



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

**EFEITO DAS DIETAS HIPOPROTEICA E HIPERLIPÍDICA EM MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE**

**FORTALEZA
2019**

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

EFEITO DAS DIETAS HIPOPROTEICA E HIPERLIPÍDICA EM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como exigência parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

FORTALEZA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D32e de Aquino, Cristhyane Costa.
EFEITO DAS DIETAS HIPOPROTEICA E HIPERLIPÍDICA EM MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE DA BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE /
Cristhyane Costa de Aquino. – 2019.
112 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. barreira hemato-encefálica. 2. hipocampo,. 3. ansiedade. 4. desnutrição. 5. obesidade.
I. Título.

CRISTHYANE COSTA DE AQUINO

EFEITO DAS DIETAS HIPOPROTEICA E HIPERLIPÍDICA EM MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como exigência parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dr. Orleancio Gomes Ripardo de Azevedo
Faculdade de Odontologia Paulo Picanço

Prof. Dr. João José Oliveira Malva
Universidade de Coimbra - UC

Prof. Dr. Francisco de Assis Aquino Gondim
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus e à minha mãe,
Divânia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo o caminho percorrido e luz na minha vida. A Nossa Senhora por toda intercessão e sempre me permitindo sentir paz e tranquilidade.

À minha família por todo o apoio e torcida, minha irmã, Thycianne Costa, meu pai, Francisco Aquino, minhas primas (Fernanda, Laryssa e Myrlla), tias e tios e meu carinho especial por um ser iluminado que deixou um grande vazio na nossa família, o meu grande amigo e tio Luís Cavalcante Vale (*in memoriam*).

Aos meus amigos alunos e ex alunos do Labiconte, que estiveram ao meu lado em toda essa trajetória: Lianna, Carolina Benício, Fátima Virgínia, Gabriella Matos, Juan Roriz, Juliana Rêgo, Amanda Ribeiro, Juliana Zani, Kildere Canuto, Leonardo, Raul, Cássia, Tiê, Kalina, Josiane, Amanda Aragão, Celina, Orleânio, Rosângela, Ricardo, Claudiane, Daniel Moreira, Dulce, Daniel Pinto.

Em especial ao amigo Luís Antônio que me recebeu em Coimbra e ajudou na minha acomodação. Teve muita paciência para repassar todos os protocolos do presente estudo e iniciou toda a pesquisa para que eu pudesse concluí-la. Aos colegas que conquistei nesses anos com muita parceria na pós-graduação: Camila Fernandes, Iury, Cássio, entre outros.

Minhas amigas de graduação, que sei que torcem por mim: Rayssa Frota, Thainá Lopes, Raquel Bessa, Lara Cavalcante, Ariella. Os amigos da época de colégio que sempre estão por perto: Estevão, Neto (Chama), Thiago e Atyla.

Não poderia deixar de agradecer o apoio recebido pela instituição em que trabalho (UNIFAMETRO) em nome da ex-coordenadora profa. Eva Vasconcelos que permitiu minha ausência durante um mês para conclusão dos experimentos na Universidade de Coimbra. Agradeço também o apoio, colaboração e incentivo das professoras e colegas de trabalho profa Camila Pinheiro, profa Alane Nogueira, prof Karla Pinheiro, profa Isabela Limaverde, profa Isadora Vasconcelos, profa Raquel Paim, prof Felipe Magalhães, prof Edson, profa Priscila Pereira, profa Larissa Aguiar, profa Jacqueline, entre outros.

Meu agradecimento especial ao prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, por ter me recebido em seu laboratório, por toda orientação e oportunidades acadêmicas a mim confiadas. Se cheguei onde estou, foi consequência desses sete anos trabalhando em seu laboratório.

À Universidade de Coimbra, em nome dos profs. Drs. João Malva, Ana Paula Silva e toda equipe (especialmente ao pós-doutorando Ricardo Leitão) que me acolheram nessa cidade encantadora. Foi a melhor experiência de vida e profissional que obtive. Não tenho palavras para agradecer a esses dois mestres que me ensinaram a ter um olhar mais crítico, ético e foram responsáveis pelo meu amadurecimento científico. Obrigada de coração por todas as orientações, puxões de orelha e acolhimento, vocês são incríveis. É com sempre se diz: “Uma vez Coimbra, para sempre saudades”.

Todas as pessoas especiais que cruzaram meu caminho nessa jornada em terras portuguesas: as funcionárias do IBILI (Dona Fernanda e Dona Piedade), e os amigos que conquistei por esse mundo a fora: Gisele, Allana, Thomaz, Alice, Tiago, Carol, Ingrid, Stefany, Douglas, são vários e peço perdão de não citar todos, mas foram fundamentais e especiais.

A minha querida Universidade Federal do Ceará, do qual tenho imenso orgulho, em especial ao IBISAB e seus funcionários que além de amigos me apoiaram em momentos de angustias e tristeza (José Amadeus, Jeferson, Claudia, João, Marcilio, Valdenir, Cátia, Charles, Terezinha).

Aos membros da minha banca de doutorado: profs. Drs. Veralice Bruin, profa. Flávia Almeida, Francisco de Assis Gondim e ao meu amigo suplente prof. Dr. Carlos Câmara.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas por mais uma vez ter me ajudado, em especial a Ivone e a Rita.

Ao projeto pesquisador visitante especial (PVE) para o prof. Dr. João Oliveira Malva do CNPq e ao projeto PROCAD da CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que me ajudaram nessa jornada.

“ Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Carolina

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua
própria produção ou a sua construção”

Paulo Freire

RESUMO

A transição nutricional tem afetado grande parte dos países emergentes, devido às mudanças socioeconômicas. Os perfis dietéticos hipoproteico e hiperlipídico têm caracterizado o consumo alimentar de populações carentes. Diante disso, o SNC apresenta sensibilidade notória aos diferentes perfis nutricionais, resultando em mudanças nas suas funções estruturais e cognitivas. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito das dietas regional básica (DRB) e hiperlipídica (DH) em marcadores de estresse oxidativo, inflamação e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo e sua associação com comportamento de ansiedade. Foram utilizados camundongas fêmeas gestantes C57BL/6J submetidas a seis dias de dieta padrão (DC), e a partir do 11º dia pós-parto, foram alocadas em três grupos recebendo diferentes dietas (DC), (DRB) e (DH), sendo os filhotes desmamados e alimentados com a dieta do respectivo grupo de suas matrizes a partir do 21º pós-natal ao 52º dia (n=76). O soro foi coletado para análise de perfil lipídico (colesterol total sérico e hepático, HDL, LDL e triglicérides sérico e hepático), usando kits laboratoriais, bem como a dosagem das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-10) por imunoenensaio de absorção enzimática (ELISA). Amostras de hipocampo foram dissecadas e armazenadas para determinação de estresse oxidativo, avaliando o nível de peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído (MDA) por ELISA. A expressão de proteínas como GFAP e S100 β , marcadores de ativação astrocitária, caveolina 1 (cav1), claudina-5 e albumina (marcadores estruturais de barreira), e VCAM-1, foi quantificada pela técnica de *western blotting* e de imunofluorescência, sendo a última acompanhada de avaliação da imunorreatividade de colágeno IV. Ademais, foi feita análise morfológica de processo astrocítico por meio de *software* específico. O teste de labirinto de cruz elevado foi usado para investigar o comportamento de ansiedade dos animais. O ganho de peso corporal foi observado no grupo DH, e o decréscimo no grupo DRB, ambos comparados ao controle. Os níveis séricos de colesterol total sérico (p<0.003) e hepático (p<0.001), LDL (p<0.004) e triglicérides sérico e hepático (p<0.001) foram significativamente maiores no grupo DH, enquanto as concentrações de HDL sérico (p<0.003) foram significativamente menores no grupo DRB, em comparação aos demais. Em relação às citocinas séricas avaliadas, IL-1 β apresentou maiores níveis no grupo DH (p<0.01), seguido pelo DRB (p<0.05); TNF- α (p<0.001) com níveis elevados no grupo DRB, seguido pelo HF (p<0.01); e IL-10 em baixas concentrações no grupo DH (p<0.01), seguido pelo DRB (p<0.05), quando comparados ao grupo controle. A concentração sérica de MDA apresentou aumento significativo no grupo DH (p<0.001), quando comparado aos demais grupos. As análises de *western blotting* demonstraram aumento significativo na expressão de albumina e diminuição na de claudina-5 tanto no grupo DRB (p<0.05) quanto no DH (p<0.01). Em relação aos níveis de proteína cav1, houve um aumento significativo de seus níveis totais no grupo da DH (p<0.05). DRB (p<0.0001) e DH (p<0.05) induziram uma diminuição significativa na imunorreatividade ao colágeno IV. Além disso, ambas as dietas (DH, p<0.001; DRB, p<0.05) induziram um aumento significativo na VCAM-1. Aumento significativo na expressão de GFAP e de imunorreatividade foi observado nos grupos DRB (p<0.05) e DH (p<0.001). Maior expressão de S100 β foi identificada no grupo DH (p<0.01), seguido pelo DRB (p<0.05). Ademais, aumento no número total e comprimento de processos astrocíticos foi observado no grupo DH (p<0.01). O presente estudo sugere que ambas as dietas induzem alterações estruturais na BHE hipocampal, bem como desencadeamento de resposta inflamatória e de estresse oxidativo, com indução do comportamento de ansiedade em camundongos.

Palavras-chaves: barreira hemato-encefálica, hipocampo, ansiedade, inflamação, estresse oxidativo, desnutrição, obesidade

ABSTRACT

The nutritional transition has affected most emerging countries due to socioeconomic changes. Hypoproteic and hyperlipidic dietary profiles have characterized the food intake of poor populations. In view of this, the CNS presents notorious sensitivity to different nutritional profiles, resulting in changes in their structural and cognitive functions. The aim of this study was to evaluate the effect of basic regional (RBD) and hyperlipidic (HF) diets on markers of oxidative stress, inflammation and blood-brain barrier (BBB) permeability in the hippocampus and its association with anxiety behavior. Pregnant C57BL / 6J female mice subjected to six days of standard diet (DC) were used, and from the 11th postpartum day, they were allocated to three groups receiving different diets (CD), (DRB) and (HF). The weaned offspring and fed the diet of the respective group of their mothers from the 21st postnatal to the 52nd day (n = 76). Serum was collected for lipid profile analysis (serum and hepatic total cholesterol, HDL, LDL and serum and hepatic triglycerides), using laboratory kits, as well as the measurement of serum concentrations of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-10) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hippocampal samples were dissected and stored for oxidative stress determination, assessing the level of lipid peroxidation by quantification of malondialdehyde (MDA) by ELISA. The expression of proteins such as GFAP and S100 β , astrocyte activation markers, caveolin 1 (cav1), claudin-5 and albumin (structural barrier markers), and VCAM-1 was quantified by western blotting and immunofluorescence technique. last accompanied by evaluation of collagen immunoreactivity IV. In addition, morphological analysis of astrocytic process was made through specific software. The elevated cross maze test was used to investigate the animals' anxiety behavior. Body weight gain was observed in HF group, and decrease in DRB group, both compared to control. Serum total (p <0.003) and hepatic (p <0.001), LDL (p <0.004) and serum and hepatic triglycerides (p <0.001) levels were significantly higher in the HF group, while serum HDL (p <0.003) were significantly lower in the DRB group compared to the others. Regarding the serum cytokines evaluated, IL-1 β presented higher levels in the HF group (p <0.01), followed by DRB (p <0.05); TNF- α (p <0.001) with elevated levels in the DRB group, followed by HF (p <0.01); and IL-10 at low concentrations in the HF group (p <0.01), followed by DRB (p <0.05) when compared to the control group. Serum MDA concentration showed a significant increase in the HF group (p <0.001) when compared to the other groups. Western blotting analysis showed a significant increase in albumin expression and a decrease in claudin-5 in both the DRB (p <0.05) and HF (p <0.01) groups. Regarding the levels of cav1 protein, there was a significant increase in its total levels in the HF group (p <0.05). DRB (p <0.0001) and HF (p <0.05) induced a significant decrease in collagen IV immunoreactivity. In addition, both diets (HF, p <0.001; DRB, p <0.05) induced a significant increase in VCAM-1. Significant increase in GFAP expression and immunoreactivity was observed in the DRB (p <0.05) and HF (p <0.001) groups. Higher expression of S100 β was identified in the HF group (p <0.01), followed by DRB (p <0.05). In addition, an increase in the total number and length of astrocytic processes was observed in the HF group (p <0.01). The present study suggests that both diets induce structural alterations in hippocampal BBB, as well as triggering inflammatory response and oxidative stress, inducing anxiety behavior in mice.

Key words: blood-brain barrier, hippocampus, anxiety, inflammation, oxidative stress, malnutrition, obesity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema demonstrativo da transição nutricional e demográfica.....	19
Figura 2 –	Componentes celulares da BHE.....	27
Figura 3 –	Barreiras sangue-neurais presentes no SNC.....	29
Figura 4 –	Representação esquemática da localização de astrócitos na unidade neurovascular.....	35
Figura 5 –	Mecanismos de acesso ao SNC através da BHE.....	46
Figura 6 –	Diagrama do protocolo experimental para os camundongos durante o período de indução da desnutrição e obesidade.....	52
Figura 7 –	Teste do labirinto em cruz elevado.....	55
Figura 8 –	Curva de peso dos animais experimentais monitorados a cada três dias, submetidos às dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	60
Figura 9 –	Foto representativa das diferenças do peso dos animais nos grupos experimentais com 52 dias de idade.....	61
Figura 10 –	Foto representativa da gordura visceral dos animais dos grupos experimentais com 52 dias de idade.....	62
Figura 11 –	Análise do comportamento dos animais pelo Teste do Labirinto Elevado.....	63
Figura 12 –	Dosagem de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle...	65
Figura 13 –	Dosagem de LDL sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	66
Figura 14 –	Dosagem de HDL sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	67
Figura 15 –	Dosagem Triglicerídeos sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	68
Figura 16 –	Dosagem de colesterol hepático total (mg/100mg) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	69
Figura 17 –	Dosagem Triglicerídeos Hepáticos total (mg/100mg) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.....	70

Figura 18 –	Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) na resposta periférica por mediadores inflamatórios.....	72
Figura 19 –	Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) na resposta neuroinflamatória do hipocampo.....	73
Figura 20 –	Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) nas propriedades da barreira hematoencefálica.....	76
Figura 21 –	Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) nas propriedades dos astrócitos.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores nutricionais e constituintes das dietas: padrão (CTL), DRB e HF.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
Cav 1	Caveolina 1
CTL	Controle
DCG	Doenças crônico-degenerativas
DEPPD	Dietilparafenilenodiamina
DH	Dieta Hiperlipidêmica
DP	Desvio-padrão
DPN	Dia pós-natal
DRB	Dieta Regional Básica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENDF	Estudo Nacional sobre Saúde e Nutrição
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-10	Interleucina 10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
PBS	Tampão fosfato-salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PFA	Paraformaldeído
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SNC	Sistema Nervoso Central

SNP	Sistema Nervoso Periférico
TBARs	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM	Proteína 1 de adesão celular vascular
ZO	Zona de Oclusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Transição Nutricional	18
1.2 Dietas	23
1.2.1 <i>Dieta Regional Básica</i>	23
1.2.2 <i>Dieta Hiperlipidêmica</i>	24
1.2.3 <i>Repercussões das dietas no SNC</i>	24
1.3 Barreira Hematoencefálica (BHE)	26
1.3.1 <i>Aspectos Gerais</i>	27
1.3.2 <i>Componentes Estruturais da BHE</i>	30
1.3.2.1 <i>Unidade Neurovascular</i>	30
1.3.2.1a <i>Células endoteliais</i>	30
1.3.2.1b <i>Pericitos</i>	31
1.3.2.1c <i>Lâmina basal</i>	34
1.3.2.1d <i>Astrócitos</i>	34
— <i>Astrócitos protoplasmáticos</i> —.....	35
— <i>Astrócitos fibrosos</i> —.....	36
— <i>Astrócitos interlaminares</i> —.....	36
1.4 GFAP	37
1.4.1 <i>Funções do GFAP</i>	38
1.5 S100β	39
1.6 Glutamina-sintetase e Transportadores de Glutamato	39
1.7 Neurônios e interneurônios	40
1.8 Micróglia	41
1.9 Funcionalidade da BHE	43
1.9.1 <i>Permeabilidade da BHE</i>	44
1.9.2 <i>O papel do astrócito na BHE</i>	47
1.10 Resposta inflamatória e estresse oxidativo no SNC	48
2 OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Animais e aspectos éticos	51
3.1.1 <i>Acompanhamento dos animais</i>	51
3.2 Delineamento experimental	52
3.3 Dietas	53

3.4 Análise Comportamental pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	55
3.5 Análise do perfil lipídico.....	56
3.6 Determinação de marcadores de estresse oxidativo.....	56
3.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	57
3.8 <i>Western blotting</i>.....	57
3.9 Imunofluorescência.....	58
3.10 Análise Morfológica de Processo Astrocítico.....	59
3.11 Estatística.....	59
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Avaliação das mudanças de peso corporal dos grupos experimentais das dietas regional básica (DRB), hiperlipidêmica (DH) e controle (CTL).....	60
4.2 Avaliação comportamental pelo Labirinto Elevado.....	63
4.3 Determinação do Perfil Lipídico (Soro e Tecido Hepático).....	64
4.4 Determinação de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação.....	71
4.5 Alterações morfofuncionais da Barreira Hematoencefálica (BHE).....	74
4.6 Marcadores moleculares de Astroglíose Reativa.....	78
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transição Nutricional

A saúde da população humana tem sido afetada por uma série de mudanças na dieta ao longo do tempo e mudança do estado nutricional, pela influência das transformações socioeconômicas associadas às sociedades agrícolas, sociedades industrializadas e urbanizadas, até as recentes transformações na sociedade moderna na época atual (WHO, 2012).

O significado da palavra “transição” foi aplicado a um estudo de populações humanas sendo utilizado inicialmente por Omran (1971) em seu estudo “*The Epidemiologic Transition*”. Ele descreveu a transição epidemiológica como uma mudança de um padrão da alta prevalência de doenças de origem infecciosa associada a períodos de inanição, desnutrição e condições precárias de saneamento, para uma mudança de maior prevalência em doenças crônicas degenerativas (DCG), associadas a um estilo de vida mais urbano e industrializado (BATISTA FILHO *et al.*, 2003). Em consequência desta transição epidemiológica, houve a transição demográfica caracterizada pela mudança de um padrão de alta fertilidade e mortalidade para um padrão de baixa fertilidade e mortalidade (BRASIL *et al.*, 2011). Na sociedade brasileira, as taxas reprodutivas mudaram acentuadamente, transitando de um quadro em que as mães tinham um total de 6 a 8 filhos, para um em que nascem em média 2 a 3 filhos por mulher. A mortalidade infantil caiu substancialmente, declinando de patamares acima de 300 óbitos por mil nascidos vivos em várias regiões do Brasil na década de 40, para níveis nacionais médios de 30 por mil nascidos vivos (SANTOS, 2013).

Apesar de o Brasil viver em um contexto de conflitos econômicos, políticos e sociais, o país mudou substancialmente nos últimos anos, seja por conta de fatores externos, oriundos da globalização, seja pelas circunstâncias e processos históricos e culturais. Inverteram-se os termos da ocupação demográfica do espaço físico: de uma população fundamentalmente rural, na época dos anos 50, passando a condição de um país urbano (IBGE, 2010), com mais de 80% das pessoas migrando para as cidades.

Implícitos à rápida transição demográfica, particularmente acelerada no período 1960-1980, houve outras mudanças significativas, relacionadas a

ocupações e empregos, passando de um mercado de trabalho estabelecido no setor primário (agropecuária e extrativismo) para uma demanda de mão-de-obra concentrada no setor secundário e, sobretudo, no setor terciário da economia. Tais transformações foram cruciais, no que se refere à geração de renda, estilos de vida e, especificamente, demandas nutricionais (FERREIRA *et al.*, 2004). A **figura 1** esquematiza os efeitos e as consequências dessa transição demográfica, demonstrando os padrões da sociedade, o tipo de alimentação, composição nutricional e expectativa de vida (POPKIN, 2015).

Figura 1. Esquema ilustrativo da transição nutricional e demográfica e consequência no padrão nutricional.



Fonte: Adaptado de Popkin, 2015.

Apesar de não ter ocorrido aumentos históricos da renda nominal, o valor relativo do produto *per capita* aumentou significativamente, sobretudo na década de 70, por força da diminuição em mais de 50% do tamanho da família economicamente dependente (devido a menor taxa de fecundidade) e da participação crescente da mulher no mercado de trabalho (PATARRA, 2000;

YUNES, 2000). Porém, a distribuição social de renda não melhorou, mantendo-se ou até aumentando o diferencial entre ricos e pobres, de forma que o Brasil é um dos três países mais desigual do mundo no que se refere à partilha social das riquezas produzidas e extremos de classes sociais.

Outro aspecto de grande relevância é a compreensão do cenário epidemiológico dos problemas alimentares/nutricionais que se configura nas disparidades regionais de renda, com as regiões mais pobres (Norte e Nordeste) desfrutando de uma renda *per capita* que corresponde pouco mais de 1/4 da renda individual disponível nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, sem esquecer na distribuição de renda entre o meio rural (bem mais pobre) e o urbano, acentuadamente nas regiões Norte e Nordeste (FERREIRA *et al.*, 2016).

A transição nutricional que as populações do século XX e XXI vivenciaram, encontra-se profundamente relacionada à transição epidemiológica e demográfica, com associação ao consumo de uma dieta hipercalórica, principalmente rica em gorduras saturadas e açúcares simples associado a um estilo de vida cada vez mais sedentário e com menor tempo para o lazer (POPKIN, 2015).

Ao mesmo tempo em que diminui a ocorrência da desnutrição em crianças e adultos num ritmo bem acelerado, estudos efetuados nas últimas três décadas têm confirmado um caráter pan-epidêmico da obesidade a nível mundial e no Brasil (SANTOS, 2013). Nos últimos anos, o índice de obesidade aumentou e, segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2016 houve mais de 1,9 bilhões de pessoas com sobrepeso e 650 milhões foram consideradas obesas (WHO 2018). No Brasil, a obesidade aumentou 60% em 10 anos, e a prevalência passou de 11,8% para 18,9 % em 2016 (Brasil, 2017). A mudança do perfil de desnutrição para sobrepeso/obesidade, mesmo em populações mais pobres, é uma das características marcantes do processo de transição nutricional do país.

No mundo, a *World Obesity Federation/International Obesity Task Force* (WOF/IOTF) estima que até 200 milhões de crianças em idade escolar estão com sobrepeso ou obesidade, sendo que 50 milhões são classificados como obesos. Nos 27 estados membros da União Europeia, cerca de 60% dos adultos e mais de 20% das crianças em idade escolar estão acima do peso ou obesas, equivalendo a, aproximadamente, 260 milhões de adultos e mais de 12 milhões de crianças com sobrepeso ou obesidade. (WOF/IOTF, 2015)

Através dos resultados de duas pesquisas (Estudo Nacional da Despesa Familiar em 1974/75 (ENDEF) e a Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição em 1989 (PNSN), observou-se a diminuição da desnutrição entre crianças e adultos e, em contrapartida, o aumento da prevalência da obesidade entre adultos e a estabilidade deste problema entre crianças. (MELO *et al.*, 2010). POPKIN (2015) enumera quatro forças condutoras para as modificações dos padrões de atividade física e de alimentação que contribuíram para o aumento da prevalência de obesidade no mundo: 1) a tecnologia permitiu a redução do esforço físico em relação às atividades domésticas, ocupacionais, de locomoção e de lazer; 2) o processo de urbanização afetou a densidade populacional e está associado ao acesso a uma ampla variedade de alimentos em sua maioria processados, atividades de *marketing* do setor de alimentos processados que promovem o consumo de alimentos prontos para comer, rotinas que não são compatíveis com o preparo de alimentos em casa ou que exigem esforço para sua realização; 3) mudança na renda per capita e redução do custo dos alimentos, o preço real de muitos alimentos embalados e bebidas caiu; 4) expansão do mercado global de serviços permitindo acesso à tecnologia.

