do teste cego.

##### 4.5.1. Campo Aberto

Relevância do modelo: Este modelo é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (Prut e Belzung, 2003). A avaliação da atividade locomotora espontânea de roedores tem sido utilizada para analisar o putativo efeito de drogas sobre o sistema nervoso central, sendo que agentes que suprimem a atividade locomotora podem/devem apresentar

ação/propriedades sedativas e agentes que aumentam a atividade locomotora podem/devem apresentar propriedades estimulantes (Archer, 1973).

Protocolo Experimental: Neste paradigma permite-se aos animais livre exploração por uma caixa de 50 cm x 50 cm x 40 cm de volume, feita de madeira e revestida de material impermeável de cor branca, com assoalho pardo dividido por linha em 25 quadrados (10 x 10 cm cada). Os animais foram posicionados no centro do aparato e foi permitido explorar livremente o aparato por 5 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: número total de cruzamentos periféricos e centrais, tempo no centro, número de levantamentos verticais, número de fezes, tempo de autolimpeza (Prut, Belzung, 2003).

#### 4.5.2. Labirinto em T

Relevância do modelo: O protocolo de alternância forçada foi adaptado de Wolf e colaboradores (2016) e avalia memória espacial de curto prazo em roedores. Baseando-se na premissa que roedores possuem um comportamento natural de exploração diante da novidade, de modo que nesse teste, espera-se que o animal que aprendeu a tarefa permaneça mais tempo explorando o braço novo, quando comparado aos demais braços já explorados.

Protocolo Experimental: O aparato experimental é feito de acrílico transparente com um braço central e dois braços laterais posicionados a uma angulação de 90° com o braço central. Cada braço do labirinto tinha 30 cm de comprimento, 9 cm de largura e 12 cm de altura, e a parede no final de cada braço era marcada com um padrão preto e branco diferente. O teste consistiu em um treino de 5 minutos seguido de uma fase de teste de 5 minutos. Durante o treino, o animal teve a oportunidade de explorar apenas dois braços do aparato enquanto a entrada no terceiro braço estava bloqueada, e 30 min após essa fase o animal foi recolocado no aparato e passou a ter acesso aos três braços. O número de entradas (definido pela colocação das quatro patas em um braço) e o tempo gasto em cada braço foram registrados.

#### 4.5.3. Teste esquiva inibitória

Relevância do modelo: A esquiva inibitória é uma tarefa comportamental usada para investigar processos de aprendizagem e memória em roedores (McGaugh e Roozendaal, 2009). Os roedores devem codificar diferentes informações para obter uma associação correta entre um local específico dentro do aparato e o estímulo aversivo do choque nas patas (McGaugh e Roozendaal, 2009).

Latências de teste de retenção mais longas, induzidas, por exemplo, por manipulação de drogas pós-treinamento, poderiam indicar que o animal desenvolveu uma representação mais precisa ou detalhada da experiência de treinamento.

Protocolo Experimental: O aparelho consistiu em uma caixa de 0,5 x 0,25 x 0,25 m com uma plataforma de 0,09 x 0,05 x 0,02 m colocada no centro, cercada por um piso feito de barras de bronze paralelas e conectada a uma fonte de energia. Durante as sessões de treinamento, camundongos foram gentilmente colocados na plataforma e quando eles desceram com as quatro patas no piso do aparato, receberam um choque de 2 mA por 2 segundos. A latência para descer foi registrada. Para avaliação da retenção da memória, os animais foram novamente colocados no topo da plataforma, aos 90 minutos e vinte e quatro horas após o treinamento, e a latência para descer foi registrada novamente.

#### 4.5.4. Reconhecimento de objetos

Relevância do modelo: A tarefa de reconhecimento de objetos avalia a habilidade de roedores em reconhecer um novo objeto no ambiente. Basicamente, neste teste, não há reforços positivos ou negativos, e esta metodologia afere a preferência natural por novos objetos exibida por roedores. O procedimento experimental consiste em três fases: habituação, familiarização e a fase de teste. Ressalta-se que a tarefa de reconhecimento de objetos é particularmente atrativa porque não requer motivação externa, recompensa ou punição – apenas um pouco de treinamento e habituação é requerido – sendo que a tarefa pode ser completada em um período relativamente curto de tempo. Os resultados deste paradigma são influenciados tanto por lesões hipocampais quanto corticais (Buckmaster et al., 2004).

Protocolo experimental: O aparato utilizado foi o mesmo utilizado no teste campo aberto, descrito anteriormente. O procedimento consistiu em uma sessão de habituação ao aparato com duração de 5 minutos, na qual o animal teve a oportunidade para livre exploração. Este modelo é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais (Prut e Belzung, 2003). Após 24 horas da habituação, os animais foram reexpostos ao campo aberto por 5 minutos, contudo nesta apresentação (treino) dois objetos idênticos eram apresentados aos animais. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa. Depois do treino os animais retornaram à sua caixa moradia e aguardaram até o momento do teste, 30 minutos após o treino. No momento do teste, porém, um dos objetos foi trocado por um objeto diferente e registrado o tempo

de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Este tempo de exploração foi utilizado para o cálculo do índice de localização de objetos:  $(T \text{ novo} \times 100) / (T \text{ novo} + T \text{ antigo})$ , onde T novo é o tempo gasto explorando o objeto novo e T antigo é o tempo gasto explorando o objeto antigo, e foi utilizado como parâmetro de memória (Leger et al., 2013).

#### 4.5.5. Teste de Borrifagem de Sacarose

Relevância do modelo: A autolimpeza é um comportamento inato e importante no repertório comportamental de roedores, tendo hormônios, neuromoduladores e várias regiões do encéfalo envolvidas nesse comportamento (Kalueff e Tuohimaa, 2004). Outra característica do teste, é que ao borrifar sacarose no dorso do animal, substância doce e palatável, o animal tem motivação para continuar o comportamento de autolimpeza. Já está descrito na literatura, que pessoas diagnosticadas com depressão, bem como modelos animais de estados tipo-depressivos, têm disfunção no sistema de recompensa e, por conta disso, deixam de realizar tarefas que outrora prazerosas, comportamento conhecido como anedonia. Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini et al. (2010), com modificações. Os indícios de falta de autocuidado e comportamento motivacional são considerados como comportamentos do tipo depressivo (Moretti et al., 2012).

Protocolo experimental: Trata-se de borrifar 1mL de solução de 10% de sacarose no dorso do animal, que estava disposto, individualmente, em uma caixa acrílico (30 x 30 x 20 cm). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose “suja” o pelo do animal, induzindo um comportamento de autolimpeza (grooming) do mesmo. Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (duração) e a latência para o início do comportamento de grooming foram observados por 5 min. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre os testes, para eliminar pistas olfativas.

#### 4.5.6. Suspensão pela cauda

Relevância do modelo: O teste da suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru e colaboradores (1985) baseado na premissa que um animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresenta dois tipos de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de “*searching-behavior*”, caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia com a imobilidade (Steru et al., 1985; Cryan e Holmes, 2005).

Protocolo experimental: Os animais foram colocados em uma sala, com controle de ruídos, onde foram suspensos à 30 cm acima da bancada por meio de uma fita adesiva presa na ponta da cauda e em uma superfície plana. É importante ressaltar que os animais não tiveram acesso a nenhuma parede ou compartimento que possa favorecer a subida. O teste foi registrado, com o auxílio de uma câmera de vídeo, durante um período de 6 min. O tempo de imobilidade foi analisado de forma que foram considerados imóveis os animais que não apresentaram movimentos ativos ou qualquer movimento corporal. Foram observados o tempo para a primeira imobilidade (latência) e o tempo de imobilidade.

#### 4.6. Ensaio bioquímico

##### 4.6.1. Adiposidade visceral

A gordura visceral foi cuidadosamente removida, pesada e fixada em paraformaldeído 4% tamponado – pH 7,2 após a eutanásia dos animais.

##### 4.6.2. Quantificação dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol, proteínas totais, glicose, colinesterase, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP)

As análises foram realizadas utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados estão expressos em mg/dl.

##### 4.6.3. Conteúdo de colesterol e triglicerídeos hepáticos

As amostras de fígado, pesando entre 95-105 mg foram transferidas para tubos de ensaio contendo NaCl e homogeneizadas com dispersor Ultra-Turrax T18 (IKA, Staufen, Alemanha). Em seguida foi adicionado 2mL de clorofórmio-metanol (2:1) e os tubos foram levados à centrífuga, resultando na formação de três porções distintas, sendo uma NaCl, outra tecido e a terceira metanólica. A parte metanólica foi retirada e levada para secar em banho maria. Posteriormente foi ressuspensa com solução de Triton/metanol (2:1) e utilizando reagente comercial para quantificação de colesterol e triglicerídeo (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante.

##### 4.6.4. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT):

Os animais foram submetidos a um jejum calórico de 6 h e o teste foi iniciado às 13h. A glicemia de jejum foi coletada no tempo 0, por meio de um pique na ponta da cauda dos animais, sendo a

primeira gota de sangue descartada e a segunda utilizada para a determinação da glicemia utilizando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). Após a primeira medição (tempo 0) foi dado uma injeção i.p. de 2 g / kg de D (+)-glucose (Sigma Aldrich, St Louis, MO) e medida a glicemia nos tempos 15, 30, 60 e 120 min. Os resultados foram expressos em mg/dL. A área sob a curva (AUC) foi obtida após a normalização pelo valor inicial.

#### 4.6.5. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT):

A glicemia foi medida no minuto 0 a partir de um pique na ponta da cauda do animal utilizando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). Imediatamente após, foi administrado solução contendo insulina humana recombinante (Humulin, Lilly, Indianápolis, Ind., EUA), em dose equivalente a 0,75 UI/kg de peso corpóreo, i.p. Foram colhidas amostras de sangue adicionais nos tempos 10, 20, 30, 60 e 120 min para medição de glicose sanguínea. A constante de decaimento da glicose sanguínea ( $\kappa$ ITT) foi calculada a partir da curva obtida com valores log-transformados obtidos nos tempos entre 0 e 60 minutos após a administração de insulina (Gomes et al, 2019).

#### 4.6.6. Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ e IL 1- $\beta$ hepáticos e no hipocampo e IL 1- $\beta$ no córtex pré-frontal:

Os níveis de IL 1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram avaliados utilizando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), e os resultados foram expressos em picogramas por miligrama de proteína em cada amostra. A quantidade de proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976). A albumina sérica bovina (Sigma) foi usada como padrão.

#### 4.7. Análise estatística:

Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média, com exceção da latência para descer da plataforma no teste da esquiiva inibitória que segue expresso como mediana  $\pm$  intervalo interquartil, uma vez que o tempo de latência nesse teste não obedece a uma distribuição normal, atestada pelo teste Shapiro-Wilk. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal realizamos uma análise não paramétrica por meio do teste Kruskal-Wallis, e teste de Dunn's para múltiplas comparações. Para comparação dos tempos de latência de descida



da sessão treino versus o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal, analisamos pelo teste de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste t pareado. Foi realizado o teste de Grubbs para identificação de possíveis outliers e quando detectados foram retirados da análise.

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais do bloco 1 foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores dieta e restrição calórica), seguida pelo teste de Newman-Keuls, para múltiplas comparações entre grupos. No segundo bloco experimental, a fim de comparar o grupo controle da linhagem C57Bl/6 com o controle LDL foi realizado um teste T e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais da linhagem LDL foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores metformina e restrição calórica), seguida pelo teste de Newman-Keuls, para múltiplas comparações entre grupos.

Para o teste do reconhecimento de objetos e labirinto em T também realizamos um teste T para cada grupo contra um valor hipotético de 50 e 33%, respectivamente, para verificar se houve ou não aprendizado da tarefa proposta.

Valores de p menores que 0,05 ( $P \leq 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) e para gerar os gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Protocolo 1: Efeitos da restrição calórica nas alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFD.

#### 5.1.1. Parâmetros metabólicos:

##### 5.1.1.1. Consumo calórico, variação da massa corporal, eficácia calórica e média da temperatura corporal.

A figura 11 A mostra o consumo calórico *per capita* dos machos e a 11 B das fêmeas ao longo do protocolo experimental. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito da dieta nas primeiras 12 semanas, sendo o consumo calórico maior nos grupos de machos ( $F_{(1, 9)}=5,2575$ ;  $P < 0,05$ ) e fêmeas ( $F_{(1, 8)}=6,4204$ ;  $P < 0,05$ ) tratados com HFD em comparação com os animais tratados com SD. Além disso, de 12 até 16 semanas foi encontrado efeito da repetição ( $F_{(14, 84)}=3,0760$ ;  $P < 0,05$ ), da RC ( $F_{(1, 9)}=12,837$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre repetição e RC ( $F_{(14, 84)}=4,1369$ ;  $P < 0,05$ ) nos animais machos e ainda efeito da repetição ( $F_{(14, 70)}=2,6278$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre repetição e dieta ( $F_{(14, 70)}=3,0119$ ;  $P < 0,05$ ) nas fêmeas, porém sem diferenças significativas no *post-hoc* de ambos os sexos.

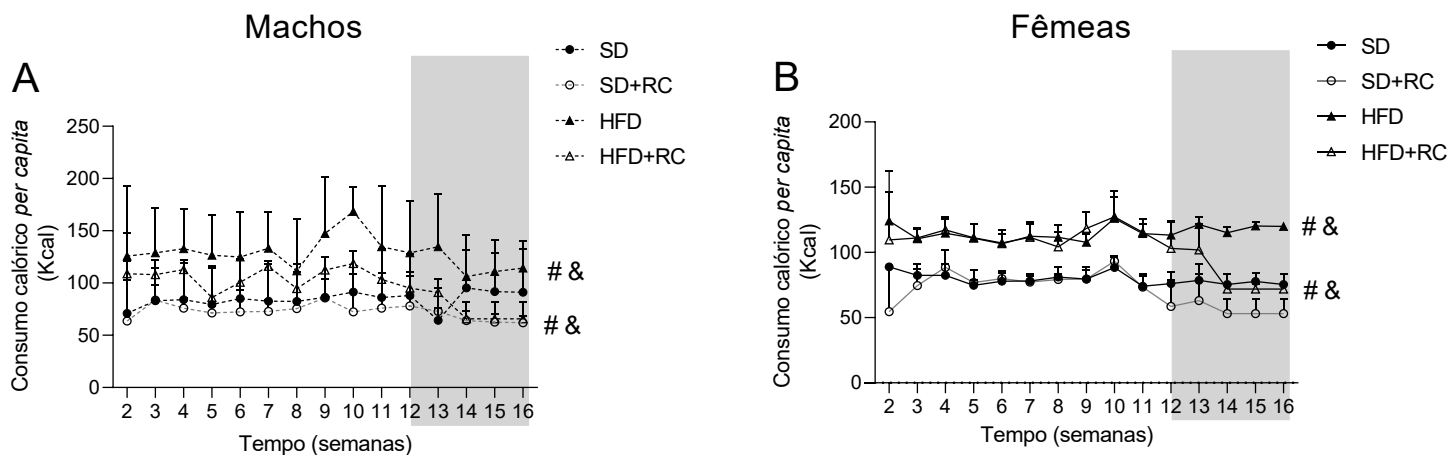


Figura 11: Consumo calórico ao longo das 16 semanas de protocolo experimental.

A) consumo calórico dos camundongos machos; B) consumo calórico das camundongos fêmeas. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. # mostra efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); & indica efeito do fator RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

Com relação à variação de massa corporal (figura 12 A) durante as quatro semanas de intervenção, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para o fator RC ( $F_{(1, 29)}=48,784$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre dieta e RC ( $F_{(1, 29)}=10,392$ ;  $P < 0,05$ ) nos camundongos machos. As comparações do *post-hoc* subsequente revelaram diminuição da massa corporal nos animais machos dos grupos SD+RC e HFD+RC quando comparados aos seus respectivos controles. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos em relação ao parâmetro de massa corporal nos camundongos fêmeas.

A eficácia calórica (figura 12 B), cálculo feito levando em conta a massa corporal e o consumo calórico do animal mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 29)}=36,163$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre os fatores dieta e RC ( $F_{(1, 29)}=5,8884$ ;  $P < 0,05$ ) nos camundongos machos. O *post-hoc* mostrou diminuição da eficácia calórica nos grupos submetidos a RC quando comparados aos seus controles. A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas para essa variável.

Ademais foi monitorado a temperatura corporal dos animais e os dados são apresentados na figura 12 C. A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa entre os grupos de machos ou fêmeas para essa variável.

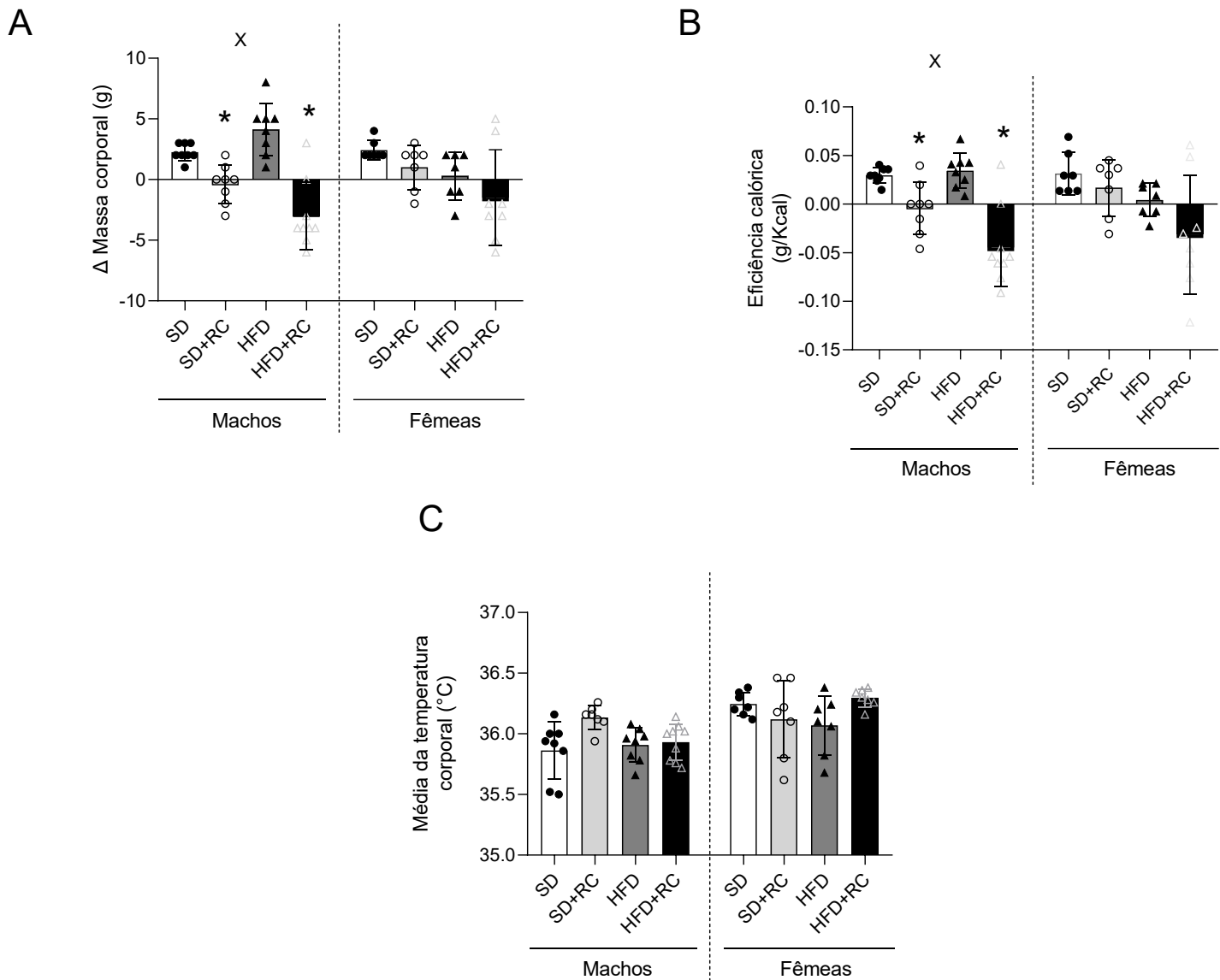


Figura 12: Variação da massa corporal, eficácia calórica e média da temperatura corporal ao longo das 16 semanas de protocolo experimental.

A)  $\Delta$  Massa corporal (g) (massa final- inicial); B) Eficácia calórica ( $\Delta$  Massa corporal (g)/ consumo calórico (kcal); C) Média da temperatura corporal. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. X denota o efeito da interação entre os fatores dieta e RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  SD x SD+RC e HFD x HFD+RC; SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.1.2. Gordura visceral

A ANOVA de duas vias identificou efeito da RC ( $F_{(1, 26)}=14,301$ ;  $P < 0,05$ ) no parâmetro de gordura visceral em camundongos machos, mostrando uma redução da massa de gordura visceral nos grupos RC. A ANOVA não mostrou diferença significativa entre os grupos de fêmeas para esse parâmetro.

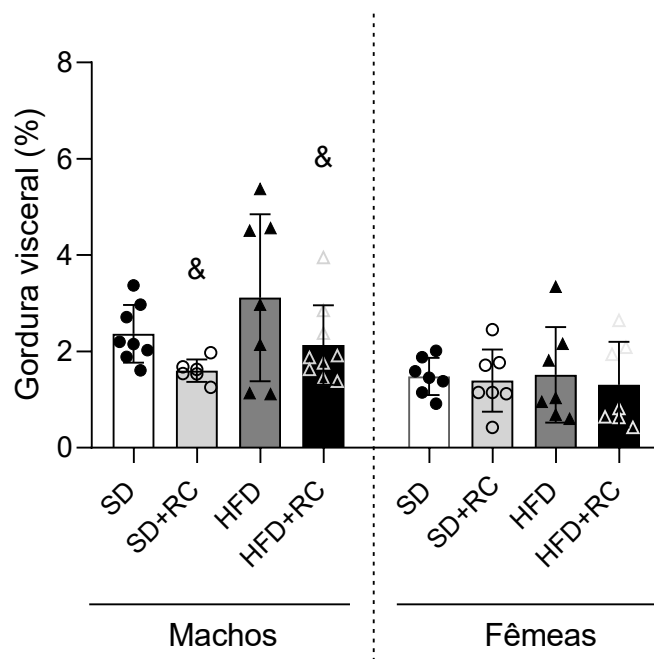


Figura 13: Gordura visceral (%).

Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. Gordura Visceral (%) = peso gordura visceral\*100/massa final. & indica efeito do fator RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.1.3. Glicemia de jejum

Em machos, a ANOVA de duas vias indicou efeito da dieta ( $F_{(1, 28)}=28,914$ ;  $P < 0,05$ ) e da RC ( $F_{(1, 28)}=65,759$ ;  $P < 0,05$ ) para o parâmetro de glicemia de jejum (figura 14). A HFD aumentou a glicemia de jejum dos camundongos machos quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão e a RC diminuiu os níveis glicêmicos tanto em animais que recebiam a dieta padrão quanto a HFD. Nas fêmeas, por sua vez, a ANOVA mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 25)}=40,423$ ;  $P < 0,05$ ), com redução os níveis glicêmicos nos grupos SD+RC e HFD+RC.

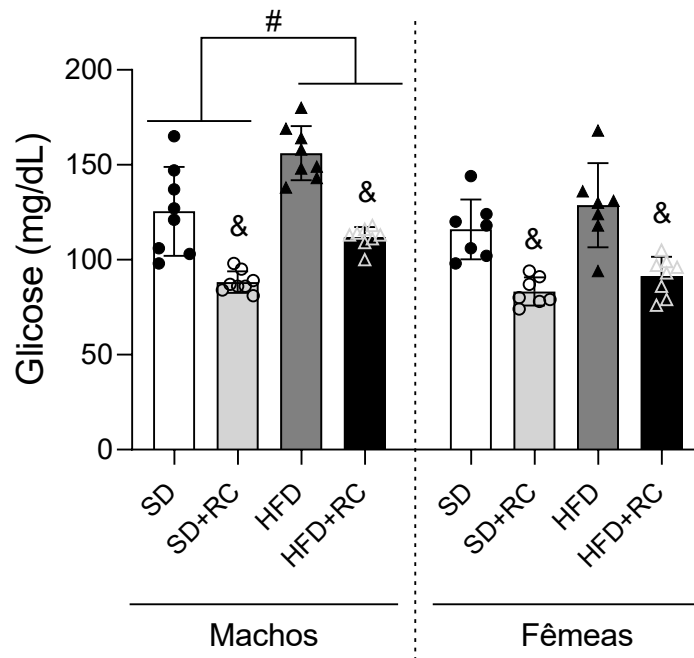


Figura 14: Efeito do tratamento com HFD e RC na glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos.

Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. & denota o efeito da RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); # denota o efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

#### 5.1.1.4. Teste de tolerância à glicose (ipGTT)

A figura 15 mostra os dados do ipGTT, sendo o gráfico A representativo da curva glicêmica dos machos ao longo do teste, o gráfico B das fêmeas e o C a área sob a curva (AUC) de ambos os sexos. Para os machos (figura 15 A), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeito da RC ( $F_{(1, 28)}=56,294$ ;  $P < 0,05$ ), da repetição ( $F_{(4, 112)}=193,47$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre repetição e RC ( $F_{(4, 112)}=16,421$ ;  $P < 0,05$ ), repetição e dieta ( $F_{(4, 112)}=3,1175$ ;  $P < 0,05$ ) e repetição, dieta e RC ( $F_{(4, 112)}=2,6947$ ;  $P < 0,05$ ). As comparações do *post-hoc* revelaram níveis de glicose mais baixos nos machos submetidos a RC, nos tempos 15 e 30 min, em comparação com os respectivos grupos controle.

Nas fêmeas (figura 15 B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas apontou efeito da dieta ( $F_{(1, 25)}=4,6506$ ;  $P < 0,05$ ), da RC ( $F_{(1, 25)}=6,9555$ ;  $P < 0,05$ ), da repetição ( $F_{(4, 100)}=136,57$ ;  $P <$

0,05), interação entre dieta e RC ( $F_{(1, 25)}=5,5320$ ;  $P < 0,05$ ), repetição e dieta ( $F_{(4, 100)}=3,9285$ ;  $P < 0,05$ ), repetição e RC ( $F_{(4, 100)}=3,0694$ ;  $P < 0,05$ ) e ainda, repetição, dieta e RC ( $F_{(4, 100)}=2,9354$ ;  $P < 0,05$ ). O *post-hoc* mostrou diminuição da glicemia nos grupos que receberam dieta padrão ou hiperlipídica associados à RC nos tempos 15, 30 e 60 quando comparados aos seus controles.

Na AUC (figura 15 C) a ANOVA de duas vias mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 28)}=18,484$ ;  $P < 0,05$ ) nos machos e interação entre os fatores dieta e RC ( $F_{(1, 25)}=5,1196$ ;  $P < 0,05$ ) nas fêmeas. O *post-hoc* mostrou diminuição da AUC no grupo de fêmeas que recebeu HFD e RC quando comparado ao seu respectivo controle.

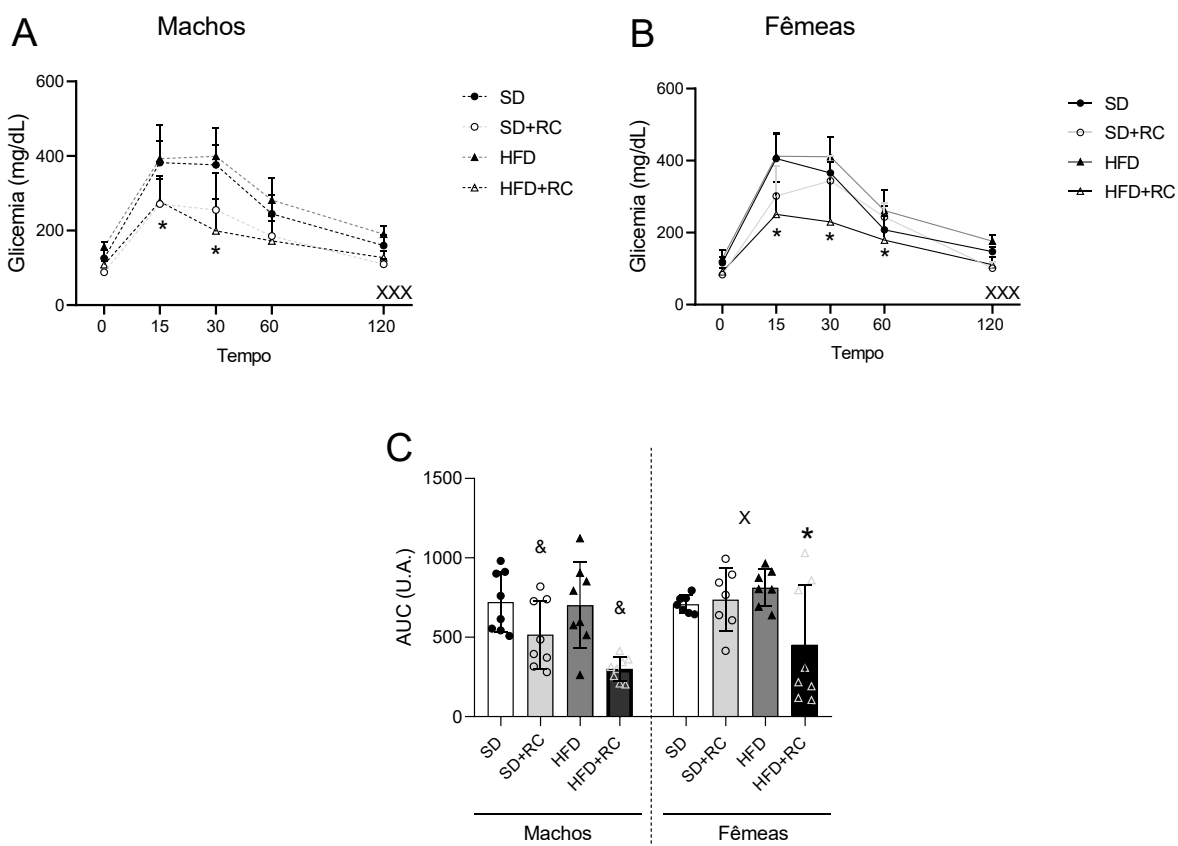


Figura 15: Teste de tolerância à glicose (mg/dL).