Duas importantes alterações do estado nutricional ocorrem de desordens do balanço energético do organismo: a desnutrição e a obesidade. A desnutrição resulta de um balanço energético negativo em consequência da interação entre o consumo insuficiente de alimentos e/ou a presença de doenças que comprometem a absorção dos alimentos consumidos. A obesidade é resultado de um balanço energético positivo, ocasionado pela interação entre um consumo energético excessivo e/ou um modelo reduzido de atividade física. Distúrbios nutricionais, decorrentes tanto do déficit como do excesso alimentar, determinam consequências importantes para a saúde dos indivíduos (HESKET *et al.*, 2004).

A desnutrição precoce pode afetar o desenvolvimento, comprometendo a plasticidade cerebral e a capacidade cognitiva. Etapas do desenvolvimento cerebral, incluindo proliferação e migração neuronais, mielinização, astrocitogênese e morte celular programada são alterações ocasionadas pela desnutrição proteica (FLEEGAL-DE-MOTTA *et al.*, 2009).

Estudos experimentais indicam regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) que são mais sensíveis aos efeitos da desnutrição, tais como córtex cerebral e hipocampo. Do ponto de vista experimental, quando utilizamos modelos animais,

são muitas evidências sobre o efeito deletério da desnutrição, entretanto, do ponto de vista clínico, ainda persistem questionamentos, já que são poucos os estudos realizados de forma sistemática que tenham avaliado esta condição (LAWTHER *et al.*, 2011).

Uma nutrição adequada é essencial para o desenvolvimento estrutural, maturacional e funcional do sistema nervoso (DIAZ-CINTRA *et al.*, 2017). Alguns fatores são cruciais referentes à como e em que extensão esse déficit nutricional afeta o sistema nervoso central, a saber: (1) o tipo de nutriente que não está sendo ingerido ou de maneira insuficiente; nesse sentido, a desnutrição proteica é considerada a mais importante, visto que, uma dieta deficiente quanto à ingestão de proteína, leva a um prejuízo na ingestão de aminoácidos essenciais que são necessários para a síntese proteica estrutural de enzimas, neuropeptídeos e neurotransmissores (GALLER *et al.*, 2016); (2) a duração do déficit nutricional (desnutrição por períodos curtos ou longos); (3) a intensidade da desnutrição (leve, severa ou moderada); e (4) a idade em que se inicia a desnutrição.

Em relação à idade em que a desnutrição acontece, a literatura aponta para a existência de um período crítico de rápido crescimento cerebral, no qual acontecem processos organizacionais precoces como a neurogênese, mielinização, migração, organização sináptica e diferenciação celular, que estão intimamente dependentes dos aminoácidos provenientes da dieta (aminoácidos essenciais) (DA SILVA *et al.*, 2016). Nos seres humanos, o período crítico se estende desde o terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida (MORGANE *et al.*, 2003).

Diversas alterações no organismo também estão associadas à obesidade, entre elas um processo inflamatório denominado metainflamação, acompanhada da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF e IL-6 que contribuem para a resistência à insulina e para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (LUMENG, 2013). Ainda, a obesidade está relacionada com a intolerância à glicose, aumento de adipocinas pró-inflamatórias, como leptina e diminuição de adipocinas anti-inflamatórias, como adiponectina (OSBORN e OLEFSKY 2012, LUMENG 2013, PEREIRA e ALVAREZ-LEITE 2014).

Os macrófagos M1 são caracterizados como as principais células da metainflamação induzida pela obesidade. A produção de TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 β , além da produção de ROS e a expressão de iNOS nos macrófagos M1 contribuem para indução da resistência à insulina (FUJISAKA, USUI *et al.*, 2009). Entretanto, os

macrófagos M2 estão associados ao remodelamento, ao reparo tecidual, a sensibilidade à insulina e a resolução da inflamação (OUCHI, PARKER *et al.*, 2011). Dessa forma, durante a obesidade, macrófagos M1, TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 β , NO e espécies reativas de oxigênio (EROS) contribuem para desencadear a síndrome metabólica.

A síndrome metabólica é uma condição associada a alguns fatores essenciais como intolerância à glicose, obesidade com aumento da circunferência abdominal, hipertensão e dislipidemias, que podem ou não ser acompanhados de outras alterações, que ao longo da vida evolui para quadros cada vez mais graves, dentre eles, o aumento do risco e incidência de doenças cardiovasculares (MORRELL *et al.*, 2012).

1.2 Dietas

1.2.1 Dieta Regional Básica

A dieta regional básica (DRB), utilizada em modelos experimentais de indução ao estado de desnutrição proteico-energética, representa o padrão de consumo alimentar multideficiente do Nordeste brasileiro (área de desnutrição endêmica). Através de inquéritos alimentares de populações carentes, foi elaborada uma dieta constituída pelos quatro alimentos mais consumidos na região: feijão mulatinho, batata doce, farinha de mandioca e charque (carne bovina salgada e prensada). A DRB proposta por Teodósio *et al.* (1990) fornece: 7,87% de proteína, 69,69% de carboidratos e 0,95% de lipídios; 1,26% sais minerais; 7,21% de fibra e 336,15 calorias em 100g.

Até então, essa dieta tem sido utilizada em diversos estudos, incluindo a avaliação da morfometria cardíaca de ratos expostos à desnutrição e ao etanol no período perinatal (ARAUJO-FILHO *et al.*, 2007); na avaliação do efeito da desnutrição intra-uterina e pós-natal sobre a progressão da resposta inflamatória aguda e crônica (DA SILVA *et al.*, 2016); para verificar o efeito da desnutrição sobre o perfil de ácidos graxos do leite materno, o crescimento e o desenvolvimento (SOUZA *et al.*, 2009); e ainda na ontogenia de reflexos neonatais e locomoção em ratos (BARROS *et al.*, 2006)

Considerada uma dieta isocalórica e hipoproteica, apresenta proporções inadequadas na quantidade e qualidade das proteínas, calorias, gordura, vitaminas e

minerais. Embora todos os nutrientes tenham influência no desenvolvimento cerebral, a deficiência de proteínas é um fator determinante para o comprometimento das funções neurológicas (PRAZERES *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2016).

1.2.2 Dieta Hiperlipídica

A dieta hiperlipídica (DH), em contrapartida, é utilizada em modelos experimentais de indução à obesidade ou dislipidemia, transtornos considerados uma epidemia mundial. No Brasil, estudos comprovaram que a transição nos padrões nutricionais está refletindo na diminuição progressiva da desnutrição e no aumento da obesidade, especialmente em crianças (FRANCISCHI *et al.*, 2011). A DH baseia-se no consumo alimentar de dieta ocidental, dieta mais rica em gorduras (particularmente as de origem animal), açúcares e alimentos refinados, sendo reduzida em carboidratos complexos e fibras.

Experimentalmente, diversos modelos de dieta hiperlipídica têm sido usados para induzir obesidade em roedores. Eles permitem investigar os efeitos do consumo de dietas hiperlipídicas sobre o ganho de peso, o acúmulo de gordura e o metabolismo. Em geral, dietas hiperlipídicas fornecem uma ingestão energética a partir das gorduras que varia de 30 a 78% das calorias totais. Esse aumento na ingestão energética proveniente das gorduras favorece o desenvolvimento da obesidade e doenças metabólicas relacionadas (OUCHI *et al.*, 2011).

Os ingredientes utilizados na composição nutricional podem variar de acordo com os modelos experimentais. Uma das dietas utilizadas para indução de obesidade é composta por 45 a 60% de lipídios, contendo pasta de amendoim, leite condensado, farinha de soja, óleo de milho ou de soja, bolacha de chocolate tipo waffer, banha de porco ou gordura hidrogenada, (CABEÇO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2014).

1.2.3 Repercussões das dietas no SNC

Estudos experimentais demonstram que a exposição às dietas hipoproteicas e hiperlipídicas em fases críticas da vida, como os períodos peripuberal, pré- e pós-

natal podem causar alterações fisiológicas e morfológicas permanentes no sistema nervoso central em desenvolvimento, podendo persistir mesmo após a recuperação nutricional. Em modelos experimentais de desnutrição proteica durante o desenvolvimento pós-natal, observa-se diminuição do número de neurônios nas regiões CA3 e DG do hipocampo (prejudicando a resposta ao estresse), expressão diminuída de IEGs (genes relacionados à neuroplasticidade) e redução de calcineurina (comportamento depressivo). Portanto, a incapacidade de lidar com situações estressantes pode aumentar a vulnerabilidade à depressão (BELLUSCIO, 2016). As dietas hiperlipídicas estão associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina no cérebro, prejudicando a sinalização da insulina que medeiam a plasticidade e a formação da memória, contribuindo para agravar danos cognitivos (LEBOUCHER *et al.*, 2019).

Estudos apontam que a desnutrição proteica pré-natal e a dieta hiperlipídica no início da vida podem causar aumento na população de células do ácido gama-aminobutírico (GABA), ativando os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e, conseqüentemente, aumentando a captação de glutamato. Portanto, podendo causar alterações na transmissão sináptica, diminuição da eficácia sináptica e inibição dos mecanismos de plasticidade, além disso, a ativação de NMDA pode provocar o influxo de cálcio ativando mecanismos celulares como a apoptose neuronal. Estes resultados estão associados a prejuízos na aprendizagem, memória e desenvolvimento de depressão (GONZÁLEZ-MACIEL *et al.*, 2015; SARKER *et al.*, 2018). Estudos demonstram que filhos adultos de mães desnutridas exibem níveis cerebrais aumentados de serotonina (5-HT) e de metabólitos neuroativos da via da quinurenina (KP): ácidos quinurênico (KA) e xanturênico (XA), sugerindo alterações na neurotransmissão serotoninérgica, resultante do metabolismo prejudicado do triptofano. Essas alterações podem desempenhar um papel nos déficits cognitivos e na suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como depressão e esquizofrenia, exibidos por indivíduos expostos a desnutrição no início da vida (HONÓRIO, 2017).

Enquanto isso, na obesidade ocorre a presença de inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, sendo que a maior parte dos estudos mostram alterações em sistemas e órgãos periféricos. No entanto, estudos já revelaram que a obesidade também pode causar anormalidades no cérebro, em especial nas estruturas cerebrais hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. O

hipotálamo é o centro regulador do metabolismo energético, o hipocampo está envolvido com cognição, memória, aprendizagem e emoções e o córtex pré-frontal e o estriado estão envolvidos com o sistema de recompensa. Portanto, alterações nessas estruturas cerebrais podem trazer diversos prejuízos para o indivíduo (CHAAR *et al.*, 2015).

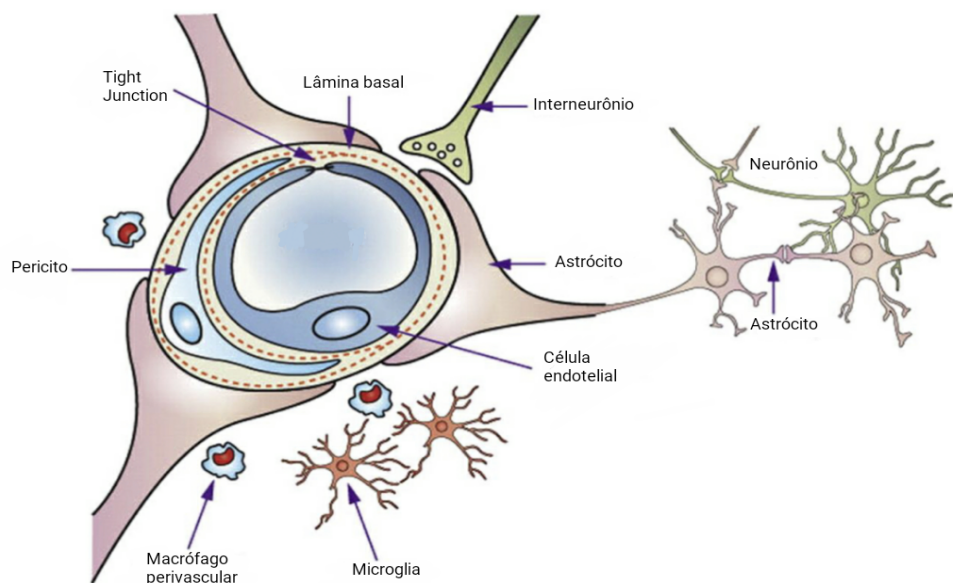
Estudos de obesidade induzida por DH, demonstram que as perturbações nos sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos e melanocortinérgico são provocados pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas pró-inflamatórias. Os achados indicam que comportamentos ansiogênicos estão relacionadas a elevação de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1), receptor 2 do hormônio liberador de corticosteróide (rCRH-2) e quinurenina mono-oxigenase (KMO) (WINTHER, 2018).

Além disso, reduções nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de interleucina-10 (citocina anti-inflamatória), prejudicando a neurogênese e neuroplasticidade (KIM, 2018; DE AQUINO *et al.*, 2018).

1.3 Barreira Hematoencefálica (BHE)

A barreira hematoencefálica (BHE), está presente em quase todas as regiões do cérebro e tem um papel na regulação do sistema nervoso autônomo (SNA) e endócrino (SNE) (CARDOSO *et al.*, 2010). A nível celular, a BHE é composta por células endoteliais (CEs), conectadas entre si por junções de oclusão (TJs) e aderentes (AJs) e associadas a pericitos, membrana basal, astrócitos, microglia e neurônios, compreendendo a unidade neurovascular (UNV) (**Figura 2**).

Figura 2: Componentes celulares da BHE.



Fonte: Adaptado de CARDOSO *et al.*, 2010.

O endotélio cerebral, com falta de fenestrações e baixa atividade de endocitose (pinocitose), é a primeira “barreira física” em que os complexos juncionais conferem baixa permeabilidade paracelular e alta resistência elétrica a BHE (CHOI e KIM, 2008; CARDOSO *et al.*, 2010). A importância central da BHE é demonstrada por seu papel na manutenção da homeostase cerebral e proteção contra compostos tóxicos e flutuações sanguíneas, mas simultaneamente fornece nutrientes essenciais para a função cerebral normal (DIETRICH, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010).

1.3.1 Aspectos Gerais

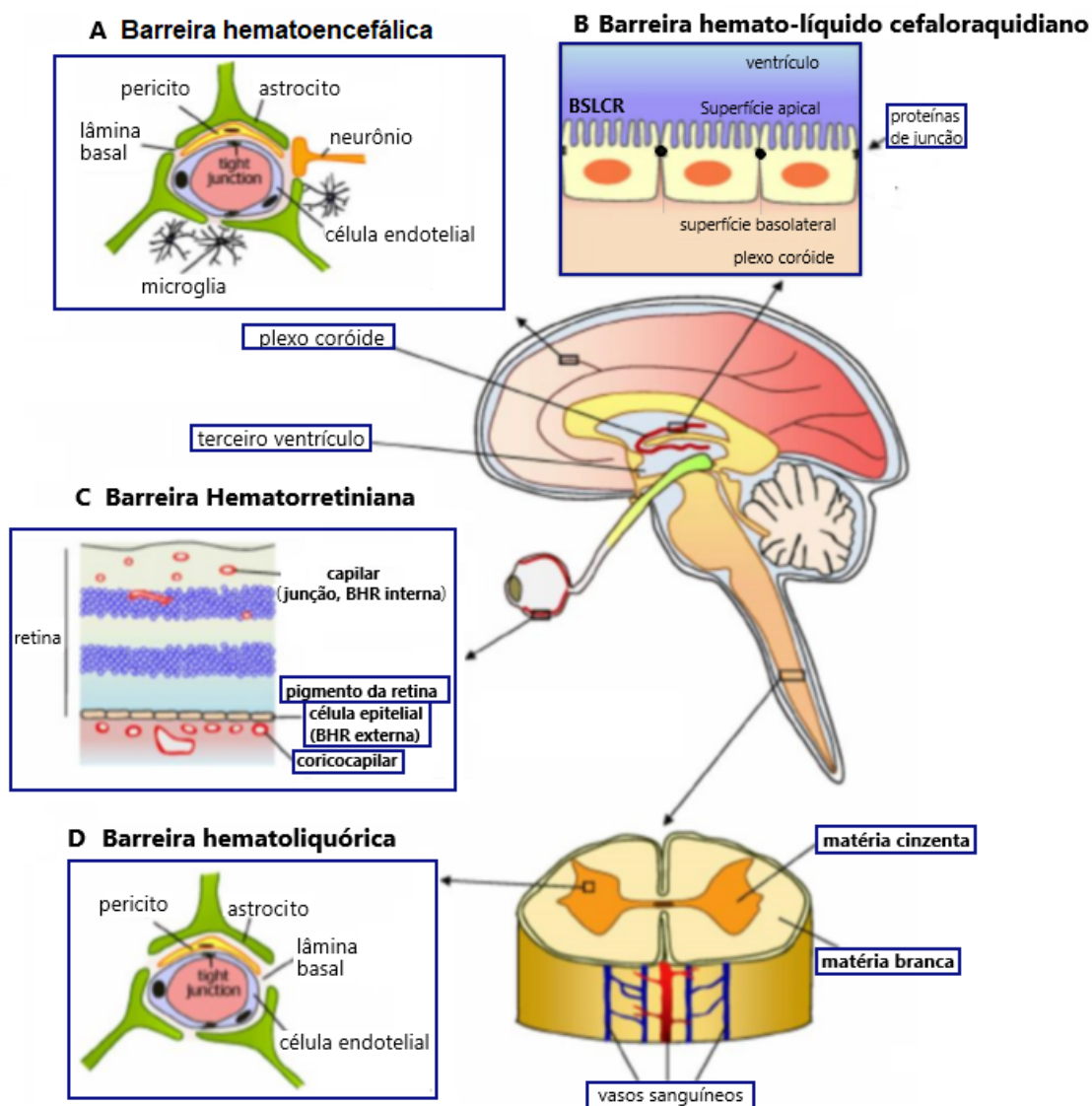
A ocorrência da BHE foi identificada primeiramente em 1885, quando Paul Ehrlich (1854-1915) observou que um corante introduzido por via intravenosa impregnava os tecidos de todo o organismo, com exceção do encéfalo, sugerindo que os capilares do SNC, diferentemente dos capilares de outras regiões, eram impermeáveis a este agente químico. Goldmann (1913), através de experimentos com azul de tripan e vários corantes vitais derivados da anilina, constatou, após a introdução desses corantes pela corrente sanguínea, que eles impregnavam o corpo inteiro do animal, com exceção do neuro-eixo. Entretanto, se o corante fosse introduzido por via subaracnoide, o tecido nervoso ficava fortemente marcado, não

atingindo a circulação periférica, demonstrando que há impedimento bidirecional à livre passagem de substâncias para o encéfalo (ABBOTT *et al.*, 2006).

Em condições fisiológicas, a BHE assegura a homeostase no ambiente neural, através do estabelecimento de uma barreira seletiva que permite o suprimento de oxigênio e glicose para as células neurais e as protege de flutuações na composição do plasma sanguíneo ou da entrada de xenobióticos (BALLABH *et al.*, 2004). A BHE é a estrutura responsável pelo rígido controle do tráfego bi-direcional de substâncias na interface sangue-cérebro; seus componentes: o endotélio, perícitos, astrócitos, em conjunto com neurônios e micróglia são componentes da NVU (WILHELM *et al.*, 2011).

A BHE está presente em todas as regiões cerebrais, exceto nos órgãos circumventriculares, incluindo área postrema, eminência mediana, neurohipófise, glândula pineal, órgão subfornical e lâmina terminais. Os vasos sanguíneos dessas áreas do cérebro contêm fenestrações que permitem a passagem bi-direcional de substâncias entre sangue-cérebro sem passar pelo citoplasma das células endoteliais. Essas áreas, com barreira semipermeável regulam o sistema nervoso autônomo e as glândulas endócrinas (BALLABH *et al.*, 2004). Diferentemente, vasos com endotélio contínuo, não fenestrado, constituem as regiões cerebrais onde há BHE.

Figura 3: Barreiras sangue-neurais presentes no SNC.



Existem quatro tipos diferentes de barreiras.

(A) A barreira hematoencefálica (BHE) separa o sangue do parênquima cerebral. (B) as células ependimárias presentes afetam a composição do líquido cefalorraquidiano (BCSF) e são responsáveis pela barreira hemato-líquórica (BHL). Nesta barreira, os vasos do plexo coróide são fenestrados, portanto menos restritivos que os vasos da BHE. (C) A barreira sangue-retiniana (BRB) é composta por barreiras internas e externas. O BRB interno possui uma estrutura e propriedade semelhantes ao BHE e é formado por microvasos cercados por pericitos e pés vasculares de astrócitos; BRB externo contém vasos sanguíneos fenestrados e uma camada de epitélio

pigmentar da retina que forma a barreira. (D) A barreira da medula espinhal protege o microambiente medular (adaptado de Choi e Kim, 2008).

1.3.2 Componentes Estruturais da BHE

A BHE já se encontra completamente formada ao nascimento (ARMULIK et al., 2010; KRUEGER et al., 2013), é responsável pela homeostase do SNC. É formada por um sistema celular complexo, composto por células endoteliais, membrana basal, astrócitos e pericitos (KELLER, 2013; OBERMEIER, 2013).

1.3.2.1 Unidade Neurovascular

1.3.2.1a. Células endoteliais

As células endoteliais cerebrais apresentam um fenótipo diferente das células endoteliais localizadas em outros locais. São células altamente polarizadas que expressam transportadores de influxo e efluxo específicos e são conectadas por junções intercelulares denominadas junções de oclusão (*tight junctions*), junções de adesão (*adherens junctions*) e junções comunicantes (*gap junctions*) (CAPONE et al., 2011).

As junções de oclusão apresentam duas funções primordiais, a função de barreira que impede a livre passagem de substâncias e a função de “portão” que controla a passagem paracelular de íons e solutos entre as células. São formadas por proteínas integrais de membranas denominadas claudina (do total de 24 diferentes tipos de claudinas, as claudinas 1 e 5 são as mais expressas na barreira hematoencefálica), , ocludina, moléculas de adesão juncional (JAMs, ex. JAMs 1, 2 e 3) e várias proteínas citoplasmáticas acessórias, destacando-se a zonula ocludens (ZO), ZO-1, ZO-2 e ZO-3 e cingulina entre outras. Estas proteínas acessórias conectam as proteínas de membrana à actina para a manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio (MORAIS et al., 2014; ABBOT et al, 2010).

As junções de adesão executam várias funções incluindo a iniciação e estabilização da adesão celular, regulação do citoesqueleto de actina, sinalização intracelular e regulação da transcrição. São compostas por glicoproteínas transmembrana da superfamília caderina, que interagem com os membros da família

das cateninas (α , β e γ). Em conjunto, estas proteínas controlam a formação, manutenção e funções das junções de adesão (QASEM *et al.*, 2012; FIDALGO *et al.*, 2013).

As junções comunicantes são canais de baixa resistência responsáveis pela comunicação entre o citoplasma de células adjacentes, permitindo a transferência intercelular de pequenos solutos tais como íons, metabólitos e segundos mensageiros. São constituídas pela união de dois hemicanais proteicos denominados conexons. Um conexon é composto por seis subunidades de proteínas integrais de membrana, as conexinas (Cx). Diferentes regiões do organismo apresentam isoformas distintas de conexinas. Em relação ao SNC, pelo menos 11 isoformas foram detectadas. Entretanto, ainda não foi bem estabelecido quais isoformas estão presentes na BHE. Há um consenso apenas sobre a presença da Cx43 em todos os componentes da unidade neurovascular (ZLOKOVIC, 2016).

1.3.2.1b. Pericitos

São células circundadas por membrana basal, presentes ao longo de arteríolas pré-capilares, capilares propriamente ditos e vênulas pós-capilares (VILLABONA-RUEDA *et al.*, 2019), podendo, dessa forma, serem encontradas ao longo da microvasculatura cerebral, como já descrito há mais de um século por Rouget, 1873. Os pericitos estão localizados na parte externa ao longo dos pequenos vasos, com seus prolongamentos, os quais possuem diferentes formas — circunferenciais, longitudinais ou estrelados — a depender do segmento vascular onde se fixam (HARTMANN *et al.*, 2015). A caracterização morfológica dos pericitos tem sido auxiliada por meio da técnica de microscopia eletrônica (MOTTOW-LIPPA *et al.*, 1983; RAUCH; REALE, 1968; RODRIGUEZ-BAEZA *et al.*, 1998).

Os pericitos possuem morfologia semelhante às das células musculares lisas, as quais circundam o endotélio vascular, apresentando diferentes fenótipos e capacidade contrátil. Seus prolongamentos nas ramificações arteriolares dos capilares tomam a forma circunferencial e expressam α -actina do músculo liso, tropomiosina e miosina (α SMA, do inglês, *α -smooth muscle actin*) (ALARCON-MARTINEZ *et al.*, 2018; NISANCIOGLU *et al.*, 2008; RUCKER; WYNDER; THOMAS, 2000).

Em relação ao capilar verdadeiro, esse tem sido caracterizado e definido por não conter prolongamentos circunferenciais, mas longitudinais (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011). No segmento das vênulas pós-capilares, os pericitos exibem uma rede de prolongamentos celulares estrelados, os quais estão diretamente ligados à modulação da transmigração de células do sistema imune (PROEBSTL *et al*, 2012). A alta densidade de prolongamentos está associada ao aumento da permeabilidade da BHE, desempenhando papel importante na sua integridade (ARMULIK *et al*, 2010).

No que consiste às funções dos pericitos, também conhecidos por “células murais”, tem-se: o controle do fluxo sanguíneo cerebral, uma vez que são capazes de liberar mediadores vasoativos; modulação do fenótipo da barreira hematoencefálica, ao regular as vias de sinalização Wnt e Notch, transporte caveolar através da BHE, expressão de GLUT-1 e receptor CD71 de transferrina (LIEBNER; CZUPALLA; WOLBURG, 2011; SWEENEY; AYYADURAI; ZLOKOVIC, 2016); manutenção e desenvolvimento vascular, ao recrutarem os pericitos em resposta ao estímulo de TGF- β , angiopoietina-1, liberado pelas células endoteliais (RIBATTI; NICO; CRIVELLATO, 2011); e participação na resposta imune, por sua capacidade fagocítica, responsiva a moléculas da cadeia inflamatória e de apresentação de antígenos às células do sistema imune (RUSTENHOVEN *et al*, 2017).

Além disso, é válido ressaltar a capacidade proliferativa dos pericitos, por sua similaridade com as células-tronco mesenquimais, que podem se diferenciar em outros tipos celulares. Com o intuito de descobrir possíveis alvos terapêuticos para doenças variadas, estudiosos buscam mediadores específicos, os quais dão origem ao processo de diferenciação das células murais. Farahani *et al*, 2019, identificaram pericitos pluripotentes, localizados na polpa dental, que se diferenciaram em células neuronais e constituintes da glia *in vitro*. Contudo, uma pesquisa recente demonstrou que pericitos murais periféricos têm se mostrado diferentes em relação aqueles presentes no cérebro (FARAHANI *et al*, 2019) (VANLANDEWIJCK *et al*, 2018).

A expressão de receptor e co-receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o proteoglicano de sulfato de condroitina-2 (NG2) são importantes na identificação de pericitos maduros (DORE-DUFFY; CLEARY, 2011). A liberação de PDGF pelas células endoteliais caracteriza a comunicação entre

essas e os pericitos, por apresentarem a proteína de superfície PDGFR β . Essa ligação desencadeia o recrutamento de células murais para os vasos sanguíneos, importante na manutenção da BHE (DANEMAN *et al*, 2010).

Os mecanismos, relacionados à patogênese e à caracterização de desordens neurológicas, como acidente vascular cerebral, dano cerebral traumático, enxaqueca e doenças neurodegenerativas, têm demonstrado a participação de pericitos com anormalidades em suas funções (CHENG *et al*, 2018). Os eventos pós-isquêmicos são caracterizados por morte dos pericitos, após intensa contratilidade dos capilares, causando lentidão no processo de reperfusão sanguínea na região afetada. Essas alterações na resposta das células murais se devem ao influxo de cálcio intracelular e ao estresse oxidativo (HALL *et al*, 2014). A liberação da metaloprotease-9 de matriz (MMP9, do inglês, *matrix metalloprotease 9*) enfraquece as junções (*tight junctions*) existentes, na parede do vaso, entre os pés astrocíticos e as células endoteliais, causando o aumento da permeabilidade da BHE (UNDERLY *et al*, 2017). Além disso, por terem papel na microvasculatura periférica, a disfunção das células murais está relacionada a distúrbios cardiovasculares, como hipertensão, doenças renais e Diabetes (STRAIN; PALDANIUS, 2018).

A doença de Alzheimer apresenta acúmulo de proteína beta amiloide (A β), responsável pela patogênese dessa desordem neurológica. Além disso, a disfunção vascular, causada pela restrição de fluxo sanguíneo cerebral e por prejuízos na BHE, tem importante papel no surgimento e na progressão da doença (SAGARE *et al*, 2013; SENGILLO *et al*, 2013). Diante disso, estudos têm observado a perda de pericitos em modelos animais e em humanos com doença de Alzheimer, apontando a possibilidade de A β ser tóxica aos pericitos, na sua tentativa de *clearance* dessa proteína, nessa condição neurológica (MA *et al*, 2018). Nesse ponto, Rensink *et al*, 2014, identificaram ação protetora da insulina, por essa inibir a formação de fibrilas de proteína A β e a ligação de A β com a superfície celular, evitando a morte de pericitos em resposta à toxicidade de A β .

James e Cotlier, 1983 identificaram receptor de insulina em pericitos. Em contrapartida, um estudo posterior, utilizando cultura de células humanas, observou que a insulina não estava relacionada à captura de glicose pelas células murais (RENSINK *et al*, 2004), mas a outros pontos, como: proliferação celular; hiperpolização, por meio dos canais de potássio sensíveis ao cálcio (BERWECK *et al*, 1993); redução de morte celular endotelial (KOBAYASHI; PURO, 2007);

sensibilidade dos neurônios à insulina (TAKAHASHI *et al*, 2015); e desenvolvimento vascular (WARMKE *et al*, 2017). Contudo, ainda há uma lacuna sobre os mecanismos moleculares que circundam a interação específica dos pericitos, insulina e desencadeamento de desordens neurológicas.

1.3.2.1c. *Lâmina basal*

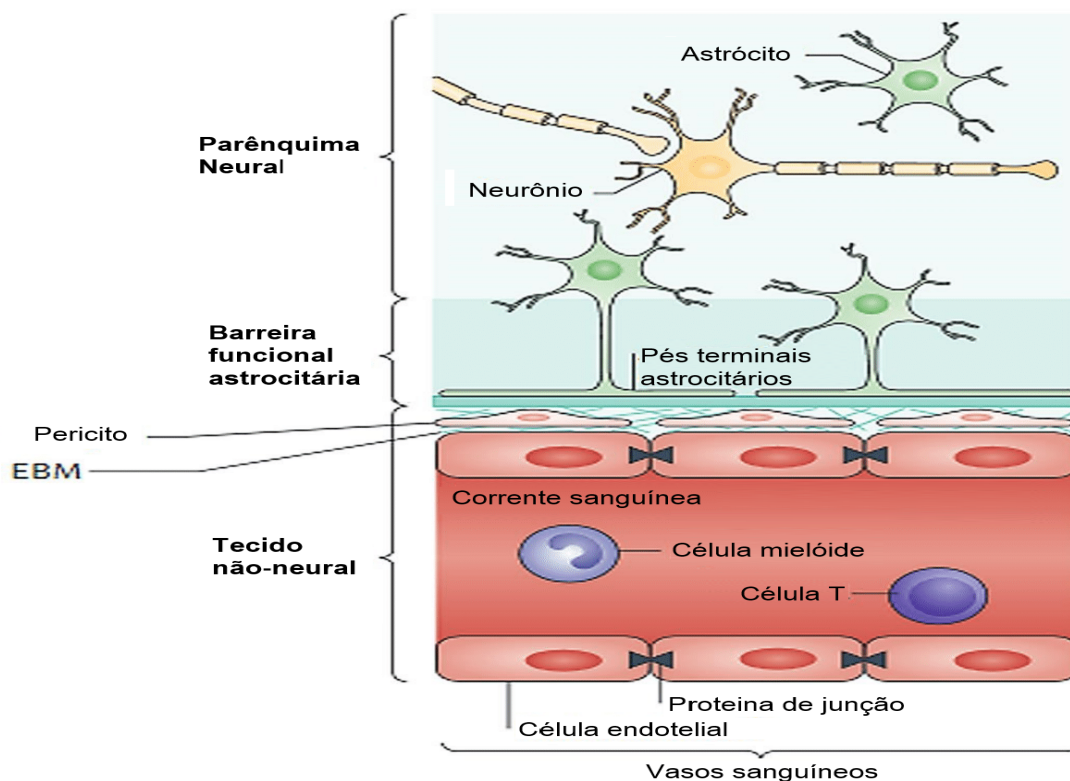
A lâmina basal é uma camada de matriz extracelular composta por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, entactina, trombospondina e várias proteoglicanas. É utilizada como um local de ancoragem e de sinalização para interações célula-célula. Estas interações podem estimular a expressão de proteínas das junções de oclusão, indicando que, embora essas proteínas constituam a principal barreira para difusão paracelular, as proteínas da lâmina basal estão provavelmente envolvidas na sua manutenção (RUSTENHOVEN *et al*, 2017).

No SNC, os vasos sanguíneos são envolvidos por uma camada interna (endotelial) e outra externa (parenquimal) de lâmina basal. A lâmina basal endotelial é secretada por células endoteliais e pericitos, que estão envoltos nesta lâmina. Já, a lâmina basal parenquimal é secretada por astrócitos e conecta os pés astrocitários à lâmina basal através de interações proteína-proteína. Dessa forma, o acesso de moléculas e células ao parênquima cerebral requer não apenas a passagem pelas junções das células endoteliais, mas também por ambas as camadas de lâmina basal (CHENG *et al*, 2018).

1.3.2.1d. *Astrócitos*

São produtos da diferenciação de células radiais gliais — células-tronco primárias neuronais, oriundas do ectoderma, mais especificamente, do neuroepitélio germinativo do tubo neural (TAVERNA; GÖTZ; HUTTNER, 2014). Os astrócitos possuem morfologia variada, a qual depende do local no qual essas células podem ser encontradas. As formas existentes são: astrócitos protoplasmáticos, fibrosos, prolongamentos interlaminares e varicosos, glia de Bergmann unipolar com prolongamentos radiais ascendentes e tanícitos radiais *glia-like* (VASILE; DOSSI; ROUACH, 2017).

Figura 4: Representação esquemática da localização de astrócitos na unidade neurovascular.



Os astrócitos entram em contato com os vasos cerebrais pelos pés vasculares, formando o astrócito de barreira. Além disso, as junções intercelulares (junções de oclusão e aderentes) são as moléculas que determinam a vedação/integridade da barreira paracelular entre as células endoteliais adjacentes. Ao redor dos vasos cerebrais também existem pericitos e uma membrana basal extracelular (EBM). É importante ressaltar que os astrócitos também têm papel na comunicação entre neurônios e células endoteliais (adaptado de Sofroniew, 2015).

— Astrócitos protoplasmáticos —

São encontrados, majoritariamente, na substância cinzenta cerebral e espinhal. Na região hipocampal CA1 de roedores, Bushong et al., 2002, descreveram morfológicamente astrócitos protoplasmáticos, sendo esses caracterizados por apresentarem corpos celulares pequenos e arredondados, com cinco a dez prolongamentos primários cujas ramificações dão origem a uma densa rede arbórea periférica. Além disso, foram identificadas outras formas de células GFAP-positivas no hipocampo de ratos, bem como em outras regiões do SNC

(EMSLEY; MACKLIS, 2006; NIXDORF-BERGWEILER; ALBRECHT; HEINEMANN, 1994; OLUDE *et al.*, 2015).

No hipocampo, as células astrocíticas protoplasmáticas foram subdivididas em duas categorias, segundo a expressão de determinadas proteínas: GluR+ (receptor ionotrópico de glutamato) e GluT+ (transportador de glutamato), podendo o último subtipo apresentar receptor metabotrópico e/ou ionotrópico de glutamato (BERGLES; JAHR, 1997; MATTHIAS *et al.*, 2003; ZHOU; KIMELBERG, 2001).

— *Astrócitos fibrosos* —

Ocupam a substância branca do cérebro e medula espinhal. Os corpos celulares dessa população são dispostos em fileiras entre os feixes axonais. Em comparação aos astrócitos protoplasmáticos, os do tipo fibroso têm menos prolongamentos que são mais finos, esses se sobrepõem, demonstrando a ausência de organização, a qual caracteriza as células protoplasmáticas (LUNDGAARD *et al.*, 2014; OBERHEIM *et al.*, 2009).

— *Astrócitos interlaminares* —

São encontrados no córtex de primatas superiores e, em humanos, apenas na camada cortical I. Essas células se caracterizam por seus corpos celulares esferoides com prolongamentos curtos.

A astroglia, assim denominado o conjunto de astrócitos, é responsável por manter a homeostase do SNC. As diferentes funções astrocíticas são: controle da atividade sináptica das células de Purkinje e da liberação, captura e recaptção de neurotransmissores (DE ZEEUW; HOOGLAND, 2015; ROBERTS *et al.*, 2014; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018); modulação das funções neuroendócrinas hipotalâmicas (PREVOT *et al.*, 2018); fornecimento de energia para os neurônios e influência na liberação neuronal de gliotransmissores (PETERI *et al.*, 2019; SHERWOOD *et al.*, 2006).

O papel dos astrócitos na homeostase do glutamato é tido primariamente como essencial na manutenção do estado saudável do SNC e seus processos fisiológicos. Essas células possuem as moléculas de piruvato carboxilase (PC) e ácido tricarbóxico (do inglês, TCA, *tricarboxylic acid*), que participam do ciclo de atividades de formação de glutamato, necessário para sinalização neuronal

glutamatérgica, a partir da glicose, crucial na funcionalidade do SNC (ROSE; VERKHRATSKY; PARPURA, 2013). Além disso, os astrócitos contribuem na liberação de glutamato pelos processos: de excitose dependente de Ca^{2+} ; de resposta ao aumento de Ca^{2+} intracelular ou K^+ extracelular; de ligação dos receptores de canais iônicos dependentes de glutamato; e de permeabilidade ao cálcio dos receptores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolepropriônico e GluA2 (MAHAN, 2019).

Em processos inflamatórios, os astrócitos se tornam reativos, categorizando-os em dois tipos principais: os formadores de cicatrizes e os hipertróficos. Essas células reativas apresentam alterações em suas funções fisiológicas homeostáticas na captação de K^+ e de neurotransmissores excitatórios, bem como na sinalização que envolve o íon Ca^{2+} (KHAKH *et al.*, 2017; ROSSI; VOLTERRA, 2009).

Os marcadores de astrócitos se tornam essenciais no delineamento de mecanismos envolvidos em processos fisiológicos ou patogênicos, os quais essas células desempenham papel importante.

1.4 Proteína Glial fibrilar Ácida (GFAP)

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês, *glial fibrillary acidic protein*) é a principal constituinte dos filamentos intermediários citoplasmáticos do astrócito, especificamente, os do tipo III. Ademais, a quantidade de GFAP serve como indicador de reatividade de astrócitos, pois, durante esse processo, há o aumento significativo de sua expressão. As funções da GFAP, assim como de outras proteínas do arcabouço astrocitário, são de sinalização e migração celular, alteração de propriedades morfológicas, como controle da viscoelasticidade em estado de gliose reativa, e controle de respostas celulares ao estresse (HOL; PEKNY, 2015).

O uso de GFAP como marcador de astrogliose possui percalços, pois a possibilidade de marcação é de 30% do total de astrócitos (LIDDELOW; BARRES, 2017) e a presença dessa proteína não é restrita a essa classe de células, mas já foi encontrada também em progenitores neuronais (VAN BODEGRAVEN *et al.*, 2019).

Localizado no cromossomo 17, o gene humano de GFAP está intimamente relacionado ao início da diferenciação da glia radial e das células neuronais progenitoras em astrócitos na zona subventricular; além disso, possibilita a

identificação do processo de astrogliose reativa em resposta a alterações fisiológicas e/ou patológicas. Fatores de transcrição, atividade neuronal bem como a liberação de citocinas são seguimentos, os quais desencadeiam a produção de moléculas sinalizadoras com o papel crucial na expressão de GFAP (LI *et al.*, 2019).

Ao olhar mais a fundo os fatores de transcrição, que ativam o gene de GFAP, temos diferentes mecanismos de sinalização envolvidos. Sítios de ligação de fatores promotores incluem STAT3, AP-1, NFI, c-Jun, receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ), entre outros (ITO *et al.*, 2016). O desencadeamento se caracteriza por uma série de cascatas de regulação transcricional acerca da expressão gênica de GFAP. A expressão dessa proteína também é influenciada pelo aumento da atividade neuronal, caracterizada pela maior entrada de K⁺ intracelular, que acarreta a formação de fibras de GFAP, observada em modelos de convulsão no hipocampo (VIZUETE *et al.*, 2017).

1.4.1. Funções do GFAP

As funções do GFAP dependem de cada isoforma, dez identificadas até o momento (IKEZU *et al.*, 2012), a qual essa proteína se apresenta, sendo a GFAP α a que ocorre majoritariamente, com importante papel na composição do citoesqueleto dos astrócitos (POTOKAR *et al.*, 2007), e caracteriza as propriedades funcionais do GFAP. Ademais, essa molécula proteica está ligada tanto à plasticidade quanto à morfologia astrocitária (RAI *et al.*, 2013). Hol e Pekny, 2015, descreveram em seus achados as seguintes isoformas de GFAP: α , β , γ , δ , ζ , κ , Δ exon 6 e Δ exon 7 com expressão no cérebro humano, exceto pela Aexon 6, no SNC de ratos.

Nos astrócitos, Kamphuis *et al.*, 2014, observaram o papel do GFAP na formação da BHE, em conjunto com desmossomos, ancorando célula-matriz, e comunicação intercelular. A interação célula-célula se dá por meio da participação do GFAP na formação de *gap junctions* e *tight junctions*, possibilitando, dessa forma, a resposta celular a estímulos do ambiente intra e extracelular (MACK; WOLBURG, 2006).

1.5 S100 β

É uma proteína glial, assim como a GFAP, porém presente em diversos tipos celulares, como: astrócitos, oligodendrócitos, células ependimais, células vasculares endoteliais, linfócitos e em neurônios de diferentes regiões cerebrais (RICKMANN; WOLFF, 1995; STEINER *et al.*, 2007). A expressão de S100 β se restringe aos vertebrados e atuam como tampões de Ca²⁺ e como transdutores na sinalização desse íon. A modulação de processos como diferenciação, proliferação e de inibição de apoptose celular são também funções de S100 β no SNC (DONATO *et al.*, 2013). A produção e liberação de S100 β por astrócitos, de mecanismo ainda indefinido, pode ter efeitos neuroprotetores e/ou neurotóxicos contribuindo para a reatividade astrocitária, por meio da proliferação dessas células e ativação da micróglia (ADAMI *et al.*, 2001; LECLERC *et al.*, 2007; VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003; VILLARREAL *et al.*, 2014).

Os altos níveis de S100 β , detectados em soro e líquido cefalorraquidiano, têm-se mostrado relação a distúrbios de humor. O aumento da expressão de S100 β em astrócitos está associada à participação dessas células na patogênese de doenças neurodegenerativas, como a de Parkinson (RITURAJ, 2014). Além disso, o papel da glia, especialmente dos astrócitos, na síndrome de Down, tem sido demonstrado pela detecção de altos níveis de S100 β (CHEN *et al.*, 2014).

1.6 Glutamina-sintetase e Transportadores de Glutamato

Quase exclusivamente expressos em astrócitos, os transportadores astrocitários de glutamato EAAT-1 (GLAST) e EAAT-2 (GLT-1) fazem parte, em conjunto com a glutamina-sintetase, do processo de *turnover* de glutamato no SNC. EAAT-1 é, predominantemente, expresso no cerebelo, em contraste ao EAAT-2, o qual é o tipo principal de transportador presente em outras regiões cerebrais (BARRY; MCDERMOTT, 2005; JUNGBLUT *et al.*, 2012; SCHMITT *et al.*, 1997). A marcação de astrócitos protoplasmáticos e fibrosos, bem como glia de Bergmann e de Müller, foi feita por Jungblut *et al.*, 2012, com o anticorpo ACSA-1 para epítomos de EAAT-1.

A glutamina sintetase é uma enzima presente no citosol de diferentes células, apresentando finos prolongamentos perisinápticos, quando marcada com anticorpos específicos (NORENBERG; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979). O anticorpo anti-GS

(glutaminase sintetase) funciona como marcador de todos os tipos de astrócitos, especialmente, aqueles que apresentam baixa imunorreatividade de GFAP (ANLAUF; DEROUICHE, 2013). Em um estudo, YEH *et al.*, 2013, utilizando anticorpos anti-GFAP e anti-GS em córtex entorrinal de ratos, demonstraram diferenças percentuais na marcação de células radiais gliais, sendo 78% marcadas por anti-GS, 12% por anti-GFAP e 10% por ambos os anticorpos.

1.7 Neurônios e interneurônios

Devido aos seus mecanismos de homeostase altamente sofisticados, os neurônios detectam variações muito pequenas em seu suprimento de nutrientes e oxigênio, e transformam estes sinais em mensagens elétricas e químicas para os interneurônios adjacentes ou astrócitos. Em resposta a estes sinais, alguns mecanismos de ajuste são ativados. Quando necessário, os neurônios se comunicam com os vasos sanguíneos influenciando o tônus vascular e, conseqüentemente, o fornecimento de sangue para a área ao seu redor (ITO *et al.*, 2016).

Uma das formas de detectar os neurônios e diferenciá-los das demais células do sistema nervoso é utilizar o marcador neuronal nuclear (NeuN). Desde sua descoberta, NeuN tornou-se um dos marcadores neuronais mais utilizados devido seu amplo padrão de distribuição no sistema nervoso e localização específica no núcleo de neurônios maduros. Entretanto, estudos recentes têm argumentado que a imunoreatividade de NeuN pode variar durante certas doenças e estados fisiológicos exigindo cautela na interpretação dos resultados (MAHAN, 2019).

O sistema imunológico também desempenha um papel importante no SNC em relação à sobrevivência e morte neuronal. As citocinas podem atuar no SNC como fatores de crescimento neuronal e/ou como neurotoxinas, desempenhando, portanto, um papel importante em diversas doenças neurológicas e trauma cerebral (VIZUETE *et al.*, 2017).

1.8 Micróglia

Advinda da classificação das células gliais no cérebro de mamíferos, a micróglia é constituída de macrófagos, que residem no SNC, componentes do sistema imune, altamente sensíveis a alterações, atuando continuamente no controle da homeostase desse meio. As células, que compõem a micróglia, são detentoras de atividade fagocitária e atuam, direta e primariamente, no desencadeamento de processos neuroinflamatórios locais (MICHELL- ROBINSON *et al.*, 2015).