A) Curva glicemia dos machos; B) Curva glicemia de camundongos fêmeas; C) Área sob a curva do teste de tolerância à glicose. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. XXX indica interação significativa entre os fatores dieta, RC e repetição por ANOVA de duas vias com medidas repetidas ( $p \leq 0,05$ ); & denota o efeito da RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  SD x SD+RC e HFD

x HFD+RC; SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

#### 5.1.1.5. Teste de tolerância à insulina (ipITT)

A figura 16 apresenta os resultados obtidos no teste ipITT, sendo o gráfico A representativo da curva glicêmica dos machos ao longo do teste, o gráfico B das fêmeas e o C a constante de decaimento ( $K_{ITT}$ ) calculada para ambos os sexos. Tanto para os camundongos machos (figura 16 A) quanto nas fêmeas (figura 16 B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeito da repetição (machos:  $F_{(5, 140)}=51,439$ ;  $P < 0,05$ / fêmeas:  $F_{(5, 125)}=13,007$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre repetição e RC (machos:  $F_{(5, 140)}=22,241$ ;  $P < 0,05$ / fêmeas:  $F_{(5, 140)}=22,241$ ;  $P < 0,05$ ). Em resposta a injeção de insulina, os grupos submetidos à RC tiveram menor decaimento da glicemia em todos os tempos do teste, tanto em machos quanto em fêmeas. Para a constante de decaimento (figura 16 C) a ANOVA mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 29)}=40,226$ ;  $P < 0,05$ ) nos machos. Nas fêmeas, houve efeito da dieta ( $F_{(1, 23)}=9,1621$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1, 23)}=13,980$ ;  $P < 0,05$ ) na constante de decaimento e o *post-hoc* mostrou diminuição da constante de decaimento nas fêmeas do grupo HFD+RC quando comparado ao seu controle.

A figura 16 D mostra a concentração plasmática de insulina, a ANOVA não mostrou diferença significativa entre os grupos de machos e fêmeas para esse parâmetro.



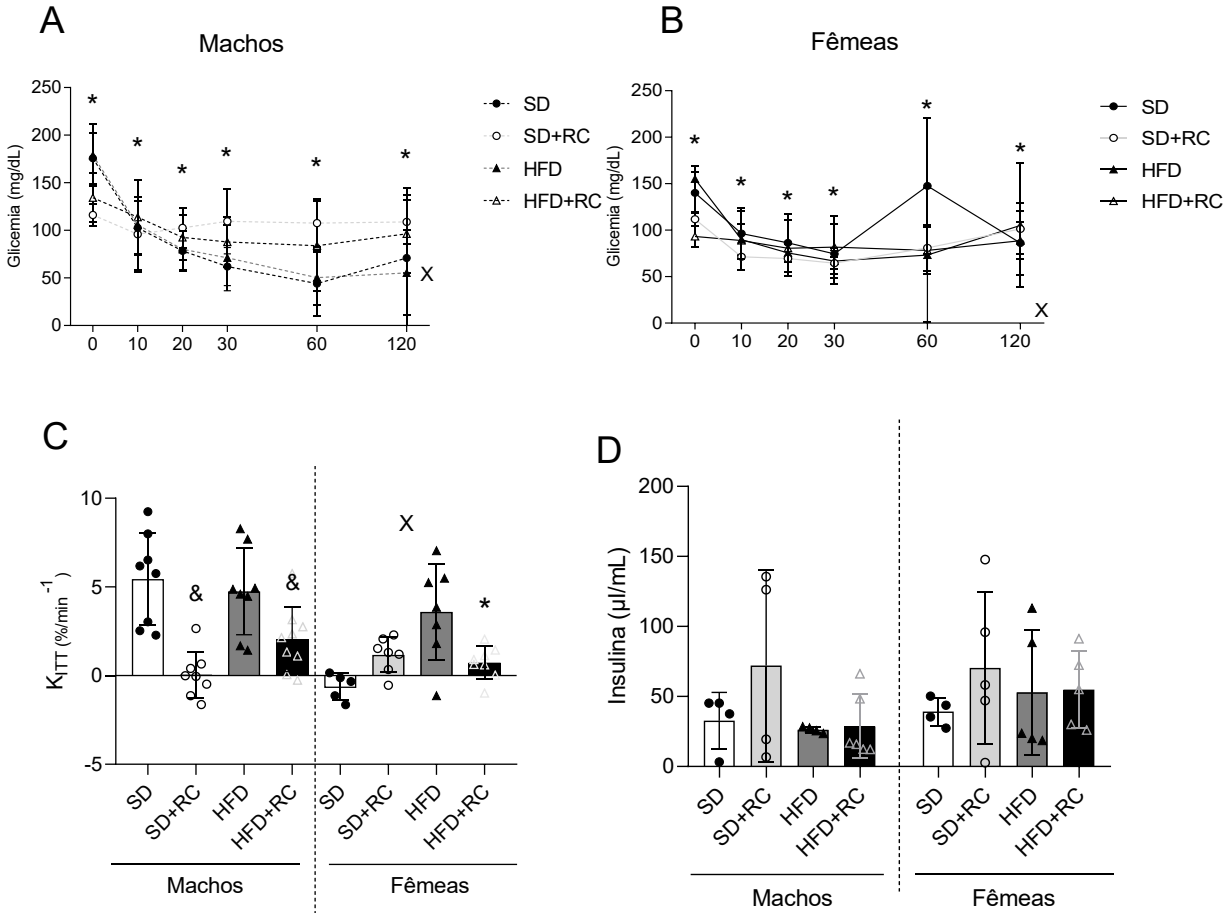


Figura 16: Teste de tolerância à insulina (mg/dL).

A) Curva glicemia dos machos; B) Curva glicemia de camundongos fêmeas; C) Constante de decaimento do teste de tolerância à glicose; D) Insulina plasmática ( $\mu\text{l/mL}$ ). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. & denota o efeito da RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); X indica interação significativa entre fatores por ANOVA de duas vias com medidas repetidas ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  SD x SD+RC e HFD x HFD+RC; SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.1.6. Níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol, colinesterase, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP)

A figura 17 mostra os resultados das análises plasmáticas realizadas. Ao verificarmos os níveis plasmáticos de colesterol (figura 17 A), constatamos pela ANOVA de duas vias efeito da

dieta nos camundongos machos ( $F_{(1, 29)}=14,778$ ;  $P < 0,05$ ), com aumentos dos níveis de colesterol nos grupos alimentados com a HFD, porém nenhuma alteração foi observada em fêmeas.

Para o parâmetro de triglicerídeo plasmático (figura 17 B), a ANOVA de duas vias mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 28)}=4,2173$ ;  $P < 0,05$ ) nos machos, havendo elevação dos níveis de triglicerídeos plasmático nos grupos tratados com a RC. Nas fêmeas, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo.

A ANOVA de duas vias também não mostrou efeito significativo nas análises de colinesterase (figura 17 C) e TGO (figura 17 D) tanto em machos quanto em fêmeas. A figura 17 E mostra dos dados de níveis de TGP plasmático e a ANOVA de duas vias mostrou efeito da dieta nos machos ( $F_{(1, 28)}=5,0402$ ;  $P < 0,05$ ), com diminuição dos níveis de TGP nos animais tratados com HFD e sem efeito significativo nas fêmeas.

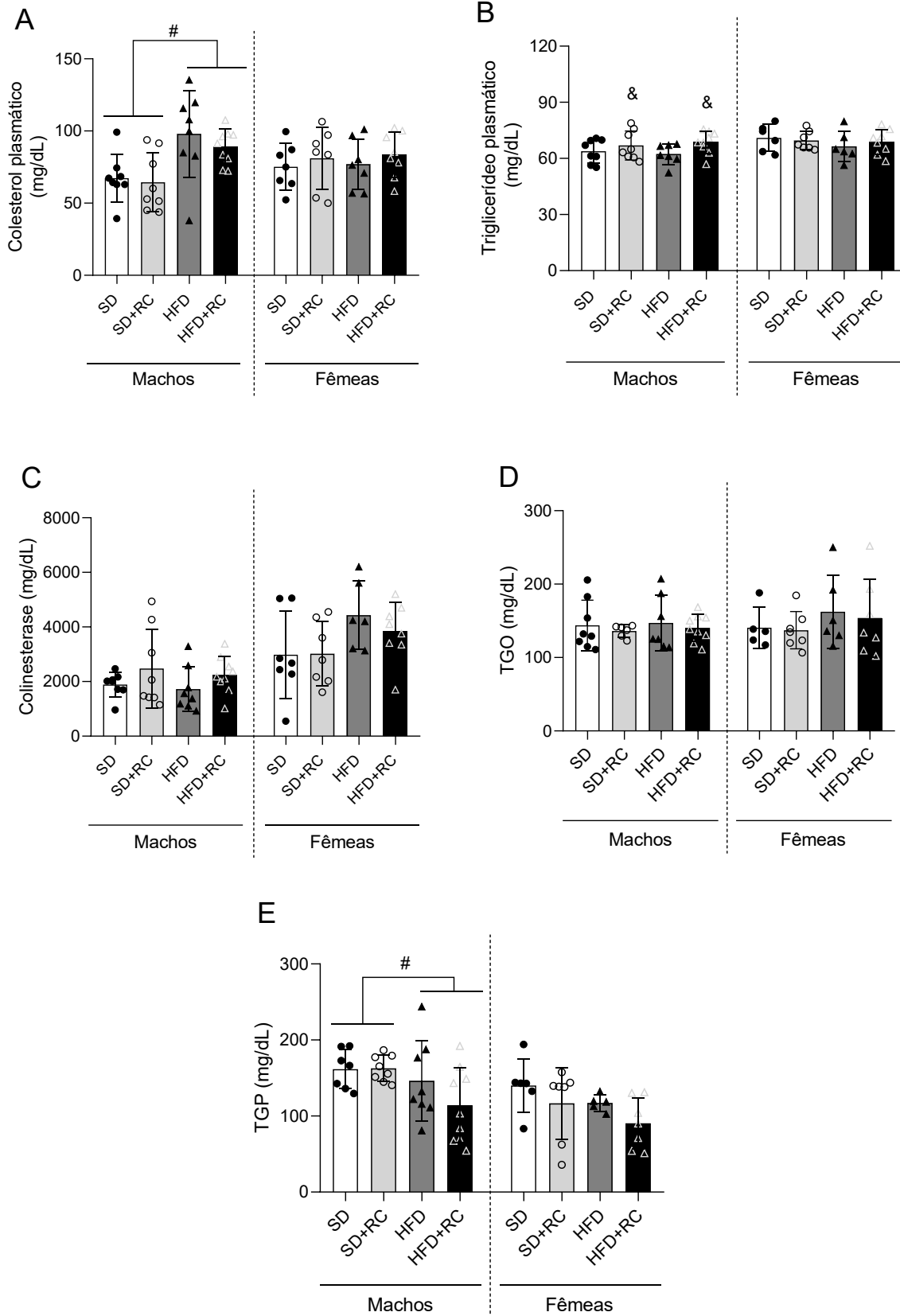


Figura 17: Análise de variáveis plasmáticas (mg/dL) de camundongos submetidos a intervenção crônica com HFD e RC.

A) Colesterol plasmático; B) Triglicerídeos plasmáticos; C) Colinesterase plasmática; D) TGO; E) TGP. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. # denota o efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); & denota efeito da RC detectado pela ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.1.7. Conteúdo de colesterol e triglicerídeos hepáticos

Nos camundongos machos, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da dieta ( $F_{(1, 21)}=6,1970$ ;  $P < 0,05$ ) para o parâmetro de colesterol hepático (figura 18 A), com elevação dos níveis de colesterol nos grupos tratados com a HFD. Ainda sobre esse parâmetro, nas fêmeas, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da RC ( $F_{(1, 21)}=4,5091$ ;  $P < 0,05$ ), com incremento nos níveis de colesterol nos grupos submetidos à RC. Para a variável triglicerídeo hepático (figura 18 B), a ANOVA de duas vias apontou efeito da dieta ( $F_{(1, 24)}=10,199$ ;  $P < 0,05$ ) e RC ( $F_{(1, 24)}=39,427$ ;  $P < 0,05$ ) em machos, sendo observado elevação dessa variável nos grupos SD+RC, HFD e HFD+RC. Nas fêmeas, foi observado efeito da dieta ( $F_{(1, 23)}=4,6504$ ;  $P < 0,05$ ), com aumento do triglicerídeo hepático nos grupos que receberam HFD.

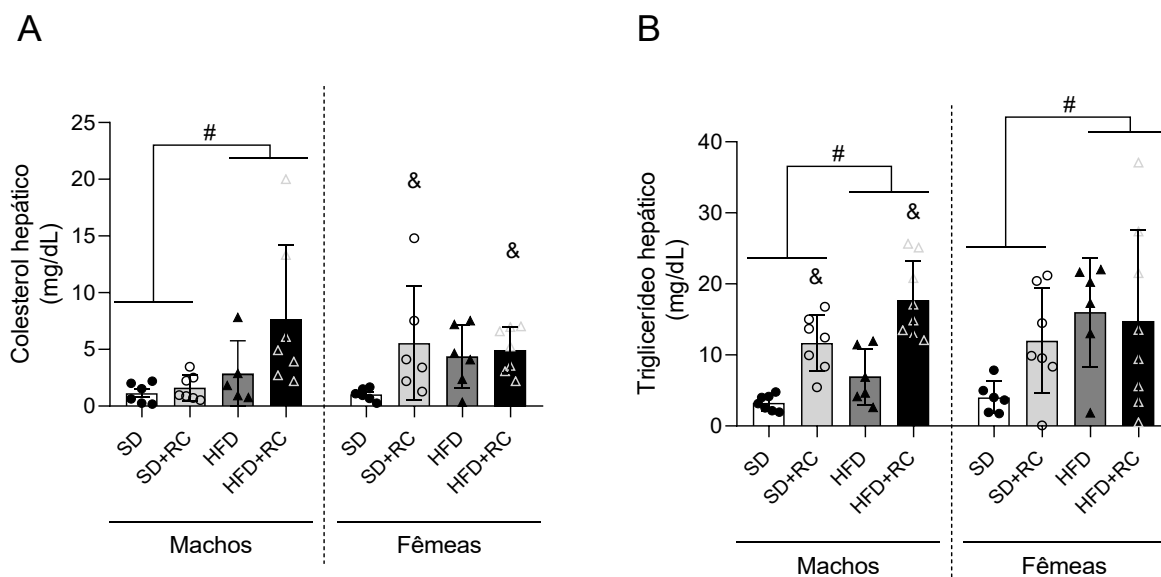


Figura 18: Análise de variáveis hepáticas (mg/dL) de camundongos tratados de HFD e RC.

A) Colesterol hepático; B) Triglicerídeo hepático. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. & denota o efeito da RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); # indica efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.1.8. Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ e IL 1- $\beta$ hepáticos

Em relação aos níveis de TNF- $\alpha$  no fígado (figura 19 A), ANOVA de duas vias mostrou efeito da dieta nos machos ( $F_{(1,28)}=9,1599$ ;  $P < 0,05$ ), com diminuição da concentração dessa citocina nos grupos alimentados com HFD. Nas fêmeas a ANOVA de duas vias apresentou interação entre os fatores restrição e dieta ( $F_{(1,23)}=7,3473$ ;  $P < 0,05$ ). No *post-hoc* realizado nas fêmeas foi observado aumento dos níveis do TNF- $\alpha$  no grupo que recebeu dieta padrão associada a RC quando comparado ao seu controle. Já para a variável IL 1- $\beta$  (figura 19 B) a ANOVA apontou efeito da dieta nos machos ( $F_{(1,28)}=7,7678$ ;  $P < 0,05$ ), mostrando menores níveis da citocina nos grupos que receberam a HFD associada ou não a RC e sem diferença significativa nas fêmeas.

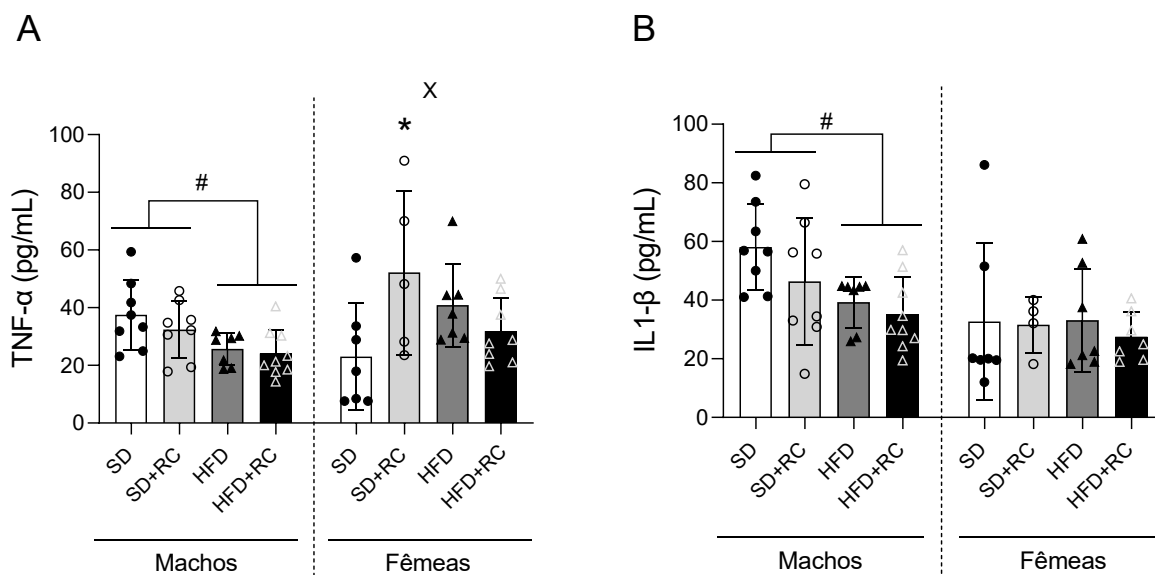


Figura 19: Efeito do tratamento com HFD e RC nos níveis de citocinas hepáticas (pg/MI).

A) TNF- $\alpha$  hepático; B) IL 1- $\beta$  hepático. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. # denota o efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); X indica interação significativa entre os fatores dieta e RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ). Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  SD x SD+RC; SD

(n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.2. Parâmetros comportamentais:

#### 5.1.2.1. Campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar atividade locomotora espontânea e emocionalidade. Os parâmetros analisados foram os números de cruzamentos totais e porcentagem de tempo no centro do aparato, como mostrado na figura 20. A ANOVA de duas vias mostrou interação entre dieta e RC no parâmetro de cruzamentos totais dos camundongos machos ( $F_{(1, 29)}=12,676$ ;  $P < 0,05$ ). O *post-hoc* mostrou diminuição do número de cruzamentos dos machos submetidos ao tratamento com dieta padrão associada a RC e aumento do número de cruzamentos nos machos tratados com HFD e RC, ambos comparados ao seu controle (figura 20 A). A ANOVA não mostrou diferença significativa nas fêmeas para o parâmetro de quantidade de cruzamentos, bem como para a variável de tempo no centro em ambos os sexos (figura 20 B).

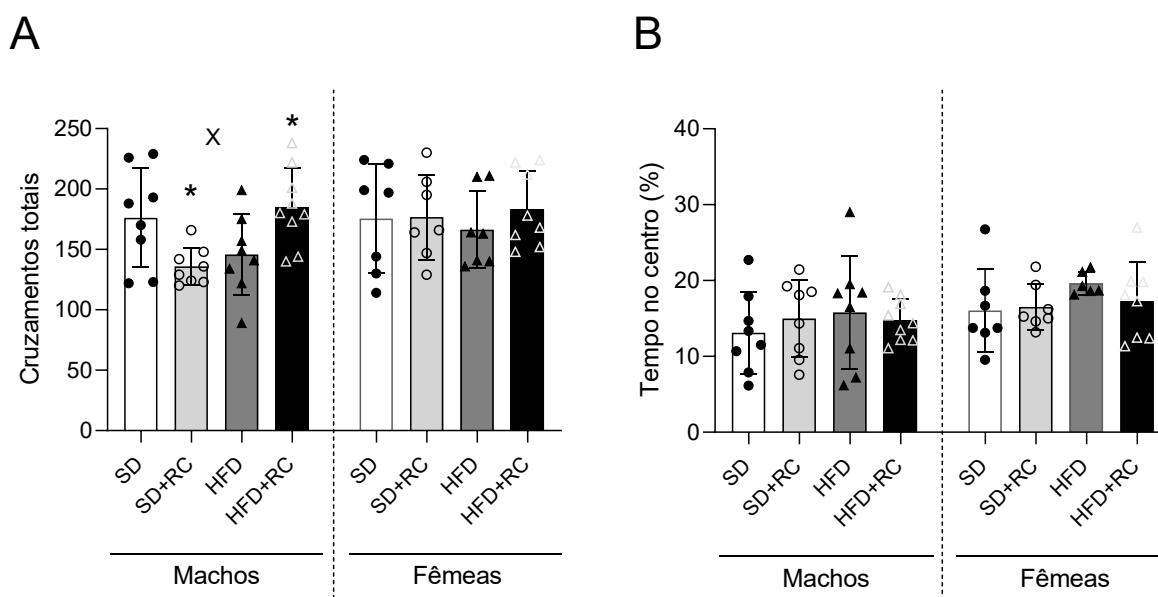


Figura 20: Efeito do consumo crônico de HFD e RC na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos C57Bl/6.

A) Avaliação do número de cruzamentos totais; B) tempo no centro. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. X indica interação significativa entre os fatores dieta e RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ). Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  SD x SD+RC e HFD x HFD+RC; SD (n=15, sendo 8

machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

#### 5.1.2.2. Labirinto em T

Um dia após o campo aberto, os animais foram submetidos ao teste de alternância forçada no labirinto em T, para avaliar a memória espacial de curto prazo. Esse teste consiste em fase de treino e fase de teste, e os parâmetros coletados foram cruzamentos totais na sessão de treino e de teste, e o tempo gasto no braço novo durante a sessão de teste. Não foi observado diferenças entre os grupos nas fases de treino (figura 21 A) e teste (figura 21 B) para o total de cruzamento ao longo dos braços do aparato. Além disso, conforme mostrado na figura 21 C, para os machos do grupo SD ( $t=2,579$ ;  $df=7$ ;  $P < 0,05$ ) e SD+RC ( $t=3,190$ ;  $df=5$ ;  $P < 0,05$ ), a porcentagem de tempo gasto explorando o braço novo foi maior que a chance aleatória de 33%. Semelhantemente, as fêmeas do grupo SD ( $t=3,743$ ;  $df=7$ ;  $P < 0,05$ ) também exploraram o braço novo por mais tempo. Explorar mais tempo o braço novo é indicativo de aprendizado da tarefa nesses grupos. Esse resultado também mostra prejuízo na memória espacial de curto prazo nos grupos de machos e fêmeas tratados com HFD, os quais não foram revertidos pela RC. Para o mesmo dado, realizamos a ANOVA de duas vias, que indicou efeito significativo da dieta para a variável de tempo no braço novo nos camundongos machos ( $F_{(1, 28)}=4,9071$ ;  $P < 0,05$ ), indicando o prejuízo dos animais que receberam HFD no teste e não mostrou alteração nas fêmeas.

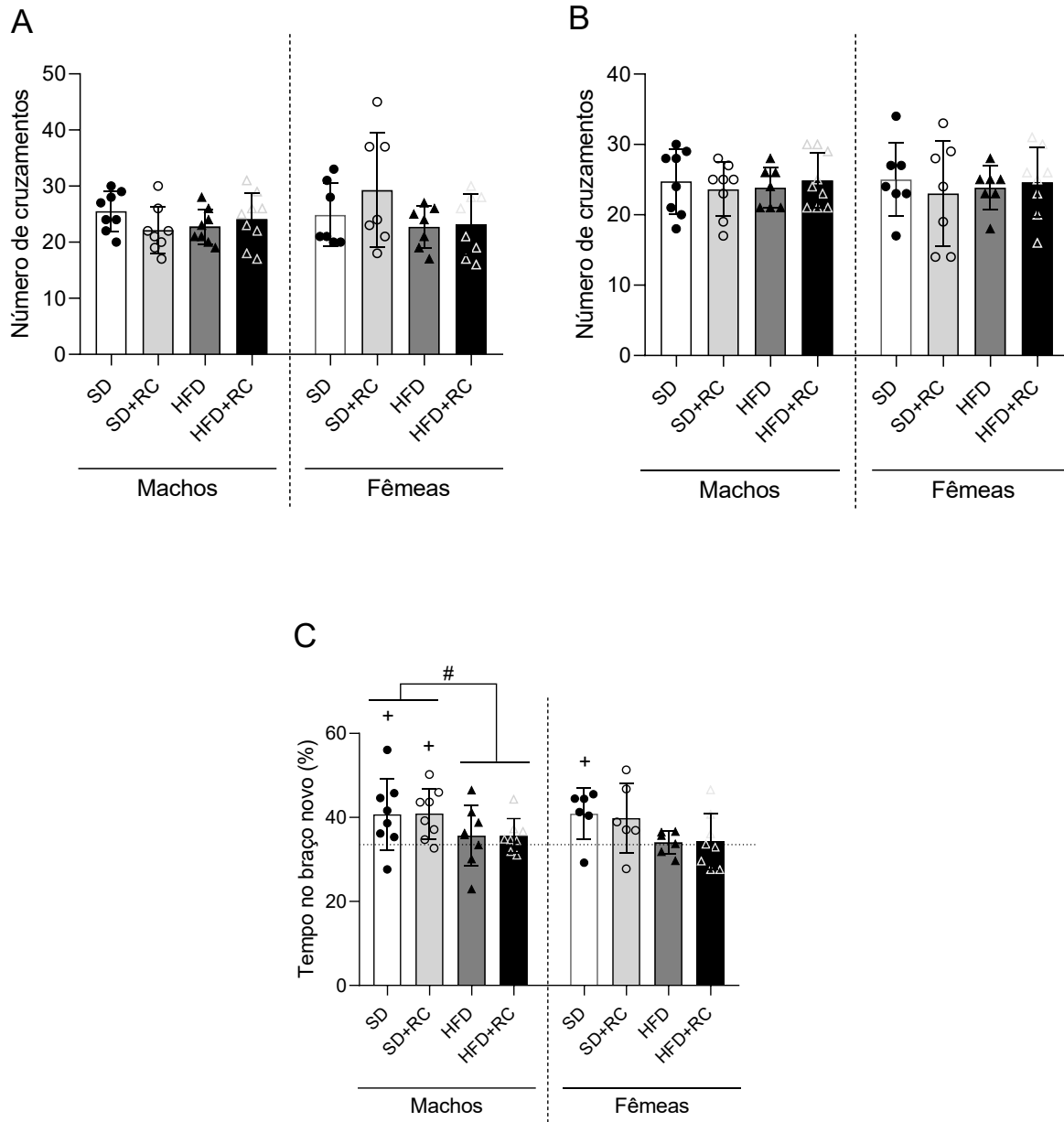


Figura 21: Influência da alimentação crônica com HFD e RC na alternância forçada no labirinto em T.

A) Número de cruzamentos totais na sessão de treinamento; B) Número de cruzamento na sessão de teste; C) Tempo (%) gasto no novo braço durante o teste. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. +  $\leq p$  0,05 versus nível de chance (33% do tempo gasto explorando o novo braço no teste). # denota o efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.2.3. Step Down



Com o objetivo de avaliar memória espacial de curto e longo prazo utilizamos o modelo de esquiwa inibitória do tipo step down. Esse teste possui uma fase de treino (figura 22 A) em que o animal recebe um estímulo elétrico (0,3 mA por 2 segundos) nas patas ao descer da plataforma e duas fases de teste, 90 minutos (figura 22 B) e 24h (figura 22 C) após o treino. Analisamos o tempo que o animal demora para descer da plataforma, ou seja latência. Por se tratar de um dado não paramétrico, os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Na latência para descer da plataforma no treino não foi observado diferença entre os grupos de machos e fêmeas. Além disso, nos testes de 90 minutos e 24h após a fase de treino, também não identificamos diferenças entre os grupos, porém todos os grupos aprenderam a tarefa e demoraram mais tempo para descer da plataforma ou atingiram o tempo total do teste, 180 minutos e foram retirados do aparato.

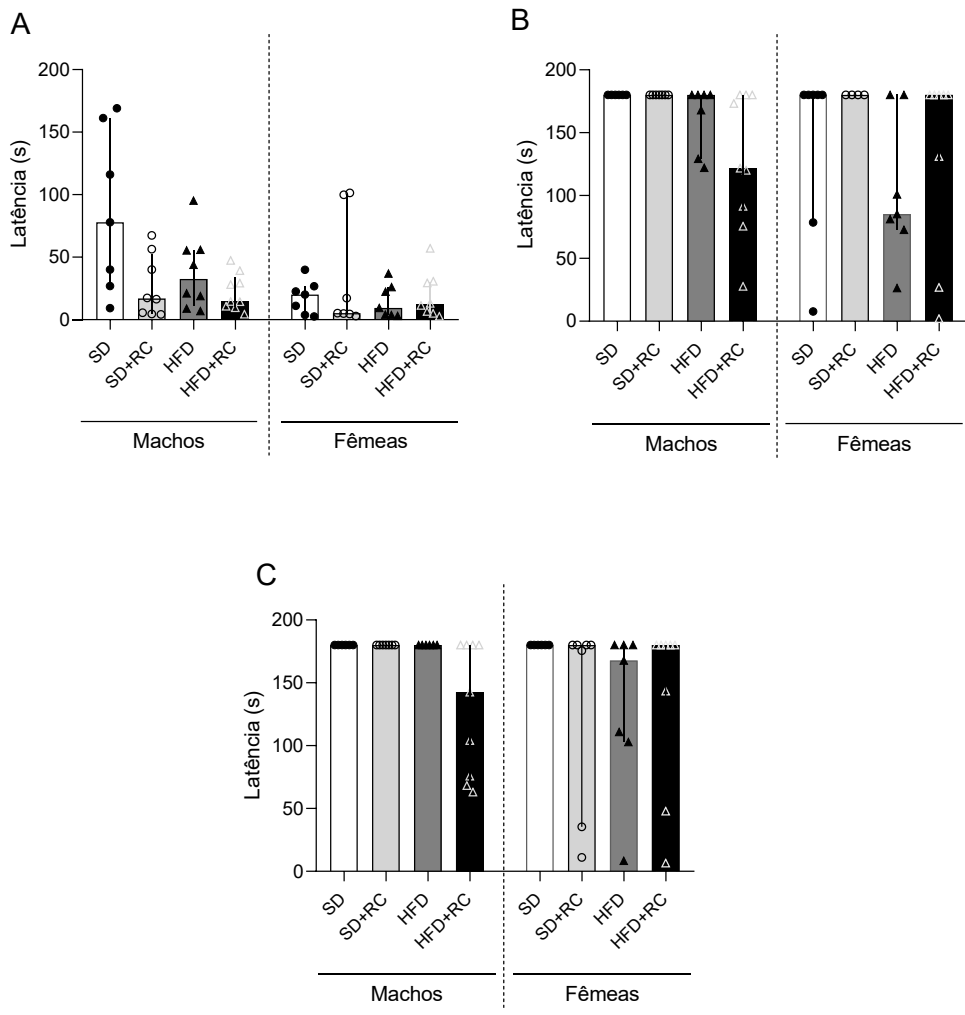


Figura 22: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC na memória aversiva de curto e longo prazo.