Diferentemente de outras regiões parenquimatosas cerebrais, a micróglia se origina a partir de uma única fonte de linhagem mesodérmica, dos macrófagos primitivos de yolksac (YS) (GINHOUX *et al.*, 2010; GOMEZ PERDIGUERO *et al.*, 2015; HOEFFEL *et al.*, 2015). O desenvolvimento do ambiente neurológico é regulado pelas células da micróglia, pela sua capacidade de interagir com neurônios, modelando as sinapses, liberação de fatores tróficos e eliminação de detritos celulares (TAY *et al.*, 2017). A hipótese de modelagem sináptica é sustentada pela ação de processos microgliais na fagocitose de estruturas pré-sinápticas e pelo papel na indução de filopódios na coluna vertebral (WEINHARD *et al.*, 2018).

A conectividade neuronal, função fisiológica realizada pela micróglia, é crucial para o bom desempenho de atividades cognitivas, de memória e de aprendizagem (WEINHARD; D'ERRICO; TAY, 2018). Por secretar fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1, do inglês, insulin-like growth fator 1), a micróglia providencia fator neurotrófico, o qual possibilita a sobrevivência de neuroblastos e sua migração para o bulbo olfatório adulto (RIBEIRO XAVIER *et al.*, 2015); manutenção de neurônios da camada cortical V (UENO *et al.*, 2013); e o controle dos progenitores basais do cérebro anterior embrionário (ARNÒ *et al.*, 2014).

A micróglia apresenta heterogeneidade em diferentes aspectos morfológicos, genéticos, bioenergéticos, estruturais e fenotípicos ao longo de regiões cerebrais distintas (DE BIASE *et al.*, 2017; DE HAAS; BODDEKE; BIBER, 2005; DOORN *et al.*, 2015). Essas alterações são produtos da seleção de resposta gênica exclusiva, desencadeadas pela pressão do meio no qual a micróglia se encontra (GOSSELIN *et al.*, 2014; GOSSELIN *et al.*, 2017).

A densidade celular neuronal, influenciada pela micróglia, bem como progenitores neurais na zona ventricular e subventricular (SVZ) do córtex em

desenvolvimento, têm relação com a sinalização existente entre o receptor CXCR4 e CXCL12 secretado pelos progenitores basais do cérebro anterior embrionário (ARNÒ *et al.*, 2014).

Distintos perfis da micróglia acompanham as mudanças de diferentes estágios do desenvolvimento do organismo. Ações neuroprotetoras, no reparo de tecidos e na recuperação da homeostase, são características da micróglia jovem reativa, enquanto a senescente tem sua capacidade de reagir às alterações cerebrais de forma inadequada. Durante o envelhecimento, a micróglia apresenta aumento na atividade fagocitária basal. Em contrapartida, essa exibe decréscimo na mobilidade, na arborização dos dendritos e na mudança de perfil pró- para antiinflamatório, em decorrência da liberação imprópria de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (CORNEJO; VON BERNHARDI, 2016; MATT; JOHNSON, 2016). A disfunção celular da micróglia na velhice se caracteriza pelo descontrole da resposta neuroinflamatória a processos de injúria e patológicos. Isso acontece pelo crescimento na sinalização de NF κ B no hipotálamo, causando declínio na sua função endócrina, que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ZHANG *et al.*, 2013).

Em sua forma ativada, a micróglia pode apresentar dois fenótipos: M1 e M2 (BENARROCH, 2013). O perfil M1 é ativado classicamente e possui atividade pró-inflamatória, sendo mais propenso a causar deterioração cerebral, pois secreta citocinas e quimiocinas, importantes no desencadeamento do processo inflamatório, e espécies reativas de oxigênio (EROs). Em contraste, o M2 é ativado alternativamente e se caracteriza por ser anti-inflamatório ao promover reparo tecidual e fagocitose de detritos celulares e proteicos (PENG *et al.*, 2017). Para marcação de perfil M1, BEDI *et al.*, 2013, utilizaram anticorpos anti-(CD86-PE e Fc γ RIII[CD32]-PE) e, para verificação da pureza da micróglia, foram usados anticorpos monoclonais anti-(CD11b-FITC e CD45-APC) pela técnica de citometria de fluxo. Em relação à marcador de reatividade e de identificação de subtipo de micróglia, CD105/endoglin tem sido útil na correlação desses tipos celulares em processos teciduais patogênicos (WALKER *et al.*, 2019).

As células da micróglia (macrófagos residentes do SNC) funcionam em estreita associação com a BHE. Em condições basais, a microglia caracteriza-se morfológicamente por processos celulares largamente ramificados, os quais realizam um contínuo monitoramento de SNC. Sua função mais característica é uma

rápida ativação em resposta a estímulos patológicos no SNC (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Estão criticamente envolvidas em lesões, doenças neurodegenerativas, AVC e tumores cerebrais (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Em resposta à injúria, isquemia e/ou estímulos inflamatórios, essas células são ativadas e assumem um fenótipo característico (redução do número de processos celulares, aumento da densidade nuclear e indução de formato ameboide) associado à sua proliferação, migração às proximidades do local de injúria, fagocitose de resíduos celulares e síntese de fatores tanto neurotróficos, quanto neurotóxicos (MÖLLER, 2006).

A ativação da microglia também promove a produção local de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (SHI *et al.*, 2010; ZUBCEVIC *et al.*, 2011). Células da microglia ativadas podem destruir microrganismos invasores, remover detritos potencialmente deletérios, promover reparo tecidual por secretar fatores de crescimento e facilitar o retorno à homeostase tecidual. Sabe-se também que a microglia tem importante papel na manutenção da integridade endotelial, por facilitar seu reparo em condições patológicas (KELLER, 2013; OBERMEIER, 2013).

1.9 Funcionalidade da BHE

A BHE tem várias funções (BRIGHTMAN, 2006). Ela supre o cérebro com nutrientes essenciais e controla o efluxo de produtos indesejáveis. Restringe o movimento de fluídos entre o sangue e o cérebro, permitindo transporte iônico específico e, portanto, regulando as passagens iônicas. Produz o fluído intersticial do cérebro, o qual é responsável pelas funções neuronais.

Além disso, a BHE protege, de forma dinâmica, o SNC de flutuações na composição iônica, que ocorrem no sangue, após uma refeição ou exercício, a qual perturbaria a sinalização sináptica e axonal. O SNC não pode tolerar e continuar sua função diante de um ambiente com flutuações na concentração de substâncias neuroativas que ocorrem no fluido extracelular geral. Aminoácidos que estão presentes no sangue em altas concentrações (p.ex. glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico) são potentes neurotransmissores excitatórios; então, sua concentração no fluido extracelular cerebral precisa ser mantida estável e com níveis constantes (GOSSELIN *et al.*, 2017).

Desta forma, a BHE age primordialmente na homeostase do SNC. A homeostasia cerebral é essencial para seu funcionamento e para o funcionamento do organismo como um todo. Outra importante função da BHE é de neuroproteção do SNC contra xenobióticos tóxicos. Em um tecido altamente complexo como o tecido nervoso, onde a divisão mitótica é restrita a células tronco neurais, qualquer aceleração na morte celular e no contato dos neurônios com substâncias tóxicas pode causar doenças degenerativas prematuras e patologias diversas. Muitas substâncias potencialmente neurotóxicas são continuamente ingeridas na dieta ou geradas pelo metabolismo. A BHE é, portanto, crucial em limitar o acesso desses xenobióticos e metabólitos potencialmente prejudiciais ao SNC por bloquear sua entrada ou removê-los ativamente do cérebro (BEGLEY e BRIGHTMAN, 2003; BEGLEY, 2004).

A BHE também tem papel na manutenção dos neurotransmissores e agentes neuroativos que agem centralmente (SNC) e periféricamente (SNP) separados (ABBOTT *et al.*, 2006).

Uma das principais funções da BHE ocorre pela restrição à passagem de substâncias tóxicas e potencialmente danosas do sangue para o encéfalo (ABBOTT *et al.*, 2006; WILHELM *et al.*, 2011). Existem três tipos de barreiras responsáveis pelo regulamento dessa função: Uma barreira paracelular, formada pelas junções oclusivas interendoteliais, que restringem o movimento de substâncias hidrossolúveis entre sangue e tecido neural através das células endoteliais adjacentes, outra barreira transcelular, composta pelos baixos níveis de endocitose, característica de células endoteliais encefálicas (diferente de outras células endoteliais) desta forma inibindo o transporte de substâncias através do citoplasma e uma barreira enzimática, composta de um complexo conjunto de enzimas, incluindo acetilcolinesterase, fosfatase alcalina, transpeptidase gama-glutamil, monoamina oxidases, e outras enzimas metabolizadoras de drogas capazes de degradar diferentes compostos químicos (WEINHARD *et al.*, 2018).

1.9.1. Permeabilidade da BHE

A BHE é formada pela presença de junções oclusivas endoteliais que controlam sua abertura e fechamento coordenado (STAMATOVIC *et al.*, 2008). Estas junções são compostas de diferentes complexos proteicos, como as junções

de oclusão (JA) e as junções endoteliais aderentes (JEA), que são os principais reguladores da permeabilidade celular. As JA são constituídas de três proteínas integrais de membrana denominadas claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional e um número de proteínas citoplasmáticas acessórias, incluindo a zona occludens (ZO) ZO-1, ZO-2 e ZO-3 e outras proteínas guanilato quinase associadas à membrana (Stamatovic *et al.*, 2008). Estas proteínas acessórias conectam as proteínas de membrana à actina para a manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio (BAZZONI *et al.*, 2014).

As JEA possuem proteínas de membrana chamadas caderinas, que se unem com a actina via proteínas intermediárias, intercelulares e com as JA. As células endoteliais cerebrais (CEC) são apoiadas sobre uma lâmina basal que contém moléculas da matriz extracelular (ME) cobrindo mais de 90% da superfície das células endoteliais, também estando envolvida na permeabilidade da BHE (BAZZONI *et al.*, 2014).

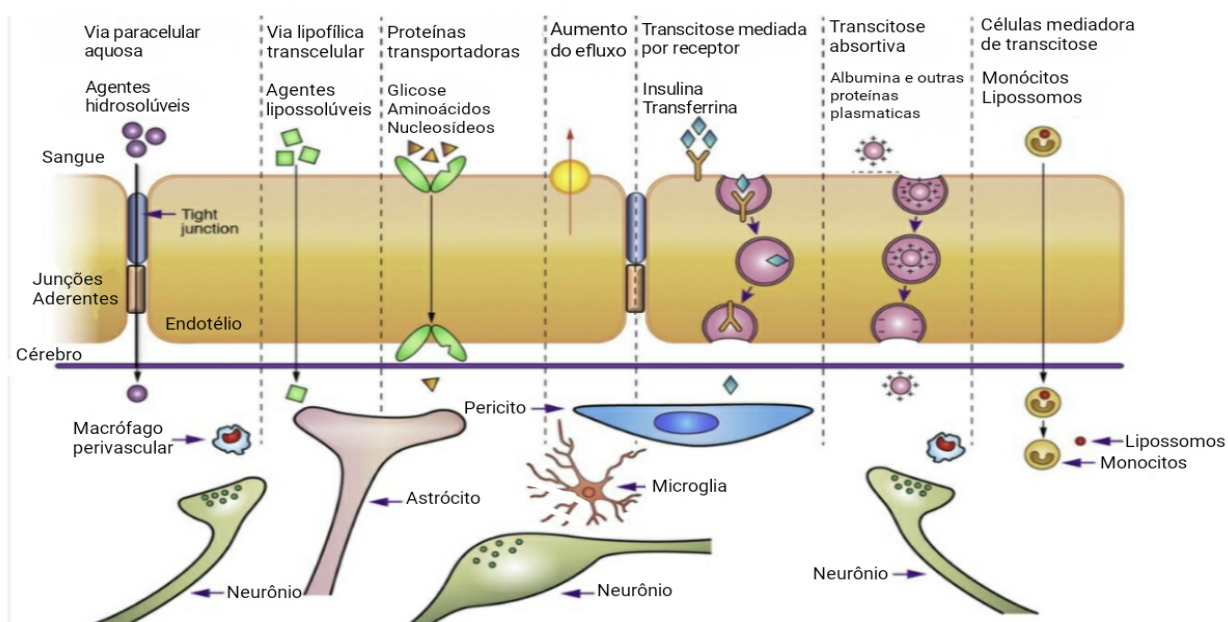
As ocludinas foram as primeiras proteínas integrais de membrana a serem identificadas nas JA das células endoteliais. A ocludina é uma fosfoproteína de 65 kDa com 4 domínios transmembrana ligados a duas porções extracelulares ricas em tirosina nos domínios intracelulares carboxi e amino terminal. Sua função é atuar como regulador ao invés de como uma proteína estrutural importante no estabelecimento das propriedades da barreira. Seu domínio citoplasmático carboxi terminal fornece a conexão da ocludina com o citoesqueleto assegurando a alta resistência elétrica das monocamadas das células endoteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (BAUER *et al.*, 2010).

O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular aos íons pequenos. Para isto, as interações entre as diferentes classes ocorrem de duas maneiras: lateralmente no plano da membrana (interações heteroméricas) ou a ligação cabeça a cabeça entre células adjacentes (interações heterotípicas) (FINDLEY *et al.*, 2015).

A BHE é de suma importância para o bom funcionamento do SNC, funcionando como um sistema biológico, impede desordens cerebrais. O papel mais importante da BHE é impedir que moléculas pequenas (<40 kDa) e fármacos com moléculas grandes atravessem, além disso funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre o sangue e o SNC, com isso, cria-se um ambiente único e estável para uma atividade neuronal de ótima funcionalidade

(SOBRAL, R. 2018; BENTES, H. M. M. 2016). Como ilustrado na figura 3, há diferentes vias de transporte pelo qual moléculas podem atravessar a BHE.

Figura 5: Mecanismos de acesso ao SNC através da BHE.



Fonte: Adaptado de BAUER *et al.*, 2010.

A impermeabilidade da barreira é explicada pela presença de enzimas que exercem atividade de degradação presentes no interior do endotélio de modo que, com exceção de água, oxigênio, dióxido de carbono e apenas determinadas moléculas lipossolúveis podem passar a BHE de forma íntegra. Outras moléculas como glicose, aminoácidos e componentes de ácidos nucleicos, que são essenciais para o metabolismo do cérebro, atravessam a BHE por canais especializados. Já as moléculas hidrofílicas, que não possuem um sistema de transporte específico, como peptídeos e proteínas, apresentam uma passagem mais lenta que as moléculas

lipofílicas, contudo, as quantidades que atravessam a BHE podem ser suficientes para ocasionar um efeito mediado por receptores nos neurônios (MARTINHO, L.M.L. 2015).

1.9.2 O papel do astrócito na BHE

Os astrócitos, um dos constituintes da BHE, executam papel regulador no transporte de substâncias na BHE, estando essas células presentes em torno de microvasos cerebrais (ALMUTARI *et al.*, 2016). Além disso, os astrócitos, contribuem no desempenho das funções da BHE. O controle da entrada de íons e balanço de água na BHE é feito com o auxílio dos astrócitos, uma vez que esses, em seus processos terminais, apresentam de canais de potássio e aquaporina-4 (LIEN *et al.*, 2012).

Em relação à participação dos astrócitos em respostas imunoinflamatórias no SNC, temos que essas células estão diretamente ligadas a esse processo, uma vez que, a liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias pelos astrócitos, é responsável por regular a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais presentes nos vasos cerebrais, que constituem a BHE (TAKESHITA; RANSOHOFF, 2012; MULLER, 2014).

A ruptura da BHE afeta negativamente processos fisiológicos do SNC. No que consiste à resposta aos processos de injúria da BHE, causados por dano cerebral traumático, isquemia e outras condições que afetam o SNC, os astrócitos são convertidos de sua forma latente para a forma ativa. Diante disso, a depender dos fatores derivados de astrócitos envolvidos no seguimento, é possível ter agravamento disruptura (NO, ETs, MMPs, VEGF e glutamato) ou atenuação (APOE, GDNF, IGF-1, SHH, RA, e ANG-1) da disruptura da BHE, caracterizando o papel dualístico dessas células (MICHINAGA; KOYAMA, 2019).

A busca por moléculas, que possam atuar como promissores alvos terapêuticos para distúrbios neurológicos, como Parkinson's (MIYAZAKI; ASANUMA, 2017), Alzheimer's (ASSEFA *et al.*, 2018) e esclerose múltipla (PONATH *et al.*, 2018), tem demonstrado possíveis candidatas a esse tipo de aplicação. Diante disso, o estudo de receptores, como de estrogênio, de endotelina tipo B, de canabinoides e microRNAs, que tenham a capacidade de modular a resposta de astrócitos, é recorrente, uma vez que essas células exercem funções de controle da BHE.

1.10 Resposta inflamatória e estresse oxidativo no SNC

O surgimento do processo de estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre a produção de EROs e defesas antioxidantes, em favor da produção excessiva das EROs ou em detrimento da diminuição da remoção destas pelos antioxidantes. O estresse oxidativo pode levar à oxidação de biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA, com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático. Além disso, ao danificar estruturas celulares, o estresse oxidativo pode desencadear ou potencializar uma resposta inflamatória. Portanto, um equilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes é essencial para a adequada função dos órgãos e tecidos.

Diversos mecanismos relacionados ao processo inflamatório que ocorre na obesidade, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de leucócitos, podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e levar a danos oxidativos (TATEYA *et al.*, 2013).

As citocinas são liberadas a partir de vários tipos de células, e podem ser sintetizadas no SNC por microglia, astrócitos, e algumas populações de neurônios. Elas são induzidas em resposta à lesão cerebral e tem diversas ações que podem agravar ou inibir a lesão e reparação celular. Algumas citocinas estimulam a produção de moléculas efetoras importantes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de crescimento tumoral-alfa (TNF- α), enquanto outras suprimem a atividade de citocinas pró-inflamatórias e são

chamadas de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) (MOLLER *et al.*, 2008).

O processo inflamatório ocasionado pelo consumo em excesso de calorias na dieta (em especial dietas ricas hiperlipidêmicas) e consequente obesidade está associado ao comprometimento do hipocampo, estrutura cerebral relacionada com cognição, memória, aprendizagem e emoções. Neste contexto, Jeon e colaboradores (2017) mostraram que dieta com alto teor de gordura promove um aumento na expressão do TNF- α no hipocampo de camundongos, assim como ativa a micróglia. Em outro estudo realizado por Boitard e colaboradores (2016) relataram que a ingestão de dieta com alto teor de gordura promoveu aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de roedores, o que contribui para danificar os processos envolvidos com a memória. Estudo conduzido por Dutheil e colaboradores (2017) mostrou aumento dos níveis de TLR4 e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no hipocampo de ratos alimentados com dieta rica em gordura.

Além disso, há a participação de células gliais, como microglia e astrócitos, na inflamação central induzida pela dieta hiperlipídica. A alimentação com dieta hiperlipídica levou a uma produção excessiva de IL-6 pela microglia ativada (TAPIA-GONZALEZ *et al.*, 2011) e ativação de astrócitos por vários estímulos, tais como citocinas pró-inflamatórias (BELANGER *et al.*, 2011) e ácidos graxos saturados (GUPTA *et al.*, 2012), o que, por sua vez, estimulou a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que podem contribuir com a metainflamação central.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Demonstrar o efeito das dietas regional básica e hiperlipídica em marcadores de estresse oxidativo, inflamação e permeabilidade da barreira hematoencefálica no hipocampo e no comportamento da ansiedade em camundongos C57BL6J jovens.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito das dietas regional básica e hiperlipídica no ganho de peso dos animais durante todo o protocolo experimental;
- Analisar o efeito de ambas as dietas em parâmetros lipídicos (colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos) em amostras de soro e fígado;
- Avaliar o efeito de ambas as dietas no estresse oxidativo, medindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo e níveis de malondialdeído no soro dos animais;
- Avaliar o efeito de ambas as dietas nos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunoblotting e da citocina antinflamatória IL-10 por ELISA no hipocampo;
- Analisar a permeabilidade da barreira hematoencefálica a partir dos níveis de albumina e molécula de adesão vascular celular-1 (VCAM-1) (marcador de adesão celular), caveolina (marcador de transcitose endotelial) e claudina-5 (marcador de junção de oclusão) no hipocampo por western blot e imunomarcção de colágeno IV da lâmina basal no hipocampo.
- Avaliar o efeito de ambas as dietas na ativação de astrócitos através de imunofluorescência e imunoblotting dos níveis de proteína GFAP no hipocampo;
- Analisar o efeito de ambas as dietas na morfologia do astrócito e a extensão de seus prolongamentos (complexidade arbórea) por meio da análise Sholl em células GFAP positivas no hipocampo.
- Avaliar o efeito de ambas as dietas no comportamento exploratório e de ansiedade dos animais através do teste de labirinto de cruz elevada (*Elevated Plus Maze*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e aspectos éticos

Foram utilizadas camundongas fêmeas grávidas C57BL/6J da empresa Charles River, aclimatadas e submetidas a uma dieta padrão por 6 dias no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com livre acesso a água e comida. Alguns experimentos foram realizados no Núcleo de Biologia e Experimentação Animal (NUBEX) na Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Posteriormente, as fêmeas grávidas foram alojadas individualmente em gaiolas do biotério para o nascimento dos filhotes. Os animais foram mantidos sob rigoroso controle sanitário. Os mesmos permaneceram em temperatura controlada de 21°C e ciclo claro/escuro de 12h. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Comitê de Ética do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Universidade de Fortaleza com protocolo 135/2017 aprovaram todos os protocolos experimentais.

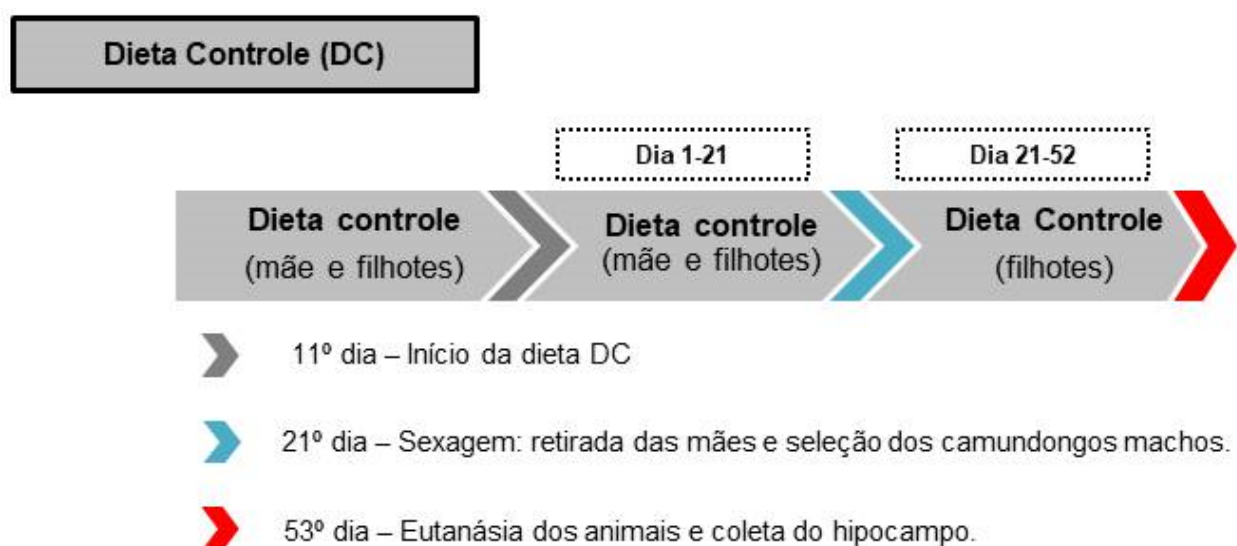
3.1.1 Acompanhamento dos animais

Os camundongos foram acondicionados em gaiolas com no máximo 5 animais por gaiola com acesso livre a água e ração livre após o desmame. Para o experimento completo foram utilizados 76 animais. As gaiolas eram mantidas em cabines de fluxo de ar negativo. Para entrada e manuseio dos animais no biotério era necessário a colocação de todos os aparatos de proteção individual (luvas, máscaras, gorros, propés e avental). As carcaças após o descarte foram colocadas em freezer adequado e levadas ao incinerador. Para avaliar o ganho de peso, os camundongos foram pesados 3 vezes por semana, sempre no mesmo horário com o objetivo de mensurar as variações de peso que os grupos experimentais apresentavam de acordo com o protocolo adotado. Os pesos foram registrados em balança semi-analítica ($\pm 0.01g$) e em seguida inseridos em arquivo Excel para posterior análise.