A) Latência para descer da plataforma no treino (s); B) Latência para descer da plataforma 90 minutos após o treino (s); C) Latência para descer da plataforma 24h após a fase de treinamento. Os valores estão expressos em mediana e intervalo inter-quartil. SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

#### 5.1.2.4. Borrifagem de sacarose

O teste da borrifagem de sacarose (figura 23) permite fazer inferências sobre os comportamentos de autocuidado e anedonia. Após borrifar uma solução contendo 10% de sacarose no dorso do animal, é contabilizado o tempo para o comportamento de autolimpeza (latência para limpeza; figura 23 A) e o tempo total de limpeza (figura 23 B). Na latência para o comportamento de limpeza, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da RC nos machos ( $F_{(1, 29)}=5,0520$ ;  $P < 0,05$ ), com aumento no tempo para manifestação do primeiro comportamento de autolimpeza nos machos submetidos a RC, porém sem efeito nas fêmeas. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos no tempo de autolimpeza em camundongos machos e fêmeas (figura 23 B).

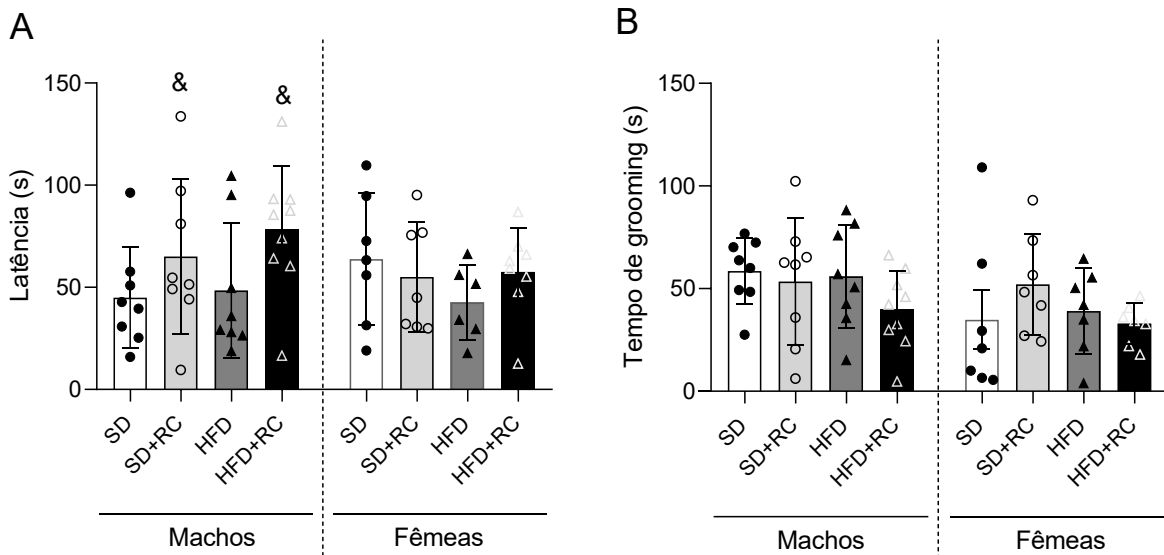


Figura 23: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC no teste de borrifagem de sacarose.

A) Latência para autolimpeza (s); B) Tempo de autolimpeza (s). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. & denota o efeito da RC por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

### 5.1.2.5. Suspensão pela cauda

Para analisar a estratégia comportamental frente a um estresse agudo inescapável, utilizamos o teste de suspensão pela cauda (figura 24). Nesse teste o animal apresenta dois tipos de comportamentos alternados, a agitação e a imobilidade, sendo contabilizado o tempo para a primeira imobilidade, isso é, a latência (figura 24 A) e tempo total de imobilidade (figura 24 B). A ANOVA de duas vias indicou efeito da dieta no parâmetro de latência para imobilidade (figura 24 A) nas fêmeas ( $F_{(1, 25)}=5,5193$ ;  $P < 0,05$ ), havendo aumento no tempo para a imobilidade nas fêmeas alimentadas com HFD. Porém não foi identificada diferenças significativas nos machos para a mesma variável, além de não haver distinção em ambos os sexos para o parâmetro de tempo de imobilidade (figura 24 B).

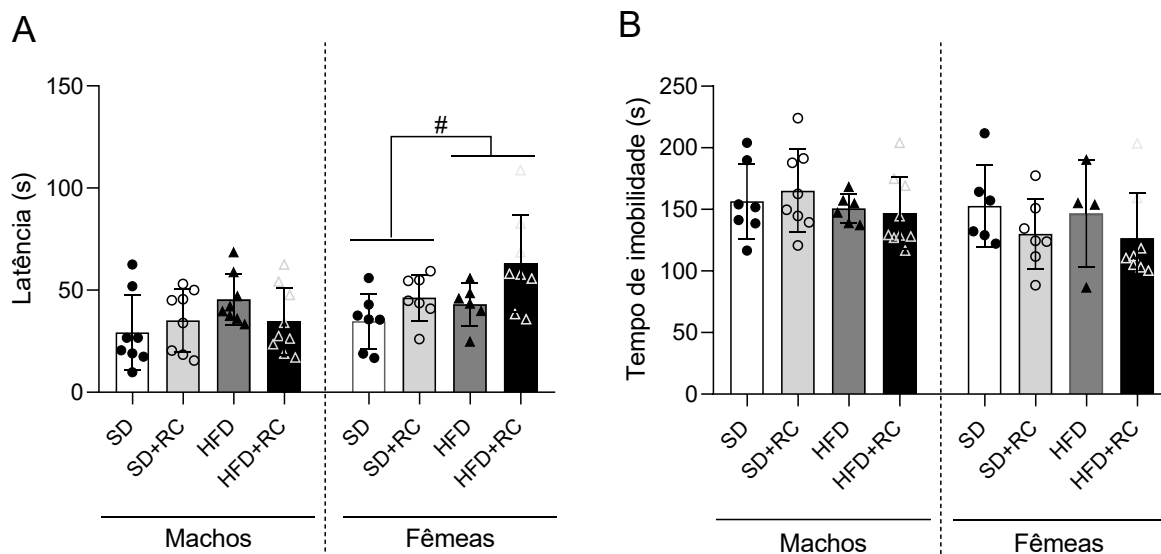


Figura 24: Efeito da exposição crônica à HFD e da RC no teste de suspensão pela cauda.

A) Latência para imobilidade (s); B) Tempo de total de imobilidade (s). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. # denota o efeito da dieta por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); SD (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), SD+RC (n=15, sendo 8 machos e 7 fêmeas), HFD (n=15, 8 machos e 7 fêmeas), HFD+RC (n=17, 9 machos e 8 fêmeas).

5.2. Protocolo 2 - Efeito da restrição calórica nas alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas em modelo experimental de hipercolesterolemia familiar de camundongos nocaute do receptor de LDL de meia-idade.

## 5.2.1. Parâmetros metabólicos

### 5.2.1.1. Variação da massa corporal

O gráfico 25 A mostra a evolução ponderal da massa corporal de todos os grupos ao longo das quatro semanas de protocolo experimental. O teste T mostrou que o grupo C57 tem maior massa que o grupo LDLr<sup>-/-</sup> ao longo de todo experimento ( $P < 0,05$ ). Na linhagem LDLr<sup>-/-</sup>, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito da restrição calórica ( $F_{(1, 29)}=56,951$ ;  $P < 0,05$ ) na primeira ( $F_{(1, 29)}=37,740$ ;  $P < 0,05$ ), segunda ( $F_{(1, 29)}=34,513$ ;  $P < 0,05$ ), terceira ( $F_{(1, 29)}=51,617$ ;  $P < 0,05$ ) e na quarta semana. A ANOVA mostrou também efeito da restrição e interação entre os fatores RC e metformina ( $F_{(1, 29)}=5,6666$ ;  $P < 0,05$ ). O *post-hoc* realizado mostrou diminuição da massa corporal do grupo LDLr<sup>-/-</sup>+RC comparado ao grupo LDLr<sup>-/-</sup>, bem como do grupo LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET quando comparado com todos os outros três grupos.

No gráfico 25 B apresentamos o delta da massa corporal (massa final – massa inicial) onde a ANOVA de duas vias mostrou efeito da restrição calórica e interação entre dos fatores restrição calórica e metformina ( $F_{(1, 29)}=5,0793$ ;  $P < 0,05$ ). O *post-hoc* mostrou diminuição da massa corporal nos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC e LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET quando comparados ao grupo LDLr<sup>-/-</sup> e aumento da massa corporal dos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+MET comparado aos animais do grupo LDLr<sup>-/-</sup>.

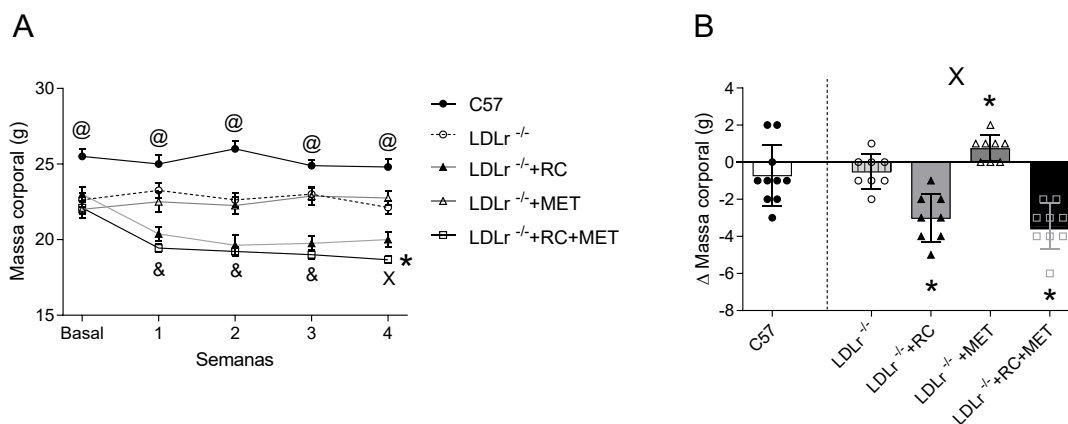


Figura 25: Evolução da massa corporal dos animais ao longo de 4 semanas de intervenção.

A) Variação da massa corporal ponderal dos grupos experimentais. B) Delta da massa corporal (peso final - inicial). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra LDLr<sup>-/-</sup>; & indica efeito do fator restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); X denota o efeito principal da interação entre os fatores metformina e restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de

Newman–Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$ ; C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC+MET (n=9).

### 5.2.1.2. Gordura visceral

Não observamos diferença entre os animais do grupo C57 e LDLr<sup>-/-</sup> em relação ao peso da gordura visceral. Nos animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup>, ANOVA de duas vias mostrou efeito da restrição calórica ( $F_{(1, 29)}=42,585$ ;  $P < 0,05$ ), da metformina ( $F_{(1, 29)}=37,556$ ;  $P < 0,05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(1, 29)}=7,1342$ ;  $P < 0,05$ ) para tal parâmetro. Ainda, o *post-hoc* realizado mostrou diminuição significativa da massa de gordura visceral nos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC, LDLr<sup>-/-</sup>+MET e LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET comparados ao controle LDLr<sup>-/-</sup>, como mostrado na figura 26. O *post-hoc* mostrou que o grupo LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET também tinha menor massa de gordura visceral que aos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC, LDLr<sup>-/-</sup>+MET.

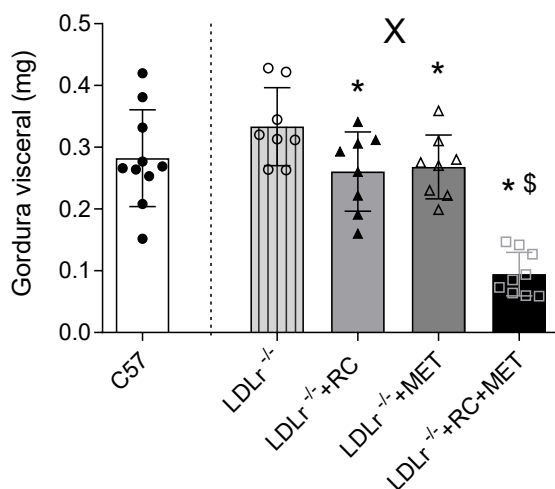


Figura 26: Peso da gordura visceral dos animais após 4 semanas de intervenção.

Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. X denota o efeito principal da interação entre os fatores metformina e restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman–Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo LDLr<sup>-/-</sup> e \$  $p \leq 0,05$  comparando LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET aos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC e LDLr<sup>-/-</sup>+MET; C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC+MET (n=9).

### 5.2.1.3. Consumo hídrico *per capita*

A ingestão hídrica dos animais foi medida diariamente e segue representada na figura 27 como consumo *per capita* normalizado pela massa corporal. Observamos que ao longo das quatro semanas de protocolo experimental, os animais do grupo C57 tem uma ingesta hídrica superior ao grupo controle LDLr<sup>-/-</sup> (t=10,08, df=56; P< 0,05). Entre os grupos de animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> a ANOVA de duas vias mostrou efeito da RC (F<sub>(1, 114)</sub>= 85,472; P< 0,05), da metformina (F<sub>(1, 114)</sub>= 47,641; P< 0,05) e interação entre os fatores RC e metformina (F<sub>(1, 114)</sub>= 15,628; P< 0,05). O *post-hoc* mostrou aumento do consumo hídrico nos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC, LDLr<sup>-/-</sup>+MET e LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET. A elevação da ingestão hídrica no grupo LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET foi superior aos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC e LDLr<sup>-/-</sup>+MET.

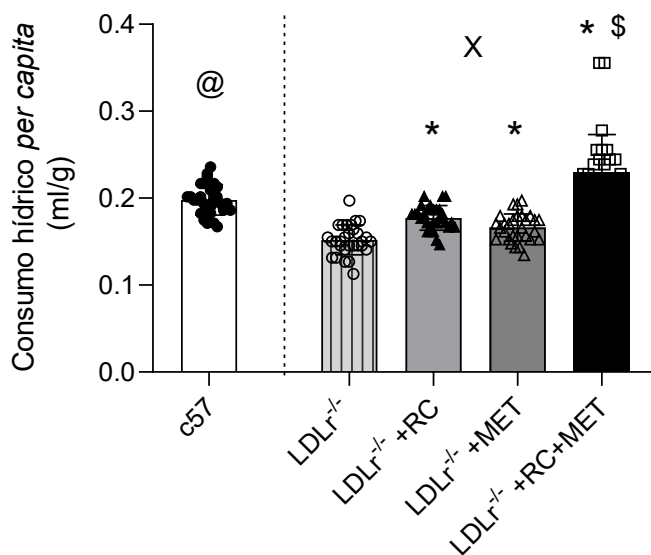


Figura 27: Ingestão hídrica per capita ao longo de 4 semanas de intervenção.

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra LDLr<sup>-/-</sup>; X denota o efeito principal da interação entre os fatores metformina e restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman–Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo LDLr<sup>-/-</sup> e \$  $p \leq 0,05$  comparando LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET aos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC e LDLr<sup>-/-</sup>+MET. C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET (n=9).

#### 5.2.1.4. Concentração plasmática de glicose, colesterol, triglicerídeo e proteínas totais

A figura 28 mostra os resultados das análises plasmáticas realizadas. Ao verificarmos os níveis plasmáticos de colesterol (figura 28A), constatamos, como esperado, aumento dos níveis de

colesterol no grupo LDLr<sup>-/-</sup> comparado ao grupo C57 (t=18,31, df=16; P< 0,05). Para esse mesmo parâmetro, a ANOVA de duas vias efeito da restrição calórica (F<sub>(1, 29)</sub>=8,6497; P< 0,05), com aumento nos níveis de colesterol plasmático nos grupos submetidos a RC. Para o parâmetro de triglicerídeo plasmático (figura 28 B), não encontramos diferença entre o grupo C57 e LDLr<sup>-/-</sup>. A ANOVA de duas vias mostrou efeito da metformina (F<sub>(1, 28)</sub>=5,6288; P< 0,05), havendo elevação dos níveis de triglicerídeos plasmático nos grupos tratados com o fármaco. Para a variável glicose plasmática (figura 28 C), a ANOVA de duas vias mostrou efeito da restrição calórica (F<sub>(1, 29)</sub>=4,3995; P< 0,05) e interação entre os fatores (F<sub>(1, 29)</sub>=4,7818; P< 0,05). O *post-hoc* mostrou elevação dos níveis de glicose plasmática nos grupos LDLr<sup>-/-</sup>+RC, LDLr<sup>-/-</sup>+MET e LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET comparados ao grupo LDLr<sup>-/-</sup>. Finalmente, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo nos níveis de proteínas totais (figura 28 D).

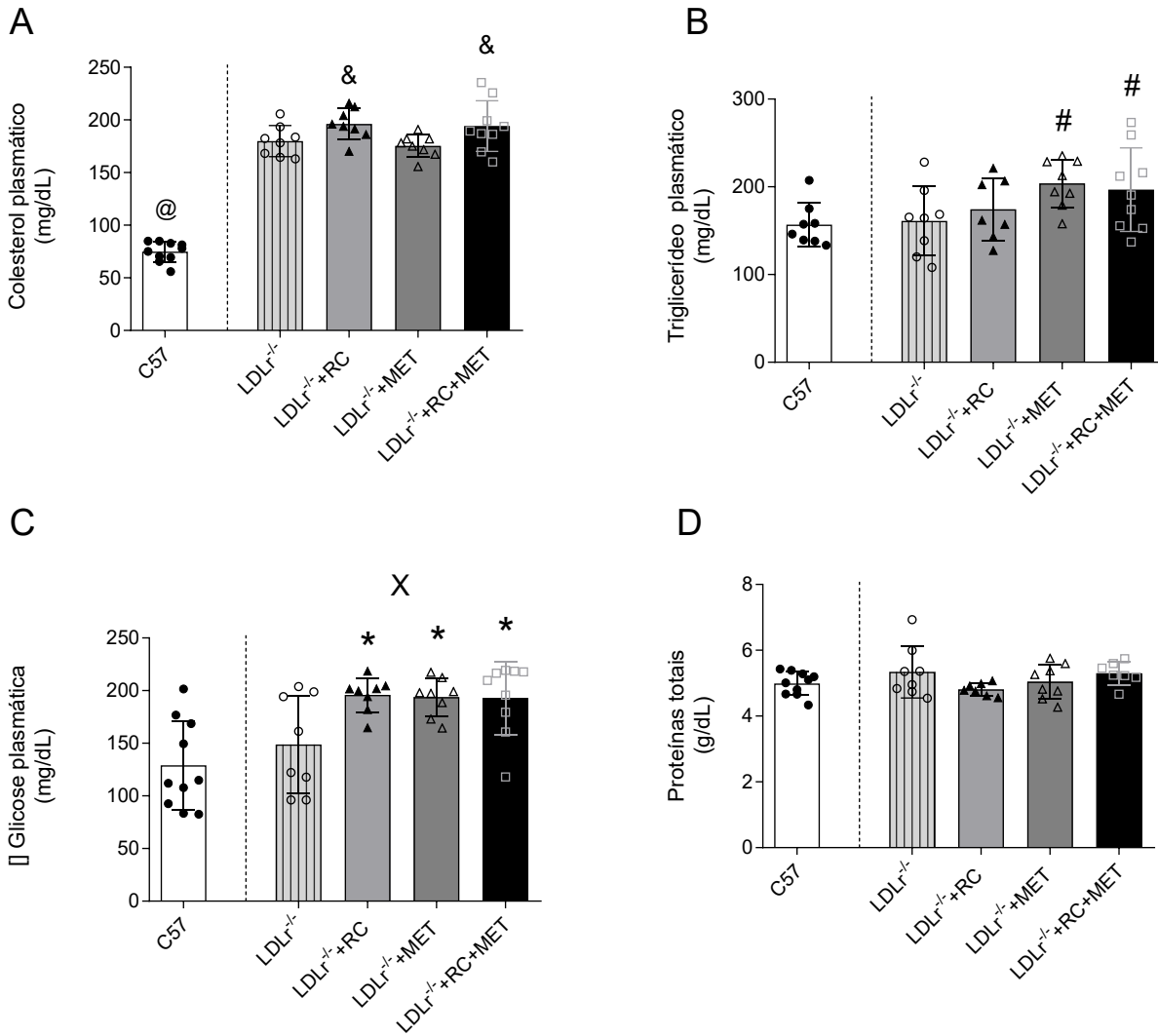


Figura 28: Análise plasmática após 4 semanas de intervenção.

A) Níveis de colesterol- mg/dL. B) Níveis de triglicerídeo- mg/dL. C) Níveis de glicose- mg/dL. D) Níveis de proteínas totais- g/dL. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra LDLr<sup>-/-</sup>; & indica efeito do fator restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); # mostra efeito da metformina por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); X denota o efeito principal da interação entre os fatores metformina e restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); Resultados do teste *post-hoc* de Newman-Keuls, onde \*  $p \leq 0,05$ ; C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET (n=9).

## 5.2.2. Parâmetros comportamentais

### 5.2.2.1. Campo aberto



O teste T mostrou aumento significativo no número de cruzamentos totais (figura 29 A) nos animais do grupo  $LDLr^{-/-}$  comparado ao grupo C57 ( $t=3,437$ ,  $df=16$ ;  $P < 0,05$ ), porém a ANOVA de duas vias não mostrou efeito na locomoção espontânea entre os grupos da linhagem nocautes. Para a variável de tempo no centro (figura 29 B) dado em porcentagem, identificamos diminuição do tempo no centro no grupo  $LDLr^{-/-}$  versus C57 ( $t=3,215$ ,  $df=16$ ;  $P < 0,05$ ) e a ANOVA não mostrou diferença significativa tal parâmetro nos grupos LDL, independentemente se tratados com restrição calórica, metformina ou ambas as intervenções.

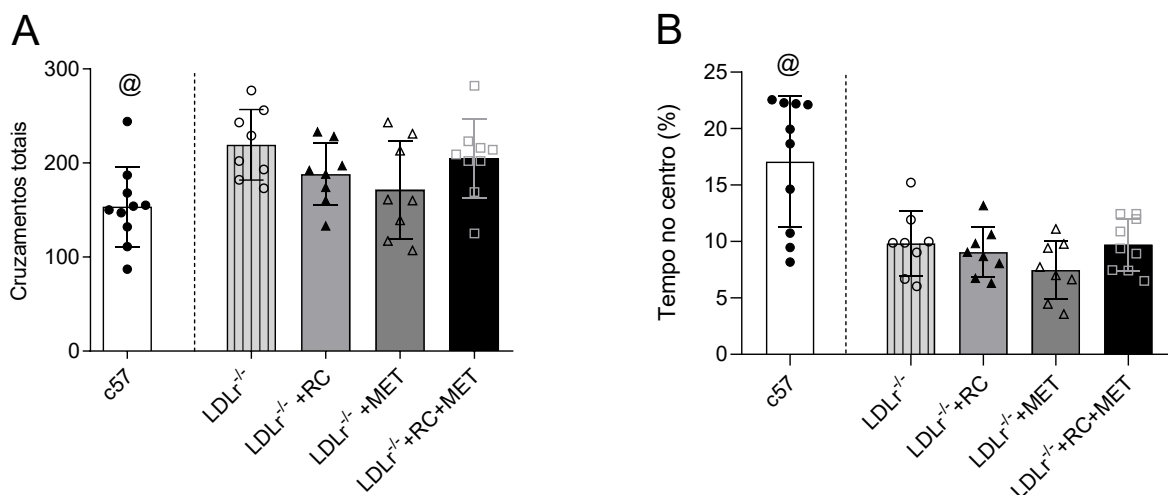


Figura 29: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina na locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no campo aberto em camundongos C57Bl/6 e  $LDLr^{-/-}$ .

A) Cruzamentos totais. B) Tempo no centro (%). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra  $LDLr^{-/-}$ ; C57 (n=10),  $LDLr^{-/-}$  (n=8),  $LDLr^{-/-}$  +RC (n=8),  $LDLr^{-/-}$  +MET (n=8),  $LDLr^{-/-}$  +RC+MET (n=9).

#### 5.2.2.2. Reconhecimento de objetos

Na sessão de treino do teste de reconhecimento de objetos (figura 30 A), não houve nenhuma diferença no índice de reconhecimento de objetos entre os grupos, denotando a ausência de preferência inata por um dos objetos. Na sessão de teste (figura 30 B), o índice de reconhecimento foi superior a 50% para o objeto novo no grupo C57 ( $t=3,310$ ,  $df=9$ ,  $P < 0,05$ ), demonstrando aprendizado da tarefa apenas nesse grupo. Nos animais  $LDLr^{-/-}$ , o índice de exploração do objetivo

foi inferior a 50%, denotando prejuízo na memória de reconhecimento, que não foi revertido pelo protocolo de intervenção com RC e/ou metformina.

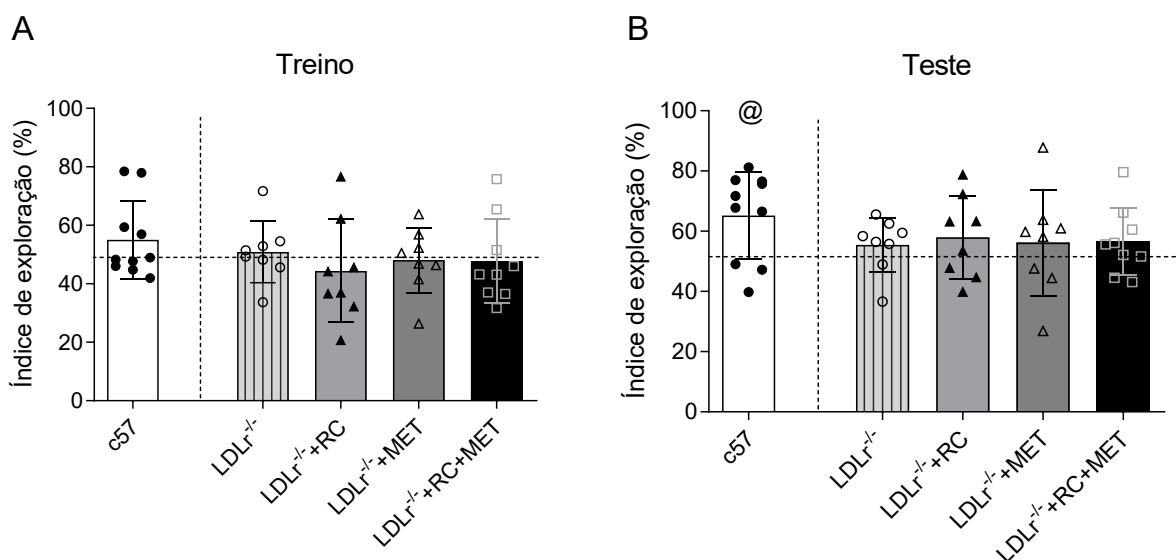


Figura 30: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina memória de reconhecimento em camundongos C57Bl/6 e LDLr<sup>-/-</sup>.

A) Índice de reconhecimento (%) de objetos durante o treino no teste de reconhecimento de objetos; B) Índice de reconhecimento (%) de objetos durante a fase de teste. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra LDLr<sup>-/-</sup>; C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET (n=9).

### 5.2.2.3. Labirinto em T

Avaliamos a memória espacial de curto prazo usando teste do labirinto em T. O grupo LDLr<sup>-/-</sup> apresentou aumento da locomoção espontâneo comparado ao grupo C57 durante as sessões de treino ( $t=6,425$ ,  $df=16$ ;  $p<0,05$ ) e de teste ( $t=6,144$ ,  $df=15$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 31 A e B). Ainda, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da restrição calórica no número de cruzamentos nas fases de treino ( $F_{(1, 29)}=32,713$ ;  $p<0,05$ ) e teste ( $F_{(1, 28)}=14,990$ ;  $p<0,05$ ). Os grupos C57, LDLr<sup>-/-</sup>, LDLr<sup>-/-</sup>+MET e LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET apresentaram um aumento significativo no tempo gasto explorando o novo braço (C57:  $t=3,787$ ,  $df=7$ ;  $p<0,05$ ; LDLr<sup>-/-</sup>:  $t=2,903$ ,  $df=7$ ;  $p<0,05$ ; LDLr<sup>-/-</sup>+MET:  $t=4,201$ ,  $df=7$ ;  $p<0,05$ ; LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET:  $t=5,513$ ,  $df=8$ ;  $p<0,05$ ), evidenciando aprendizado da tarefa (Figura 31 C).

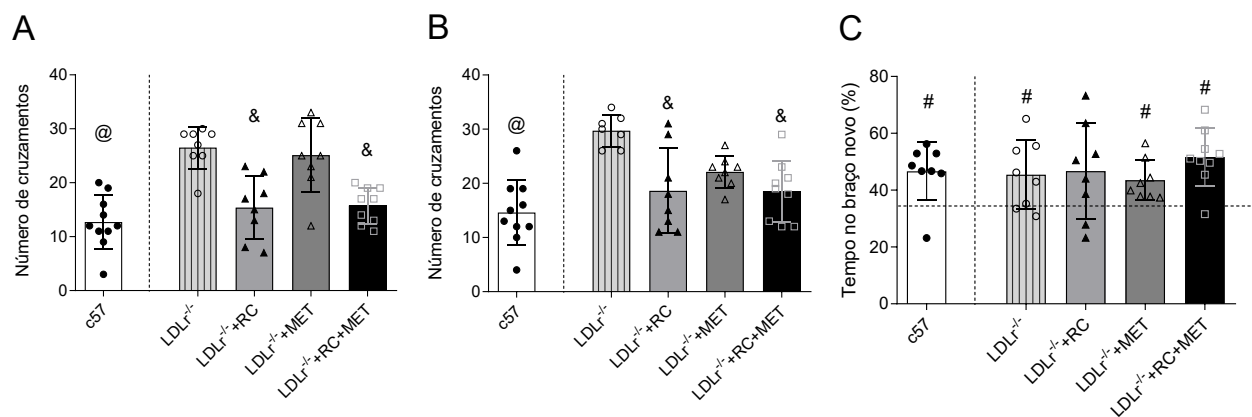


Figura 31: Efeito da restrição calórica e tratamento com metformina memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 e LDLr<sup>-/-</sup>.

A) Avaliação do número de cruzamentos durante a fase de treino; B) Avaliação do número de cruzamentos durante a fase de teste. C) Tempo (%) de exploração do braço novo. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra LDLr<sup>-/-</sup>; & indica efeito do fator restrição calórica por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); #  $P < 0,05$  comparado com 33% (denota aprendizado da tarefa); C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET (n=9).

#### 5.2.2.4. Step Down

Usamos o teste do Step Down para avaliar memória aversiva de curto e longo prazo. Na latência para descer da plataforma (figura 32 A) não foi observado diferença entre os grupos. Além disso, no teste de 90 minutos (figura 32 B) houve um prejuízo no aprendizado da tarefa no grupo LDLr<sup>-/-</sup> em relação ao grupo C57 ( $t=2,199$ ,  $df=15$ ;  $P < 0,05$ ), porém a mesma diferença não foi identificada no teste de 24h (figura 32 C) após a fase de treino. No teste 90 minutos, encontramos diferença significativa no grupo LDLr<sup>-/-</sup>+RC+MET ( $P= 0,0358$ ) em relação ao grupo LDLr<sup>-/-</sup>, com aumento da latência para descer da plataforma, o que indica aprendizado da tarefa em tal grupo. No teste de 24h observamos que todos os grupos aprenderam a tarefa e demoraram mais tempo para descer da plataforma ou atingiram o tempo total do teste, 180 minutos e foram retirados do aparato.

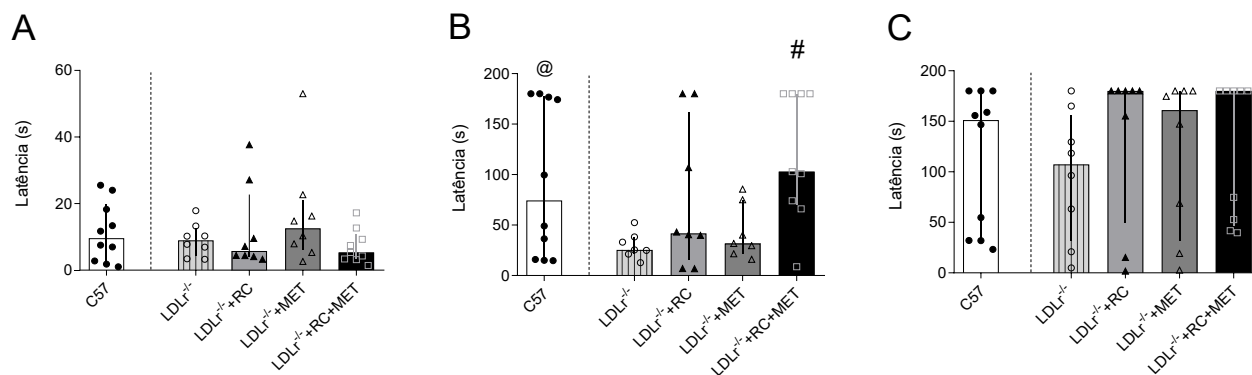


Figura 32: Impacto da restrição calórica e tratamento com metformina na memória aversiva de curto e longo prazo.

A) Latência para descer da plataforma no treino (s); B) Latência para descer da plataforma 90 minutos após o treino (s); C) Latência para descer da plataforma 24h após a fase de treinamento. Os valores estão expressos em mediana e intervalo inter-quartil. @ denota  $p \leq 0,05$  no teste T do grupo C57 contra  $LDLr^{-/-}$ ; #  $P < 0,05$  denota aprendizado da tarefa; C57 (n=10),  $LDLr^{-/-}$  (n=8),  $LDLr^{-/-}$ +RC (n=8),  $LDLr^{-/-}$ +MET (n=8),  $LDLr^{-/-}$ +RC+MET (n=9).

### 5.2.3. Parâmetros neuroquímicos

#### 5.2.3.1. Determinação dos níveis de $TNF-\alpha$ e IL 1- $\beta$ no hipocampo e IL 1- $\beta$ no córtex pré-frontal

Em relação aos níveis de IL 1- $\beta$  (figura 33 A) e  $TNF-\alpha$  (figura 33 B) no hipocampo e IL 1- $\beta$  no córtex pré-frontal (figura 33 C), não identificamos diferença significativa entre os grupos C57 e  $LDLr^{-/-}$ , bem como a ANOVA de duas vias também não mostrou efeito entre os grupos de animais nocautes.

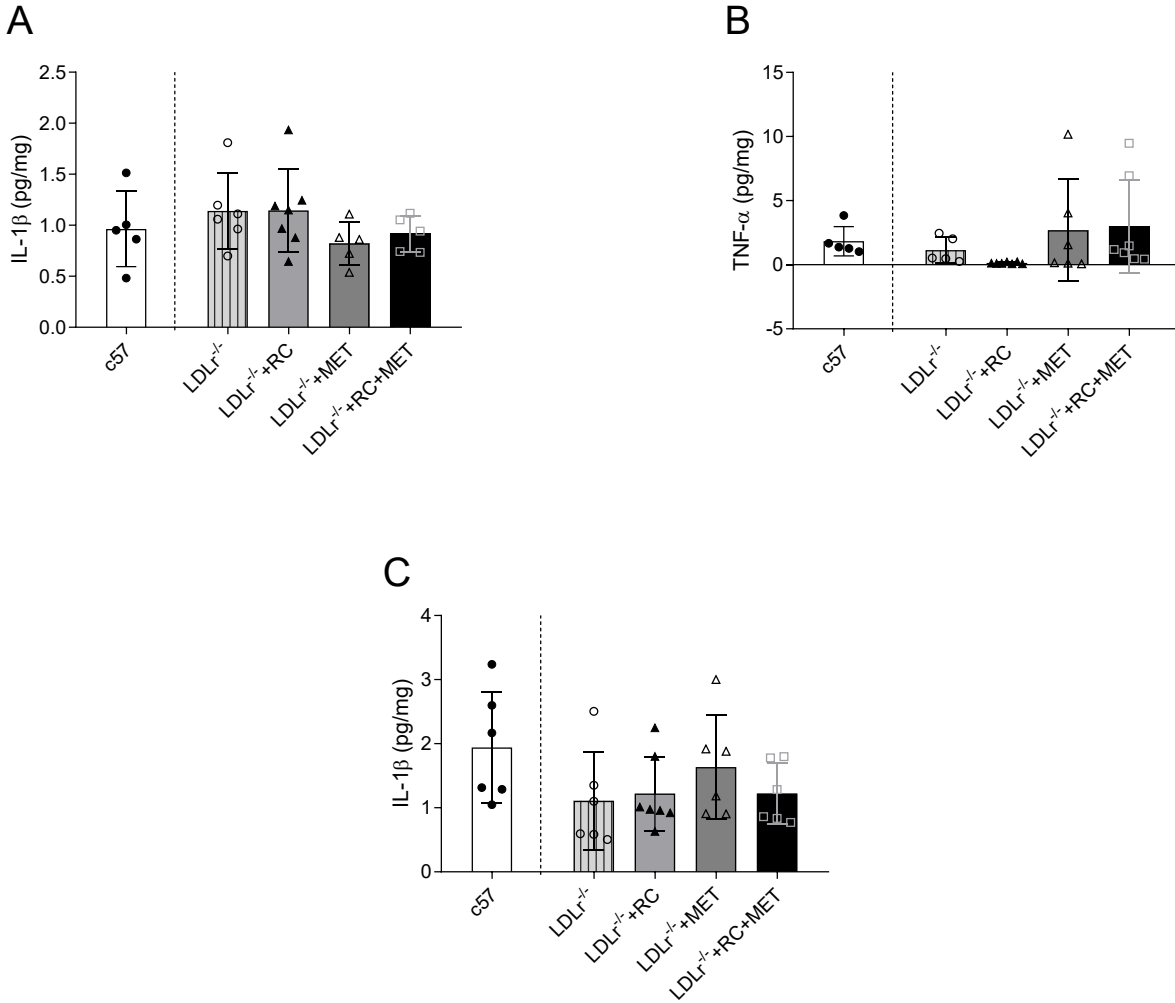


Figura 33: Níveis de TNF- $\alpha$  e IL 1- $\beta$  no hipocampo e IL 1- $\beta$  no córtex pré-frontal de camundongos submetidos a restrição calórica e/ou tratamento com metformina.

A) IL 1- $\beta$  no hipocampo; B) TNF- $\alpha$  no hipocampo; C) IL 1- $\beta$  no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média; C57 (n=10), LDLr<sup>-/-</sup> (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +MET (n=8), LDLr<sup>-/-</sup> +RC+MET (n=9).

## 6. DISCUSSÃO

O consumo de dietas com alto teor de gorduras tem sido associado a alterações periféricas como o desenvolvimento de obesidade, alterações metabólicas e cardiovasculares (Lovejoy, 2002) e alterações no sistema nervoso central como prejuízos em funções cognitivas e emocionais (Cordner, 2015; Abbott, 2019). Os distúrbios metabólicos manifestados em humanos após consumo crônico de HFD são, de modo semelhante, observados também em camundongos (Woods et al., 2003), sendo um modelo experimental apropriado para o estudo da obesidade (Hariri e Thibault, 2010). Animais que receberam HFD podem apresentar diminuição na sensibilidade à insulina, aumento da concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos e da massa corporal (Buettner et al., 2007), aumento na massa de tecido adiposo visceral e alterações que resultam em aumento de secreção de adipocitocinas (Xu, et al., 2003).

Nesse contexto a RC pode ser uma estratégia dietética útil, uma vez os estudos evidenciam que os benefícios da RC incluem redução da massa corporal e de tecido adiposo visceral, temperatura corporal e taxa metabólica reduzidas, aumento da sensibilidade à insulina e redução de espécies reativas de oxigênio (ERO). No SNC, a RC pode resultar em atenuação da neuroinflamação no hipotálamo e no hipocampo, redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em contexto obesogênico no encéfalo e no plasma, maior expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e preservação e atenuação de prejuízo da memória espacial (Vasconcelos et al., 2014; Pani, 2015; Rojic-Becker et al., 2019; Weiss e Fontana 2011). Assim, o presente estudo se concentrou em investigar os efeitos da RC nos desfechos metabólicos, comportamentais e neuroquímicos no contexto de disfunção metabólica induzida por consumo crônico de dieta hiperlipídica (HFD) em camundongos da linhagem C57Bl/6 e em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, em camundongos nocautes para receptor de LDL (LDL<sup>r-/-</sup>).

Nosso estudo demonstrou que o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica alterou parâmetros metabólicos como aumento da glicemia de jejum, colesterol plasmático e diminuição da concentração séricas de TGP. No fígado, a HFD elevou o colesterol e triglicerídeo e reduziu citocinas inflamatórias. No comportamento, a dieta prejudicou a memória espacial de curto prazo. O impacto da RC nos desfechos metabólicos incluiu diminuição da massa corporal e gordura visceral, glicemia de jejum, melhorou a tolerância à glicose, elevou a concentração sérica de

triglicerídeo e concentração de colesterol e triglicerídeo hepático. Nos parâmetros comportamentais, a RC não foi suficiente para reverter o prejuízo na memória espacial de curto prazo causado pela HFD. Nossos dados também mostram que, em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, a RC diminuiu a massa corporal, gordura visceral, mas não foi capaz de atenuar os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos, bem como não reverteu prejuízo na memória espacial de curto prazo prejudicado pela condição genética dos animais. A seguir, abordaremos separadamente a discussão dos resultados obtidos no protocolo experimental 1 e, em seguida, procederemos à análise do segundo protocolo.

#### 6.1. Efeitos da restrição calórica nas alterações metabólicas e comportamentais induzidas por consumo crônico de HFD.

Não observamos aumento de massa corporal e gordura visceral em camundongos, machos e fêmeas, tratados com HFD quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão. Diferentemente dos dados que encontramos, Guerra-Cantera e colaboradores (2021), em seu experimento com camundongos da linhagem C57Bl/6, machos e fêmeas, de seis meses de idade no início de um protocolo com duração 12 semanas, observaram que no começo do estudo os machos tinham massa corporal superior as fêmeas e isso se manteve ao longo do experimento. Além disso, mostraram que machos tratados com HFD (62% de gordura) apresentavam aumento da massa corporal depois de uma semana quando comparado ao grupo controle e em contrapartida, as fêmeas tiveram aumento do peso significativo apenas após 4 semanas de intervenção. Por outro lado, Elzinga e colaboradores (2021) realizaram seu estudo com camundongos da linhagem C57Bl/6 machos e fêmeas, com 5 semanas de idade, expostos à HFD (60% de gordura) até completarem 36 semanas de idade. O experimento mostrou que os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram aumento da massa corporal em relação ao grupo que recebia dieta padrão apenas após 16 semanas de intervenção. Além disso, houve também aumento da massa de tecido adiposo e prejuízo na sensibilidade à insulina nos machos tratados com HFD, porém as fêmeas tiveram um retardo no aparecimento das disfunções metabólicas, se mantendo saudáveis por mais tempo quando comparadas aos camundongos machos.

Camundongos da linhagem C57Bl/6 são comumente usados como modelo experimental para obesidade induzida por dieta (DIO do inglês *diet induced obesity*) (Fisher-Wellman et al., 2016), porém o aparecimento dos prejuízos decorrentes do consumo de HFD são influenciados por favores

como linhagem, sexo, microbiota intestinal, genética, condições ambientais, idade de início de exposição à dieta e composição da dieta (Preguiça et al., 2020). O estudo de Siersbæk e colaboradores analisou diferentes cepas de C57Bl/6, provenientes de três fornecedores distintos, a C57Bl/6JBomTac (da Taconic Bioscience), C57Bl/6J (distribuído pela SCANBUR e criado sob licença Charles Rivers) e C57Bl/6JRj (de Janvier). Cada cepa foi dividida em três grupos, que receberam dietas diferentes, sendo elas, dieta padrão de roedores, dieta hiperlipídica (60% de gordura; HFD) e dieta ocidental, rica em gordura (42% de gordura; WD) e suplementada com frutose na água de beber. Os resultados desse estudo mostraram que há diferença na resposta das cepas às dietas, por exemplo, a cepa C57Bl/6JBomTac teve maior ganho de massa corporal em comparação com as outras duas quando alimentada com dieta padrão para roedores. Os grupos alimentados com HFD ganharam uma quantidade de massa corporal semelhante, entretanto o percentual de gordura foi menor na cepa C57Bl/6JBomTac, em comparação com as demais. Em contraste com os grupos tratados com HFD, os grupos que receberam WD responderam de forma diferente em termos de ganho de massa corporal, sendo o C57Bl/6J mais propenso às alterações induzidas por essa modalidade de dieta. A cepa C57Bl/6JRj foi mais resistente às alterações induzidas por dieta e apresentou perfil metabólico mais saudável em comparação com C57Bl/6JBomTac e C57Bl/6J (Siersbæk et al., 2020).

Ainda, outro fator que pode ter influenciado a ausência de ganho de massa corporal e gordura visceral em animais submetidos a HFD é a temperatura ambiente que os animais foram mantidos. Isso porque o estresse pelo frio a que os roedores são comumente submetidos afeta sua fisiologia e pode comprometer a capacidade de modelar algumas doenças humanas, como a obesidade e doenças relacionadas (Tian et al., 2016). A maioria dos estudos é conduzida a uma temperatura ambiente de 22–24°C, que está abaixo da zona termoneutra para camundongos e ratos (29–31°C) (Ginting et al., 2023). O alojamento de roedores abaixo de sua zona termoneutra resulta na ativação da termogênese para manter sua temperatura central. Na verdade, a 22°C, os roedores gastam duas vezes mais energia e consomem mais alimentos do que aqueles a temperaturas ambientes de 30°C (Preguiça et al., 2020). Assim, o constante estresse térmico induzido pelas condições de alojamento dos animais pode afetar os resultados de estudos metabólicos. Por exemplo, um estudo com camundongos C57Bl/6 mostrou que o alojamento em 30°C combinado com HFD acelerou o ganho de massa corporal em comparação como camundongos alimentados com HFD alojados em ambiente com temperatura de 22°C. Os pesquisadores verificaram que o aumento da massa corporal no grupo



mantido em ambiente termoneutro ocorreu apesar da menor ingestão de alimentos no grupo e que provavelmente aconteça devido a menor gasto energético em tais condições (Giles et al., 2017). Sabe-se a taxa metabólica de camundongos alojados em condições termoneutras é menor em comparação com camundongos alojados em ambiente com temperatura abaixo da zona termoneutra (Ginting et al., 2023).

Observamos que os camundongos machos submetidos à RC de 30% tratados com dieta padrão ou hiperlipídica tiveram uma diminuição da massa corporal e gordura visceral e o mesmo achado não foi observado em fêmeas. Teng e colaboradores (2019) mostraram que camundongos da linhagem C57, machos, alimentados com dieta padrão para roedores e submetidos a uma restrição alimentar de 40%, por um período de 8 semanas tiveram diminuição da massa corporal em relação ao grupo com a mesma dieta *ad libitum*. Semelhantemente, Gao e colaboradores (2015) mostraram que tanto camundongos machos tratados com dieta padrão quanto com HFD (60% de gordura) tiveram diminuição da massa corporal quando submetidos a RC de 40%. Ainda, um ensaio clínico de fase 2, randomizado, controlado e multicêntrico, denominado CALERIE, foi conduzido com 218 participantes. As características da amostra do estudo eram homens e mulheres, com idade entre 21-50 anos, saudáveis e não obesos e designados aleatoriamente para os grupos RC de 25% ou controle *ad libitum*. Os participantes foram mantidos nas intervenções por 2 anos e os pesquisadores observaram redução sustentada da massa corporal de 7,5kg no grupo RC versus um aumento de 0,1 kg no grupo controle, porém a perda de massa corporal não diferiu pelo sexo (Kraus et al., 2019). Entretanto, Chaix e colaboradores (2021) mostraram que alguns benefícios da alimentação restrita eram dependentes do sexo. Os pesquisadores submeteram camundongos, machos e fêmeas, a dieta ocidental (45% de gordura, 17% de sacarose) por 12 semanas e observaram que uma alimentação restrita pelo tempo, trouxe benefícios na massa corporal apenas para os machos. A maior parte das pesquisas pré-clínicas sobre o metabolismo são feitas em camundongos machos. Isto se deve em parte a observações de que camundongos fêmeas da cepa C57BL/6, alimentadas com HFD, são menos propensos à obesidade induzida por dieta e doenças metabólicas associadas do que os camundongos machos. Os camundongos fêmeas são mais magros, não desenvolvem hiperinsulinemia e apresentam menos inflamação do tecido adiposo (Grove et al., 2010; Pettersson et al., 2012) do que os camundongos machos. Experimentos de depleção de estrogênio e reposição de estrogênio apoiam fortemente a ideia de que a sinalização de estrogênio está subjacente ao

dimorfismo sexual nas respostas metabólicas e inflamatórias entre homens e mulheres (Chaix et al., 2021).

Não identificamos alteração na temperatura corporal de camundongos alimentados com HFD e bem como nos grupos submetidos à RC. Apesar disso, a literatura mostra que animais endotérmicos, isso é, aqueles que podem manter sua temperatura corporal quase constante, equilibrando produção e dissipação de calor, como humanos, primatas não humanos e roedores tem a capacidade de reduzir sua temperatura corporal em resposta à RC (Guijas et al., 2020). Esta resposta fisiológica é considerada parte de um mecanismo adaptativo que pode ter evoluído para conservar energia quando a disponibilidade de nutrientes é limitada, e é um exemplo da integração da homeostase dos nutrientes e da temperatura. Os mecanismos que o regulam não são totalmente compreendidos (Cintron-Colon et al., 2017; Cintron-Colon et al., 2019). Para avaliar a temperatura corporal, utilizamos um termômetro infravermelho de superfície, considerado um método adequado para determinar a temperatura quando comparado a formas implantáveis de verificação. O estudo de Mei e colaboradores (2018), comparou dois métodos para medição da temperatura corporal em camundongos, um transponder de temperatura implantado e termômetro infravermelho de superfície, em condições de normotermia e hipotermia. Os pesquisadores observaram que houve concordância entre a temperatura central e superficial determinada pelos dois métodos, na normotermia e hipotermia. Porém o termômetro de superfície parecia ser menos sensível em detectar pequenas variações da temperatura corporal quando comparado ao método implantado e esse fato poderia explicar o resultado entrado no nosso estudo.

Os machos que receberam HFD apresentaram aumento da glicemia de jejum quando comparados ao grupo controle, porém a dieta não resultou em alteração na glicemia das fêmeas. O estudo de Moreno-Fernandéz e colaboradores (2018) mostrou que tanto dietas com alto teor de gordura (22,5% de gordura), quanto alto teor de gordura/alto teor de frutose (25% de frutose) ou alto teor de gordura/alto teor de glicose (25% de glicose), fornecidas ao longo de 20 semanas, são capazes de elevar a glicemia de jejum de roedores. Já o estudo de Peng e colaboradores (2020), com camundongos machos e fêmeas da linhagem C57, alimentados com HFD (45% gordura) por 12 semanas, observou que o camundongos machos tiveram ganho de massa corporal, resistência à insulina, glicemia de jejum quando comparado ao controle. Entretanto, as fêmeas se mostraram resistentes as alterações induzidas pela dieta, de modo que não observaram diferença na glicemia de

jejum entre o grupo controle e grupo HFD, também não foi encontrado resistência à insulina nem alteração nos níveis séricos de insulina.

A RC reverteu o aumento da glicemia de jejum causado pela HFD nos camundongos machos. E apesar da HFD não ter provocado alteração na glicemia de jejum das fêmeas, a RC resultou em diminuição da glicemia também nos camundongos fêmeas. O estudo de Azemi e colaboradores (2022) mostrou que a associação de HFD (39% gordura) e restrição alimentar por 6 semanas, foi capaz de reverter o ganho de massa corporal causado pela dieta, porém a dieta e a restrição não provocaram alterações na glicemia de jejum nem nos níveis séricos de insulina de ratos Sprague Dawley machos. Já o estudo de Baumeier e colaboradores (2015) buscou verificar se a RC e o jejum intermitente poderiam melhorar a sensibilidade à insulina e o desenvolvimento de DM2. Para isso, utilizaram camundongos machos, alimentados com HFD (33% de gordura), que fossem obesos e suscetíveis ao diabetes. Nos camundongos alimentados *ad libitum*, a prevalência de diabetes foi de 43%, enquanto as duas estratégias dietéticas, RC e jejum intermitente, foram capazes de proteger completamente os animais contra hiperglicemia e melhorou a sensibilidade à insulina. Gao e colaboradores (2015) mostraram que animais tratados com HFD que tiveram a dieta substituída por dieta padrão associada a RC tiveram atenuação do ganho de massa corporal, restauração da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, secreção de insulina e do conteúdo plasmático de insulina. Os pesquisadores relacionaram tais eventos biológicos ao processo de autofagia que estava ativo nas células  $\beta$  dos camundongos submetidos a RC, podendo contribuir para a restauração das funções pancreáticas.

Estudos clínicos também mostram efeitos da RC nos parâmetros glicêmicos, como é o caso do trabalho de Peeke e colaboradores (2021). O estudo foi um ensaio clínico randomizado e controlado, realizado com 60 indivíduos, homens e mulheres, obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) e submetidos a restrição alimentar por 8 semanas. Os pesquisadores observaram que os participantes tiveram diminuição progressiva da massa corporal e glicemia de jejum. Ainda, o trabalho de Wilkinson e colaboradores (2020) mostrou que uma restrição alimentar pelo tempo de 10h/dia era benéfica para pacientes com síndrome metabólica, resultando em reduções na pressão arterial, colesterol total, LDL e entre os participantes com glicemia de jejum e/ou hemoglobina glicada elevadas, observaram melhora desses parâmetros.

Não observamos prejuízo na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina, demonstrados nos resultados dos testes ipGTT e ipITT respectivamente, nos grupos que receberam HFD, tanto em camundongos machos e fêmeas. Zemdegs e colaboradores (2016) mostraram que camundongos C57 tratados com HFD (45% de gordura) por 12 ou 16 semanas tiveram aumento da glicemia, da insulina plasmática e prejuízo na tolerância à glicose identificada no GTT. Outro estudo mostrou que camundongos C57Bl/6 tratados com HFD por 12 semanas tiveram alterações metabólicas como ganho de massa corporal, aumento do tecido adiposo, elevação da glicemia de jejum, prejuízo na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Ren et al., 2022). Semelhantemente, o estudo de Yan e colaboradores (2021) mostrou que camundongos C57 alimentados com HFD (60% gordura) por 16 semanas apresentaram aumento da glicemia de jejum, intolerância à glicose e prejuízo na sensibilidade a insulina no tempo 0 e 30 min do ipITT.

A RC foi capaz de melhorar a tolerância à glicose nos grupos submetidos a essa intervenção, tanto em machos quanto em fêmeas, como mostrado no resultado do ipGTT. Por outro lado, nossos achados no ipITT parecem contraditórios aos encontrados no ipGTT. Enquanto no ipGTT há uma melhora na tolerância à glicose nos grupos submetidos à RC, no ipITT, os mesmos grupos se apresentam como resistentes à insulina.

Para manutenção da homeostase, há o monitoramento de certas funções-chaves, como pressão arterial e glicemia, que são denominadas na fisiologia de variáveis reguladas. Essas variáveis são mantidas dentro de um intervalo de normalidade aceitável por mecanismos de controle fisiológico, que são ativados se a variável regulada se distanciar do seu ponto de ajuste (Silverthorn, 2015). Os principais hormônios que atuam na manutenção da concentração de glicose plasmática são a insulina e o glucagon, que possuem ações antagônicas (Chao et al., 2019). Ambos os hormônios estão presentes na corrente sanguínea ao mesmo tempo, sendo a proporção entre eles o que determinara qual ação predomina (razão insulina/glucagon). Quando os níveis de glicose se encontram elevados, o hormônio predominante é a insulina, que promove a maior entrada de glicose nas células e como resultado a concentração de glicose começa a baixar até níveis normais de jejum (Kuo et al., 2015). A secreção de insulina é reduzida em conjunto com a concentração de glicose e o glucagon lentamente começa a aumentar. O fígado é o tecido-alvo primário do glucagon, estimulando a síntese de glicose (gliconeogênese) e a degradação de glicogênio (glicogenólise), resultando em liberação de glicose na corrente sanguínea (Chao et al., 2019; Ham et al., 2022; Kuo

et al., 2015). Como a RC resultou em diminuição nos níveis de glicose no jejum e no ipGTT, acreditamos que a resposta encontrada no ipITT seja resultante de uma ação compensatória do organismo, em não permitir diminuição dos níveis glicêmicos diante do estímulo produzido pelo teste, para evitar hipoglicemia severa em animais que já tinham níveis de glicose baixos. Essa hipótese poderia ser justificada por baixos níveis de insulina sérica e/ou níveis elevados de glucagon. Dosamos os níveis plasmáticos de insulina e, embora nosso n amostral nesse teste esteja reduzido comparado ao ipITT e haja uma dispersão entre os dados, não encontramos diferença significativa entre os grupos. Outra possível justificativa para nosso resultado poderia ser a concentração de glucagon. A secreção de glucagon pelas células  $\alpha$  está principalmente associada à ocorrência de hipoglicemia, agindo como proteção contra níveis baixos de glicemia, promovendo a glicogenólise hepática e elevando a concentração de glicose no sangue (Zhang et al., 2023). O estudo de Stern e colaboradores (2019), mostrou que camundongos C57 submetidos a diferentes tempos de jejum (4h, 8h, 16h e 24h) apresentaram um aumento progressivo nos níveis de glucagon com o prolongamento do tempo em jejum. Outro trabalho mostrou que camundongos C57 submetidos a RC de 15% ao longo de toda a vida apresentaram aumento do glucagon sérico (Peters et al., 2022).

A literatura aponta a RC com estratégia útil para retardar o envelhecimento, melhorar a resistência à insulina e a minimizar disfunção das ilhotas pancreáticas (Dogan, 2017; Zhang et al., 2021). No tecido adiposo, a RC é capaz de reduzir a adiposidade, mobilizando depósitos de gordura no tecido adiposo branco ao mesmo tempo em que ativa a lipogênese, que está associada melhora da sensibilidade sistêmica à insulina e saúde metabólica melhorada (Bruss et al., 2010; Chen et al., 2008; Yu et al., 2012) e no fígado reduz o acúmulo de gordura e previne a condição de fígado gorduroso. Um dos mecanismos propostos na literatura para explicar os efeitos benéficos da RC é via sinalização AMPK/SIRT1.

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma quinase serina/treonina que atua como o principal sensor de energia celular (Chyau et al., 2020). A AMPK quando ativada estimula o metabolismo catabólico e inibe o metabolismo anabólico para restaurar a homeostase energética. Além disso, em tecidos metabolicamente sensíveis, a AMPK ativada aumenta a função da desacetilase sirtuína-1 dependente de NAD (SIRT1), um fator relacionado à longevidade que modula a deposição de gordura (Dziewulska et al., 2020; Tian et al., 2019). A RC promove a fosforilação/ativação de AMPK tanto em tecido adiposo quanto em tecido hepático no modelo de

camundongo obeso induzido por HFD (Zhang et al., 2022). No fígado, a ativação da AMPK pode reduzir o acúmulo de gordura e aumentar o gasto energético, a oxidação lipídica e a capacidade termogênica (Kim et al., 2019). Adicionalmente, a AMPK participa da gênese do tecido adiposo marrom e bege. O estudo de Zhang e colaboradores (2022) mostrou que a expressão da proteína SIRT1 estava elevada no grupo de animais submetidos à RC, em comparação com o grupo alimentado com HFD. A SIRT1 é um modulador metabólico bem caracterizado, que é ativado para melhorar a obesidade induzida por dieta (Kwak et al., 2019; Zhang et al., 2022; Lee et al., 2019). Animais nocautes para SIRT1 exibem aumento da massa gorda, tolerância à glicose diminuída e sensibilidade à insulina atenuada (Li et al., 2019). Assim, a RC pode promover a perda de peso e melhorar os índices metabólicos relacionados à obesidade melhorando ou ativando a via de sinalização AMPK/SIRT1.

No plasma, analisamos os níveis de colesterol, triglicerídeos, colinesterase, TGO/AST e TGP/ALT. Em camundongos machos, observamos aumento do colesterol plasmático e diminuição do TGP/ALT quando tratados com HFD. Nas fêmeas, não observamos diferença entre os grupos para os parâmetros analisados. De modo semelhante, Magri-Tomáz e colaboradores (2018) mostraram que ratos Wistar alimentados com HFD (35% gordura) apresentaram aumento do colesterol plasmático sem alterar os níveis de triglicerídeos no plasma. Em contrapartida, Tian e colaboradores (2023) utilizando camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, submetidos a HFD (45% gordura) por 6 semanas, identificou aumento nos níveis séricos de triglicerídeo, colesterol total, LDL e ácidos graxos livres. Ainda, Fan e colaboradores (2023), buscando verificar a diferença do impacto que uma dieta hiperlipídica (60% gordura), uma dieta enriquecida com colesterol (1% colesterol) e dieta rica em sacarose (37% de sacarose) no perfil lipídico de camundongos da linhagem C57Bl/6, mostrou que as 3 dietas analisadas resultaram em aumento plasmático de triglicerídeo e colesterol. O estudo de Yan e colaboradores (2021) mostrou que camundongos alimentados com HFD (60% gordura) por 16 semanas, tiveram aumento de TGP/ALT sérico sem alterar os níveis de TGO/AST. Por sua vez, Liang e colaboradores (2021) mostraram que camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6, quando expostas a HFD (60% gordura) por 12 semanas, não apresentavam alteração nos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeo, TGP/ALT e TGO/AST quando comparadas aos animais que receberam a dieta padrão.