3.2 Delineamento experimental

Camundongos recém-nascidos amamentados foram selecionados aleatoriamente para três grupos experimentais, com mães recebendo dieta regional básica (DRB) ou dieta hiperlipídica (DH), começando 10 dias após o parto. Os controles receberam a dieta padrão (CTL). No dia 21, os filhotes foram desmamados e continuaram com a dieta inicial até os 52 dias de idade. Foi realizado o teste de comportamento para verificar comportamento de ansiedade nos animais. Após a anestesia, foi retirado o sangue dos animais através do plexo retroorbital para análise do perfil lipídico e citocinas pró-inflamatórias pelo método ELISA, os camundongos foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, e os hipocampus coletados para *Western Blotting* ou o cérebro inteiro removido para imunofluorescência, respectivamente.

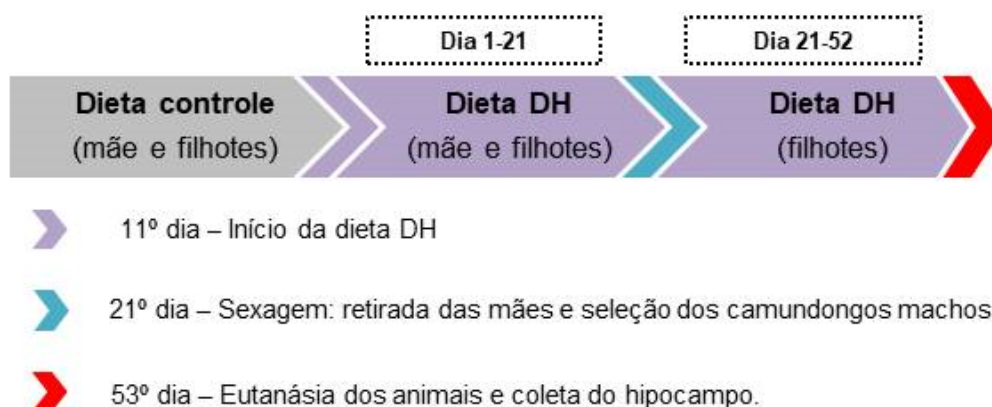
Figura 6: Diagrama do protocolo experimental para os camundongos durante o período de indução da desnutrição e obesidade.



Dieta Regional Básica (DRB)



Dieta Hiperlipidêmica (DH)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.3 Dietas

A DRB é moderadamente deficiente em proteínas e gorduras (88% de carboidratos, 7% de proteína, 5% de gordura), enquanto a DH é rica em lipídios (20% de carboidratos, 20% de proteínas, 60% de gordura). Na **Tabela 1**, segue a constituição de cada dieta utilizada no presente estudo.

Tabela 1 – Valores nutricionais e constituintes das dietas: padrão (CTL), DRB e dieta hiperlipídica (DH).

Fórmula	Padrão (CTL)	DRB	HF
kcal%			
Proteína	20	7	20
Carboidrato	65	88	20
Gordura	15	5	60
Total	100	100	100
Componentes	kcal		
Caseína	800	284	800
L-cistina	12	4	12
Dextrose	1000	1000	0
Sacarose	0	10	275
Maltodextrina 10	180	280	500
Amido de milho	1384	2228	0
Óleo de soja	630	210	225
Celulose, BW200	0	0	0
Banha de porco	0	0	2205
Inulina	25	25	0
Mix de vitaminas	40	40	40
Mix de minerais	0	0	0
Fosfato dicálcico	0	0	0
Carbonato de cálcio	0	0	0
Total	4071	4081	4057

Fonte: © 2011 Research Diets, Inc. Todos os direitos reservados. DIO-3000-2-13.

3.4 Análise Comportamental pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar se as alterações de estresse oxidativo, inflamação e alteração da permeabilidade do hipocampo, após o desafio pelas dietas, levavam a alterações funcionais e comportamentais, foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) para medir o nível de ansiedade dos animais. Estudos têm identificado que o hipocampo tem um importante papel na regulação da ansiedade em camundongos com envolvimento de receptores NMDA do hipocampo (BANNERMAN *et al*, 2014). Além disso, a desnutrição proteica perinatal contribui de forma negativa no processo de ansiedade em modelos experimentais (BELLUSCIO *et al*, 2014) (BERARDINO *et al*, 2019). O LCE consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços fechados (50 x 10 cm, paredes com 40 cm de altura). Os braços são conectados a um quadrado central (10 x 10 cm) que confere uma aparência de cruz ao labirinto. O labirinto é mantido a, aproximadamente, 50 cm do chão (**Figura 6**). Os parâmetros avaliados foram o tempo de permanência nos braços abertos, nos braços fechados. Foram registrados, também, o número de entradas nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados. Quanto mais o animal entrar e/ou quanto mais tempo permanecer nos braços abertos, menor o nível de ansiedade.

Figura 7: Teste do labirinto em cruz elevado



Fonte: Imagem cedida pela Universidade Federal de Uberlândia.

3.5 Análise do perfil lipídico

As amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo retroorbital e o soro foi obtido para determinação dos níveis de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides séricos foram determinados por analisador semi-automático (LabQuest, Labtest, Brasil), utilizando kits de diagnóstico (Labtest®, Minas Gerais, Brasil).

A extração de lipídeos hepáticos foi realizada por meio da homogeneização de 100 mg de tecido hepático em solução de álcool etílico e éter (3:1). Após aquecimento do homogenato a 65 °C por 1 h, este foi submetido a centrifugação a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então separado e concentrado por evaporação, sendo resfriado a temperatura ambiente e diluído em 3 mL de álcool isopropílico para posterior emprego dos ensaios de quantificação de Colesterol Total e Triglicérides de acordo com os seus respectivos kits bioquímicos (Labtest®, Minas Gerais, Brasil).

3.6 Determinação de marcadores de estresse oxidativo

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo foram medidos pelo ensaio N,N-dietil-pera-fenilenodiamina (DEPPD). Foi pipetado 5 µL de hipocampo, em seguida foram adicionados a 140 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,8) a 37 ° C em uma placa de 96 poços. As amostras foram coletadas em triplicata e 100 µL da solução mista de DEPPD e sulfato ferroso na proporção de 1:25 foram adicionados a cada poço para iniciar a reação. A placa foi então incubada a 37° C, durante 5 min, e a absorbância foi medida por um leitor de placas de espectrofotometria (Biotek, Synergy HT), a 505 nm. Os níveis de EROs foram calculados a partir de uma curva de calibração e expressos como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) equivalente (1 unidade = 1,0 mg H₂O₂/L). A curva de calibração para solução padrão foi obtida calculando-se inclinações a partir de um gráfico de densidade óptica.

O ensaio de EROs ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foi utilizado para avaliar os produtos da peroxidação lipídica, via malondialdeído (MDA). Resumidamente, 100 µL de sobrenadantes dos tecidos foram incubados à temperatura ambiente no escuro por 1 h em uma solução de TBA juntamente com butilhidroxitolueno (BHT; Sigma-Aldrich) e um catalisador (cloreto de ferro III; Sigma-Aldrich). Em seguida, as

amostras foram incubadas a 95–100 °C por 60 minutos e seguidas por extração com butanol. Os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro a 532 nm (Biotek, Synergy HT) e a concentração de MDA foi calculada em relação a uma curva de calibração utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich) (intervalo: 0,1-83,5 µM). Os resultados foram expressos como M/mg de tecido hipocampal.

3.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Amostras de sangue foram retiradas através do plexo retroorbital em capilares heparinizados BD Vacutainer SST (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA). O soro foi separado por centrifugação a $1.100 \times g$ por 15 min e armazenado a -80 °C até a análise. Os níveis liberados de IL-1 β , TNF- α e IL-10 dos três grupos de animais foram quantificados usando um kit ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos), conforme especificado no “*datasheet*” do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.8 Western blotting

O tecido do hipocampo foi processado para *Western Blotting* de acordo com procedimentos padrão. Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em tampão de lise (cloreto de sódio 0,15 M, base Tris 0,05 M, ácido etilenoglicol-tetracico 0,005 M, 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% SDS e 1% X-Triton, pH 7,5) suplementado com inibidores de protease (Roche Applied Sciences). O nível total de proteína foi quantificado usando o método do ácido bicinconínico (BCA; Pierce) e armazenado a -20° C até uso posterior. Em seguida, as amostras processadas foram colocadas em banho-maria (a 95° C) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M a 10,4% SDS pH 6,8) durante 5 min. Diferentes concentrações de amostra, contendo proteínas específicas, foram analisadas. Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (10% e 12%), corrida a 130 V. Em seguida, as proteínas da amostra foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore) por 1 h 30 min a 110 V. bloqueio com BSA (5%), as amostras foram incubadas com anticorpos primários (anti-TNF- α de cabra, 1: 500, Millipore; anti-IL-1 β de coelho; 1: 200, Santa Cruz Biotechnology; anti-albumina de cabra, 1: 20.000,

Bethyl Laboratories, anti-claudina-5 de rato, 1: 100, Invitrogen, anti-caveolina-1 de coelho, 1: 200, Santa Cruz Biotechnology; anti-VCAM-1 de rato, 1: 200, Biotecnologia Santa Cruz; anti-GFAP de coelho, 1: 2.000, Sigma-Aldrich; anti-S100 β de rato, 1: 500, Sigma-Aldrich), durante a noite, a 4° C por incubação com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina IgG anti-cabra (1: 10.000, GE Healthcare), anti-coelho (1: 20.000, GE Healthcare) ou anti-rato (1: 10.000, GE Healthcare), 1h no quarto temperatura (ambiente). O controle interno para o nível de proteína em cada amostra foi avaliado por anti-GAPDH de camundongo (1:10.000, Sigma-Aldrich). Bandas proteicas alvo foram visualizadas após incubação com membrana com quimiofluorescência aumentada (ECF, Amersham) usando um Typhoon FLA 9000 (GE-Healthcare Biosciences) e quantificadas usando o software Image Studio (versão 5.2, Licor).

3.9 Imunofluorescência

Após a perfusão com PFA a 4%, os cérebros foram removidos e incubados durante a noite com PFA a 4%, seguido de sacarose a 30% (em PBS 0,01 M) por 24 h, a 4° C e então armazenados a -80° C, até uso posterior. Cérebros foram processados em fatias coronais de 20 μ m de espessura e montados em lâminas próprias para imunoensaio, lavadas com solução de PBS, depois permeabilizados com Triton X-100 (1%) e bloqueados com BSA a 3% durante 1 h à temperatura ambiente. A incubação dos anticorpos primários foi realizada durante 24 h, a 4° C, utilizando um anticorpo monoclonal conjugado anti-GFAP-Cy3 de camundongo (1:500, Sigma-Aldrich) e anti-colagénio IV de coelho (1: 200, Abcam). Depois disso, fatias de cérebro foram incubadas com 5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) por 5 min no escuro, à temperatura ambiente, para coloração de núcleos. As preparações de amostra foram montadas em meio de fluorescência Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca) e imagens adquiridas e processadas utilizando um microscópio confocal Carl Zeiss LSM 710 Meta (Carl Zeiss; Oberkochen, Alemanha). A quantificação de GFAP e imunorreatividade de colágeno IV foi realizada utilizando o software de análise NIH ImageJ 1.47. Resumidamente, toda a área da fotografia foi considerada, assim como três zonas diferentes sem coloração (preto) para serem utilizadas para subtração de fundo. Para determinar a fluorescência total corrigida,

usamos a seguinte fórmula: fluorescência total correta = (intensidade integrada) - (área da imagem × fundo médio). Os resultados são expressos como a média da intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) de cinco secções cerebrais obtidas de três animais diferentes para cada grupo experimental.

3.10 Análise Morfológica de Processo Astrocítico

Os astrócitos marcados com GFAP foram analisados, as imagens foram enviadas para o *plugin “Simple Neurite Tracer da FIJI Software”* para medir o comprimento (μm) e contar o número de processos astrocíticos. Além disso, para inferir sobre a complexidade arbórea dos astrócitos, foi realizada uma análise de Sholl. Um total de 30 células foram analisadas (10 células / animal de um total de três animais diferentes para cada grupo experimental).

3.11 Estatística

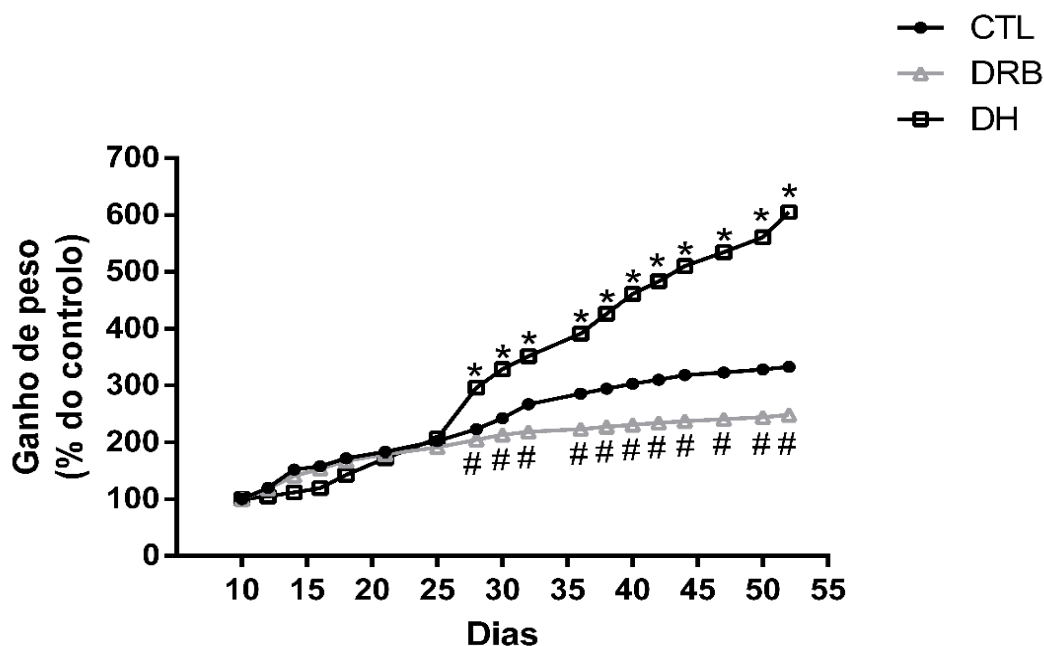
Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM), um mínimo de 6 animais por grupo. A análise estatística de ganho de peso e análise de Sholl foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. Em relação às demais abordagens experimentais, a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. Todas as demandas estatísticas foram calculadas usando o GraphPad Prism 6.0. O nível de significância foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação das mudanças de peso corporal dos grupos experimentais das dietas regional básica (DRB), hiperlipidêmica (DH) e controle (CTL)

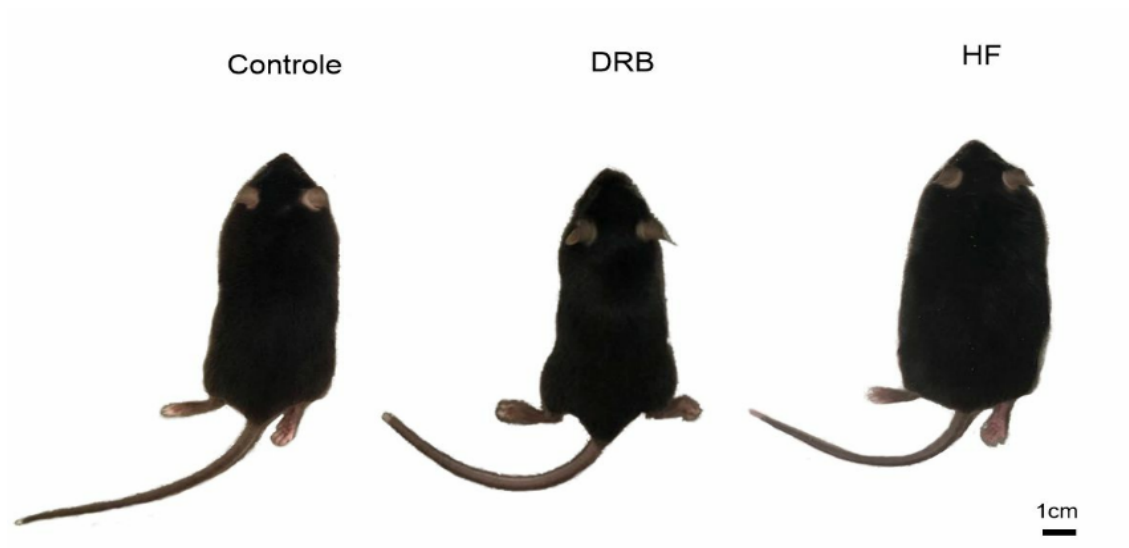
Os camundongos foram agrupados em três coortes submetidas à dieta controle (n = 7), DRB (n = 8) e DH (n = 8). O peso corporal foi monitorado a cada 3 dias por um total de 42 dias, começando no dia 10 pós-natal, com peso corporal médio de $4,4 \pm 0,3$ g, até o 52º dia de idade. Os resultados mostraram que, até o 25º dia pós-natal (DPN), todos os grupos apresentaram um desenvolvimento semelhante. Em seguida, observamos que o grupo controle evoluiu, como esperado, com ganho de peso lento e sustentado, atingindo valor médio de $14,9 \pm 0,2$ g ($332,7 \pm 4,9\%$ de controle). Em relação ao grupo DRB, o peso corporal diminuiu ao longo do tempo, atingindo $10,6 \pm 0,05$ g ($248,5 \pm 1,2\%$ do controle) aos 52 dias de idade, enquanto houve aumento acentuado no ganho de peso para a dieta DH de $26,2 \pm 0,2$ g ($605 \pm 6,1\%$ de controle; **Figura 7**).

Figura 8. Curva de peso dos animais experimentais monitorados a cada três dias, submetidos às dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



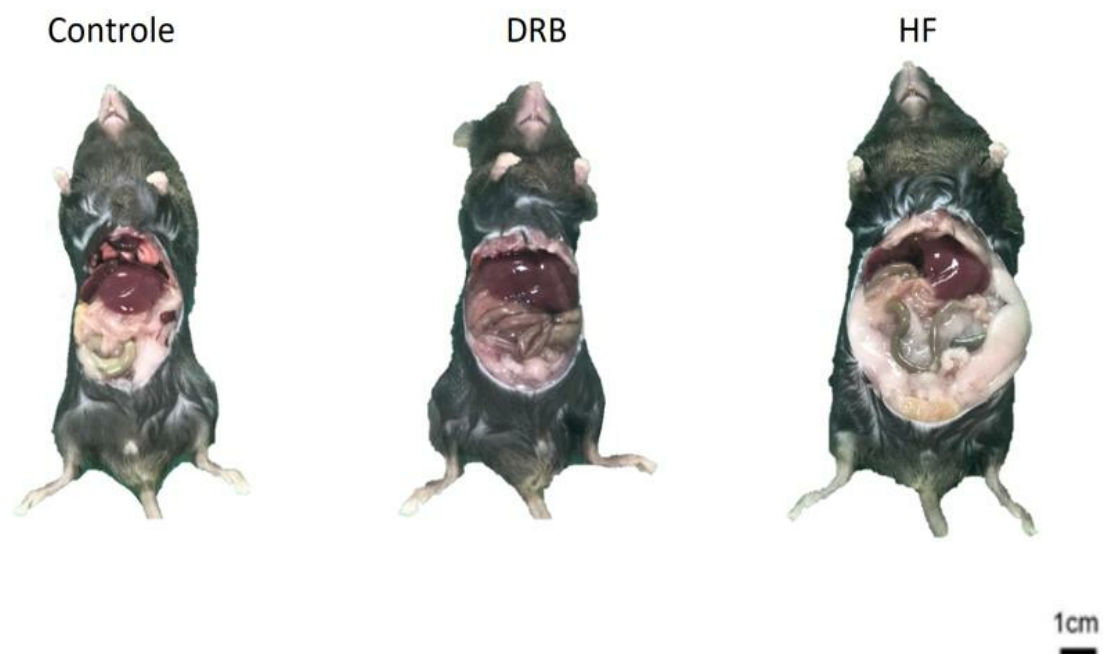
Os resultados estão expressos em % do peso inicial sendo apresentados como média \pm EPM. Os grupos estão representados pelas seguintes siglas: CTL = Controle, DRB = Dieta Regional Básica e DH = Dieta Hiperlipidêmica.

Figura 9. Foto representativa das diferenças do peso dos animais nos grupos experimentais com 52 dias de idade.



Fonte: Fotografada pelo próprio autor.

Figura 10. Foto representativa da gordura visceral dos animais dos grupos experimentais com 52 dias de idade.

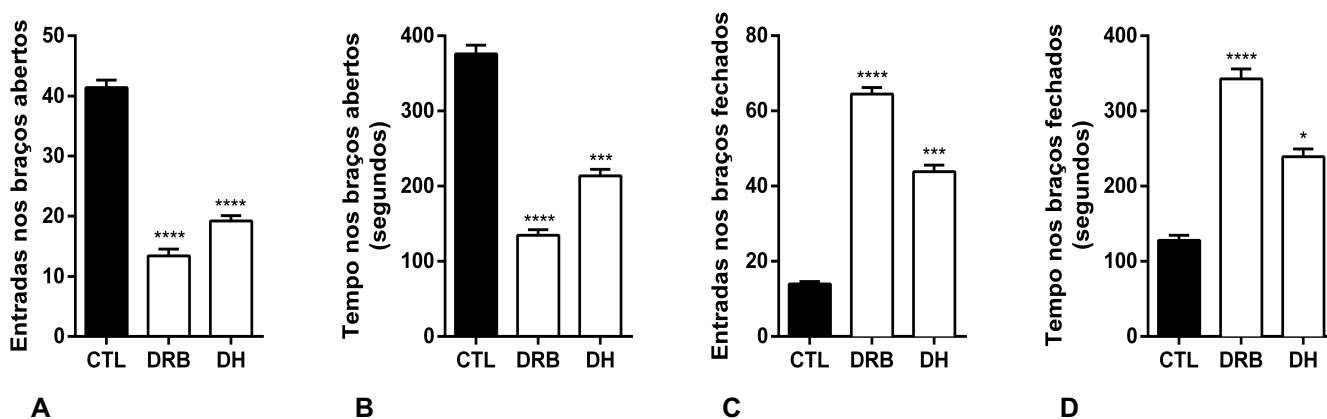


Fonte: Fotografada pelo próprio autor.

4.2. Avaliação comportamental pelo Labirinto de Cruz Elevado

Depois de observar significantes alterações no tecido cerebral, em particular um aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, e que tem sido amplamente associados a alterações comportamentais, resolvemos avaliar se as dietas podem também interferir com o comportamento animal. Assim, questionamos se as dietas utilizadas poderiam induzir um comportamento do tipo ansioso (**Fig. 11**). Usando o labirinto de cruz elevado, observamos que as duas dietas, a DRB e a DH, diminuíram o número de entradas (**Fig. 11A**) e o tempo gastos (**Fig. 11B**) nos braços abertos. Para além disso, um aumento tanto do número total de entradas (**Fig. 11C**) tanto do tempo gasto (**Fig. 11D**) nos braços fechados foi observado depois da exposição às dietas DRB e DH. Estes resultados sugerem que os animais submetidos à dietas não balanceadas desenvolveram um comportamento do tipo depressivo.

Figura 11. Análise do comportamento dos animais pelo Teste do Labirinto Elevado



A exposição crónica às dietas regional básica (DRB) e da hiperlipidêmica (DH) induziu um aumento no comportamento do tipo ansioso. Quer a DRB quer a DH levaram a uma diminuição (A) no número total de entradas nos braços abertos e a (B) uma diminuição no tempo gasto pelos animais nos braços aberto, indicando um comportamento do tipo ansioso. Para além disso, a exposição às duas dietas levou a um aumento (C) quer no número de entradas nos braços fechados, (D) quer no tempo gasto nos braços fechados, o que reforça o efeito ansiogénico das duas dietas. Os resultados são representados como média + EPM, n=20 animais em cada condição. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P <$

0,0001 usando o teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's para comparações múltiplas.

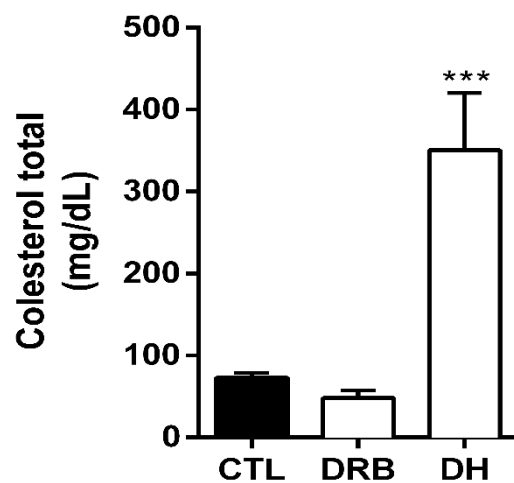
4.3 Determinação do Perfil Lipídico (Soro e Tecido Hepático)

Para avaliar o efeito das dietas em relação ao perfil lipídico, utilizamos amostras do soro e tecido hepático dos camundongos, analisando através da dosagem de colesterol total (soro e tecido hepático), frações LDL e HDL (soro) e triglicerídeos (soro e tecido hepático). Houve um aumento significativo de colesterol no grupo da dieta rica em lipídeos, na análise do soro e do tecido hepático. Não se observou alterações em relação ao grupo da dieta regional básica.

Em relação as frações do colesterol, o LDL se apresentou em maiores concentrações no grupo da dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle e da dieta regional básica. Curiosamente na fração de HDL, o grupo da dieta regional básica houve uma diminuição das concentrações dessa lipoproteína, não observado no grupo controle e dieta rica em lipídeos.

Já na análise dos triglicerídeos, em ambas as amostras, houve uma maior concentração no grupo que utilizava a dieta hiperlipídica. Não havendo alterações nos grupos controle e da dieta regional básica.

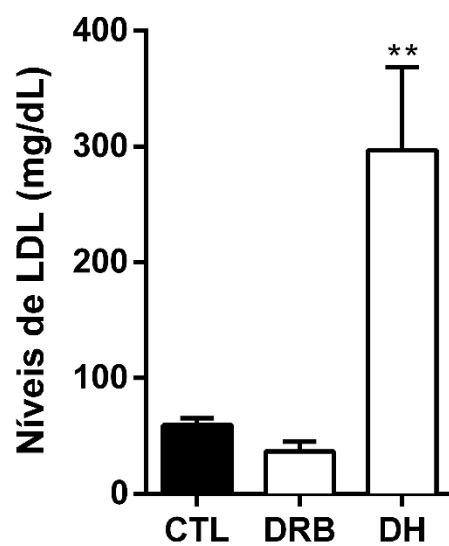
Figura 12. Dosagem de colesterol total sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de colesterol sérico foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo.

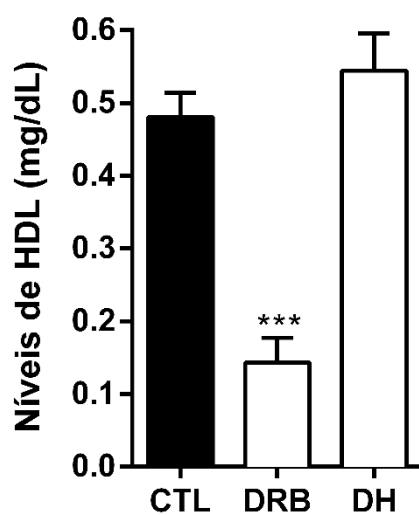
*** $p < 0,003$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett's.

Figura 13. Dosagem de LDL sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de LDL sérico foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo. $**p < 0,004$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnett's.

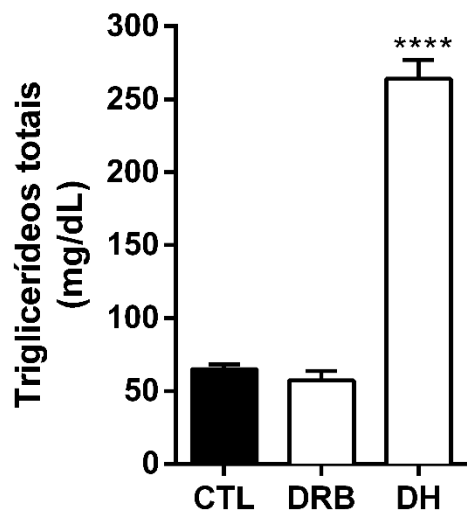
Figura 14. Dosagem de HDL sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de HDL sérico foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo.

*** $p < 0,003$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnet's.

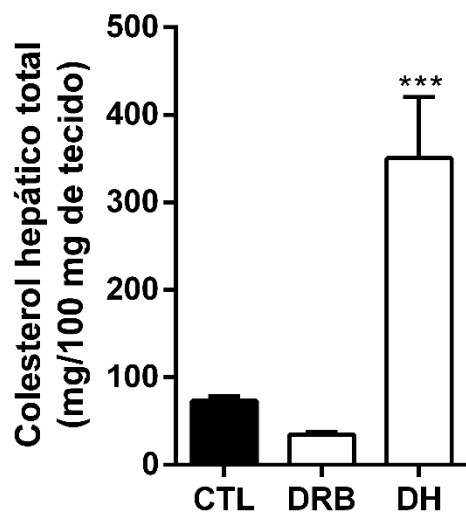
Figura 15. Dosagem Triglicerídeos sérico (mg/dL) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de Triglicerídeos sérico foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo.

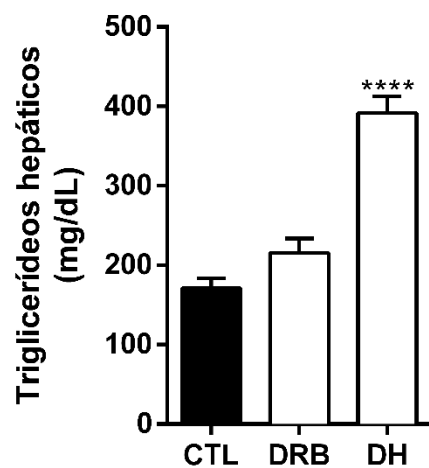
**** $p < 0.001$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnet's.

Figura 16. Dosagem de colesterol hepático total (mg/100mg) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de colesterol total hepático foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo. *** $p < 0.001$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnet's.

Figura 17. Dosagem Triglicerídeos Hepáticos total (mg/100mg) dos animais submetidos ao protocolo das dietas regional básica, hiperlipidêmica e controle.



Os valores de Triglicerídeos sérico foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo.

**** $p < 0.001$ por two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnett's.

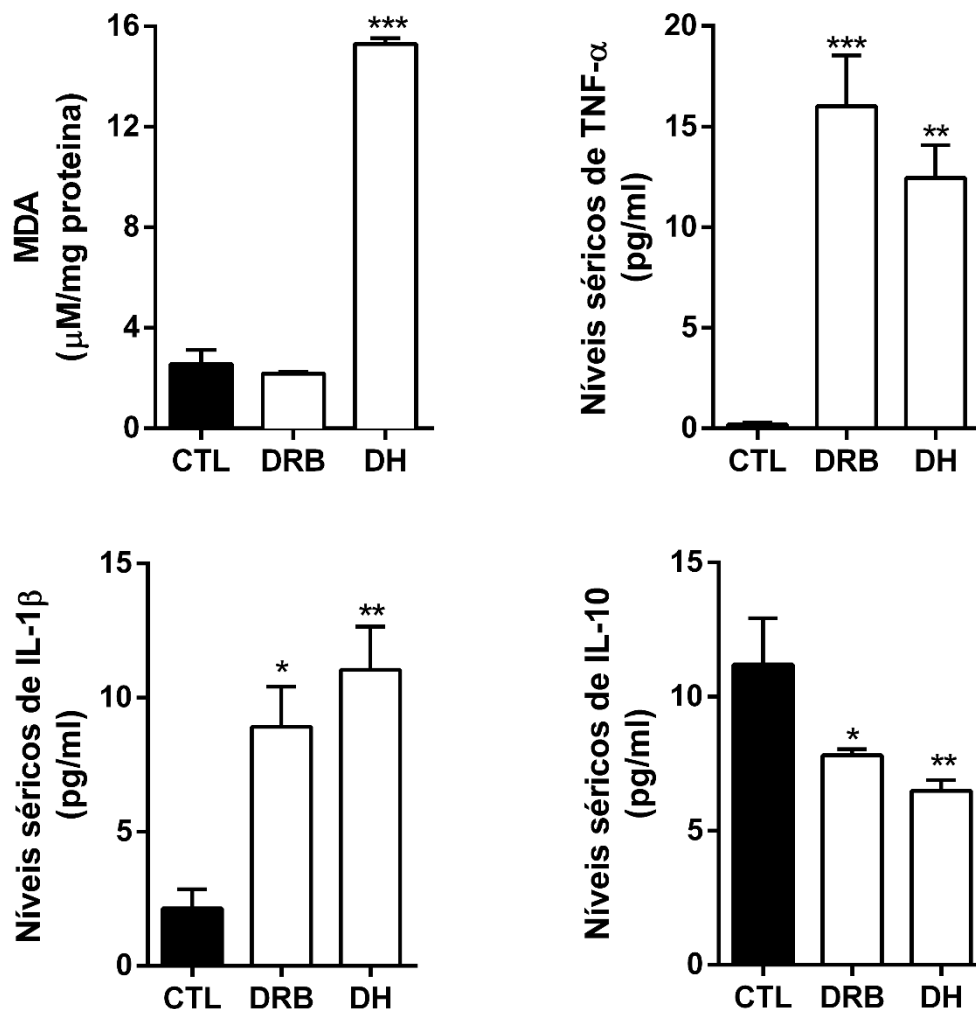
4.4 Determinação de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação

Em seguida, avaliamos diversos mediadores inflamatórios no soro sanguíneo desses animais. Primeiro, observamos um aumento significativo de produtos reativos em animais com dieta DH (**Figura 18A**, $15,3 \pm 0,2 \mu\text{M}/\text{mg}$; $P < 0,001$), sem efeito nos animais com dieta DRB (**Figura 18A**; $2,18 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{mg}$).

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, houve um aumento nos níveis séricos de TNF- α e IL-1 β não apenas em DRB (Figuras 15B, C; $16 \pm 2,5 \text{ pg}/\text{mL}$ TNF- α , $P < 0,001$; $8,9 \pm 1,5 \text{ pg}/\text{mL}$ IL-1 β , $P < 0,05$, respectivamente), mas também em animais sob DH (Figuras 15B, C; $12,5 \pm 1,6 \text{ pg}/\text{mL}$ TNF- α $P < 0,01$; $11 \pm 1,6 \text{ pg}/\text{mL}$ IL-1 β , $P < 0,01$, respectivamente). Além disso, os níveis séricos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram diminuídos com ambas as dietas (**Figura 18D**; DRB $7,8 \pm 0,2 \text{ pg}/\text{mL}$ IL-10, $P < 0,05$; DH $6,5 \pm 0,4 \text{ pg}/\text{mL}$ IL-10, $P < 0,01$). Tais resultados mostram claramente que ambas as dietas induzem um perfil pró-inflamatório periférico.

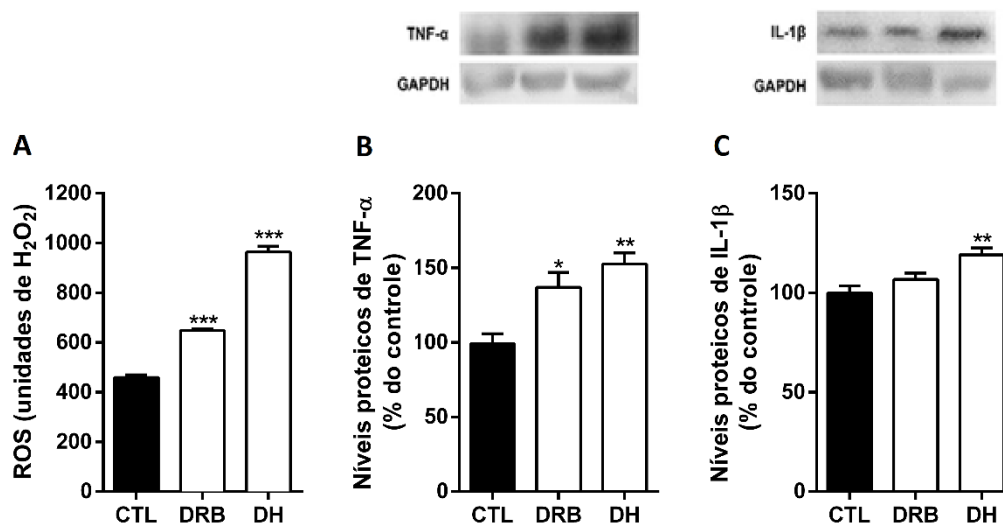
Já foi demonstrado que marcadores séricos podem ter um impacto na função cerebral. Entretanto, também avaliamos em nível central o estado inflamatório dos hipocampus dos animais submetidos às duas dietas. De fato, observamos um significativo aumento na produção de ROS (**Figura 19A**; DRB $648,5 \pm 4,7$ e DH $964,3 \pm 23,3$ Unidades de H_2O_2 , $P < 0,001$) e TNF- α (**Figura 19B**; DRB $137 \pm 10\%$ e DH $153 \pm 7,6\%$ comparados ao controle, $P < 0,01$) por ambas as dietas. Em relação à IL-1 β , houve aumento dos níveis proteicos com a DH (**Figura 19C**, $119 \pm 3,5\%$ comparado ao controle, $P < 0,01$) e apenas uma tendência, ainda que não significativa, pela dieta DRB. No geral, concluímos que ambas as dietas desencadearam um estado inflamatório periférico que foi acompanhado por uma neuroinflamação hipocampal concomitante.

Figura 18. Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) na resposta periférica por mediadores inflamatórios.



(A) formação de malondialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo no soro sanguíneo, é aumentado apenas em animais com dieta hiperlipidêmica (HF). Quantificação por ELISA dos níveis séricos de proteína sérica de citocinas pró-inflamatórias (B) O TNF- α e (C) IL-1 β mostra uma regulação positiva após exposição crônica a ambas as dietas. Além disso, a quantificação por ELISA da citocina anti-inflamatória (D) A IL-10 mostra uma diminuição significativa de seus níveis de proteína tanto na dieta regional básica (DRB) quanto na dieta hiperlipidêmica (HF). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn pós-teste para múltiplas comparações, $n = 5-8$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. grupo controle nutrido (CTR). Os resultados são mostrados como média \pm EPM.

Figura 19. Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) na resposta neuroinflamatória do hipocampo.



Ambas as dietas induziram um estresse oxidativo. (A) observado por um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS) e (B) um aumento dos níveis de proteína TNF- α nos homogenados do hipocampo de camundongos. (C) Somente os animais que se alimentam com a dieta HF mostraram uma regulação positiva significativa dos níveis de proteína IL-1 β . Acima das barras, são mostradas imagens representativas de western blot de TNF- α (19 kDa), IL-1 β (17 kDa) e GAPDH (37 kDa). Os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações, $n = 5-7$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. grupo controle nutrido (CTR). Os resultados são mostrados como média \pm EPM.

4.5 Alterações morfofuncionais da Barreira Hematoencefálica (BHE)

Os processos neuroinflamatórios têm sido descritos como fatores-chave na ruptura da BHE e na transmigração de células imunes periféricas para o parênquima cerebral. Para avaliar as alterações de BHE induzidas por DRB e DH, medimos os níveis de proteína de albumina no tecido cerebral, uma vez que esta proteína transportada pelo sangue não atravessa a BHE em condições normais. O conteúdo de albumina no hipocampo foi significativamente aumentado em camundongos cronicamente submetidos à DRB (**Figura 120A**; $139,3 \pm 10,5\%$; $P < 0,05$) e DH (**Figura 18B**; $179,4 \pm 25,3\%$; $P < 0,01$), indicando um aumento de permeabilidade da BHE desencadeada por ambas as dietas.

Para desvendar ainda mais que o transporte através da BHE está sendo alterado, analisamos os níveis de proteína de claudina-5 endotelial e caveolina-1 (Cav1), esta última associada à degradação da BHE relacionada à lesão cerebral.

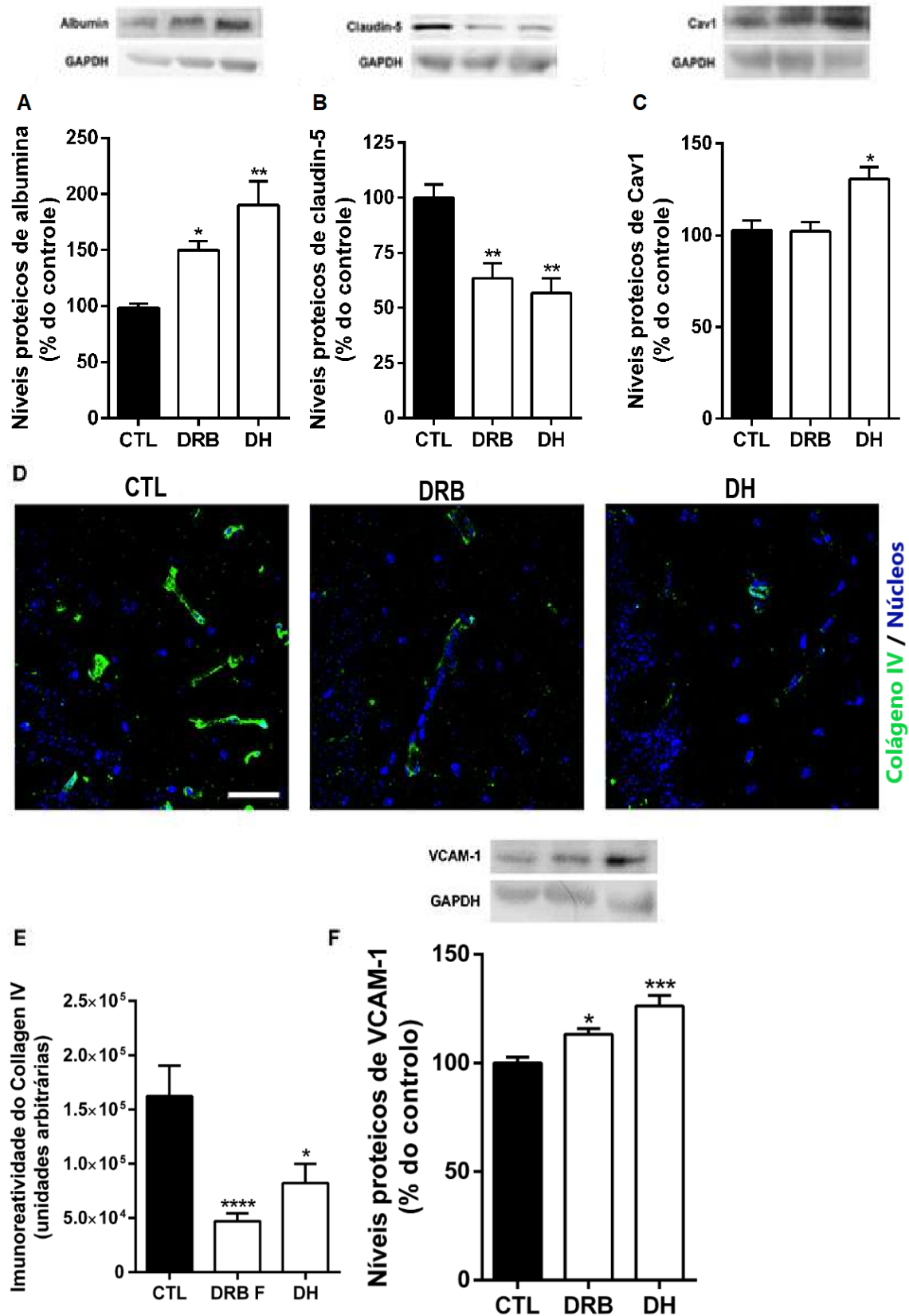
O transporte na BHE pode ocorrer através de vias paracelulares e transcelulares, sendo a primeira controlada por complexos intercelulares presentes entre células endoteliais adjacentes, como a claudina-5, uma proteína de junções firmes (*"tight junctions"*). Já a segunda via ocorre através da célula endotelial e envolve a formação de vesículas, incluindo vesículas revestidas com caveolina-1. Aqui, observamos um significativo *downregulation* (diminuição) dos níveis de proteína claudina-5 (**Figura 19B**) tanto na DRB ($63,5 \pm 6,7\%$, $P < 0,01$) quanto na DH ($56,8 \pm 6,5\%$, $P < 0,01$), sugerindo um aumento na permeabilidade paracelular da BHE. Depois disso, nós investigamos o efeito das dietas na expressão da Cav1 e concluímos que somente a DH foi capaz de induzir uma regulação positiva significativa dos níveis desta proteína (**Figura 19C**, $131 \pm 6,5\%$, $P < 0,05$).

Além disso, para corroborar o enfraquecimento da BHE, também avaliamos alterações na expressão do Colágeno IV por imunomarcação. Esta proteína é uma das mais abundantes na membrana basal, que dá suporte aos microvasos cerebrais. De fato, pôde ser vista uma redução na marcação fluorescente em amostras advindas de animais submetidos às duas dietas (**Figuras 19D, E**; CTR $162,180 \pm 28,098$; DRB $46,959 \pm 7,285$, $P < 0,001$; DH $82,098 \pm 17,780$, $P < 0,05$).

Como a BHE também tem um papel fundamental na contenção da transmigração de leucócitos periféricos no parênquima cerebral, analisamos ainda os níveis de proteína da "Proteína 1 de Adesão Celular Vascular" (VCAM-1), uma

molécula de adesão que promove a passagem de células imunológicas periféricas em um sítio extra vascular. Curiosamente, a exposição crônica a ambas as dietas induziu um *upregulation* (aumento) de VCAM-1 (**Figura 18E**; DRB $113 \pm 2,7\%$, $P < 0,05$; DH $126 \pm 4,9\%$, $P < 0,001$). Os dados apresentados no presente estudo mostram que a desnutrição relacionada à DRB ou à DH desencadeia marcas de estresse oxidativo, (neuro) inflamação e permeabilidade da BHE.

Figura 20. Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) nas propriedades da barreira hematoencefálica.