A transaminase oxalacética (TGO/AST) e a transaminase pirúvica (TGP/ALT) são enzimas que, quando elevadas, podem indicar danos hepáticos. O estudo de Sheng e colaboradores (2019) submeteu camundongos C57Bl/6 a 8 semanas de HFD (40% de gordura) e verificaram que a dieta resultava em lesões no fígado, indicada pela elevação sérica de TGO e TGP, além de observarem fibrose e aumento de colesterol e triglicérido hepático, sugerindo que a longo prazo a dieta rica em gorduras pode levar ao desenvolvimento de doença hepática.

A RC aumentou o nível de triglicérido plasmático nos machos, independentemente do tipo de dieta. Nas fêmeas, a RC não resultou em diferenças entre os grupos nos parâmetros testados. Chaix e colaboradores (2021) submeteram camundongos, machos e fêmeas a dieta ocidental (45% de gordura, 17% de sacarose) por 12 semanas e não observaram diferenças entre os sexos nos níveis séricos de triglicérido. Segundo os pesquisadores, animais que receberam HFD (45% de gordura) ou dieta padrão, *ad libitum* ou em restrição apresentaram níveis de triglicérido <100 mg/dL, independentemente de sexo e idade dos camundongos. Entretanto, nesse mesmo trabalho, os níveis séricos de colesterol foram significativamente mais baixos nos machos restritos, mas não foram diferentes nas fêmeas. O estudo de Ikeda e colaboradores (2014), submeteu ratos a tempos de jejum de 6h, 9h e 13h e não observaram diferenças significativas nas concentrações de triglicérido e colesterol no soro nos diferentes tempos de jejum. Já o estudo de Geisler e colaboradores (2016), com camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, mostrou que o jejum de 4h, 8h, 12h e 16h resultou em diminuição dos níveis de triglicérido no plasma e elevação plasmática nos níveis de ácidos graxos não-esterificados. Em humanos, o estudo de Wilkinson e colaboradores (2020) mostrou que uma restrição alimentar pelo tempo de 10h/dia para pacientes com síndrome metabólica não provocava alteração nos níveis séricos de triglicérido, TGP/ALT e TGO/AST, porém reduziu o colesterol total. O estudo de Liu e colaboradores (2022), submeteu 118 indivíduos com obesidade, a RC ou alimentação com restrição de tempo por 12 meses. Os pesquisadores observaram que as duas intervenções, RC ou alimentação com restrição de tempo, foram capazes de atenuar os níveis de colesterol total e triglicérido séricos em pessoas com obesidade (Liu et al., 2022). A razão pela qual a concentração de triglicéridos não foi reduzida nos grupos submetidos a RC em nosso estudo não está totalmente clara, entretanto evidências sugerem que uma perda de peso > 5% seria necessária para melhorar as concentrações lipídicas plasmáticas e os fatores glicorreguladores, frente a exposição de estratégias dietéticas, como RC (Cai et al., 2019). Assim a perda de massa corporal observada nos nossos animais provavelmente não foi grande o suficiente para exercer efeito sobre a

dislipidemia. Ademais, os efeitos benéficos associados a RC como diminuição da massa gorda, colesterol total e triglicerídeos são mais caracterizados no cenário de sobrepeso e obesidade estabelecida (Patikorn et al., 2021).

Os machos e as fêmeas que receberam a dieta experimental apresentaram elevação do triglicerídeo hepático e apenas os machos que consumiram HFD apresentaram aumento do colesterol hepático. De forma semelhante aos nossos resultados, Tian e colaboradores (2023) observaram que camundongos alimentados com HFD (45% de gordura) por 6 semanas, apresentaram elevação do colesterol e triglicerídeo hepáticos, bem como TGP/ALT e TGO/AST, indicadores sensíveis para avaliar a função hepática (Ahmed, 2007). Magri-Tomáz e colaboradores (2018) mostraram que ratos Wistar que receberam HFD (35% de gordura) por 14 dias, tiveram um incremento do triglicerídeo no fígado, sem alteração nos níveis de colesterol hepático. Ainda, foi observado aumento da área de cobertura por lipídios e número de gotículas de gordura no fígado dos animais que receberam HFD. O estudo de Fan e colaboradores (2023) com camundongos também mostrou aumento das gotículas de lipídios nos animais tratados com HFD (60% de gordura) bem como em dieta enriquecida com colesterol (1% de colesterol). Ainda, mostraram alterações histomorfológicas no fígado, como estrutura turva e desorganizada, com desaparecimento de algumas estruturas do cordão de hepatócitos e aumento do número de vacúolos no citoplasma, sendo mais significativas no grupo HFD. Já Lian e colaboradores, estudando camundongos fêmeas, constatou que a HFD (60% de gordura) não afetou os níveis de colesterol e triglicerídeo no fígado, porém uma dieta com colesterol (40% gordura + 1,25% de colesterol) foi responsável por aumento de colesterol, triglicerídeo e peso do fígado nos animais.

A deposição irregular de lipídios como triglicerídeos e colesterol nos hepatócitos caracteriza a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD do inglês *Nonalcoholic fatty liver disease*), definida como presença de esteatose hepática em nível maior ou igual a 5% da área do fígado sem a presença de outras doenças que afetem o órgão ou o uso de álcool em quantidades consideradas prejudiciais (Lian et al., 2020). O espectro da doença varia desde acúmulo de gordura no fígado em menor grau, chamado de esteatose hepática até progressões mais graves, como esteato-hepatite não alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular. A etiologia da doença é multifatorial, e seu surgimento e progressão dependem de fatores relacionados à dieta, peso, microbiota intestinal, além da contribuição de fatores genéticos (Recena Aydos et al., 2019). Entretanto a presença da doença está



correlacionada com o excesso de massa corporal induzido por dieta hipercalórica e hiperlipídica e está presente em até 91% dos pacientes com obesidade. Isso porque o excesso de nutrientes proveniente da dieta estimula a deposição de gordura fora do tecido adiposo em locais considerados inadequados para armazenamento de gordura, especialmente o fígado (Lian et al., 2020).

O tipo de dieta adotada pode favorecer tanto a ocorrência quanto a progressão NAFLD (Dongiovanni et al., 2015; Semiane et al., 2016). Por exemplo, uma dieta rica em gordura pode induzir a esteatose hepática (Zhang et al., 2022), uma vez que, o acúmulo de gordura promove a lipólise nos adipócitos e aumenta os níveis de ácidos graxos livres, resultando em diminuição da depuração de lipídios plasmáticos e elevação da  $\beta$ -oxidação nos músculos (Ullah et al., 2019). Evidências mostram que a alimentação com HFD induz obesidade e esteatose hepática em roedores, e tais modelos tem sido utilizado para estudo da progressão clínica e investigação de terapêuticas efetivas no tratamento da doença. Yang e colaboradores mostraram em seu estudo (2022) que camundongos machos da linhagem C57Bl/6 tratados com HFD por cerca de 5 meses apresentavam achados característicos de esteatose hepática, como deposição de gotículas de gordura, inflamação lobular e lesão de hepatócitos (Yang et al., 2022).

Nas fêmeas restritas encontramos elevação dos níveis de colesterol hepático e nos machos em RC aumento dos níveis de triglicerídeo hepático. Esse resultado pode ser justificado pelo tempo que os animais permaneceram em jejum (Zhang et al., 2021). Nossos animais dos grupos RC recebiam sua porção diária de dieta no período da manhã, por volta das 8h. Observamos que comiam rapidamente toda a refeição disponibilizada e passavam o restante do dia em jejum. Geisler e colaboradores (2016) mostraram no seu estudo que tempos prolongados de jejum aumentavam níveis de triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios hepáticos. Nesse estudo os animais foram submetidos a diferentes tempos de jejum, sendo eles 4, 8, 12 e 16 h e os pesquisadores observaram, por exemplo, que quanto maior o tempo de jejum mais elevados eram os níveis de triglicerídeo hepático (Geisler et al., 2016) e o mesmo acontecia para outros parâmetros analisados como ácidos graxos não esterificados e colesterol. O fígado é o tecido central para a manutenção da homeostase metabólica à medida que o animal alterna entre os estados alimentado e em jejum. O jejum induz a produção hepática de glicose e corpos cetônicos, depleção de glicogênio e acúmulo de triacilglicerol (Kersten et al., 1999; Yoon et al., 2001; Renquist et al., 2012), sendo o acúmulo de triacilglicerol uma resposta ao aumento da lipólise do tecido adiposo (Renquist et al., 2012; Geisler et al., 2016).

Entretanto, outros estudos mostram achados divergentes, como o estudo de Baumeier e colaboradores (2015), que mostrou que camundongos submetidos a RC exibiram diminuição no tamanho de gotículas lipídicas no fígado, sem alteração nos níveis de triglicérideo, ceramidas e DAG hepático, comparado ao grupo controle.

No tecido hepático, dosamos os níveis de TNF- $\alpha$  e IL 1- $\beta$ , citocinas inflamatórias, e observamos diminuição de ambas nos camundongos machos que receberam HFD, resultado divergente de dados da literatura, que mostra um incremento da concentração de citocinas pró-inflamatórias induzido por dieta rica em gorduras (Sheng et al., 2019; Park et al., 2012; Van Der Heijden et al., 2015).

As citocinas são glicoproteínas produzidas por diversos tipos de células, principalmente os glóbulos brancos, que regulam a imunidade e a resposta à inflamação, podendo ser moduladas por dietas como HFD. Sua elevação persistente tem efeitos negativos em vários órgãos e funções corporais, como aumento do risco de diabetes, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Yu et al., 2012). Apesar do fígado exercer um importante papel no processo inflamatório induzido por dieta, outros tecidos também participam de forma expressiva, como é o caso do tecido adiposo. O tecido adiposo não é considerado um tecido apenas para armazenamento de energia. Ele produz e secreta uma variedade de sinais e fatores associados à inflamação, incluindo IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e adipocinas como adiponectina, leptina e resistina. A adiponectina é um mediador essencial na regulação da resistência à insulina e efeitos antiinflamatórios através da inibição de TNF- $\alpha$ . O estudo de Park e colaboradores (2012) observou aumento de marcadores inflamatórios no fígado e tecido adiposo de ratos Sprague-Dawley tratados com HFD (45% de gordura) por um período de 13 semanas (Park et al., 2012). Outro estudo submeteu, camundongos machos da linhagem C57Bl/6 a HFD (45% gordura) por 24, 40 e 52 semanas e avaliaram acúmulo de lipídios e inflamação desencadeados pela dieta no tecido hepático e adiposo. Os pesquisadores observaram que a inflamação no tecido adiposo se mostrava presente após 24 semanas de HFD, evidenciado por regulação positiva de genes pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a inflamação hepática não foi detectada até 40 semanas de HFD, mostrando que a inflamação no tecido adiposo é estabelecida antes da inflamação hepática (Van Der Heijden et al., 2015). Uma limitação do nosso estudo foi ter desconsiderado o tecido adiposo e o plasma na avaliação de citocinas inflamatórias e não ter

realizado avaliações ao longo do tempo, com a finalidade de acompanhar o comportamento dessa variável ao longo do protocolo experimental.

Identificamos também aumento da concentração de TNF- $\alpha$  nas fêmeas que receberam dieta padrão junto com a RC, apesar do n reduzido e da dispersão dos dados. Estudos em modelos animais mostraram que a ingestão de baixas calorias reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias (González et al., 2012). O estudo de Almeneessier e colaboradores (2019), avaliou os níveis das citocinas interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 ao longo de 24h com indivíduos que praticavam uma alimentação com restrição de tempo e não de calorias, devido a prática religiosa. Eles demonstraram uma redução significativa de citocinas em comparação com a linha de base, particularmente os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6. Acreditamos que o resultado que encontramos pode ter sido influenciado pelo horário que os animais foram alimentados. Isso porque camundongos são animais de hábitos noturnos, tendo maior nível de atividade física espontânea e busca por alimentos durante a noite. Estudos em roedores mostram que comer no horário circadiano incompatível com a espécie pode desalinhar o ritmo circadiano e aumentar a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Hatori et al., 2012; Marinac et al., 2015).

A literatura aponta a perda de peso e diminuição dos níveis de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) como prováveis mecanismos para redução dos níveis de citocinas pró inflamatórias (Almeneessier et al., 2019). Isso porque a RC provoca uma remodelação do tecido adiposo, que tem a função de armazenar energia, mas que também é um importante órgão endócrino que secreta adipocinas, sendo que seu perfil secretor se difere de acordo com o tamanho dos adipócitos. De fato, pequenos adipócitos secretam mais adiponectina, menos proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e menos TNF $\alpha$  do que grandes adipócitos, caracteristicamente observados em quadro de obesidade. A lipólise desencadeada pela RC promove uma diminuição da massa gorda, remodelação do tecido adiposo e aumenta as concentrações circulantes de adiponectina, o que previne a inflamação através da ativação das vias de sinalização da AMPK e a subsequente inibição do NF- $\kappa$ B. Além disso, vários estudos relatam que a RC diminui a produção de leptina e citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e em tecidos como fígado, cérebro e intestino no contexto de diferentes tipos de doenças (Elliott et al., 2014; Razavi et al., 2020; Kökten et al., 2021).

De modo geral, em nosso modelo experimental, uma exposição a HFD não resultou em alteração na massa corporal, gordura visceral, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e níveis

séricos de insulina, triglicerídeo, colinesterase e TGO. Porém, a HFD foi capaz de provocar incremento da glicemia de jejum, do colesterol plasmático, colesterol e triglicerídeo hepático, bem como diminuição nos níveis séricos de TGP e citocinas inflamatórias no fígado. É uma limitação do nosso estudo a falta da caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta de forma clara, porém nossos dados, tomados em conjunto, indicam efeitos brandos da dieta, que poderiam ser exacerbados após exposição mais prolongada à dieta (Rodríguez-Correa et al., 2020). Nossa intervenção com RC de 30% alterou parâmetros metabólicos, sendo capaz de provocar diminuição da massa corporal e gordura visceral, glicemia de jejum, melhorou a tolerância à glicose, elevou os níveis séricos de triglicerídeo e os níveis de colesterol e triglicerídeo hepático.

Os parâmetros comportamentais avaliados incluíram a locomoção espontânea, memória espacial de curto e longo prazo, comportamento de autocuidado, anedonia, perfil ansiogênico e estratégia comportamental frente a estresse agudo inescapável. Ao avaliarmos a locomoção espontânea e perfil ansiogênico no campo aberto, não observamos diferenças entre os grupos de fêmeas e machos que receberam a HFD em relação os grupos que se alimentaram com dieta padrão. Ainda sobre este teste, não identificamos diferenças entre os grupos de machos e fêmeas na variável tempo no centro, sendo um indicativo de ausência de alterações relacionadas a emocionalidade. Ademais, sobre a locomoção espontânea, no teste do labirinto em T, para o parâmetro de cruzamentos realizados, não observamos diferenças entre os grupos de machos e fêmeas, tanto na fase de treino quanto na fase de teste. Corroborando com nossos achados, Griffin e colaboradores (2010) mostraram que camundongos que receberam HFD (45% gordura) por 5, 11, 18 e 30 semanas não apresentaram alteração na locomoção espontânea quando comparado ao controle. Diferentemente do nosso estudo, os pesquisadores acompanharam a locomoção espontânea dos animais por 72h no campo aberto monitorado por aparelho. Ainda, Kerr e colaboradores (2021) mostraram que 12 semanas que exposição a HFD (60% gordura) não alterava a locomoção espontânea de camundongos. Porém, esses pesquisadores perceberam que 40 semanas de HFD foi capaz de reduzir a locomoção espontânea.

A locomoção espontânea, no campo aberto, foi menor nos camundongos machos do grupo RC associada a dieta padrão (SD+RC), caracterizada pela redução do número de cruzamentos (SD+RC) e no grupo HFD+RC tal parâmetro se encontrou elevado. Não foi observado diferença na locomoção espontânea entre os grupos de fêmeas. Diferentes formas de atividade física espontânea

podem contribuir para o gasto energético diário (Garland et al., 2011), e assim desempenha um papel na manutenção do equilíbrio entre a taxa de aquisição de energia e o armazenamento na forma de gordura. Em geral, atividade física espontânea elevado tem benefícios sobre a saúde e reduz o risco de obesidade e os gastos energéticos que induz sob baixa ingestão alimentar, por exemplo em situação de RC podem contribuir significativamente para os efeitos benéficos a longo prazo da RC na obesidade. No entanto, sua eficácia depende da relação entre o nível de RC e atividade física espontânea (Brzęk et al., 2016).

No teste do labirinto em T observamos um prejuízo da memória espacial de curto prazo nos grupos de camundongos machos e fêmeas alimentados com HFD. Em contrapartida, no teste da esquiwa inibitória, não observamos diferenças entre os grupos experimentais nas fases de teste 90 min e 24h após o treino, porém tanto os machos quanto as fêmeas aprenderam a tarefa, demorando mais tempo para descer ou permanecendo na plataforma até atingir o tempo máximo do teste, quando eram retirados. Estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado evidências de que a obesidade induzida por dieta, por exemplo HFD, tem potencial de prejudicar os processos de aprendizagem e memória e pode resultar em comprometimento cognitivo leve e demência (Dionysopoulou et al., 2021), apontando para uma conexão entre desregulação metabólica e declínio da função cerebral. Estudos mostram que o diabetes tipo 2, uma das possíveis consequências metabólicas do excesso de peso, é considerado um importante fator de risco para incidência e gravidade de comprometimento cognitivo (Haan, 2006; Cukierman et al., 2005) e que a glicemia aumentada se correlaciona com diminuição da capacidade cognitiva e alterações na microestrutura do hipocampo de mulheres aparentemente saudáveis (Kerti et al., 2013). O estudo de Crane e colaboradores acompanhou 2067 voluntários e mostrou que a chance de desenvolver demência ao longo do tempo era maior nos indivíduos com glicemia aumentada, independente de terem diabetes ou não (Crane et al., 2013). Além disso, o efeito da dieta parece depender de fatores como idade e tempo de exposição, além da composição da dieta (Khazen et al., 2019).

Existem vários mecanismos pelos quais dietas com alto teor de gordura podem prejudicar a cognição. Um desses mecanismos é a neuroinflamação (Lama et al., 2022). As deficiências induzidas pela dieta geralmente são acompanhadas de aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , assim como marcadores para ativação de células da glia. Outro mecanismo proposto pela literatura é a redução da neuroplasticidade (Zhuang et al., 2022). Estudos

relatam que no cenário obesogênico induzido por dieta, ocorre redução na expressão de substâncias como RNAm para sinapsina-1, proteínas presentes nos terminais pré-sinápticos e que contribuem para a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e RNAm para BDNF (Abbott et al., 2019; Zimmerman et al., 2021). Outros mecanismos biológicos também têm sido propostos para explicar o surgimento de condições neurodegenerativas induzida por HFD, como alterações na função mitocondrial (Dionysopoulou et al., 2021), dano oxidativo (Wu et al., 2004), disfunção vascular (Li et al., 2010), perda de integridade dendrítica (Stranahan et al., 2008; Morin et al., 2017), alteração da sinalização da insulina no hipocampo (Xu et al., 2018) e perda da integridade da barreira hematoencefálica (Hsu e Kanoski, 2014).

Em nosso experimento, a RC não mostrou ser um estímulo suficientemente forte para reverter o prejuízo na memória espacial de curto prazo provocado pela HFD, sendo encontrado déficit nessa habilidade nos grupos que receberam a HFD em conjunto com a RC. De acordo com Heilbronn e colaboradores (2006), a RC pode melhorar a saúde do cérebro, interferindo nas vias metabólicas e de sinalização celular fundamentais que regulam o tempo de vida (Heilbronn et al., 2006). No entanto, em relação ao efeito na função cognitiva, os estudos são menos conclusivos, pois dependendo do protocolo realizado, pode levar a efeitos opostos na cognição (De Cabo, 2019; Mattson, 2017). A cognição inclui funções intelectuais como atenção, consolidação do conhecimento, memória, compreensão da linguagem, avaliação e tomada de decisão. Os distúrbios cognitivos referem-se a um grupo de sintomas que são causados por déficits das funções acima mencionadas (Dionysopoulou et al., 2021). O mais comum e óbvio desses déficits diz respeito aos distúrbios de memória, a qual é uma das funções cognitivas mais importantes. A perda de memória e o comprometimento cognitivo são as principais características da demência (Cassilhas et al., 2016).

O estudo de revisão de Dias e colaboradores (2020) teve como objetivo apresentar os principais achados dos estudos realizados com RC, nos últimos 10 anos com o foco no efeito dessa intervenção na cognição de animais de experimentação. Foram incluídos no estudo um total de 40 artigos e englobou trabalhos com RC em diferentes fases da vida, associada a outras intervenções como exercício físico e fármacos miméticos de RC, em contexto obesogênico e de doenças neurodegenerativas, além de estudos com alguns animais selvagens. Em conjunto os dados analisados mostraram que a RC pode ser benéfica ou não para a cognição, a depender de quando é iniciada, da intensidade e duração da intervenção. Por exemplo, níveis de RC entre 20 e 40% iniciado

no primeiro mês de vida tem maior potencial de atenuar declínios cognitivos relacionados à idade em animais experimentais, seja no contexto de envelhecimento saudável ou patológico, como na doença de Alzheimer, porém a RC não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do envelhecimento na cognição quanto iniciada mais tarde. O mesmo parece ocorrer nos prejuízos cognitivos resultantes de lesões cerebrais, como traumatismo encefálico. Por fim, quando se trata da intensidade, a RC pode melhorar a cognição quando realizada de forma moderada e no início da vida, tendo efeitos deletérios para a cognição de animais de uso experimental quando feita de forma intensa e tardia (Lu et al., 2022).

Teng e colaboradores (2019) examinaram a base nutricional e regulação mecanicista da RC para melhorar a função cognitiva. Os pesquisadores descobriram que a restrição crônica e constante pode efetivamente melhorar o desempenho da memória de camundongos por meio da modulação negativa da sinalização serotoninérgica mediada por receptor 5-hidroxitriptamina 6 da serotonina (HTR6) e complexo de rapamicina 1 (mTORC1). Embora tenham observado apenas uma tendência a níveis baixos de 5-HT ou 5-HIAA em tecidos cerebrais dos animais em RC, uma relação 5-HIAA/5-HT significativamente reduzida pode indicar uma taxa de renovação de serotonina diminuída, um reflexo da atividade serotoninérgica reduzida no cérebro. Os dados também mostraram que a administração de fenfluramina aboliu o efeito benéfico da RC no desempenho da memória de camundongos. Esta hipótese foi apoiada por achados de redução da sinalização mTORC1 mediada por HTR6 no tecido hipocampal de camundongos restritos.

Para avaliar parâmetros relacionados a emocionalidade, realizamos os testes de borrifagem de sacarose e suspensão pela cauda. O teste de suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru et al. 1982, inspirado no teste de Porsolt (1981) e baseado no conceito de desespero comportamental. Este teste parte de premissa que um animal submetido a uma situação aversiva apresenta dois comportamentos alternados, agitação, caracterizado por atividade intensa para se livrar e gasto de energia e imobilidade para poupar energia. Por outro lado, o teste de borrifagem de sacarose se propõe a avaliar o comportamento de autocuidado e motivação, considerado semelhante ao comportamento de anedonia, característico de depressão (Moretti et al., 2012; Isingrini et al., 2010). Assim, mesmo que ambos os testes avaliem comportamentos similares, os métodos e parâmetros para avaliar o comportamento é característico de cada paradigma, o que pode justificar a utilização de ambos os testes, bem como diferença de resultado dentro de um mesmo protocolo experimental

(De Souza et al., 2021). Nossos resultados do teste de borrifagem de sacarose mostraram não haver diferença entre os grupos da dieta padrão e a dieta experimental na latência e tempo de autolimpeza e no teste de suspensão pela cauda, observamos aumento da latência para a imobilidade apenas nas fêmeas que receberam HFD *ad libitum*. O estudo de Sharma e Funton (2013) buscou verificar o impacto da HFD (58% de gordura) na emocionalidade e as alterações bioquímicas nos circuitos de recompensa no cenário obesogênico em camundongos da linhagem C57Bl/6. Seguindo os pesquisadores, o consumo de HFD por 12 semanas resultou em aparecimento de comportamento semelhante ao ansioso, resposta prejudicada frente a estresse agudo, aumento da resposta do eixo HPA ao estresse e foi responsável por modificações bioquímicas nos circuitos de recompensa do cérebro. Zemdegs e colaboradores relataram que camundongos C57Bl/6 alimentados com HFD (45% de gordura) por 16 semanas apresentaram funções serotoninérgicas prejudicadas. Segundo os pesquisadores, essa alteração levava a uma diminuição do parâmetro de tempo no centro no teste do campo aberto, sendo um indicativo de comportamento semelhante à ansiedade, além de comportamento anedônico, mostrado pela diminuição do tempo de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose (Zemdegs et al., 2016). Seguella e colaboradores (2021) também avaliaram emocionalidade em camundongos submetidos a HFD (72% de gordura) por 20 semanas, com os testes comportamentais do campo aberto, suspensão pela cauda e nado forçado. No estudo, camundongos do grupo HFD exibiram aumento do tempo de imobilidade nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado em comparação com os animais do grupo dieta padrão. Ainda, no grupo HFD se movimentou menos no campo aberto e, conseqüentemente, aumentaram sua imobilidade e o tempo no centro também reduziu. Os pesquisadores associaram tais alterações comportamentais a ativação glial ao longo do eixo intestino-cérebro.

No teste de borrifagem de sacarose encontramos aumento no tempo para expressar o comportamento de autocuidado nos camundongos machos com dieta restrita, associada a dieta padrão ou HFD, sendo um indicativo de prejuízo em tal comportamento. Já no teste de suspensão pela cauda, observamos aumento da latência para a imobilidade apenas nas fêmeas que receberam a HFD associada a RC. Dietas que reduzem a ingestão calórica diária podem produzir níveis elevados de corpos cetônicos, bem como resultar em uma mudança do uso de glicose como fonte de combustível para a utilização de ácidos graxos e corpos cetônicos (Johnson et al., 2007; Harvie et al., 2011). E os efeitos dos corpos cetônicos parecem ter propriedades neuroprotetoras e reduzem sintomas semelhantes à depressão em modelos de ratos e camundongos (Igwe et al., 2021). Morris



e colaboradores (2020) sugeriram que a cetose induzida ou a ingestão prolongada de corpos cetônicos pode resultar em uma redução no estresse oxidativo, biogênica celular melhorada e regulação positiva de PPARs (fatores de transcrição que regulam a expressão gênica), sirtuína-1 (SIRT-1, um regulador intracelular proteína que estimula a autofagia) e proteína quinase ativada (AMPK, uma enzima envolvida na homeostase energética através de efeitos na ativação de glicose, captação e oxidação de ácido graxo livre) e níveis cerebrais de dinucleotídeo de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ , uma coenzima envolvida em diversos processos metabólicos). A SIRT-1 modula vários fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo celular, resistência ao estresse e inflamação; também parece mediar a neuroproteção em distúrbios neurodegenerativos. Os níveis cerebrais de SIRT-1 em camundongos são aumentados pela RC e, de fato, foi proposto que a SIRT-1 é necessária para a resposta cerebral à RC (Cohen et al., 2009; Fusco e Pani, 2013).

A figura 34 mostra uma compilação dos principais resultados, em machos e fêmeas encontrados nesse bloco de experimentos. Em suma, em nosso primeiro bloco experimental não observamos efeito da HFD na massa corporal, gordura visceral, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e níveis séricos de insulina, triglicerídeo, colinesterase e TGO. Mas a exposição à dieta hiperlipídica resultou em aumento da glicemia de jejum, do colesterol plasmático, colesterol e triglicerídeo hepático, bem como diminuição nos níveis séricos de TGP e citocinas inflamatórias no fígado. Ainda nos parâmetros metabólicos, a RC promoveu diminuição da massa corporal e gordura visceral, glicemia de jejum, melhorou a tolerância à glicose, elevou os níveis séricos de triglicerídeo e os níveis de colesterol e triglicerídeo hepático. Nos parâmetros comportamentais, a HFD prejudicou a memória espacial de curto prazo, sem alterar a memória aversiva e emocionalidade e a RC de 30% por quatro semanas não foi efetiva em reverter tal prejuízo.

	Machos		Fêmeas	
<b>Dieta</b>	Massa corporal	=	Massa corporal	=
	Gordura visceral	=	Gordura visceral	=
	Glicemia de jejum	+	Glicemia de jejum	=
	Colesterol plasmático	+	Colesterol plasmático	=
	Colesterol hepático	+	Colesterol hepático	=
	Triglicerídeo hepático	+	Triglicerídeo hepático	+
	TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	-	TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	=
	Memória espacial de curto prazo	-	Memória espacial de curto prazo	-
	Comportamento de autocuidado	=	Comportamento de autocuidado	=
<b>Restrição calórica</b>	Massa corporal	-	Massa corporal	=
	Gordura visceral	-	Gordura visceral	=
	Glicemia de jejum	-	Glicemia de jejum	-
	Colesterol plasmático	=	Colesterol plasmático	=
	Colesterol hepático	=	Colesterol hepático	+
	Triglicerídeo hepático	+	Triglicerídeo hepático	=
	TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	=	TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	=
	Memória espacial de curto prazo	=	Memória espacial de curto prazo	=
	Comportamento de autocuidado	=	Comportamento de autocuidado	=

Figura 34: Síntese dos principais resultados encontrados no protocolo experimental 1.

Na figura o símbolo “=” é indicativo de sem efeito significativo; “+” denota aumento do parâmetro e “-” atenuação do parâmetro em questão.

## 6.2. Efeito da restrição calórica nas alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas em modelo experimental de hipercolesterolemia familiar.

Nesse protocolo experimental, submetemos camundongos da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> a uma intervenção dietética com RC 30%, ou metformina na água de beber e outro grupo foi exposto a uma combinação de RC 30% e metformina. Também utilizamos camundongos da linhagem C57Bl/6 como controle para os animais LDLr<sup>-/-</sup>. Observamos que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram menor massa corporal quando comparado com animais da linhagem C57Bl/6. De Oliveira e colaboradores (2020) mostraram que o genótipo não afetou a massa corporal de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Ngai e colaboradores (2010), embora não tenham encontrado diferença entre LDLr<sup>-/-</sup> e C57Bl/6 na massa e composição corporal, mostraram que animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> possuíam menor peso de gordura epididimal e inguinal quando comparados aos C57Bl/6. Semelhante ao resultado encontrado no nosso estudo, Rutkowsky e colaboradores (2018) observaram que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> possuíam menor massa corporal que os C57Bl/6. Uma explicação para tal resultado, seguindo os

pesquisadores, poderia ser o consumo calórico, uma vez que camundongos nocautes do receptor de LDL mostraram menor consumo calórico que animais selvagens de mesma idade (Rutkowsky et al., 2018).

Os grupos de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> submetidos a RC tiveram redução da massa corporal, percebida ao longo do protocolo e no  $\Delta$  da massa corporal, que considera a massa final e a inicial. Doriguello e colaboradores (2013) submeteram camundongos LDLr<sup>-/-</sup> a uma restrição alimentar de 20% por 3 meses e observaram redução no ganho de massa corporal no grupo restrição comparado ao grupo *ad libitum*. O estudo de Son e colaboradores (2021) submeteu indivíduos com hipercolesterolemia assintomática a uma intervenção com RC por 4 semanas. Foi um estudo unicêntrico, randomizado, realizado na Coreia do Sul com 92 participantes. Os pesquisadores observaram que os participantes submetidos a RC tiveram diminuição da massa corporal e IMC em comparação com controle, além de apresentarem efeitos benéficos na redução do risco de doenças cardiovasculares, com melhora do perfil lipídico, inflamação crônica, hiperglicemia e a doença hepática gordurosa.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é a principal forma genética de hipercolesterolemia, chagando a afetar 1 em cada 300 indivíduos em sua forma heterozigótica (Beheshti et al., 2020) no mundo e é causada por mutação no gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr). Essa condução de saúde prejudica a captação hepática de colesterol LDL, resultando em níveis plasmáticos elevados de LDL desde o nascimento, o que predispõe fortemente essas pessoas a doenças cardiovasculares e morte prematuras (Ademi et al., 2023). A fim de mitigar o efeito cumulativo prejudicial do colesterol LDL elevado ao longo da vida, a identificação e o tratamento precoces são de suma importância (Beheshti et al., 2020). O tratamento inclui medicamentos hipolipemiantes, particularmente estatinas, mas também intervenções não medicamentosas, como mudanças no estilo de vida (Gidding, 2019). O controle de variáveis como ingestão alimentar, consumo de álcool, tabagismo, prática de exercícios, regulação do peso e estresse psicológico tem sido enfatizada por diretrizes como prevenção e medidas complementares para tratamento de doenças cardiovasculares e essas recomendações também se aplicam aos pacientes com HF (Watts et al., 2020). A literatura aponta a restrição calórica como intervenção dietética que apresenta resultados benéficos para índice de massa corporal, massa gorda, colesterol LDL, colesterol total, triglicerídeos, glicemia plasmática em jejum, insulina em jejum, resistência à insulina e pressão

arterial (Patikorn et al., 2021; Madeo et al., 2019). Podendo assim, ser uma estratégia útil para auxiliar o tratamento da HF.

A RC resultou em diminuição da massa de gordura visceral, que foi intensificada pela associação com o fármaco metformina. Em contrapartida, a metformina, quando usada isoladamente, levou a um aumento no  $\Delta$  da massa corporal ao mesmo tempo que reduziu o peso da gordura visceral nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Embora a perda de massa corporal e gordura visceral seja frequentemente relatada como um “efeito colateral” favorável da metformina, há poucos dados que demonstrem perda de peso em pacientes não diabéticos (Malin e Kashyap, 2014). Martin-Montalvo e colaboradores (2013) tratou camundongos C57Bl/6 de 1 ano de idade com metformina (0,1%) até o fim de suas vidas. Observaram que entre 18-22 meses de vida não havia diferença na massa corporal entre os grupos que receberam a metformina comparado ao controle. Porém, quando os animais atingiram a idade de cerca de 30 meses de vida, o grupo metformina apresentava menor massa corporal que seu controle de mesma idade. Os pesquisadores observaram que a composição corporal durante a vida dos animais não revelou diferenças significativas na porcentagem de massa gorda e massa magra ou na relação massa magra/gordura e que embora os camundongos C57Bl/6 tratados com metformina fossem mais leves, este grupo consumia mais calorias do que seu controle, indicando uma mudança no metabolismo energético (Martin-Montalvo, et al., 2013). Ji e colaboradores (2019) mostraram que o tratamento de camundongos da linhagem C57Bl/6 com metformina, via gavagem foi capaz de aliviar o ganho de massa corporal e aumento do tamanho de adipócitos induzidos por dieta hiperlipídica.

A metformina é uma biguanida utilizada desde a década de 1960, originalmente descrita como um medicamento hipoglicemiante e antimalárico. Atualmente é prescrito no tratamento do diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica (Madeo et al., 2019; Martin-Montalvo, et al., 2013; He et al., 2009) e é considerado um fármaco mimético da RC (Willcox and Willcox, 2014; Campbell et al., 2017). Em modelos animais, a administração de metformina prolonga a vida útil (Martin-Montalvo, et al., 2013) e em humanos parece ser benéfica contra o surgimento de doenças relacionadas à idade, incluindo alguns tipos de cânceres, síndrome metabólica, distúrbios cardiovasculares e cognitivos (Foretz et al., 2014, Greenhill, 2015). Uma meta-análise, publicada em 2017, mostrou que diabéticos que tomaram metformina tiveram mortalidade por todas as causas significativamente menor do que indivíduos não diabéticos e diabéticos que não receberam

tratamento com metformina. Os usuários de metformina também reduziram a incidência de câncer em comparação com não diabéticos e doenças cardiovasculares com comparação com diabéticos que não faziam uso de metformina (Campbell et al., 2017). O potencial benefício da metformina em prolongar a vida e a expectativa de saúde, aliado pequenos efeitos colaterais impulsionou o início de vários ensaios clínicos. A metformina recapitula importantes efeitos metabólicos da RC e estimula a autofagia protetora, por exemplo, em modelos de ratos com obesidade e disfunção cardíaca (Madeo et al., 2019; Li et al., 2017, Xie et al., 2011).

O mecanismo de ação da metformina envolve, pelo menos em parte, a ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), uma enzima envolvida no equilíbrio energético celular e de todo o organismo, bem como no metabolismo da glicose e da gordura (Ma et al., 2022; Martin-Montalvo, et al., 2013; Larsson et al., 2012). Embora existam evidências de que a metformina também pode atuar através de mecanismos independentes da AMPK. A ativação da AMPK é um processo desencadeado pelo aumento da relação AMP/ATP (Ben Shara et al., 2011; Pollak, 2012). A metformina pode comprometer a produção de ATP nas mitocôndrias levando a um aumento da relação AMP/ATP. Como consequência do esgotamento energético, a glicólise é induzida para manter o metabolismo celular (Martin-Montalvo, et al., 2013).

A metformina pode resultar em perda de massa corporal e gordura visceral por meio da redução do consumo energético e modulação de sinalização no tecido adiposo e SNC para regular a ingestão alimentar (Malin e Kashyap, 2014). Isso porque tal fármaco é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e à leptina. A leptina é um importante hormônio derivado de adipócitos que regula o equilíbrio energético. Esse hormônio se liga a receptores do hipotálamo que sinalizam o aumento do gasto energético e contribui com a redução da ingestão alimentar (Lim et al., 2010). A insulina atua como sinalizador do estado energético que regula a adiposidade. No hipotálamo, se liga aos seus receptores e suprime a AMPK, mimetizando assim muitos dos efeitos anorexígenos da leptina. Assim, a redução da resistência à insulina pode contribuir para melhorar a regulação do apetite, não só melhorando as alterações específicas da glicose, mas também melhorando as vias de sinalização anoréxica no hipotálamo para reduzir os desejos alimentares (Malin e Kashyap, 2014; Shurrab e Arafa, 2020).

Monitorando a ingestão hídrica diária dos animais, observamos que os LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram redução no consumo hídrico, comparado ao controle C57Bl/6, porém esse evento foi revertido pela

associação entre RC e metformina. No plasma, realizamos a dosagem de colesterol, triglicerídeo, concentração de glicose e proteínas totais. Como esperado, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram níveis de colesterol plasmático elevado comparado ao controle. Não houve diferença entre LDLr<sup>-/-</sup> e C57Bl/6 para os demais parâmetros analisados. Vários estudos já têm demonstrado que o aumento de colesterol plasmático encontrado em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> pode chegar a ser de duas a três vezes maior comparado com animais selvagens da linhagem C57Bl/6, quando mantidos em uma dieta padrão para roedores (De Oliveira et al., 2011; Thirumangalakudi et al., 2008; De Oliveira et al., 2013). Em outros cenários, como quando são submetidos a uma dieta rica em colesterol, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> podem apresentar aumento de cerca de dez vezes nos níveis de colesterol total em comparação com camundongo C57Bl/6 (De Oliveira et al., 2020).

A RC aumentou os níveis de colesterol plasmático e a metformina foi responsável por um incremento na concentração de triglicerídeo plasmático. Semelhante ao protocolo 1, os animais do grupo RC nesse protocolo recebiam sua porção diária de alimentação pela manhã e após comerem, ficavam em jejum até o dia seguinte. Acreditamos que o tempo prolongado de jejum possa ter influenciado no perfil lipídico encontrado nesses grupos (Geisler et al., 2016; Cai et al., 2019). Uma limitação desse estudo é a dificuldade em estabelecer quais seriam efetivamente os efeitos da RC ou do jejum, uma vez que os animais acabaram sendo submetidos as duas intervenções. Dados de uma meta-análise, mostraram que a metformina, em humanos com fígado gorduroso era capaz de atenuar níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeo (Huang et al., 2022).

Ao avaliarmos a locomoção espontânea no campo aberto, observamos aumento da locomoção espontânea nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Reforçando tal observação na locomoção espontânea, no teste do labirinto em T, para o parâmetro de cruzamentos, identificamos também maior número de cruzamento no grupo LDLr<sup>-/-</sup>. Entretanto, nesse último teste, a RC reverteu o aumento da locomoção espontânea e a metformina não provocou alteração na variável. Semelhante ao resultado descrito, Rutkowsky e colaboradores (2018) mostraram que no labirinto em Y, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> foram mais ativos do que C57Bl/6, com um número aumentado de entradas totais no braço, distância total percorrida e diminuição da % do tempo de descanso. Semelhantemente, De Oliveira e colaboradores (2020) mostrou que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentavam um número maior de cruzamentos no campo aberto do que camundongos controle e que camundongos hipercolesterolêmicos alimentados com dieta rica em colesterol, tiveram aumento

ainda maior do número total de cruzamentos. Além disso, observaram que os níveis de colesterol plasmático se correlacionavam positivamente com o número total de cruzamentos.

Ainda sobre o teste do campo aberto, que também avalia perfil ansiogênico, inferido pelo tempo no centro do aparato, nosso resultado mostra que os animais do grupo LDLr<sup>-/-</sup> passaram menos tempo no centro do aparato, sendo um indicativo de comportamento semelhante ao ansioso. O estudo de Engel e colaboradores (2016) teve como objetivo avaliar parâmetros comportamentais e neuroquímicos relacionados à emocionalidade em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> e assim, demonstrar uma indicação pré-clínica da associação entre hipercolesterolemia e depressão. No teste de preferência por sacarose, os pesquisadores observaram comportamento anedônico expresso pela diminuição do consumo de sacarose nos animais LDLr<sup>-/-</sup> em comparação com o controle. Para estimar os comportamentos de autocuidado e motivacional, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> foram comparados com C57Bl/6 no teste de borrifagem de sacarose e foi identificado diminuição no tempo de autolimpeza no grupo LDLr<sup>-/-</sup>. Ainda, no teste de suspensão pela cauda, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram aumento do tempo de imobilidade em comparação com o grupo selvagem, sendo um indicativo de prejuízo na estratégia de enfrentamento frente a estresse agudo inescapável. Os pesquisadores relacionaram os prejuízos observados ao metabolismo monoaminérgico prejudicado em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, sendo possível também o envolvimento do estresse oxidativo (Engel et al., 2016). Corroborando com tais dados, o estudo de Zou e colaboradores (2023) avaliou comportamentos relacionados a emocionalidade em camundongos com dislipidemia, decorrente do consumo de uma dieta enriquecida com colesterol. O grupo de animais dislipidêmicos apresentou menor consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose, aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e diminuição do tempo no centro do aparato no teste do campo aberto. Assim o estudo mostrou que camundongos alimentados com dieta rica em colesterol apresentavam comportamento semelhante ao da ansiedade, anedonia e prejuízo na estratégia de enfrentamento frente a estresse agudo inescapável, acompanhados de distúrbio do metabolismo lipídico. Os pesquisadores associaram o prejuízo comportamental ao aumento da resposta inflamatória na periferia e no SNC (Zou et al., 2023).

Avaliamos a memória de reconhecimento, memória espacial de curto prazo e memória aversiva. No teste de reconhecimento de objetos, constatamos que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram prejuízo na memória de reconhecimento, que não foi revertido pela nossa intervenção. Já a memória

espacial de curto prazo, testada no labirinto em T, não estava prejudicada nos nossos grupos experimentais de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Ainda, nesses mesmos animais, encontramos déficit na memória aversiva testada 90 min após o treino, mas não após 24h. Além da alta associação entre hipercolesterolemia e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, os estudos de Zambón e colaboradores (2010) e Ariza e colaboradores (2016) relataram maior incidência de comprometimento cognitivo em indivíduos com hipercolesterolemia. Camundongos nocautes para o receptor de LDL apresentam déficits de aprendizado e memória. Mulder e colaboradores (2007) mostraram que aos 11 meses de idade, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentavam comprometimento na memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris e prejuízo na memória de trabalho verificada pela análise da alternância espontânea do labirinto em T. De Oliveira e colaboradores (2011; 2020) também mostraram declínio cognitivo nessa linhagem, com prejuízo na memória espacial e de trabalho observados aos 3 meses de idade. Rutkowsky e colaboradores (2018) também mostraram camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram prejuízos em processos cognitivos, avaliados no labirinto em Y e no labirinto aquático. Os prejuízos comportamentais observados em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> têm sido associados a disfunção sináptica e neuronal (De Bem et al., 2021), prejuízo na neurogênese (Engel et al., 2019) e perda da integridade da barreira hematoencefálica (De Oliveira et al., 2020).

Apesar das alterações de memória encontrada nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, não identificamos alteração nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais. Don-Doncow e colaboradores (2021) mostraram que em camundongos cronicamente hipercolesterolêmicos jovens e velhos, o sistema imunológico estava mais ativo, evidenciado pelo número de monócitos circulantes e níveis plasmáticos de interleucinas, comparado a camundongos selvagens. Os pesquisadores observaram ainda que a migração e infiltração de monócitos e macrófagos foi mais pronunciada no cérebro dos animais hipercolesterolêmicos idosos em comparação com camundongos controle jovens (Don-Doncow et al., 2021). O hipocampo de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com uma dieta rica em colesterol mostrou uma resposta neuroinflamatória pronunciada e estresse oxidativo associado a prejuízos na integridade da barreira hematoencefálica (Rutkowsky et al., 2018; Moreira et al., 2014; Thirumangalakudi et al., 2008; Witte et al., 2010). Isso parece afetar a proliferação de progenitores do hipocampo. Além disso, o processo neuroinflamatório aumenta a produção de ERO, o que é prejudicial aos neurônios. As mitocôndrias são sensíveis a danos oxidativos e a inflamação pode contribuir ainda mais para a



disfunção mitocondrial (Hong et al., 2022). Tanto inflamação quanto estresse oxidativo são processos biológicos intimamente ligados ao desenvolvimento de neuropatologias, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e depressão (Rodrigues et al., 2021; De Bem et al., 2021). Nossos resultados mostraram que, em camundongos nocautes para receptor de LDL, a RC foi capaz de reduzir a massa corporal e gordura visceral, porém quando associada a metformina, a redução da gordura visceral foi mais pronunciada. As intervenções feitas com RC e metformina nesse protocolo experimental não foram efetivas em melhorar as concentrações séricas de colesterol, triglicérido e glicose, e não reverteu o prejuízo na memória causado pela exposição ao longo da vida a altos níveis de colesterol plasmáticos.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, mostraram em medidas gerais que, no contexto de disfunção metabólica induzida pelo consumo crônico de dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem C57Bl/6 e em um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, em camundongos nocautes para receptor de LDL, os efeitos da RC foram mais evidentes nos desfechos metabólicos do que comportamentais. Este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas ao interpretar os resultados. Primeiramente, no protocolo de disfunção metabólica induzida por dieta, observamos efeitos brandos da dieta em detrimento à caracterização de modelo claro de obesidade induzida por dieta. Além disso, os animais submetidos a intervenção com RC passaram longos períodos de jejum, algo que também pode ter influenciado nos dados encontrados e dificulta a identificação dos efeitos da RC ou do jejum.

- A exposição crônica de camundongos da linhagem C57Bl/6 machos e fêmeas, a HFD não resultou em alteração na massa corporal, gordura visceral, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e níveis séricos de insulina, triglicérido, colinesterase e TGO. Porém, nos camundongos machos, a HFD resultou em aumento da glicemia de jejum, do colesterol plasmático, colesterol e triglicérido hepático, bem como diminuição nos níveis séricos de TGP e citocinas inflamatórias no fígado;
- Em camundongos machos da linhagem C57Bl/6, a intervenção com RC de 30% alterou parâmetros metabólicos, sendo capaz de provocar diminuição da massa corporal e gordura visceral, glicemia de jejum, melhorou a tolerância à glicose e elevou a concentração hepática de triglicérido;
- Em camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6, a intervenção com RC de 30% teve efeitos metabólicos mais brandos comparados aos machos, porém foi suficiente para provocar diminuição da glicemia de jejum, melhorou a tolerância à glicose e elevou a concentração hepática de colesterol;
- A HFD prejudicou a memória espacial de curto prazo, mas não afetou a memória aversiva e emocionalidade e a RC não foi suficiente para reverter tal comprometimento em camundongos da linhagem C57Bl/6 machos e fêmeas;

- Em modelo nocaute para o receptor de LDL foi observado menor massa corporal e gordura visceral em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> e incremento nos níveis plasmáticos de colesterol quando comparado ao controle selvagem;
- Nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, a RC de 30% reduziu a massa corporal, gordura visceral e aumentou os níveis de colesterol plasmático;
- A associação entre RC e metformina foi responsável por redução ainda mais acentuada da gordura visceral e elevou o consumo hídrico em LDLr<sup>-/-</sup>;
- Os dados comportamentais mostraram que LDLr<sup>-/-</sup> possuem aumento da locomoção espontânea, prejuízo na memória de reconhecimento e na memória aversiva testada 90 min após o treino;
- A RC e a metformina não reverteram todas as alterações comportamentais encontradas em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, a associação entre as intervenções reverteu apenas o prejuízo na memória aversiva testada 90 min após o treino.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Kirsten N. et al. The effect of high fat, high sugar, and combined high fat-high sugar diets on spatial learning and memory in rodents: A meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2019.

ADEMI, Zanfina et al. Cost-effectiveness and return on investment of a nationwide case-finding program for familial hypercholesterolemia in children in the Netherlands. **JAMA pediatrics**, 2023.

AHMED, Mohamed H. Biochemical markers: the road map for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. **American journal of clinical pathology**, v. 127, n. 1, p. 20-22, 2007.

ALBERT, Paul R.; BENKELFAT, Chawki; DESCARRIES, Laurent. The neurobiology of depression—revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. **Philosophical Transactions of the royal society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2378-2381, 2012.

ALMENEESSIER, Aljohara S. et al. The effects of diurnal intermittent fasting on proinflammatory cytokine levels while controlling for sleep/wake pattern, meal composition and energy expenditure. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0226034, 2019.

ALTMANN, Scott W. et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1201-1204, 2004.

AMBRÓSIO, Gabriela et al. Depression and peripheral inflammatory profile of patients with obesity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 91, p. 132-141, 2018.

AMIRI, Sohrab; BEHNEZHAD, Sepideh. Obesity and anxiety symptoms: a systematic review and meta-analysis. **Neuropsychiatrie: Klinik, Diagnostik, Therapie und Rehabilitation: Organ der Gesellschaft Österreichischer Nervenärzte und Psychiater**, v. 33, n. 2, p. 72-89, 2019.

ANANDACOOMARASAMY, Ananthila et al. The impact of obesity on the musculoskeletal system. **International journal of obesity**, v. 32, n. 2, p. 211-222, 2008.

ANDERSON, Annie S. et al. European code against cancer 4th edition: obesity, body fatness and cancer. **Cancer epidemiology**, v. 39, p. S34-S45, 2015.

ANDERSON, Rozalyn M. et al. Dynamic regulation of PGC-1 $\alpha$  localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. **Aging cell**, v. 7, n. 1, p. 101-111, 2008.

ANDRE, Caroline et al. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2, 3-dioxygenase activation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 41, p. 10-21, 2014.

ANSTEY, K. J. et al. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. **Obesity reviews**, v. 12, n. 5, p. e426-e437, 2011.

ANSTEY, Kaarin J. et al. Association of sex differences in dementia risk factors with sex differences in memory decline in a population-based cohort spanning 20–76 years. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7710, 2021.

ANSTEY, Kaarin J.; ASHBY-MITCHELL, Kimberly; PETERS, Ruth. Updating the evidence on the association between serum cholesterol and risk of late-life dementia: review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 56, n. 1, p. 215-228, 2017.

ANSTEY, Kaarin J.; LIPNICKI, Darren M.; LOW, Lee-Fay. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. **The American journal of geriatric psychiatry**, v. 16, n. 5, p. 343-354, 2008.

ANTONIOLI, Manuela et al. Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy. **Trends in biochemical sciences**, v. 42, n. 1, p. 28-41, 2017.

ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARGANINI, Claudia et al. Gender differences in food choice and dietary intake in modern western societies. **Public health-social and behavioral health**, v. 4, p. 83-102, 2012.

ARIZA, Mar et al. Neuropsychological performance of young familial hypercholesterolemia patients. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. e29-e31, 2016.

ARONICA, Lucia et al. Examining differences between overweight women and men in 12-month weight loss study comparing healthy low-carbohydrate vs. low-fat diets. **International journal of obesity**, v. 45, n. 1, p. 225-234, 2021.

ASHWELL, Margaret et al. Waist-to-height ratio is more predictive of years of life lost than body mass index. **PLoS one**, v. 9, n. 9, 2014.

AZEMI, Ahmad Khusairi et al. Time-restricted feeding improved vascular endothelial function in a high-fat diet-induced obesity rat model. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 217, 2022.

BALASUBRAMANIAN, Priya; HOWELL, Porsha R.; ANDERSON, Rozalyn M. Aging and caloric restriction research: a biological perspective with translational potential. **EBioMedicine**, v. 21, p. 37-44, 2017.

BANG, EunJin et al. Modulation of senoinflammation by calorie restriction based on biochemical and Omics big data analysis. **BMB reports**, v. 52, n. 1, p. 56, 2019.

BANGASSER, Debra A.; CUARENTA, Amelia. Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 674-684, 2021.

BANTING, Frederick Grant et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 12, n. 3, p. 141, 1922.

BARTER, Philip et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **New England journal of medicine**, v. 357, n. 13, p. 1301-1310, 2007.

BASTÍAS-PÉREZ, Marianela; SERRA, Dolores; HERRERO, Laura. Dietary options for rodents in the study of obesity. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3234, 2020.

BAUMEIER, Christian et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 5, p. 566-576, 2015.

BAYS, Harold E. et al. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. **Journal of clinical lipidology**, v. 7, n. 4, p. 304-383, 2013.

BECHER, Tobias et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. **Nature medicine**, v. 27, n. 1, p. 58-65, 2021.

BEHESHTI, Sabina O. et al. Worldwide prevalence of familial hypercholesterolemia: meta-analyses of 11 million subjects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 75, n. 20, p. 2553-2566, 2020.

BELAJ, Klara J.; ELLER, Philipp. The fate of fat. **Gerontology**, v. 58, n. 2, p. 120-122, 2012.

BELUJON, Pauline; GRACE, Anthony A. Dopamine system dysregulation in major depressive disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 12, p. 1036-1046, 2017.

BEN SAHRA, Isaam et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. **Cancer research**, v. 71, n. 13, p. 4366-4372, 2011.

BERBERICH, Amanda J.; HEGELE, Robert A. A modern approach to dyslipidemia. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 4, p. 611-653, 2022.

BERRAONDO, Beatriz; MARTÍNEZ, J. Alfredo. Free Fatty Acids Are Involved in the Inverse Relationship between Hormone-Sensitive Lipase (HSL) Activity and Expression in Adipose Tissue after High-Fat Feeding or  $\beta$ 3-Adrenergic Stimulation. **Obesity Research**, v. 8, n. 3, p. 255-261, 2000.

BERRIGAN, David et al. Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 817-822, 2002.

BJÖRNTORP, P. " Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. **Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.**, v. 10, n. 4, p. 493-496, 1990.

BLÁZQUEZ, Enrique et al. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 161, 2014.

BLÜHER, Matthias. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 27, n. 2, p. 163-177, 2013.

BOCCARDI, Virginia; MURASECCO, Ilenia; MECOCCHI, Patrizia. Diabetes drugs in the fight against Alzheimer's disease. **Ageing research reviews**, v. 54, p. 100936, 2019.

BÖHM, Anja et al. Increased mitochondrial respiration of adipocytes from metabolically unhealthy obese compared to healthy obese individuals. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12407, 2020.

BONKOWSKI, Michael S. et al. Disruption of growth hormone receptor prevents calorie restriction from improving insulin action and longevity. **PloS one**, v. 4, n. 2, p. e4567, 2009.

BORDONE, Laura et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. **Ageing cell**, v. 6, n. 6, p. 759-767, 2007.

BORDONE, Laura; GUARENTE, Leonard. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 298-305, 2005.

BORSINI, Alessandra et al. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends in neurosciences**, v. 38, n. 3, p. 145-157, 2015.

BOUDINA, Sihem; GRAHAM, Timothy E. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. **Experimental physiology**, v. 99, n. 9, p. 1168-1178, 2014.

BOYA, Patricia; REGGIORI, Fulvio; CODOGNO, Patrice. Emerging regulation and functions of autophagy. **Nature cell biology**, v. 15, n. 7, p. 713-720, 2013.

BRADY, Emer M. et al. Fibro-inflammatory recovery and type 2 diabetes remission following a low-calorie diet but not exercise training: A secondary analysis of the DIASTOLIC randomised controlled trial. **Diabetic Medicine**, v. 39, n. 8, p. e14884, 2022.

- BRAGA, Sara Pereira et al. Switching from high-fat feeding (HFD) to regular diet improves metabolic and behavioral impairments in middle-aged female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 398, p. 112969, 2021.
- BRANDACHER, G. et al. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player?. **Current drug metabolism**, v. 8, n. 3, p. 289-295, 2007.
- BROWN, Michael S.; GOLDSTEIN, Joseph L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. **Cell metabolism**, v. 7, n. 2, p. 95-96, 2008.
- BRUCE-KELLER, Annadora J. et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. **Biological psychiatry**, v. 77, n. 7, p. 607-615, 2015.
- BRUSS, Matthew D. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 1, p. E108-E116, 2010.
- BRZEK, Paweł et al. Effect of calorie restriction on spontaneous physical activity and body mass in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). **Physiology & Behavior**, v. 161, p. 116-122, 2016.
- BUCKMASTER, Cindy A. et al. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9811-9825, 2004.
- BUETTNER, Roland; SCHÖLMEICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2012.
- BUPP, Melanie R. Gubbels. Sex, the aging immune system, and chronic disease. **Cellular immunology**, v. 294, n. 2, p. 102-110, 2015.
- CAI, Hua et al. Effects of alternate-day fasting on body weight and dyslipidaemia in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial. **BMC gastroenterology**, v. 19, p. 1-8, 2019.
- CALINGASAN, Noel Y.; GIBSON, Gary E. Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. **Brain research**, v. 885, n. 1, p. 62-69, 2000.
- CAMPBELL, Jared M. et al. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: a systematic review and meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 40, p. 31-44, 2017.
- CANTÓ, Carles; AUWERX, Johan. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 325-331, 2009.
- CAPURON, Lucile; LASSELIN, Julie; CASTANON, Nathalie. Role of adiposity-driven inflammation in depressive morbidity. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 115-128, 2017.
- CAPURON, Lucile; MILLER, Andrew H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 130, n. 2, p. 226-238, 2011.
- CASSILHAS, Ricardo C.; TUFIK, Sergio; DE MELLO, Marco Túlio. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 5, p. 975-983, 2016.
- CASTANON, Nathalie et al. Chronic administration of tianeptine balances lipopolysaccharide-induced expression of cytokines in the spleen and hypothalamus of rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 6, p. 778-790, 2004.
- CASTANON, Nathalie; LASSELIN, Julie; CAPURON, Lucile. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 74, 2014.

CASTANON, Nathalie; LUHESHI, Giamal; LAYÉ, Sophie. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 229, 2015.

CATTANEO, Annamaria et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. **Neurobiology of aging**, v. 49, p. 60-68, 2017.

CHAIX, Amandine et al. Sex-and age-dependent outcomes of 9-hour time-restricted feeding of a Western high-fat high-sucrose diet in C57BL/6J mice. **Cell reports**, v. 36, n. 7, 2021.

CHALKIADAKI, Angeliki; GUARENTE, Leonard. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. **Cell metabolism**, v. 16, n. 2, p. 180-188, 2012.

CHANDLER-LANEY, P. C. et al. A history of caloric restriction induces neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 104-114, 2007.

CHAO, Hsu-Wen et al. Homeostasis of glucose and lipid in non-alcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 298, 2019.

CHAUDHARI, Kiran et al. Determination of metformin bio-distribution by LC-MS/MS in mice treated with a clinically relevant paradigm. **PLoS One**, v. 15, n. 6, p. e0234571, 2020.

CHAVAKIS, Triantafyllos; ALEXAKI, Vasileia Ismini; FERRANTE JR, Anthony W. Macrophage function in adipose tissue homeostasis and metabolic inflammation. **Nature Immunology**, v. 24, n. 5, p. 757-766, 2023.

CHEN, Kuan-Hui Ethan; LAINEZ, Nancy M.; COSS, Djurdjica. Sex differences in macrophage responses to obesity-mediated changes determine migratory and inflammatory traits. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 1, p. 141-153, 2021.

CHEN, Li et al. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **International journal of endocrinology**, v. 2015, 2015.

CHEN, Yinshuang et al. Obesity, non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1148934, 2023.