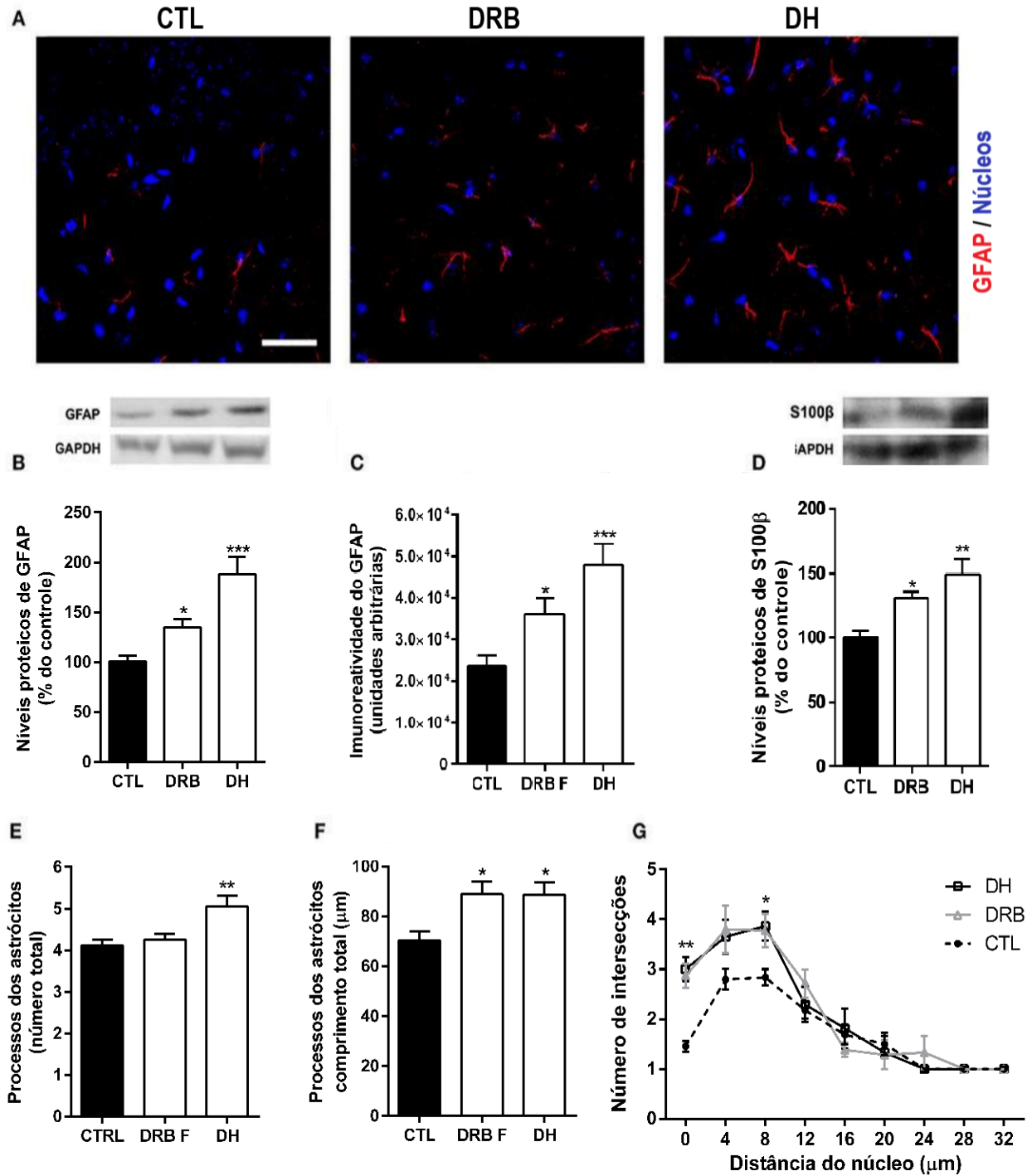


Um aumento da albumina (A) e uma diminuição dos níveis da proteína Claudina-5 (B) foram observados tanto nas dietas DRB quanto na HF. (C) Em relação aos níveis de proteína caveolin-1 (Cav1), também houve um aumento significativo de seus níveis totais no grupo da HFD. (D) Imagens imuno-histoquímicas representativas para o Colágeno IV (verde, vasos cerebrais) e Hoechst (azul, núcleos). Barra de escala = 40 μ m. (E) DRB e HF induziu uma diminuição significativa na imunorreatividade ao colágeno IV. Além disso, ambas as dietas induziram um aumento significativo na (D) VCAM-1 (adesão celular vascular molécula-1). Acima das barras, imagens representativas de western blot da albumina (66 kDa), claudina-5 (25 kDa), caveolin-1 (20 kDa), VCAM-1 (110 kDa) e GAPDH (37 kDa) são mostrados. Os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações, n = 5-7. *P <0,05, **P <0,01, ***P < 0,001, **** P <0,0001 vs. grupo controle nutrido (CTR). Os resultados são mostrados como média \pm EPM.

4.6 Marcadores moleculares de Astrogliose Reativa

É importante ressaltar que os astrócitos têm um papel crucial na estrutura e função da BHE, bem como nos processos neuroinflamatórios. Assim, investigamos o efeito de ambas as dietas em astrócitos e concluímos que a DH induziu um aumento significativo nos níveis de proteína GFAP (**Figura 21A**; Figura 18B; $188 \pm 17,3\%$ de controle, $P < 0,001$) e imunorreatividade (**Figura 21C**; 47.997 ± 5.101 , $P < 0,001$), quando comparado com o controle 23.784 ± 2.412) no hipocampo. A DRB também teve efeito nos dois parâmetros analisados, mas não tão significativo quando comparado ao DH (**Figura 21B**, $135 \pm 8,2\%$ do controle, $P < 0,05$; **Figura 21C**, $36,195 \pm 3,758$, $P < 0,05$, quando comparado ao controle $23,784 \pm 2,412$). Além disso, quando os níveis proteicos de S100 β , um marcador específico de reatividade de astrócitos, foram medidos, um *upregulation* (aumento) foi observado após a exposição a ambas as dietas (**Figura 21D**; DRB $131 \pm 4,79\%$ e DH $149 \pm 11,9\%$ comparados ao controle, $P < 0,05$). Levando em consideração a importância de uma análise simultânea das alterações morfológicas celulares, concluímos que as duas dietas induziram um aumento no comprimento total dos processos astrocíticos (**Figura 21F**; CTR $70,2 \pm 3,6\mu\text{m}$; DRB $88,8 \pm 5\mu\text{m}$; DH $88,6 \pm 5$, $P < 0,05$), e promoveu uma intensificação da complexidade arbórea dessas células (**Figura 21G**; $P < 0,05$). Curiosamente, somente nos animais com DH foi possível observar um aumento no número total de processos astrocíticos (**Figura 21E**; CTR $4,1 \pm 0,1$; DRB $4,3 \pm 0,1$; DH $5,1 \pm 0,3$; $P < 0,01$).

Figura 21. Efeito da dieta regional básica (DRB) e dieta hiperlipidêmica (HF) nas propriedades dos astrócitos.



Imagens imuno-histoquímicas representativas para (A) GFAP (vermelho, astrócitos) e Hoechst (azul, núcleos). Barra de escala = 40 μ m. Ambas as dietas induziram um aumento nos níveis de proteína (B) GFAP, imunorreatividade (C) e nos níveis de proteína (D) S100 β . No entanto, a HF teve um efeito mais pronunciado que a DRB. Em relação às alterações morfológicas, apenas a HF aumentou o (E) número total de processos astrocíticos, sem efeito em animais DRB. No entanto, ambas as dietas induziram um aumento significativo em (F) a duração total de tais processos e (G) na complexidade arbórea. Os resultados são expressos como média + S.E.M., n = 5-7 [para (B, D)], n = 10 [para (C, G)], n = 30 [para (E, F)]. Os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. *P <0,05, **P <0,01 e ***P <0,001 vs. grupo controle nutrido (CTR). Um ANOVA bidirecional seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni foi usado para análise de Sholl, onde *P <0,05 e **P <0,01 vs. CTR.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se observado uma ocidentalização da dieta, com aumento do teor de lipídeos nos alimentos consumidos, tendo como epicentro países em desenvolvimento, causando um grande impacto na saúde. Entretanto, ainda existe o paradoxo de populações mais carentes apresentarem quadros de obesidade ou de desnutrição concomitante na mesma região/área. Apesar de vários estudos pré-clínicos explorarem os impactos de dieta hiperlipídica e de desnutrição na saúde, há uma escassez de informações sobre o seu impacto na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), especialmente na desnutrição proteica (LIEBNER *et al*, 2018).

A BHE é conhecida como a “porta de entrada” do cérebro, sendo extremamente seletiva e protegendo assim o cérebro de variações na composição do sangue e presença de toxinas. Além da função de proteção, atua como transportadora de nutrientes essenciais para o bom funcionamento do cérebro. Assim, qualquer disfunção da BHE pode levar a danos cerebrais e, de fato, é conhecida por ser uma característica comum em todas as doenças neurodegenerativas (HSU *et al*, 2014).

Além disso, quando exposta a lesões relacionadas com trauma, isquemia, distúrbios metabólicos, ou desnutrição, são iniciadas cascatas neuroinflamatórias envolvendo células gliais e vias moleculares que podem interferir na função da BHE (CHEN *et al*, 2007; COELHO-SANTOS *et al*, 2018; LEITÃO *et al*, 2018). A exposição a fatores inflamatórios por longo tempo no cérebro geralmente leva a deficiência crônica da BHE, o que contribuirá para neurodegeneração e neuropatologia, corroborando com o aparecimento precoce de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (HSU *et al*, 2014).

Como fator favorável para a neuroinflamação está a desnutrição crônica (BLANTON *et al*, 2016). A desnutrição persistente pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica e efeitos deletérios no sistema nervoso central (SNC), sendo o hipocampo uma das regiões cerebrais mais suscetíveis (SPENCER *et al*, 2016; ORIÁ *et al*, 2016). Curiosamente o oposto também ocorre, o elevado consumo de calorias, o aumento na frequência das refeições e o conteúdo dos alimentos

modificam a fisiologia do hipocampo, incluindo declínio da *performance* cognitiva, associado a prejuízos na neurogênese e comportamento ansioso (STANGL *et al.*, 2009). O hipocampo é uma região do sistema nervoso central, que além de seu envolvimento na memória e aprendizagem, tem importante papel na regulação do comportamento de ansiedade, dessa forma, esse estudo teve como objetivo analisar o efeitos das dieta hipoproteica e hiperlipídica no estresse oxidativo, inflamação e barreira hemato-encefálica no hipocampo e no comportamento de ansiedade dos animais. A relação da permeabilidade da barreira hemato-encefálica no hipocampo com comportamento de ansiedade em camundongos desafiados por dietas de desnutrição e obesidade ainda é muito pouco explorado.

Nossos resultados apresentam semelhança daqueles encontrados por Souza *et al.* (2007) que investigaram o efeito de uma dieta enriquecida com sacarose e lipídios no comportamento de ansiedade e estado oxidativo do cérebro. No estudo de Souza e colaboradores foi observado que animais que receberam a dieta rica em gordura (com 80% de lipídeos), expostos ao teste do claro/escuro, passaram menos tempo no compartimento iluminado e apresentaram maior número de recusas para entrar neste compartimento em relação aos animais que foram tratados com dieta controle, o que pode ser considerado como indicativo de maior ansiedade. Nos estudos de Ortolani *et al.* (2014) e Estrela *et al.* (2015), animais que receberam a dieta controle com adição de amendoim, chocolate ao leite e bolacha maisena e dieta pobre em proteínas, respectivamente, apresentaram maiores níveis de ansiedade, demonstrado no labirinto em cruz elevado, quando comparados aos animais que foram tratados somente com dieta controle.

Lalanza *et al.* (2014) demonstraram ratas adultas que receberam a dieta hiperlipídica com 80% de gordura por um período de 8 semanas, apresentaram menores níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado e machos apresentaram menores níveis no campo aberto, ambos comparados aos animais que receberam ração comercial. Filhotes de ratas tratadas com dieta hiperlipídica passaram menos tempo no centro do campo aberto, apresentaram menor preferência pelos braços abertos do labirinto em cruz elevado e, na caixa claro-escuro, estes animais apresentaram maior número de bolos fecais quando comparados aos animais filhotes de mães tratadas com ração comercial (SASAKI *et al.*, 2013) e os dados de

Can *et al.* (2012) demonstraram que animais submetidos à dieta hiperlipídica, filhos de ratas mães que também foram submetidas à dieta hiperlipídica durante a gestação, apresentaram maiores níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado. Estes dados corroboram com os encontrados neste trabalho, já que os animais apresentaram comportamentos de maior ansiedade no teste de labirinto de cruz elevada.

Conforme descrito por Soltis *et al.* (2017) as dietas enriquecidas com gordura saturada ou dieta hiperlipídica de forma crônica, podem propiciar um aumento do ganho de peso corporal, induzir à obesidade, favorecem o aumento dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, além de desenvolver lesão hepática, deposição de gordura no fígado, resistência à insulina hepática e esteatose em camundongos.

A maneira da distribuição da gordura corporal é um fator a ser levado em consideração, quanto aos riscos de doenças sistêmicas e hepáticas. Quando há massa corporal elevada, há tecido adiposo extenso e conseqüentemente, mais ácidos graxos em excesso, provenientes do tecido adiposo, são transportados e depositados nos hepatócitos. Dessa forma, acontece o acúmulo de gordura visceral que, se ocorrer de forma exacerbada, dará início a patogênese da doença hepática gordurosa, que resulta em aumento dos perfis lipídicos séricos e hepáticos, fato evidente nos camundongos deste estudo, dentro de dois meses.

O mecanismo do acúmulo de gordura anormal desencadeia um processo inflamatório do tecido, que com o fígado disfuncional, a ativação e liberação de fatores pró-inflamatórios, a exemplo da interleucina IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) e proteína C reativa (PCR). O aumento da concentração dessas citocinas (IL-6 e TNF) conduzem a um estado inflamatório crônico. A liberação de cetonas do fígado também deixa de acontecer, e nesse processo, o fígado não conseguirá evitar a formação excessiva de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico e pode, assim, influenciar na produção de EROs (ZORITA *et al.* 2019).

Com o estresse oxidativo, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a inflamação se torna presente, podendo causar fibrose do tecido hepático e

sensibilizar os hepatócitos a apoptose ou necrose (PUSCHEL e HENKEL, 2019; TREFTS *et al*, 2017). Em nosso estudo, os camundongos do grupo hiperlipidêmico manifestaram tanto ganho de peso quanto gordura visceral acentuados, portanto, justificamos a associação entre obesidade e disfunção metabólica do fígado dos camundongos. Shang *et al*. (2017) e Kanz *et al*. (2019) demonstram um aumento acelerado na curva do ganho de peso e no perfil sérico de lipídeos: colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos séricos, além de perfil hepático de lipídeos: colesterol hepático total e triglicerídeos hepáticos dos camundongos C57BL6/J, que são prejudicados, após o consumo de uma dieta hiperlipidêmica, composta essencialmente de gordura saturada. Tais resultados corroboram com nossos achados. O excesso de gordura na dieta promove o aumento do fluxo hepático de lipídios e resulta em estímulo à síntese de ácidos graxos (AGs) e triglicerídeos (TG) por ativação da SREBP-1c. Fato que explica o aumento de TG no tecido hepático dos camundongos que se alimentaram de dieta hiperlipídica em nosso estudo (JUMP, 2011).

As dietas restritas em proteínas, embora não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas nos parâmetros de perfil lipídico sérico e hepático, exibiram-se em níveis abaixo do grupo da dieta controle, em parâmetros de colesterol total sérico, LDL, triglicerídeos sérico e colesterol hepático total, com redução significativa de HDL. Apesar de não apresentar diferença significativa em relação ao controle no perfil de triglicerídeos hepáticos, o grupo da dieta regional básica mostrou-se superior ao grupo controle. Esse fenômeno pode ser explicado pela redução de gorduras e pelo aporte calórico aumentado dos carboidratos que ultrapassa o limite de estoque, na forma de glicogênio, levando a conversão dos carboidratos em triglicerídeos, no tecido hepático, caracterizando um estado de acúmulo de gordura excessiva no fígado (SILVA *et al*, 2016).

O aumento do diacilglicerol, intermediário na síntese de TG, promove dano lipotóxico dos hepatócitos (SCHUPPAN; SCHATTENBERG, 2013). O excesso de lipídios sobrecarrega a mitocôndria e resulta na redução da oxidação de AGs e da eficiência da cadeia respiratória mitocondrial e consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o H₂O₂ (VIAL *et al*, 2011).

De forma semelhante aos achados na literatura, em nosso modelo crônico de desnutrição ou de dieta com alto teor de lipídeos, também foi observada a presença de marcadores inflamatórios periféricos (soro) e locais (hipocampo), com aumento tanto da produção de H₂O₂ quanto de citocinas pró-inflamatórias.

Alimentação a longo prazo com a DRB (BLANTON, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2014) ou DH (SELLMANN *et al.*, 2015) também se relaciona com a ruptura da barreira intestinal e consequente aumento da translocação bacteriana intestinal para o sangue. Alterações na microbiota intestinal levam ao aumento da proliferação de bactérias Gram-negativas liberadoras de LPS, por ambas as dietas. Podendo contribuir dessa forma para inflamação sistêmica de baixo grau com efeitos deletérios no cérebro devido ao aumento da circulação de LPS na corrente sanguínea, incluindo ruptura da BHE e aumento de EROs (ZHOU *et al.*, 2014).

A inflamação sistêmica também se relaciona com a disfunção da BHE devido ao aumento da atividade neutrofílica, elevando os níveis de mieloperoxidase (MPO) (ULLEN *et al.*, 2013). Essa liberação potencial de MPO dos neutrófilos no sangue circulante pode ser devido ao aumento da ligação de LPS à superfície endotelial dos capilares do cérebro (SINGH E JIANG, 2004). O potencial dano celular com aumento da concentração de EROs promove a peroxidação lipídica, fato comprovado pelo aumento das concentrações de malondialdeído (MDA) no soro.

Corroborando com o exposto, em modelo de sepse, ratos submetidos a ligadura e punção cecal apresentaram aumento da permeabilidade da BHE à coloração de Evans Blue e redução dos níveis endoteliais de claudina-3 e claudina-5, esses efeitos foram curiosamente reparados por droga redutora de colesterol, a sinvastatina (YANG *et al.*, 2015).

Outro impacto da inflamação sistêmica na BHE, foi demonstrado pelo aumento da atividade de neutrófilos pró-inflamatórios liberadores de citocinas e leucócitos que são uma parte essencial do sistema imune inato (ULLEN *et al.*, 2013). De fato, tem sido relatado que a DH consumida de maneira crônica contribui para a

ruptura da BHE em camundongos jovens e idosos, como mostrado pelo aumento da permeabilidade de microvasos cerebrais à IgG e à fluoresceína sódica e a alterações nas proteínas de junção estreita, incluindo ocludina e claudina-5 (KANOSKI *et al*, 2010; TUCSEK *et al*, 2014). Além disso, os mesmos autores concluíram que a DH desencadeia a neuroinflamação, avaliada pela presença de microglia reativa e liberação de citocinas pró- inflamatórias (TUCSEK *et al*, 2014). Além disso, em modelo animal de consumo de DH por 9 semanas, foi observado um aumento na transmigração de leucócitos para o parênquima cerebral (WANROOY *et al*, 2018).

Recentemente, foi demonstrado que a desnutrição proteica preexistente piora os déficits motores observados após o Acidente Vascular Cerebral (AVC) (ALAVERDASHVILI *et al*, 2008). Além disso, a desnutrição proteica pós-isquemia pode agravar processos neuroinflamatórios e inibir a neuroplasticidade no hipocampo (SMITH *et al*, 2014).

Da mesma forma, encontramos que ocorre uma regulação negativa do colágeno IV, a mais importante proteína da membrana basal da BHE, e da proteína de junção de oclusão, claudina-5, que é um forte indicador da disfunção da BHE. Além disso, houve um aumento nos níveis de proteína VCAM-1, uma molécula de adesão especificamente expressa nas células endoteliais e necessária para a transmigração das células imunes no parênquima cerebral. Demonstrou-se dessa forma a imunorreatividade do hipocampo, pelo aumento de cav-1, sugerindo transcitose endotelial ativa, apoiando ainda mais a hiperpermeabilidade da BHE induzida pelas dietas. Também foram verificados valores alterados para citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β locais, no hipocampo, e periféricas, no soro. Assim, demonstra-se que ambos os protocolos de dietas DRB e DH induziram um processo inflamatório geral e local bem documentado, assim como uma hiperpermeabilidade da BHE.

Células gliais, como astrócitos e microglia, estão envolvidas em respostas neuroinflamatórias, desempenhando também um papel importante na função da BHE. Tucsek *et al*. (2014) concluíram que a DH desencadeia neuroinflamação, demonstrada pela microglia ativada e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além

disso, camundongos alimentados cronicamente com DH têm sido associados ao aumento do estresse oxidativo e expressão de GFAP no córtex cerebral e giro denteado, com prejuízo na memória de reconhecimento (FEOLI *et al*, 2007). Estes dados sugerem que o consumo crônico de DH promove uma reatividade astrocitária significativa no hipocampo. De forma semelhante em nosso modelo foi verificado aumento da expressão de GFAP e S100 β . Sendo os animais submetidos à DRB avaliados como menor ativação astrocitária que os da DH.

Curiosamente, Feoli *et al*. (2007) não detectaram alterações no conteúdo imune do GFAP hipocampal e S100 β no 60º dia pós-natal em ratos desnutridos. Tal contradição pode ser explicada por diferenças relacionadas com protocolos de alimentação de dieta e cepas de animais. Ainda assim, os autores observaram um aumento dos níveis de S100 β no líquido cefalorraquidiano.

Como demonstração da alteração sofrida pelas células astrocitárias está o aumento da quantidade de processos astrocitários bem como do comprimento desses. Podendo significar que essas células estão mais reativas devido ao nível do estado inflamatório imposto ao organismo pelas dietas. Outra especulação seria que os astrócitos mais reativos induzido pela dieta, aumentam o comprimento total de forma compensatória na tentativa de preservar a BHE. Contudo apesar da DRB ser visualizada como um elemento promotor de inflamação no soro desses animais, no hipocampo não houve aumento da concentração de IL-1 β nesses animais, ao passo que no modelo DH houve.

A expressão diferenciada das citocinas IL-1 β e TNF- α pode estar relacionada com o não aumento da quantidade de processos astrocitários verificado na DRB, porém houve um aumento do comprimento dos mesmos. Sugerindo uma possível variação no tipo celular expresso. A avaliação de alterações morfológicas astrocíticas é de fundamental importância para entender o papel dessas células gliais na função cerebral. Assim, a fim de estratificar os possíveis tipos diferentes de astrócitos, uma classificação dos astrócitos A1 e A2 foi levantada pelo laboratório de Bem Barres com base em diferentes perfis de expressão gênica (LIDDELOW *et al*, 2017; ZAMANIAN *et al*, 2012). Ambos astrócitos A1 e A2 são células gliais reativas,

nas quais o tipo A1 parece ser induzido pela exposição à IL-1 α , TNF- α e proteínas do complemento (LIDDELOW *et al*, 2017).

Portanto, supõe-se que os modelos de desnutrição do presente estudo, estão mudando os astrócitos para um perfil A1. Assim, observamos uma astrogliose significativa comprovada por um aumento da expressão de GFAP e S100 β , e por alterações morfológicas significativas de astrócitos. Ainda, uma análise genômica é necessária para classificar corretamente o tipo de astrócitos reativos.