CHENG, Clara M. et al. Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and-67 expression. **Journal of neuroscience research**, v. 77, n. 2, p. 270-276, 2004.

CHOOI, Yu Chung; DING, Cherlyn; MAGKOS, Faidon. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2019.

CHOROMAŃSKA, Barbara et al. Effects of age and gender on the redox homeostasis of morbidly obese people. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 175, p. 108-120, 2021.

CHYAU, Charng-Cherng et al. Antrodan alleviates high-fat and high-fructose diet-induced fatty liver disease in C57BL/6 mice model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR $\gamma$  pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 1, p. 360, 2020.

CIANFARANI, Stefano. Insulin-like growth factor-II: new roles for an old actor. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 118, 2012.

CIFARELLI, Vincenza; ABUMRAD, Nada A. Intestinal CD36 and other key proteins of lipid utilization: role in absorption and gut homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 2, p. 493, 2018.

CINTRON-COLON, Rigo et al. Gonadal hormones influence core body temperature during caloric restriction. **Temperature**, v. 6, n. 2, p. 158-168, 2019.



CINTRON-COLON, Rigo et al. Insulin-like growth factor 1 receptor regulates hypothermia during caloric restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 36, p. 9731-9736, 2017.

CIOBANU, Ovidiu et al. Caloric restriction stabilizes body weight and accelerates behavioral recovery in aged rats after focal ischemia. **Aging Cell**, v. 16, n. 6, p. 1394-1403, 2017.

CIVITARESE, Anthony E. et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. **PLoS medicine**, v. 4, n. 3, p. e76, 2007.

CLAYTON, Janine Austin. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 2, p. 519, 2016.

COHEN, Dena E. et al. Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction. **Genes & development**, v. 23, n. 24, p. 2812-2817, 2009.

COHEN, Haim Y. et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. **science**, v. 305, n. 5682, p. 390-392, 2004.

COLEMAN, D. L.; HUMMEL, KATHARINE P. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 217, n. 5, p. 1298-1304, 1969.

COLEMAN, Douglas L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, v. 9, n. 4, p. 294-298, 1973.

COLEMAN, Douglas L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, p. 141-148, 1978.

COLMAN, Ricki J. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 201-204, 2009.

CORDNER, Zachary A.; TAMASHIRO, Kellie LK. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & behavior**, v. 152, p. 363-371, 2015.

CRANE, Paul K. et al. Glucose levels and risk of dementia. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 6, p. 540-548, 2013.

CREWE, Clair et al. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 74-82, 2017.

CRYAN, John F.; HOLMES, Andrew. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005.

CUI, Ranji et al. The mechanism of acute fasting-induced antidepressant-like effects in mice. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 223-229, 2018.

CUKIERMAN, T.; GERSTEIN, H. C.; WILLIAMSON, J. D. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2460-2469, 2005.

CURRY, Susan J. et al. Behavioral weight loss interventions to prevent obesity-related morbidity and mortality in adults: US Preventive Services Task Force recommendation statement. **Jama**, v. 320, n. 11, p. 1163-1171, 2018.

CZECH, Michael P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature medicine**, v. 23, n. 7, p. 804-814, 2017.

CZERNICHOW, Sébastien et al. Body mass index, waist circumference and waist–hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. **Obesity reviews**, v. 12, n. 9, p. 680-687, 2011.

DAI, Wenjie et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 39, 2017.

DALLMAN, Mary F. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 159-165, 2010.

DANTZER, Robert et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DE BEM, Andreza Fabro et al. Animal models of metabolic disorders in the study of neurodegenerative diseases: an overview. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 1457, 2021.

DE BEM, Andreza Fabro et al. Animal models of metabolic disorders in the study of neurodegenerative diseases: an overview. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 1457, 2021.

DE BEM, Andreza Fabro et al. Animal models of metabolic disorders in the study of neurodegenerative diseases: an overview. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 1457, 2021.

DE CABO, Rafael; MATTSON, Mark P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 26, p. 2541-2551, 2019.

DE CABO, Rafael; MATTSON, Mark P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 26, p. 2541-2551, 2019.

DE OLIVEIRA, J. et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, 2011.

DE OLIVEIRA, J. et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, 2011.

DE OLIVEIRA, Jade et al. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 2028-2036, 2013.

DE OLIVEIRA, Jade et al. High cholesterol diet exacerbates blood-brain barrier disruption in LDLr<sup>-/-</sup> mice: Impact on cognitive function. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 78, n. 1, p. 97-115, 2020.

DE SOUZA, Letícia et al. Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice. **Physiology & Behavior**, v. 228, p. 113187, 2021.

DEY, Aditi et al. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes. **Journal of neuroimmunology**, v. 269, n. 1-2, p. 20-27, 2014.

DHAHBI, Joseph M. et al. Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 15, p. 5524-5529, 2004.

DI ANGELANTONIO, Emanuele et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. **The Lancet**, v. 388, n. 10046, p. 776-786, 2016.

DI CONZA, Giusy; HO, Ping-Chih. ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 695, 2020.

DIAS, Isabella Rocha et al. Does calorie restriction improve cognition?. **IBRO reports**, v. 9, p. 37-45, 2020.

DIAS, Sofia et al. Drugs involved in dyslipidemia and obesity treatment: focus on adipose tissue. **International journal of endocrinology**, v. 2018, 2018.

DINEL, Anne-Laure et al. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24325, 2011.

DINEL, Anne-Laure et al. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2, 3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, p. 48-59, 2014.

DING, Shibin et al. Resveratrol and caloric restriction prevent hepatic steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats. **PloS one**, v. 12, n. 8, 2017.

DIONYSOPOULOU, Sofia et al. The role of hypothalamic inflammation in diet-induced obesity and its association with cognitive and mood disorders. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 498, 2021.

DOGAN, Soner; RAY, Amitabha; CLEARY, Margot P. The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: short term and long term diet effects. **Meta gene**, v. 12, p. 22-32, 2017.

DON-DONCOW, Nicholas et al. Simvastatin therapy attenuates memory deficits that associate with brain monocyte infiltration in chronic hypercholesterolemia. **npj Aging and Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 19, 2021.

DONGIOVANNI, Paola et al. High fat diet subverts hepatocellular iron uptake determining dysmetabolic iron overload. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116855, 2015.

DONNELLY, Kerry L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DORIGHELLO, Gabriel G. et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 6, p. 979-986, 2014.

DORLING, James L. et al. Effect of 2 years of calorie restriction on liver biomarkers: results from the CALERIE phase 2 randomized controlled trial. **European journal of nutrition**, v. 60, p. 1633-1643, 2021.

DORLING, James L.; MARTIN, Corby K.; REDMAN, Leanne M. Calorie restriction for enhanced longevity: the role of novel dietary strategies in the present obesogenic environment. **Ageing research reviews**, v. 64, p. 101038, 2020.

DUNN, Sandra E. et al. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. **Cancer research**, v. 57, n. 21, p. 4667-4672, 1997.

DZIEWULSKA, Anna et al. SCD1 regulates the AMPK/SIRT1 pathway and histone acetylation through changes in adenine nucleotide metabolism in skeletal muscle. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 2, p. 1129-1140, 2020.

EL HADI, Hamza et al. Food ingredients involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in calorie burning. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1954, 2019.

ELLIOTT, R. M. et al. Transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells in human subjects following a 36 h fast provides evidence of effects on genes regulating inflammation, apoptosis and energy metabolism. **Genes & nutrition**, v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

- ELZINGA, Sarah E. et al. Sex differences in insulin resistance, but not peripheral neuropathy, in a diet-induced prediabetes mouse model. **Disease models & mechanisms**, v. 14, n. 4, p. dmm048909, 2021.
- ENGEL, Daiane F. et al. Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: A role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. **Molecular Metabolism**, v. 30, p. 1-15, 2019.
- ENGEL, Daiane Fátima et al. Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr<sup>-/-</sup> mouse experimental model. **Behavioural brain research**, v. 311, p. 31-38, 2016.
- ENGIN, Atilla. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In: **Obesity and Lipotoxicity**. Springer, Cham, 2017. p. 1-17.
- ERION, Joanna R. et al. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2618-2631, 2014.
- ERION, Joanna R. et al. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2618-2631, 2014.
- ESLAM, Mohammed et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 158, n. 7, p. 1999-2014. e1, 2020.
- ESPELAND, Mark A. et al. Sex-related differences in cognitive trajectories in older individuals with type 2 diabetes and overweight or obesity. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 7, n. 1, p. e12160, 2021.
- European Commission. *Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union* (European Commission, 2013)
- FAN, Xiaowei et al. Effects of high-sugar, high-cholesterol, and high-fat diet on phospholipid profile of mouse tissues with a focus on the mechanism of plasmalogen synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1868, n. 9, p. 159345, 2023.
- FANDIÑO, Julia et al. Cirurgia bariátrica: aspectos clínico-cirúrgicos e psiquiátricos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 26, p. 47-51, 2004.
- FANG, Xin. Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. **International Journal of Neuroscience**, v. 126, n. 9, p. 771-776, 2016.
- FARIS, Mo'ez Al-Islam et al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. **Nutrition research**, v. 32, n. 12, p. 947-955, 2012.
- FEIGE, Jerome N.; AUWERX, Johan. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 3, p. 303-309, 2008.
- FELGER, Jennifer C. et al. Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: association with fatigue and CSF dopamine concentrations. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 153-160, 2013.
- FELGER, Jennifer C.; MILLER, Andrew H. Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: the subcortical source of inflammatory malaise. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 3, p. 315-327, 2012.
- FERRARIO, Carrie R.; REAGAN, Lawrence P. Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. **Neuropharmacology**, v. 136, p. 182-191, 2018.

FERRETTI, Maria Teresa et al. Sex differences in Alzheimer disease—the gateway to precision medicine. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 8, p. 457-469, 2018.

FISHER-WELLMAN, Kelsey H. et al. A direct comparison of metabolic responses to high-fat diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ mice. **Diabetes**, v. 65, n. 11, p. 3249-3261, 2016.

FOND, Guillaume et al. Fasting in mood disorders: neurobiology and effectiveness. A review of the literature. **Psychiatry research**, v. 209, n. 3, p. 253-258, 2013.

FONTANA, Luigi et al. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. **Aging cell**, v. 15, n. 1, p. 22-27, 2016.

FONTANA, Luigi et al. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 101, n. 17, p. 6659-6663, 2004.

FORETZ, Marc et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies. **Cell metabolism**, v. 20, n. 6, p. 953-966, 2014.

FORETZ, Marc; GUIGAS, Bruno; VIOLLET, Benoit. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 1-17, 2023.

FORIGHT, R. M. et al. Is regular exercise an effective strategy for weight loss maintenance?. **Physiology & behavior**, v. 188, p. 86-93, 2018.

FRANCISCO, Vera et al. Obesity, fat mass and immune system: role for leptin. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 640, 2018.

FRANCQUE, Sven et al. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 1, p. 24-39, 2021.

FRANSSSEN, Remco et al. Obesity and dyslipidemia. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 37, n. 3, p. 623-633, 2011.

FRIEDMAN, Jeffrey M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 3, p. 973S-979S, 2009.

FRÖLICH, L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **Journal of neural transmission**, v. 105, p. 423-438, 1998.

FULTON, Stephanie et al. The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 18-35, 2022.

FUSCO, Salvatore; PANI, Giovambattista. Brain response to calorie restriction. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, p. 3157-3170, 2013.

FUSCO, Salvatore; PANI, Giovambattista. Brain response to calorie restriction. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 17, p. 3157-3170, 2013.

GADDE, Kishore M. et al. Obesity: pathophysiology and management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 1, p. 69-84, 2018.

GAJDA, Angela M. High fat diets for diet-induced obesity models. **Research Diets**, v. 8, p. 1-3, 2008.

GAO, Xiuying et al. Moderate calorie restriction to achieve normal weight reverses  $\beta$ -cell dysfunction in diet-induced obese mice: involvement of autophagy. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, p. 1-10, 2015.

GARDNER, Ann; BOLES, Richard G. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 730-743, 2011.

GARIEPY, Genevieve et al. The longitudinal association from obesity to depression: Results from the 12-year National Population Health Survey. **Obesity**, v. 18, n. 5, p. 1033-1038, 2010.

GARIEPY, Genevieve; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. **International journal of obesity**, v. 34, n. 3, p. 407-419, 2010.

GARLAND JR, Theodore et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 206-229, 2011.

GARVEY WT et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity. **Endocr Pract**, 22(Suppl 3):1-203, 2016.

GASPAR, Rafael C. et al. An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 320, n. 3, p. E488-E495, 2021.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **New England journal of medicine**, v. 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

GEISLER, C. E. et al. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2016.

GEISLER, C. E. et al. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2016.

GHABEN, Alexandra L.; SCHERER, Philipp E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 4, p. 242-258, 2019.

GIDDING, Samuel S. Special commentary: is diet management helpful in familial hypercholesterolemia? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 22, n. 2, p. 135-140, 2019.

GILES, Daniel A. et al. Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. **Nature medicine**, v. 23, n. 7, p. 829-838, 2017.

GINTING, Rehna Paula; LEE, Ji-Min; LEE, Min-Woo. The Influence of Ambient Temperature on Adipose Tissue Homeostasis, Metabolic Diseases and Cancers. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 881, 2023.

GOMES, Felipe Azevedo et al. Glucose Homeostasis Is Not Affected in a Murine Model of Parkinson's Disease Induced by 6-OHDA. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 1020, 2019.

GONZÁLEZ OLMO, Brigitte M.; BUTLER, Michael J.; BARRIENTOS, Ruth M. Evolution of the human diet and its impact on gut microbiota, immune responses, and brain health. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 196, 2021.

GONZÁLEZ, Asier et al. AMPK and TOR: the yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control. **Cell metabolism**, v. 31, n. 3, p. 472-492, 2020.

GONZÁLEZ, Octavio A. et al. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. **Oral diseases**, v. 18, n. 1, p. 16-31, 2012.

GONZALEZ-BARÓ, Maria R.; LEWIN, Tal M.; COLEMAN, Rosalind A. Regulation of triglyceride metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 5, p. G1195-G1199, 2007.

GRALLE, Matthias. The neuronal insulin receptor in its environment. **Journal of Neurochemistry**, v. 140, n. 3, p. 359-367, 2017.

GREEN, Cara L.; LAMMING, Dudley W.; FONTANA, Luigi. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 56-73, 2022.

GREENHILL, Claire. Metformin improves survival and recurrence rate in patients with diabetes and gastric cancer. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 3, p. 124-124, 2015.

GRIFFIN, Timothy M. et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. **Arthritis research & therapy**, v. 12, p. 1-18, 2010.

GROVE, K. L. et al. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. **International journal of obesity**, v. 34, n. 6, p. 989-1000, 2010.

GUERRA-CANTERA, Santiago et al. Sex Differences in Metabolic Recuperation After Weight Loss in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, 2021.

GUIJAS, Carlos et al. Metabolic adaptation to calorie restriction. **Science signaling**, v. 13, n. 648, p. eabb2490, 2020.

GUILLEMOT-LEGRIS, Owein; MUCCIOLI, Giulio G. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. **Trends in neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237-253, 2017.

HAAN, MN. Therapy insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, 2(3):159-166, 2006.

HAAS, Bodo et al. Targeting adipose tissue. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2012.

HAM, Daniel J. et al. Distinct and additive effects of calorie restriction and rapamycin in aging skeletal muscle. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2022.

HAMER, Mark; BATTY, G. David; KIVIMAKI, Mika. Risk of future depression in people who are obese but metabolically healthy: the English longitudinal study of ageing. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 9, p. 940-945, 2012.

HANNAH RITCHIE and MAX ROSER (2017) - "Obesity". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/obesity>'

HARIRI, Niloofar; THIBAUT, Louise. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HARRISON, David E. et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **nature**, v. 460, n. 7253, p. 392-395, 2009.

HARVIE, Michelle N. et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women. **International journal of obesity**, v. 35, n. 5, p. 714-727, 2011.

HATORI, Megumi et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. **Cell metabolism**, v. 15, n. 6, p. 848-860, 2012.

HATZIDIS, Aikaterini et al. Removal of a high-fat diet, but not voluntary exercise, reverses obesity and diabetic-like symptoms in male C57BL/6J mice. **Hormones**, v. 16, p. 62-74, 2017.

HE, Ling et al. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 635-646, 2009.

HEGELE, Robert A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2009.

HEILBRONN, Leonie K. et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 295, n. 13, p. 1539-1548, 2006.

HELKIN, Alex et al. Dyslipidemia part 1—review of lipid metabolism and vascular cell physiology. **Vascular and endovascular surgery**, v. 50, n. 2, p. 107-118, 2016.

HENEKA, Michael T. et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. 674-678, 2013.

HENKEL, Verena et al. Treatment of depression with atypical features: a meta-analytic approach. **Psychiatry research**, v. 141, n. 1, p. 89-101, 2006.

HEROLD, Jacqueline; KALUCKA, Joanna. Angiogenesis in adipose tissue: the interplay between adipose and endothelial cells. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 624903, 2021.

HERRANZ, Daniel et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. **Nature communications**, v. 1, n. 1, p. 3, 2010.

HERSI, Mona et al. Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. **Neurotoxicology**, v. 61, p. 143-187, 2017.

HERZIG, Sébastien; SHAW, Reuben J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 2018.

HILDEBRANDT, Ximena; IBRAHIM, Mohamed; PELTZER, Nieves. Cell death and inflammation during obesity: "Know my methods, WAT (son)". **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 2, p. 279-292, 2023.

HOFER, Sebastian J. et al. Caloric restriction mimetics in nutrition and clinical trials. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 717343, 2021.

HØJLAND IPSEN, David; TVEDEN-NYBORG, Pernille; LYKKESFELDT, Jens. Normal weight dyslipidemia: is it all about the liver?. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 556-567, 2016.

HONG, Dong-Yong et al. Relationship between brain metabolic disorders and cognitive impairment: LDL receptor defect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8384, 2022.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; ERBAY, Ebru. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 923-934, 2008.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; WELLEN, K. E. Inflammation, stress and diabetes. **J. Clin. Invest**, v. 115, p. 1111-1119, 2005.

HOUTKOOPEL, Riekelt H. et al. The metabolic footprint of aging in mice. **Scientific reports**, v. 1, n. 1, p. 134, 2011.

HSU, Ted M.; KANOSKI, Scott E. Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, p. 88, 2014.

HU, Yuxin et al. Sex differences in the association between different obesity parameters and cognitive function in older adults: a cross-sectional study in rural China. **Gerontology**, v. 68, n. 7, p. 799-807, 2022.



HUANG, Chao et al. The ketone body metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate induces an antidepressant-associated ramification of microglia via HDACs inhibition-triggered Akt-small RhoGTPase activation. **Glia**, v. 66, n. 2, p. 256-278, 2018.

HUANG, Yuanshe et al. Effect of metformin on nonalcoholic fatty liver based on meta-analysis and network pharmacology. **Medicine**, v. 101, n. 43, p. e31437-e31437, 2022.

HUFFMAN, Kim M. et al. Calorie restriction improves lipid-related emerging cardiometabolic risk factors in healthy adults without obesity: Distinct influences of BMI and sex from CALERIE™ a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. **EClinicalMedicine**, v. 43, 2022.

HURLEY, James H.; YOUNG, Lindsey N. Mechanisms of autophagy initiation. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 225-244, 2017.

IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

IGWE, Ogechi et al. A review of effects of calorie restriction and fasting with potential relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110206, 2021.

IKEDA, Ikuo et al. Impact of fasting time on hepatic lipid metabolism in nutritional animal studies. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 78, n. 9, p. 1584-1591, 2014.

IMAI, Shin-ichiro; GUARENTE, Leonard. NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease. **Trends in cell biology**, v. 24, n. 8, p. 464-471, 2014.

INGLE, L., WOOD, T. R. and BANTA, A. M. A study of longevity, growth, reproduction, and heart rate in *Daphnia longispina* by limitations in quantity of food. **J Exp Zool** 76, 325–352, 1937.

INGRAM, Donald K. et al. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. **Aging cell**, v. 5, n. 2, p. 97-108, 2006.

ISHIDA, Akira; NAKAJIMA, Wako; TAKADA, Goro. Short-term fasting alters neonatal rat striatal dopamine levels and serotonin metabolism: an in vivo microdialysis study. **Developmental brain research**, v. 104, n. 1-2, p. 131-136, 1997.

ISINGRINI, Elsa et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, 2010.

IWAGAMI, Masao et al. Blood cholesterol and risk of dementia in more than 1·8 million people over two decades: a retrospective cohort study. **The Lancet Healthy Longevity**, v. 2, n. 8, p. e498-e506, 2021.

JACK, Clifford R. et al. Age, sex, and APOE  $\epsilon$ 4 effects on memory, brain structure, and  $\beta$ -amyloid across the adult life span. **JAMA neurology**, v. 72, n. 5, p. 511-519, 2015.

JAHNG, Jeong Won et al. Chronic food restriction in young rats results in depression-and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. **Brain research**, v. 1150, p. 100-107, 2007.

Ji, Shuqin; WANG, Lingwei; LI, Lei. Effect of metformin on short-term high-fat diet-induced weight gain and anxiety-like behavior and the gut microbiota. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 704, 2019.

JIN, Xin et al. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2023.

JOHNSON, James B. et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 665-674, 2007.

JOKELA, Markus et al. Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: pooled analysis of eight studies. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 8, p. 910-914, 2014.

JOKELA, Markus et al. Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: pooled analysis of eight studies. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 8, p. 910-914, 2014.

KAHN, Steven E.; HULL, Rebecca L.; UTZSCHNEIDER, Kristina M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KALUEFF, Allan V.; TUOHIMAA, Pentti. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, v. 13, n. 3, p. 151-158, 2004.

KANOSKI, Scott E.; DAVIDSON, Terry L. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiology & behavior**, v. 103, n. 1, p. 59-68, 2011.

KELLAR, Derek; CRAFT, Suzanne. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 9, p. 758-766, 2020.

KERR, Geoffrey J. et al. Diet-induced obesity leads to behavioral indicators of pain preceding structural joint damage in wild-type mice. **Arthritis research & therapy**, v. 23, n. 1, p. 1-18, 2021.

KERSTEN, Sander et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the adaptive response to fasting. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 11, p. 1489-1498, 1999.

KERTI, Lucia et al. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. **Neurology**, v. 81, n. 20, p. 1746-1752, 2013.

KEYS, A. Coronary heart disease, serum cholesterol and the diet. **Acta Med Scand** 207, 153–160, 1980.

KHAN, Saad et al. The immune landscape of visceral adipose tissue during obesity and aging. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 267, 2020.

KHAZEN, Tala et al. Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

KIM, Hwajin et al. Caloric restriction improves diabetes-induced cognitive deficits by attenuating neurogranin-associated calcium signaling in high-fat diet-fed mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 36, n. 6, p. 1098-1110, 2016.

KIM, K.-D. et al. Betulinic acid inhibits high-fat diet-induced obesity and improves energy balance by activating AMPK. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 4, p. 409-420, 2019.

KIM, Kyung Eun et al. Caloric restriction of db/db mice reverts hepatic steatosis and body weight with divergent hepatic metabolism. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 30111, 2016.

KINDEL, Tammy; LEE, Dana M.; TSO, Patrick. The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. **Atherosclerosis Supplements**, v. 11, n. 1, p. 11-16, 2010.

KLEINERT, Maximilian et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 140-162, 2018.

KLEINRIDDERS, André et al. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2232-2243, 2014.

KLEMENT, R. J.; FINK, M. K. Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system: exploiting the full repertoire against cancer. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e193-e193, 2016.

KLOP, Boudewijn; ELTE, Jan Willem F.; CASTRO CABEZAS, Manuel. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218-1240, 2013.

KNECHT, Stefan; ELLGER, Tanja; LEVINE, James A. Obesity in neurobiology. **Progress in neurobiology**, v. 84, n. 1, p. 85-103, 2008.

KNOTT, P. J.; JOSEPH, M. H.; CURZON, G. Effects of food deprivation and immobilization on tryptophan and other amino acids in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 20, n. 1, p. 249-251, 1973.

KO, Myoung Seok et al. Mitophagy deficiency increases NLRP3 to induce brown fat dysfunction in mice. **Autophagy**, v. 17, n. 5, p. 1205-1221, 2021.

KOJIMA, Masayasu et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656-660, 1999.

KOKRAS, Nikolaos; DALLA, Christina. Preclinical sex differences in depression and antidepressant response: Implications for clinical research. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 1-2, p. 731-736, 2017.

KÖKTEN, Tunay et al. Calorie restriction as a new treatment of inflammatory diseases. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 1558-1570, 2021.

KOLTA, Malak G. et al. Effect of long-term caloric restriction on brain monoamines in aging male and female Fischer 344 rats. **Mechanisms of ageing and development**, v. 48, n. 2, p. 191-198, 1989.

KOŘÍNKOVÁ, L. et al. Pathophysiology of NAFLD and NASH in experimental models: the role of food intake regulating peptides. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 597583, 2020.

KRAUS, William E. et al. 2 years of calorie restriction and cardiometabolic risk (CALERIE): exploratory outcomes of a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 673-683, 2019.

KROEMER, Guido; MARIÑO, Guillermo; LEVINE, Beth. Autophagy and the integrated stress response. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 280-293, 2010.

KUO, Taiyi et al. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. **Glucocorticoid signaling**, p. 99-126, 2015.

KWAK, Hyun Jeong et al.  $\beta$ -Lapachone regulates obesity through modulating thermogenesis in brown adipose tissue and adipocytes: role of AMPK signaling pathway. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 47, n. 04, p. 803-822, 2019.

LAM, Tony KT et al. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C- $\delta$ . **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 4, p. E682-E691, 2002.

LAMA, Adriano et al. Palmitoylethanolamide dampens neuroinflammation and anxiety-like behavior in obese mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 102, p. 110-123, 2022.

LAMMING, Dudley W. Diminished mTOR signaling: a common mode of action for endocrine longevity factors. **Springerplus**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2014.

LARSSON, Ola et al. Distinct perturbation of the transcriptome by the antidiabetic drug metformin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 8977-8982, 2012.

LASSELIN, Julie; CAPURON, Lucile. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 2-3, p. 95-101, 2014.

LAUBY-SECRETAN, Béatrice et al. Body fatness and cancer—viewpoint of the IARC Working Group. **New England journal of medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016.

LEE, Edward B.; MATTSON, Mark P. The neuropathology of obesity: insights from human disease. **Acta neuropathologica**, v. 127, p. 3-28, 2014.

LEE, Hyun Sook et al. Gynostemma pentaphyllum extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N mice by upregulating SIRT1. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2475, 2019.

LEE, In Hye. Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. **Experimental & molecular medicine**, v. 51, n. 9, p. 1-11, 2019.

LEGER, Marianne et al. Object recognition test in mice. **Nature protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531-2537, 2013.

LEIBOWITZ, Sarah F. et al. Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet. **Brain research**, v. 1047, n. 2, p. 137-147, 2005.

LEMMER, Imke L. et al. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. **Molecular metabolism**, v. 47, p. 101169, 2021.

LEMSTRA, Mark et al. Weight loss intervention adherence and factors promoting adherence: a meta-analysis. **Patient preference and adherence**, p. 1547-1559, 2016.

LENZ, Michael et al. Adipose tissue in health and disease through the lens of its building blocks. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 10433, 2020.

LETTIERI-BARBATO, Daniele; GIOVANNETTI, Esmeralda; AQUILANO, Katia. Effects of dietary restriction on adipose mass and biomarkers of healthy aging in human. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 12, p. 3341, 2016.

LI, Bingjin et al. Additive antidepressant-like effects of fasting with imipramine via modulation of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 199-206, 2014.

LI, Fang et al. Adipose-specific knockdown of Sirt1 results in obesity and insulin resistance by promoting exosomes release. **Cell Cycle**, v. 18, n. 17, p. 2067-2082, 2019.

LI, Min et al. Metformin ameliorates hepatic steatosis and improves the induction of autophagy in HFD-induced obese mice. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 1, p. 680-686, 2017.

LI, Weihong et al. The effect of combination therapy of allicin and fenofibrate on high fat diet-induced vascular endothelium dysfunction and liver damage in rats. **Lipids in health and disease**, v. 9, n. 1, p. 131, 2010.

LIAN, Cai-Yu et al. High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 330, p. 109199, 2020.

LIANG, Huijing et al. A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice. **Experimental animals**, v. 70, n. 1, p. 73-83, 2021.

LIMA GIACOBBO, Bruno et al. Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation. **Molecular neurobiology**, v. 56, p. 3295-3312, 2019.

LIN, Ai-Ling et al. Caloric restriction increases ketone bodies metabolism and preserves blood flow in aging brain. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 7, p. 2296-2303, 2015.

LIN, Sheng-Cai; HARDIE, D. Grahame. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status. **Cell metabolism**, v. 27, n. 2, p. 299-313, 2018.

LIM, Chung Thong; KOLA, Blerina; KORBONITS, Márta. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **Journal of molecular endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 87, 2010.

LIU, Deying et al. Calorie restriction with or without time-restricted eating in weight loss. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 16, p. 1495-1504, 2022.

LIU, Grace Y.; SABATINI, David M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 4, p. 183-203, 2020.

LIU, Pan; LI, Yun; MA, Lina. Caloric restriction may help delay the onset of frailty and support frailty management. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 611, 2021.

LIU, Yong et al. SIRT3 mediates hippocampal synaptic adaptations to intermittent fasting and ameliorates deficits in APP mutant mice. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1886, 2019.

LIU, Yue; CHEN, HouZao; LIU, DePei. Mechanistic perspectives of calorie restriction on vascular homeostasis. **Science China Life Sciences**, v. 57, p. 742-754, 2014.

LIZCANO, Fernando et al. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

LOEB, J. AND NORTHRUP, J. H. On the influence of food and temperature upon the duration of life. **J Biol Chem** 32, 102–121, 1917.

LOOMBA, Rohit; FRIEDMAN, Scott L.; SHULMAN, Gerald I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. **Cell**, v. 184, n. 10, p. 2537-2564, 2021.

LÓPEZ-LLUCH, Guillermo; NAVAS, Plácido. Calorie restriction as an intervention in ageing. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 8, p. 2043-2060, 2016.

LOVEJOY, Jennifer C. The influence of dietary fat on insulin resistance. **Current diabetes reports**, v. 2, n. 5, p. 435-440, 2002.

LU, Jingli et al. Adipose tissue-resident immune cells in obesity and type 2 diabetes. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1173, 2019.

LÜ, Wenqi; YU, Tingting; KUANG, Weihong. Effects of dietary restriction on cognitive function: a systematic review and meta-analysis. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-11, 2022.

LU, Xin-Yun et al. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1593-1598, 2006.

LUMENG, Carey N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, 2007.

LUO, Yan; LIU, Meilian. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. **Journal of molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 120-128, 2016.

LUPPINO, Floriana S. et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Archives of general psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 220-229, 2010.

LUSCHER, Bernhard; SHEN, Qiuying; SAHIR, Nadia. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Molecular psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 383-406, 2011.

LUTZ, Mirjam I. et al. Distinct patterns of sirtuin expression during progression of Alzheimer's disease. **Neuromolecular medicine**, v. 16, p. 405-414, 2014.

MA, Teng et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2. **Nature**, v. 603, n. 7899, p. 159-165, 2022.

MADEO, Frank et al. Caloric restriction mimetics against age-associated disease: targets, mechanisms, and therapeutic potential. **Cell metabolism**, v. 29, n. 3, p. 592-610, 2019.

MAGNUSSON, Kathy R. Influence of dietary restriction on ionotropic glutamate receptors during aging in C57B1 mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 95, n. 3, p. 187-202, 1997.

MAGRI-TOMAZ, L. et al. Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. **Cell Biochemistry and Function**, v. 36, n. 7, p. 387-393, 2018.

MANCHISHI, Stephen Malunga et al. Effect of caloric restriction on depression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 2528-2535, 2018.

MALIN, Steven K.; KASHYAP, Sangeeta R. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 21, n. 5, p. 323-329, 2014.

MANGGE, Harald et al. Obesity-related dysregulation of the Tryptophan–Kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome. **Obesity**, v. 22, n. 1, p. 195-201, 2014.

MARINAC, Catherine R. et al. Frequency and circadian timing of eating may influence biomarkers of inflammation and insulin resistance associated with breast cancer risk. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0136240, 2015.

MARINO, Guillermo et al. Caloric restriction mimetics: natural/physiological pharmacological autophagy inducers. **Autophagy**, v. 10, n. 11, p. 1879-1882, 2014.

MARTIN, Bronwen; MATTSON, Mark P.; MAUDSLEY, Stuart. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. **Ageing research reviews**, v. 5, n. 3, p. 332-353, 2006.

MARTIN, Corby K. et al. Effect of calorie restriction on mood, quality of life, sleep, and sexual function in healthy nonobese adults: the CALERIE 2 randomized clinical trial. **JAMA internal medicine**, v. 176, n. 6, p. 743-752, 2016.

MARTÍNEZ-REDONDO, Vicente; PETTERSSON, Amanda T.; RUAS, Jorge L. The hitchhiker’s guide to PGC-1 $\alpha$  isoform structure and biological functions. **Diabetologia**, v. 58, p. 1969-1977, 2015.

MARTIN-MONTALVO, Alejandro et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 2192, 2013.

MARX, Wolfgang et al. Diet and depression: exploring the biological mechanisms of action. **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 134-150, 2021.

MÄRZ, Winfried et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. **Clinical Research in Cardiology**, v. 106, p. 663-675, 2017.

MASHIMA, T.; SEIMIYA, H.; TSURUO, T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. **British journal of cancer**, v. 100, n. 9, p. 1369-1372, 2009.

MATTSON, Mark P.; LONGO, Valter D.; HARVIE, Michelle. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. **Ageing research reviews**, v. 39, p. 46-58, 2017.

MAUVAIS-JARVIS, Franck; ARNOLD, Arthur P.; REUE, Karen. A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. **Cell metabolism**, v. 25, n. 6, p. 1216-1230, 2017.

MCARDLE, Maeve A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 52, 2013.

MCCAY, C. M., CROWELL, M. F. and MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. **J Nutr** 10, 63–70, 1935.

MCCAY, C. M., DILLEY, W. E. and CROWELL, M. F. Growth rates of brook trout reared upon purified rations upon dry skim milk and upon feed combinations of cereal grains. *J Nutr* 1, 233–246, 1929.

MCCAY, C. M., MAYNARD, L. A., SPERLING, G. and BARNES, L. L. Retarded growth, life span, ultimate body size, and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *J Nutr* 18, 1–13, 1939.

MCCAY, Clive M. et al. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories: four figures. **The Journal of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 1939.

MCEWEN, Bruce S.; MORRISON, John H. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron*, v. 79, n. 1, p. 16-29, 2013.

MCGAUGH, James L.; ROOZENDAAL, Benno. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1-3, p. 3-14, 2009.

MCINTYRE, Roger S. et al. Obesity in bipolar disorder and major depressive disorder: results from a national community health survey on mental health and well-being. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 5, p. 274-280, 2006.

MEI, Jie et al. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

MERCKEN, Evi M. et al. Calorie restriction in humans inhibits the PI 3 K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. **Aging cell**, v. 12, n. 4, p. 645-651, 2013.

MILANESCHI, Yuri et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 18-33, 2019.

MILANESCHI, Yuri et al. Genetic association of major depression with atypical features and obesity-related immunometabolic dysregulations. **JAMA psychiatry**, v. 74, n. 12, p. 1214-1225, 2017.

MILANESCHI, Yuri et al. Leptin, abdominal obesity, and onset of depression in older men and women. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 73, n. 9, p. 10274, 2012.

MILANOVA, Irina V. et al. Mapping of microglial brain region, sex and age heterogeneity in obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3141, 2021.

MINAMIYAMA, Yukiko et al. Calorie restriction improves cardiovascular risk factors via reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 2, p. 535-543, 2007.

MOONEY, Robert A. et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and-6 associate with and inhibit the insulin receptor: a potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 25889-25893, 2001.

MOUBARAC, Jean-Claude et al. Consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health. Evidence from Canada. **Public Health Nutrition**, v. 16, n. 12, p. 2240-2248, 2013.

MOREIRA, Eduardo Luiz Gasnhar et al. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?. **Journal of neural transmission**, v. 121, p. 415-426, 2014.

MORENO-FERNÁNDEZ, Silvia et al. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1502, 2018.

MORETTI, Morgana et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of psychiatric research**, v. 46, n. 3, p. 331-340, 2012.

MORIN, V.; HOZER, F.; COSTEMALE-LACOSTE, J.-F. The effects of ghrelin on sleep, appetite, and memory, and its possible role in depression: a review of the literature. **L'Encéphale**, p. 1-8, 2017.

MORRIS, Gerwyn et al. Nutritional ketosis as an intervention to relieve astrogliosis: Possible therapeutic applications in the treatment of neurodegenerative and neuroprogressive disorders. **European Psychiatry**, v. 63, n. 1, 2020.

MOST, Jasper; REDMAN, Leanne Maree. Impact of calorie restriction on energy metabolism in humans. **Experimental gerontology**, v. 133, p. 110875, 2020.

MULDER, Monique et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. **Neuroscience research**, v. 59, n. 3, p. 251-256, 2007.

MURRAY, Christopher JL. The global burden of disease study at 30 years. **Nature medicine**, v. 28, n. 10, p. 2019-2026, 2022.

MUSSELMAN, Dominique L. et al. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 13, p. 961-966, 2001.

NADAL-CASELLAS, Antònia et al. Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 2, p. 164-172, 2012.

NAKAMURA, Yuko et al. Longitudinal association of hypertension and dyslipidemia with cognitive function in community-dwelling older adults: the SONIC study. **Hypertension Research**, p. 1-11, 2023.

NG, Marie et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2014.

NGAI, Ying Fai et al. *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice display decreased susceptibility to Western-type diet-induced obesity due to increased thermogenesis. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5226-5236, 2010.

NGUYEN, Thi Mong Diep. Adiponectin: role in physiology and pathophysiology. **International journal of preventive medicine**, v. 11, 2020.

NGUYEN, Thuy Trang et al. Role of insulin resistance in the Alzheimer's disease progression. **Neurochemical research**, v. 45, p. 1481-1491, 2020.

NISHIKAWA, Satomi et al. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. **Experimental animals**, v. 56, n. 4, p. 263-272, 2007.

O'FLANAGAN, Ciara H. et al. When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. **BMC medicine**, v. 15, p. 1-9, 2017.

OBRADOVIC, Milan et al. Leptin and obesity: role and clinical implication. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 585887, 2021.

OHGI, Y.; FUTAMURA, T.; HASHIMOTO, K. Glutamate signaling in synaptogenesis and NMDA receptors as potential therapeutic targets for psychiatric disorders. **Current molecular medicine**, v. 15, n. 3, p. 206-221, 2015.

OSBORNE, T. B., MENDEL, L. B. AND FERRY, E. R. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats. **Science** 45, 294–295, 1917.



PAGE, Melissa M.; JOHNSON, James D. Mild suppression of hyperinsulinemia to treat obesity and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 6, p. 389-399, 2018.

PALMER, Biff F.; CLEGG, Deborah J. The sexual dimorphism of obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 402, p. 113-119, 2015.

PANI, Giovambattista. Neuroprotective effects of dietary restriction: evidence and mechanisms. In: Seminars in cell & developmental biology. **Academic Press**, 2015. p. 106-114.

PARIKH, Ishita et al. Caloric restriction preserves memory and reduces anxiety of aging mice with early enhancement of neurovascular functions. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 11, p. 2814, 2016.

PARK, Seungae et al. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 2012.

PATEL, Nilay V. et al. Caloric restriction attenuates A $\beta$ -deposition in Alzheimer transgenic models. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 7, p. 995-1000, 2005.

PATIKORN, Chanthawat et al. Intermittent fasting and obesity-related health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of randomized clinical trials. **JAMA network open**, v. 4, n. 12, p. e2139558-e2139558, 2021.

PATIKORN, Chanthawat et al. Intermittent fasting and obesity-related health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of randomized clinical trials. **JAMA network open**, v. 4, n. 12, p. e2139558-e2139558, 2021.

PEDERSEN, Steen Bønløkke et al. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. **International journal of obesity**, v. 32, n. 8, p. 1250-1255, 2008.

PEEKE, Pamela M. et al. Effect of time restricted eating on body weight and fasting glucose in participants with obesity: results of a randomized, controlled, virtual clinical trial. **Nutrition & diabetes**, v. 11, n. 1, p. 6, 2021.

PELLEGRINELLI, Vanessa; CAROBBIO, Stefania; VIDAL-PUIG, Antonio. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016.

PENG, Chao et al. Sex-specific association between the gut microbiome and high-fat diet-induced metabolic disorders in mice. **Biology of sex Differences**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

PERREAULT, Mylène; MARETTE, André. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nature medicine**, v. 7, n. 10, p. 1138-1143, 2001.

PETERS, Emily C. et al. Metabolic and physical function are improved with lifelong 15% calorie restriction in aging male mice. **Biogerontology**, v. 23, n. 6, p. 741-755, 2022.

PETTERSSON, Ulrika S. et al. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. 2012.

PISTELL, Paul J. et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **Journal of neuroimmunology**, v. 219, n. 1-2, p. 25-32, 2010.

PI-SUNYER, Xavier. The medical risks of obesity. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 6, p. 21-33, 2009.

POEKES, Laurence; LANTHIER, Nicolas; LECLERCQ, Isabelle A. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. **Clinical science**, v. 129, n. 11, p. 933-949, 2015.

POLLAK, Michael N. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. **Cancer discovery**, v. 2, n. 9, p. 778-790, 2012.

POTI, Jennifer M.; BRAGA, Bianca; QIN, Bo. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health—Processing or Nutrient Content?. **Current obesity reports**, v. 6, n. 4, p. 420-431, 2017.

PREGUICA, Ines et al. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—a guide to a translational perspective. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 12, p. e13081, 2020.

PRENTKI, Marc et al. Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1802-1812, 2006.

PRESSLEY, Joyce C. et al. Dementia in community-dwelling elderly patients: A comparison of survey data, medicare claims, cognitive screening, reported symptoms, and activity limitations. **Journal of clinical epidemiology**, v. 56, n. 9, p. 896-905, 2003.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QIN, Xiaqing et al. PPAR $\gamma$ -mediated microglial activation phenotype is involved in depressive-like behaviors and neuroinflammation in stressed C57BL/6J and ob/ob mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 117, p. 104674, 2020.

QUAIL, Daniela F.; DANNENBERG, Andrew J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 139-154, 2019.

RANGAN, Priya et al. Fasting-mimicking diet modulates microbiota and promotes intestinal regeneration to reduce inflammatory bowel disease pathology. **Cell Reports**, v. 26, n. 10, p. 2704-2719. e6, 2019.

RASHID, Harun-Or et al. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. **Autophagy**, v. 11, n. 11, p. 1956-1977, 2015.

RAZAVI, Roghaye et al. The alternate-day fasting diet is a more effective approach than a calorie restriction diet on weight loss and hs-CRP levels. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 2020.

RECENA AYDOS, Leonardo et al. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57bl/6 models. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 3067, 2019.

REDMAN, Leanne M. et al. The effect of caloric restriction interventions on growth hormone secretion in nonobese men and women. **Aging cell**, v. 9, n. 1, p. 32-39, 2010.

REITZ, Christiane et al. A summary risk score for the prediction of Alzheimer disease in elderly persons. **Archives of neurology**, v. 67, n. 7, p. 835-841, 2010.

REN, Mingzhi et al. CTRP1 prevents high fat diet-induced obesity and improves glucose homeostasis in obese and STZ-induced diabetic mice. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 449, 2022.

RENQUIST, Benjamin J. et al. Melanocortin-3 receptor regulates the normal fasting response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. E1489-E1498, 2012.

RIBARIČ, Samo. Diet and aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

RIBARIČ, Samo. Diet and aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

RISTIC-MEDIC, Danijela et al. Calorie-restricted Mediterranean and low-fat diets affect fatty acid status in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 15, 2020.

ROBERTS, Rosebud O. et al. Association of diabetes with amnestic and nonamnestic mild cognitive impairment. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. 18-26, 2014.

RODGERS, Joseph T. et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 113-118, 2005.

RODRIGUES, Matheus Scarpatto et al. Nanotechnology as a therapeutic strategy to prevent neuropsychomotor alterations associated with hypercholesterolemia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 201, p. 111608, 2021.

RODRÍGUEZ-CORREA, Eduardo et al. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice?. **Nutrition & diabetes**, v. 10, n. 1, p. 24, 2020.

ROJIC-BECKER, Divka et al. Caloric restriction modulates the monoaminergic and glutamatergic systems in the hippocampus and attenuates age-dependent spatial memory decline. **Neurobiology of learning and memory**, v. 166, p. 107107, 2019.

ROSE, Giuseppina et al. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. **Experimental gerontology**, v. 38, n. 10, p. 1065-1070, 2003.

ROUS, F. The influence of diet on transplant and spontaneous tumors. **J Exp Med** 20, 433–451, 1914.

ROY, Tapash; LLOYD, Cathy E. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. **Journal of affective disorders**, v. 142, p. S8-S21, 2012.

RUDOLF, Sebastian et al. Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression. **Psychiatry research**, v. 217, n. 1-2, p. 34-38, 2014.

RUGGENENTI, Piero et al. Long-term kidney and systemic effects of calorie restriction in overweight or obese type 2 diabetic patients (C. Re. SO 2 randomized controlled trial). **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 185, p. 109804, 2022.

RUTKOWSKY, Jennifer M. et al. Reduced cognitive function, increased blood-brain-barrier transport and inflammatory responses and altered brain metabolites in LDLr<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice fed a western diet. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191909, 2018.

SACK, Markus et al. Early effects of a high-caloric diet and physical exercise on brain volumetry and behavior: a combined MRI and histology study in mice. **Brain imaging and behavior**, v. 11, n. 5, p. 1385-1396, 2017.

SALAS-VENEGAS, Verónica et al. The obese brain: mechanisms of systemic and local inflammation, and interventions to reverse the cognitive deficit. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 16, p. 798995, 2022.

SAMUEL, Varman T.; SHULMAN, Gerald I. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. **Cell metabolism**, v. 27, n. 1, p. 22-41, 2018.

SANDERS, Francis WB; GRIFFIN, Julian L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 452-468, 2016.

SARBASSOV, Dos D. et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Molecular cell**, v. 22, n. 2, p. 159-168, 2006.

SATOH, Akiko et al. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. **Cell metabolism**, v. 18, n. 3, p. 416-430, 2013.

SCHWARZ, Jean-Marc et al. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 1, p. 43-50, 2003.

SCOTT, Kate M. et al. Age patterns in the prevalence of DSM-IV depressive/anxiety disorders with and without physical co-morbidity. **Psychological Medicine**, v. 38, n. 11, p. 1659-1669, 2008.

SCOTT, Kate M. et al. Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys. **International journal of obesity**, v. 32, n. 1, p. 192-200, 2008.

SEGUELLA, Luisa et al. High-fat diet impairs duodenal barrier function and elicits glia-dependent changes along the gut-brain axis that are required for anxiogenic and depressive-like behaviors. **Journal of neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2021.

SEMIANE, Nesrine et al. High carbohydrate diet induces nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) in a desert gerbil. **Comptes rendus biologiques**, v. 340, n. 1, p. 25-36, 2017.

SERGEEVA, Ekaterina; RUKSHA, Tatiana; FEFELOVA, Yulia. Effects of Obesity and Calorie Restriction on Cancer Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9601, 2023.

SETIAWAN, Elaine et al. Association of translocator protein total distribution volume with duration of untreated major depressive disorder: a cross-sectional study. **The Lancet Psychiatry**, v. 5, n. 4, p. 339-347, 2018.

SHAHI, Shailesh K.; FREEDMAN, Samantha N.; MANGALAM, Ashutosh K. Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. **Gut microbes**, v. 8, n. 6, p. 607-615, 2017.

SHARMA, S.; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **International journal of obesity**, v. 37, n. 3, p. 382-389, 2013.

SHE, Yongbo et al. The interplay of obesity, dyslipidemia and immune dysfunction: a brief overview on pathophysiology, animal models, and nutritional modulation. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 840209, 2022.

SHENG, Dandan et al. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via activation of AMPK signaling. **Cell & bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

SHURRAB, Noura T.; ARAFA, El-Shaimaa A. Metformin: A review of its therapeutic efficacy and adverse effects. **Obesity medicine**, v. 17, p. 100186, 2020.

SIERSBÆK, Majken Storm et al. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Human physiology**. Jones & Bartlett Publishers, 2015.

SINGH, Gitanjali M. et al. The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e65174, 2013.

SINGH, Minati. Mood, food, and obesity. **Frontiers in psychology**, v. 5, p. 925, 2014.

SINGH, Rajan et al. Human brown adipose tissue and metabolic health: Potential for therapeutic avenues. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3030, 2021.

SOMEYA, Shinichi et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 802-812, 2010.

SON, Da-Hye et al. Effects of a calorie-restricted Mediterranean-style diet on plasma lipids in hypercholesterolemic South Korean patients. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3393, 2021.

SOWAH, Solomon A. et al. Calorie restriction improves metabolic state independently of gut microbiome composition: a randomized dietary intervention trial. **Genome medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2022.

SPEAKMAN, John R.; MITCHELL, Sharon E. Caloric restriction. **Molecular aspects of medicine**, v. 32, n. 3, p. 159-221, 2011.

- SPENCER, Sarah J. et al. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. **npj Science of Food**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2017.
- STERN, Jennifer H. et al. Obesity dysregulates fasting-induced changes in glucagon secretion. **Journal of Endocrinology**, v. 243, n. 2, p. 149-160, 2019.
- STERU, Lucien et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.
- STOLK, Ronald P. et al. Insulin and cognitive function in an elderly population: the Rotterdam Study. **Diabetes care**, v. 20, n. 5, p. 792-795, 1997.
- STRANAHAN, Alexis M.; MATTSON, Mark P. Impact of energy intake and expenditure on neuronal plasticity. **Neuromolecular medicine**, v. 10, n. 4, p. 209-218, 2008.
- STUBBINS, Renee E. et al. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **European journal of nutrition**, v. 51, p. 861-870, 2012.
- STUBBINS, Renee E. et al. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **European journal of nutrition**, v. 51, p. 861-870, 2012.
- SU, Xin; PENG, Daoquan. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 503, p. 128-135, 2020.
- SULLIVAN, Elinor L. et al. Evidence in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) that nighttime caloric intake is not associated with weight gain. **Obesity research**, v. 13, n. 12, p. 2072-2080, 2005.
- SUN, Dan-Qin et al. An international Delphi consensus statement on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and risk of chronic kidney disease. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 386, 2023.
- TAKEDA, Shuko et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 15, p. 7036-7041, 2010.
- TALL, Alan R. et al. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. **Cell metabolism**, v. 7, n. 5, p. 365-375, 2008.
- TAMURA, Shinji et al. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1139-1142, 2005.
- TANG, Fang; WANG, Gangpu; LIAN, Ying. Association between anxiety and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Psychoneuroendocrinology**, v. 77, p. 112-121, 2017.
- TAYLOR, Roy. Corrigendum: Calorie restriction for long-term remission of type 2 diabetes. **Clinical Medicine**, v. 19, n. 2, p. 192, 2019.
- TENG, Ling-Ling et al. Serotonin receptor HTR6-mediated mTORC1 signaling regulates dietary restriction-induced memory enhancement. **PLoS Biology**, v. 17, n. 3, p. e2007097, 2019.
- THIRUMANGALAKUDI, Lakshmi et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 475-485, 2008.
- THIRUMANGALAKUDI, Lakshmi et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 475-485, 2008.

TIAN, Li et al. Pretreatment with Tiliarin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 alpha signaling pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 139, n. 4, p. 352-360, 2019.

TIAN, Xiao Yu et al. Thermoneutral housing accelerates metabolic inflammation to potentiate atherosclerosis but not insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 165-178, 2016.

TIAN, Zhen et al. Selegiline ameliorated dyslipidemia and hepatic steatosis in high-fat diet mice. **International Immunopharmacology**, v. 117, p. 109901, 2023.

TRANDAFIR, Laura M. et al. Tackling Dyslipidemia in Obesity from a Nanotechnology Perspective. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 3774, 2022.

TUCKER, Shanna et al. The most undertreated chronic disease: addressing obesity in primary care settings. **Current obesity reports**, v. 10, p. 396-408, 2021.

UL-HAQ, Zia et al. Gender differences in the association between adiposity and probable major depression: a cross-sectional study of 140,564 UK Biobank participants. **BMC psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

ULLAH, Rahim et al. Role of nutrition in the pathogenesis and prevention of non-alcoholic fatty liver disease: recent updates. **International journal of biological sciences**, v. 15, n. 2, p. 265, 2019.

UTZSCHNEIDER, Kristina M.; KAHN, Steven E. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 12, p. 4753-4761, 2006.

VAN CAUWENBERGHE, Caroline et al. Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 7-8, p. 300-319, 2016.

VAN CAUWENBERGHE, Caroline et al. Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 7-8, p. 300-319, 2016.

VAN DER HEIJDEN, Roel A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 4, p. 256, 2015.

VAN DER HEIJDEN, Roel A. et al. Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 16474, 2015.

VAN DYKEN, Peter; LACOSTE, Baptiste. Impact of metabolic syndrome on neuroinflammation and the blood-brain barrier. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 930, 2018.

VASCONCELOS, Andrea R. et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 85, 2014.

VILLAREAL, Dennis T. et al. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 5, p. 923-934, 2005.

VINUESA, Angeles et al. Inflammation and insulin resistance as risk factors and potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 653651, 2021.

VITALE, Giovanni et al. Role of IGF-1 system in the modulation of longevity: controversies and new insights from a centenarians' perspective. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 27, 2019.

VOS, Theo et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, 2020.

WALFORD, Roy L. et al. Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 57, n. 6, p. B211-B224, 2002.

WALFORD, Roy L.; HARRIS, Steven B.; GUNION, Mark W. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 23, p. 11533-11537, 1992.

WANG, F. et al. Prevalence of comorbid major depressive disorder in Type 2 diabetes: a meta-analysis of comparative and epidemiological studies. **Diabetic Medicine**, v. 36, n. 8, p. 961-969, 2019.

WANG, Jun et al. Caloric restriction attenuates  $\beta$ -amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB journal**, v. 19, n. 6, p. 1-18, 2005.

WANG, Ruwen et al. Hypoxia as a Double-Edged Sword to Combat Obesity and Comorbidities. **Cells**, v. 11, n. 23, p. 3735, 2022.

WATTS, Gerald F. et al. Familial hypercholesterolaemia: evolving knowledge for designing adaptive models of care. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 6, p. 360-377, 2020.

WEBB, Victoria L.; WADDEN, Thomas A. Intensive lifestyle intervention for obesity: principles, practices, and results. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1752-1764, 2017.

WEIR, Heather J. et al. Dietary restriction and AMPK increase lifespan via mitochondrial network and peroxisome remodeling. **Cell metabolism**, v. 26, n. 6, p. 884-896. e5, 2017.

WEISBERG, Stuart P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEISS, Edward P.; FONTANA, Luigi. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 4, p. H1205-H1219, 2011.

WEN, Xue et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 298, 2022.

WHARTON, Sean et al. Obesity in adults: a clinical practice guideline. **Cmaj**, v. 192, n. 31, p. E875-E891, 2020.

WIECHERT, Meike; HOLZAPFEL, Christina. Nutrition concepts for the treatment of obesity in adults. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 169, 2021.

WILKINSON, Michael J. et al. Ten-hour time-restricted eating reduces weight, blood pressure, and atherogenic lipids in patients with metabolic syndrome. **Cell metabolism**, v. 31, n. 1, p. 92-104. e5, 2020.

WILLCOX, Bradley J. et al. Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging: the diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1114, n. 1, p. 434-455, 2007.

WILLCOX, Bradley J.; WILLCOX, Donald C. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 17, n. 1, p. 51-58, 2014.

WITTE, A. V. et al. Caloric restriction improves memory in elderly humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1255-1260, 2009.

WITTE, Maarten E. et al. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration?. **Mitochondrion**, v. 10, n. 5, p. 411-418, 2010.

WOELFER, Marie et al. The role of depressive subtypes within the neuroinflammation hypothesis of major depressive disorder. **Neuroscience**, v. 403, p. 93-110, 2019.

WOLF, Andrea et al. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. **PloS one**, 2016.

WOLFRUM, Christian et al. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1027-1032, 2004.

WOLSKA, Anna et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. **Atherosclerosis**, v. 267, p. 49-60, 2017.

WOODS, Stephen C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization obesity and overweight fact sheet**. 2000, 2014, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *OBESITY: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894)* (WHO, 2000).

WU, Aiguo; YING, Zhe; GOMEZ-PINILLA, Fernando. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1699-1707, 2004.

WU, Betty N.; O'SULLIVAN, Anthony J. Sex differences in energy metabolism need to be considered with lifestyle modifications in humans. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2011, 2011.

WU, Qi et al. Dietary regulation in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 252, 2022.

XIAO, Changting et al. Emerging role of lymphatics in the regulation of intestinal lipid mobilization. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1604, 2020.

XIE, Zhonglin et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1770-1778, 2011.

XU, Haiyan et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

XU, Ning et al. Sterol O-acyltransferase 1 deficiency improves defective insulin signaling in the brains of mice fed a high-fat diet. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 499, n. 2, p. 105-111, 2018.

YAN, Liting et al. HGF can reduce accumulation of inflammation and regulate glucose homeostasis in T2D mice. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 77, n. 4, p. 613-624, 2021.

YANCKELLO, Lucille M. et al. Caloric restriction alters postprandial responses of essential brain metabolites in young adult mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 90, 2019.

YANG, Ming-Hui et al. Reversal of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by metformin combined with PGG, an inducer of glycine N-methyltransferase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 10072, 2022.



YANG, Yongbin et al. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. **Obesity**, v. 22, n. 10, p. 2147-2155, 2014.

YIN, Zhangyuan; PASCUAL, Clarence; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy: machinery and regulation. **Microbial cell**, v. 3, n. 12, p. 588, 2016.

YOON, J. Cliff et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 131-138, 2001.

YU, Guann-Yi et al. Hepatic expression of HCV RNA-dependent RNA polymerase triggers innate immune signaling and cytokine production. **Molecular cell**, v. 48, n. 2, p. 313-321, 2012.

YU, Shui-Lian et al. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

ZAMBÓN, Daniel et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. **The American journal of medicine**, v. 123, n. 3, p. 267-274, 2010.

ZANNIS, Vassilis I.; CHRONI, Angeliki; KRIEGER, Monty. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **Journal of molecular medicine**, v. 84, p. 276-294, 2006.

ZEMDEGS, Juliane et al. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 13, p. 2095-2110, 2016.

ZHANG, Jiudan et al. The Regulation and Secretion of Glucagon in Response to Nutrient Composition: Unraveling Their Intricate Mechanisms. **Nutrients**, v. 15, n. 18, p. 3913, 2023.

ZHANG, Li et al. Beneficial effects on brain micro-environment by caloric restriction in alleviating neurodegenerative diseases and brain aging. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 715443, 2021.

ZHANG, Li et al. Protective effects of calorie restriction on insulin resistance and islet function in STZ-induced type 2 diabetes rats. **Nutrition & metabolism**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2021.

ZHANG, Qing et al. Intermittent fasting versus continuous calorie restriction: which is better for weight loss?. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1781, 2022.

ZHANG, Shaohong et al. Short-term moderate caloric restriction in a high-fat diet alleviates obesity via AMPK/SIRT1 signaling in white adipocytes and liver. **Food & Nutrition Research**, 2022.

ZHANG, Yi et al. Obesity: pathophysiology and intervention. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5153-5183, 2014.

ZHANG, Yifan et al. The effects of calorie restriction in depression and potential mechanisms. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 4, p. 536-542, 2015.

ZHANG, Yiying et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZHAO, G. et al. Depression and anxiety among US adults: associations with body mass index. **International journal of obesity**, v. 33, n. 2, p. 257-266, 2009.

ZHAO, G. et al. Depression and anxiety among US adults: associations with body mass index. **International journal of obesity**, v. 33, n. 2, p. 257-266, 2009.

ZHOU, Zhi-Lan et al. Neuroprotection of fasting mimicking diet on MPTP-induced Parkinson's disease mice via gut microbiota and metabolites. **Neurotherapeutics**, v. 16, p. 741-760, 2019.

ZHUANG, Hong et al. Long-term high-fat diet consumption by mice throughout adulthood induces neurobehavioral alterations and hippocampal neuronal remodeling accompanied by augmented microglial lipid accumulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 100, p. 155-171, 2022.

ZIMMERMAN, Benjamin et al. The effect of high fat diet on cerebrovascular health and pathology: a species comparative review. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3406, 2021.

ZOU, Lili et al. High-cholesterol diet promotes depression-and anxiety-like behaviors in mice by impact gut microbe and neuroinflammation. **Journal of Affective Disorders**, v. 327, p. 425-438, 2023.

ZOU, Xiaohan et al. Role of leptin in mood disorder and neurodegenerative disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 378, 2019.

ZWARTJES, Max SZ; GERDES, Victor EA; NIEUWDORP, Max. The role of gut microbiota and its produced metabolites in obesity, dyslipidemia, adipocyte dysfunction, and its interventions. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 531, 2021.