Em resumo, o presente estudo mostra que a dieta crônica com DRB e DH afeta negativamente a permeabilidade da BHE e leva ao aparecimento de estresse oxidativo cerebral e inflamação, local e sistêmica, com uma atuação proeminente de astrócitos.

6. CONCLUSÃO

- Houve um ganho de peso mais expressivo nos animais que consumiram a dieta hiperlipidêmica em relação ao grupo controle, já nos animais do grupo da dieta regional básica houve um ganho de peso menor que o grupo controle. Demonstrou-se que os protocolos de ambas as dietas induziram obesidade e desnutrição, respectivamente.

- O excesso de gordura na dieta DH promoveu acúmulo hepático de lipídeos com estímulo a síntese de triglicerídeos, confirmado pela trigliciridemia. O mesmo não se observou na dieta DRB, que induziu apenas um aumento significativo de HDL no soro em relação ao grupo controle.

- Ambas as dietas induziram um processo inflamatório e de estresse oxidativo no hipocampo comprovado pela maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e EROs em relação ao grupo controle. O aumento da peroxidação lipídica no grupo da dieta hiperlipídica, determinada pelas concentrações de MDA (malonaldeído) no soro, sugerindo aumento do estresse oxidativo sistêmico.

- Os nossos resultados sugerem um aumento da permeabilidade da BHE no hipocampo desencadeada por ambas as dietas, devido ao aumento dos níveis parenquimatosos da proteína albumina, visto que esta proteína transportada pelo sangue não atravessa a BHE em condições normais e pela redução da expressão de claudina-5 e aumento de caveolina-1 (esse último apenas induzida pela dieta hiperlipídica).

- A dieta hiperlipídica e DRB induziram um aumento significativo nos níveis de proteína GFAP e S100- β e imunomarcção de GFAP no hipocampo quando comparado ao grupo controle com dieta padrão.

- Observamos que as duas dietas induziram um aumento do comprimento total de processos astrocíticos, e promoveu uma intensificação da complexidade arbórea dessas células.

- Em relação a análise do comportamento de ansiedade pelo teste do labirinto elevado, os animais do grupo da dieta rica em lipídeos e da dieta regional básica, apresentaram um comportamento ansioso, pelo fato de os animais passarem maior intervalo de tempo nos braços fechados do labirinto, apresentando receio de deslocar-se até os braços abertos.

REFERÊNCIAS

- ACAZ-FONSECA, E.; SANCHEZ-GONZALEZ, R.; AZCOITIA, I.; AREVALO, M.A.; GARCIA-SEGURA, L.M. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2014, 389, 48–57.
- ADAMI, C., SORCI, G., BLASI, E., AGNELETTI, A. L., BISTONI, F., DONATO, R. S100B expression in and effects on microglia. **Glia**33: 131–142, 2001. doi:10.1002/1098-1136(200102)33:2131::AID-GLIA10123.0.CO;2-D
- after four-day binge alcohol exposure in male rats. **Alcohol.** 2017 Aug;62:29-40.
- ALARCON-MARTINEZ, L., YILMAZ-OZCAN, S., YEMISCI, M., SCHALLEK, J., KILIC, K., CAN, A., *et al.* (2018). Capillary pericytes express alpha-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. **eLife** 7:e34861. doi: 10.7554/eLife.34861
- ALAVERDASHVILI M, CAINE S, LI X, HACKETT MJ, BRADLEY MP, NICHOL H, *et al.* Protein-energy malnutrition exacerbates stroke-induced forelimb abnormalities and dampens neuroinflammation. **Transl Stroke Res.** (2018) 9:622–30. doi: 10.1007/s12975-018-0613-3
- ALMEIDA-SUHETT CP, SCOTT JM, GRAHAM A, CHEN Y, DEUSTER PA. Control diet in a high-fat diet study in mice: regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes. **Nutr Neurosci.** (2017) 22:19–28. doi: 10.1080/1028415X.2017.1349359
- ALMUTAIRI, M.M.; GONG, C.; XU, Y.G.; CHANG, Y.; SHI, H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. **Cell. Mol. Life Sci.** 2016, 73, 57–77.
- an Antibody to Variant of CD105/Endoglin. **Cells** 2019, 8(7), 766;
- ANLAUF, E., DEROUICHE, A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. **Front Endocrinol (Lausanne)**4: 144, 2013.

ARMULIK A, GENOVÉ G, BETSHOLTZ C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Dev Cell** 2011;21:193–215.

ARMULIK A, GENOVÉ G, MÄE M, NISANCIOGLU MH, WALLGARD E, NIAUDET C *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. **Nature** 2010;468:557–561.

ARNÒ, B., GRASSIVARO, F., ROSSI, C. *et al.* (2014). Neural progenitor cells caveolin-1 is increased in brain injury. **Neuropathol Appl Neurobiol.** (2008) 35:417–26. doi: 10.1111/j.1365-2990.2008.01009.

ASSEFA, B.T.; GEBRE, A.K.; ALTAYE, B.M. Reactive astrocytes as drug target in Alzheimer's Disease. **Biomed. Res. Int.** 2018, 2018, 4160247.

BARRY, D., MCDERMOTT, K. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. **Glia**50: 187–197, 2005. doi:10.1002/glia.20166.

BEDI, S. S., SMITH, P., HETZ, R. A., XUE, H., COX, C. S. Immunomagnetic beta, NF-kappaB and GnRH. **Nature**, 497 (2013), pp. 211-216.

BELLUSCIO, Laura María *et al.* Altered gene expression in hippocampus and depressive-like behavior in young adult female mice by early protein malnutrition. **Genes, Brain and Behavior**, v. 15, n. 8, p. 741-749, 2016.

BENARDAIS K, GUDI V, GAI L, NESSLER J, SINGH V, PRAJEETH CK, *et al.* Long-term impact of neonatal inflammation on demyelination and remyelination in the central nervous system. **Glia** (2014) 62:1659–70. doi: 10.1002/glia.22706

BERGLES, D. E., JAHR, C. E. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. **Neuron**19: 1297–1308, 1997. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80420-1.

BERWECK, S., THIEME, H., LEPPLE-WIENHUES, A., HELBIG, H., AND WIEDERHOLT, M. (1993). Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 34,3402–3407.

BLANTON LV, BARRATT MJ, CHARBONNEAU MR, AHMED T, GORDON JI. CHILDHOOD undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics. **Science** (2016) 352:1533. doi: 10.1126/science.aad9359

BUSHONG, E. A., MARTONE, M. E., JONES, Y. Z., ELLISMAN, M. H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci** 22: 183–192, 2002.

CABEÇO, Ludimila Canuto et al. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 417-424, 2010.

CARDOSO FL, BRITES D, BRITO MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Res Rev.** (2010) 64:328–63. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003

CEKANAVICIUTE E, BUCKWALTER MS. Astrocytes: integrative regulators of neuroinflammation in stroke and other neurological diseases. **Neurotherapeutics** (2016) 13:685–701. doi: 10.1007/s13311-016-0477-8

CHEN TG, CHEN TL, CHANG HC, TAI YT, CHERNG YG, CHANG YT, *et al* Oxidized low-density lipoprotein induces apoptotic insults to mouse cerebral endothelial cells via a Bax-mitochondria-caspase protease pathway. **Toxicol Appl Pharmacol.** (2007) 219:42–53. doi: 10.1016/j.taap.2006.11.031

CHEN, C., et al. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. **Nat. Commun.**, 5 (2014), pp. 1-18

CHENG, J., KORTE, N., NORTLEY, R., SETHI, H., TANG, Y., AND ATTWELL, D. (2018). Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. **Acta Neuropathol.** 136:507–523. doi:10.1007/s00401-018-1893-0

COELHO-SANTOS V, CARDOSO FL, LEITAO RA, FONTES-RIBEIRO CA, SILVA AP. Impact of developmental exposure to methylphenidate on rat brain's immune privilege and behavior: control versus ADHD model. **Brain Behav Immun.** (2018) 68:169–82. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.016

COELHO-SANTOS V, LEITAO RA, CARDOSO FL, PALMELA I, RITO M, BARBOSAM, *et al.* The TNF-alpha/NF-kappaB signaling pathway has a key role in methamphetamine-induced blood-brain barrier dysfunction. **J Cereb Blood Flow Metab.** (2015) 35:1260–71. doi: 10.1038/jcbfm. 2015.59

CORNEJO, F., VON BERNHARDI, R. Age-dependent changes in the activation DA SILVA, Edson Mello; DE OLIVEIRA, Luiz Marcellino; DE SOUSA ALMEIDA, Sebastião. Desnutrição protéica precoce reduz intervalo entre tentativas de ratos em tarefas de discriminação condicional. **Revista Brasileira de Análise do Comportamento**, v. 10, n. 2, 2016.

DALVI et al. Long-term metabolic effects of malnutrition: Liver steatosis and insulin resistance following early-life protein restriction. **Plos one.** Brazil, Rio de Janeiro.v,3.p.77 – 98 jul. 2018

DANEMAN R, ZHOU L, KEBEDE AA, BARRES BA. 2010. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. **Nature** 468:562–66

DE AQUINO, Cristhyane Costa et al. Effect of Hypoproteic and High-Fat Diets on Hippocampal Blood-Brain Barrier Permeability and Oxidative Stress. **Frontiers in nutrition**, v. 5, 2018.

DE HAAS, A. H., BODDEKE, H. W. G. M., BIBER, K. (2008). Region-specific dependent transcriptional network specifies human microglia identity. **Science**

DE ZEEUW, C.I., HOOGLAND, T.M. (2015). Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 246.

DEBOER MD, LIMA AA, ORIA RB, SCHARF RJ, MOORE SR, LUNA MA, *et al.* Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? **Nutr Rev.** (2012) 70:642–53. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00543.

DENVER P, GAULT VA, MCCLEAN PL. Sustained high-fat diet modulates inflammation, insulin signalling and cognition in mice and a modified xenin peptide ameliorates neuropathology in a chronic high-fat model. **Diabetes Obes Metab.** (2018) 20:1166–75. doi: 10.1111/dom. 3210

DI BENEDETTO B, MALIK VA, BEGUM S, JABLONOWSKI L, GOMEZ-GONZALEZ GB, Q13 Neumann ID, *et al.* Fluoxetine requires the endfeet protein aquaporin-4 to enhance plasticity of astrocyte processes. **Front Cell Neurosci.** (2016) 10:8. doi: 10.3389/fncel.2016.00008 doi: 10.1016/j.alcohol.2017.02.175. Epub 2017 Jun 20.

DONATO, R., CANNON, B. R., SORCI, G., RIUZZI, F., HSU, K., WEBER, D. J., GECZY C. L. Functions of S100 proteins. **Curr Mol Med**13: 24–57, 2013. doi:10.2174/156652413804486214.

DOORN, K. J., BREVÉ, J. J. P., DRUKARCH, B. *et al.* (2015). Brain region-DUFFY, P. AND CLEARY, K. Morphology and properties of pericytes. **Methods Mol Biol** 2011; 686: 49–68.

DURAFOURT, B. A., BAR-OR, A., ANTEL, J. P., MOORE, C. S. Roles of drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. **Cell** 159:1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>

EMSLEY, J. G., MACKLIS, J. D. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. **Neuron Glia Biol**2: 175–186, 2006. doi:10.1017/S1740925X06000202.

FARAHANI, R. M., REZAEI-LOTfi, S., SIMONIAN, M., XAYMARDAN, M., AND HUNTER, N. (2019). Neural microvascular pericytes contribute to human adult neurogenesis. **J.Comp.Neurol.**527,780–796.doi:10.1002/cne.24565

FEOLI AM, LEITE MC, TRAMONTINA AC, TRAMONTINA F, POSSER T, RODRIGUES L, et al. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. **Brain Res.** (2008) 1187:33–41. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.035

FERNANDES, Silvio Anderson Toledo et al. Dieta hiperlipídica e ácido linoleico conjugada: efeitos nos lipídios séricos, peso e composição corporal de camundongos ApoE (-/-) exercitados. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 20, n. 1, p. 47-55, 2012.

FERREIRA HS, MOURA FA, CABRAL CR JR, FLORENCIO TM, VIEIRA RC, DE ASSUNCAO, ML. Short stature of mothers from an area endemic for undernutrition is associated with obesity, hypertension and stunted children: a population- based study in the semi-arid region of Alagoas, Northeast Brazil. **Br J Nutr.** (2009) 101:1239–45. doi: 10.1017/S0007114508059357.

FERREIRA, V.A.; MAGALHÃES, R. 15. Obesidade no Brasil: tendências atuais. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, 24(2): 71-78, 2016.

FRANCISCHI, Rachel Pamfilio et al. Dietas hiperlipídicas e frequência alimentar: efeitos sobre as reservas lipídicas em ratos. **Livro de Resumos**, 2001.

GINHOUX, F., GRETER, M., LEBOEUF, M. et al. (2010). Fate Mapping
GOMEZ PERDIGUERO, E., KLAPPROTH, K., SCHULZ, C. et al. (2015).

GONZÁLEZ-MACIEL, Angélica et al. Prenatal protein malnutrition affects the density of GABAergic interneurons during hippocampus development in rats. **Revista de investigación clínica**, v. 67, n. 5, p. 296-303, 2015.

GOSSELIN, D., LINK, V. M., ROMANOSKI, C. E. et al. (2014). Environment

HALL, C. N., REYNELL, C., GESSLEIN, B., HAMILTON, N. B., MISHRA, A., SUTHERLAND, B. A., *et al.* (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. **Nature** 508,55–60. doi:10.1038/nature13165

HARTMANN, D. A., UNDERLY, R. G., GRANT, R. I., *et al.* Pericytes structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high resolution imaging of transgenic mice. **Neurophotonics** 2015; 2: 041402.

HERSOUG LG, MOLLER P, LOFT S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide Q10 in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. **Nutr Res Rev.** 31:153–63. doi: 10.1017/S0954422417000269

HOEFFEL, G., CHEN, J., LAVIN, Y. *et al.* (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, 32, 121–130.

HOL, E.M., PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 32 (2015), pp. 121-130.

HONDA H, UEDA M, KOJIMA S, MASHIBA S, SUZUKI H, HOSAKA N, *et al.* Oxidized high-density lipoprotein is associated with protein-energy wasting in maintenance hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2010) 5:1021 8. doi: 10.2215/CJN.06110809

HONÓRIO DE MELO MARTIMIANO, Paula *et al.* Maternal protein restriction during gestation and lactation in the rat results in increased brain levels of kynurenine and kynurenic acid in their adult offspring. **Journal of neurochemistry**, v. 140, n. 1, p. 68-81, 2017.

HSU TM, KANOSKI SE. Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. **Front Aging Neurosci.** (2014) 6:88. doi: 10.3389/fnagi.2014.00088

IKEZU, T., KAMPHUIS, W., MAMBER, C., MOETON, M., KOOIJMAN, L., SLUIJS, J. A., *et al.* (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. **PLoS One**, 7, e42823.

ITO, K., SANOSAKA, T., IGARASHI, K., IDETA-OTSUKA, M., AIZAWA, A., UOSAKI, Y., TAKIZAWA, T. (2016). Identification of genes associated with the astrocyte-specific gene *Gfap* during astrocyte differentiation. **Scientific Reports**, 6, 23903.

JAMES, C.R., AND COTLIER, E.(1983). Fate of insulin in the retina: an autoradiographic study. **Br.J.Ophthalmol.** 67,80–88. doi:10.1136/bjo.67.2.80

JUNGBLUT, M., TIVERON, M. C., BARRAL, S., ABRAHAMSEN, B., KNÖBEL, S., PENNARTZ, S., SCHMITZ, J., PERRAUT, M., PFRIEGER, F. W., STOFFEL, W., CREMER, H., BOSIO, A. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal anti-body ACSA-1. **Glia**60: 894–907, 2012. doi:10.1002/glia.22322.

KAMPHUIS, W., MIDDELDORP, J., KOOIJMAN, L., SLUIJS, J. A., KOOI, E. J., MOETON, M., HOL, E. M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 35, 492–510.

KANDILIS *et al.* Liver innervation and hepatic function: New insights. **Journal of Surgical Research**. Texas, Houston, v. 194, n° 2, p. 511 – 519, abr. 2015.

KANOSKI SE, ZHANG Y, ZHENG W, DAVIDSON TL. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. **J Alzheimers Dis.** (2010) 21:207–19. doi: 10.3233/JAD-2010-091414

KATZ DL. The mass of humanity and the weight of the world: obesity and the environment at a confluence of causes. **Curr Obes Rep.** (2016) 5:386–8. doi: 10.1007/s13679-016-0236-5

KEARNEY J. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2010) 365:2793–807. doi: 10.1098/rstb.2010.0149

KHAKH, B. S., BEAUMONT, V., CACHOPE, R., MUNOZ-SANJUAN, I., GOLDMAN, S. A., AND GRANTYN, R. (2017). Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington's disease. **Trends in neurosciences** 40, 422-437.

KIM, Tae-Woon; PARK, Hye-Sang. Physical exercise improves cognitive function by enhancing hippocampal neurogenesis and inhibiting apoptosis in male offspring born to obese mother. **Behavioural brain research**, v. 347, p. 360-367, 2018.

KOBAYASHI, T., AND PURO, D. G. (2007). Loss of insulin-mediated vasoprotection: early effect of diabetes on pericyte-containing microvessels of the retina. **Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.**48,2350–2355.

KUNZ *et al.* Sericin as treatment of obesity: morphophysiological effects in obese mice fed with high-fat diet. **Eistein**. Brasil, São Paulo.v.18, p. 26, set.2019.

KUO YC, LU CH. Effect of human astrocytes on the characteristics of human brain-microvascular endothelial cells in the blood-brain barrier. **Colloids Surf B Biointerfaces** (2011) 86:225–31. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.005

LEBOUCHER, Antoine *et al.* Brain insulin response and peripheral metabolic changes in a Tau transgenic mouse model. **Neurobiology of disease**, v. 125, p. 14-22, 2019.

LECLERC, E., FRITZ, G., WEIBEL, M., HEIZMANN, C. W, GALICHET, A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. **J Biol Chem**282: 31317–31331, 2007. doi:10.1074/jbc.M703951200.

LEITAO RA, SERENO J, CASTELHANO JM, GONCALVES SI, COELHO-SANTOS V, FONTES-RIBEIRO C, *et al.* Aquaporin-4 as a new target against methamphetamine-induced brain alterations: focus on the neurogliovascular unit and

motivational behavior. **Mol Neurobiol.** (2018) 55:2056–69. doi: 10.1007/s12035-017-0439-0

LI, D., LIU, X., LIU, T., LIU, H., TONG, L., JIA, S., WANG, Y. F. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia.** 2019 Oct 18. doi: 10.1002/glia.23734.

LIDDELOW SA, BARRES BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. **Immunity** (2017) 46:957–67. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006

LIDDELOW SA, GUTTENPLAN KA, CLARKE LE, BENNETT FC, BOHLEN CJ, SCHIRMER L, *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature** (2017) 541:481–7. doi: 10.1038/nature 21029

LIDDELOW, S.A., BARRES, B.A. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. **Immunity.**, 46 (2017), pp. 957-967.

LIEBNER S, DIJKHUIZEN RM, REISS Y, PLATE KH, AGALLIU D, CONSTANTIN G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. **Acta Neuropathol.** (2018) 135:311–36. doi: 10.1007/s00401-018-1815-1

LIEBNER, S., CZUPALLA, C. J., AND WOLBURG, H. (2011). Current concepts of bloodbrain barrier development. **Int. J. Dev. Biol.** 55, 467–476. doi: 10.1387/ijdb.103224sl

LIEN, C.F.; MOHANTA, S.K.; FRONTZAK-BANIEWICZ, M.; SWINNY, J.D.; ZABLOCKA, B.; GORECKI, D.C. Absence of glial alpha-dystrobrevin causes abnormalities of the blood–brain barrier and progressive brain edema. **J. Biol. Chem.** 2012, 287, 41374–41385.

LING PR, SMITH RJ, KIE S, BOYCE P, BISTRAN BR. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in

rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** (2004) 287:R801–8.doi:10.1152/ajpregu.00715.2003

LIU, G., CAI, D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-macrophages. **Immunity** 42:665–678.<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>

MAHAN, V. L. Neurointegrity and neurophysiology: astrocyte, glutamate, and carbon monoxide interactions. **Med Gas Res.** 2019;9(1):24-45.

LOTOCKI G, DE RIVERO VACCARI JP, PEREZ ER, SANCHEZ-MOLANO J, FURONES-ALONSO O, BRAMLETT HM, *et al.* Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury effects of post traumatic hypothermia. **J Neurotrauma** (2009) 26:1123–34 doi:10.1089/neu.2008.0802

LUNDGAARD, I., OSÓRIO, M. J., KRESS, B. T., SANGGAARD, S., NEDERGAARD, M. White matter astrocytes in health and disease. **Neuroscience** 276: 161–173, 2014. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.050.

MA, Q., ZHAO, Z., SAGARE, A. P., WU, Y., WANG, M., OWENS, N. C., *et al.* (2018). Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid- β 2 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism. **Mol. Neurodegener.** 13:57.doi:10.1186/s13024-018-0286-0

MACK, A. F., & WOLBURG, H. (2006). Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. **Brain Research**, 1103, 25–31.

MATT, S. M., JOHNSON, R. W. Neuro-immune dysfunction during brain aging: macrophages. **Immunity** 42:665–678.<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>

MAHAN, V. L. Neurointegrity and neurophysiology: astrocyte, glutamate, and carbon monoxide interactions. **Med Gas Res.** 2019;9(1):24-45.

MATTHIAS, K., KIRCHHOFF, F., SEIFERT, G., HÜTTMANN, K., MATYASH, M., KETTENMANN, H., STEIN-HÄUSER, C. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. **J Neurosci** 23: 1750–1758, 2003.

MICHELL-ROBINSON, M. A., TOUIL, H., HEALY, L. M., OWEN, D. R., MICHINAGA, S., KOYAMA, Y. Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. **Int. J. Mol. Sci.**, 20(3), 571. 2019.

MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M. Therapeutic strategy of targeting astrocytes for neuroprotection in Parkinson's Disease. **Curr. Pharm. Des.** 2017, 23, 4936–4947.

MULLER, W.A. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. **Am. J. Pathol.** 2014, 184, 886–896.

NAG S, MANIAS JL, STEWART DJ. Expression of endothelial phosphorylated microglia in brain development, tissue maintenance and repair. **Neuroscience Methods**. 2013; 219:176–182. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.07.017
new insights in microglial cell regulation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 26 (2016), pp. , 138

NASREDDINE *et al.* Nutritional status and dietary intakes of children amid the nutrition transition: the case of the Eastern Mediterranean Region. **Nutrition Research**. Líbano, Beirut. v.57, p. 12 – 27, set. 2018.

NISANCIOGLU MH, MAHONEY WM, KIMMEL DD, SCHWARTZ SM, BETSHOLTZ C, GENOVÉ G. Generation and characterization of rgs5 mutant mice. **Mol Cell Biol** 2008; 28:2324–2331.

NISTAL *et al.* Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. **Elsevier**. Espanha, Léon v.102, p.188 – 202. jan. 2017.

NIXDORF-BERGWEILER, B. E., ALBRECHT, D., HEINEMANN, U. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. **Glia**12: 180–195, 1994. doi:10.1002/glia.440120304.

NORENBERG, M. D., MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Fine structural localization of glutaminy synthetase in astrocytes of rat brain. **Brain Res**161: 303–310, 1979. doi:10.1016/0006-8993(79)90071-4.

OBERHEIM, N. A., TAKANO, T., HAN, X., HE, W., LIN, J. H., WANG, F., XU, Q., WYATT, J. D., PILCHER, W., OJEMANN, J. G., RANSOM, B. R., GOLDMAN, S. A., NEDERGAARD, M. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J Neurosci** 29: 3276–3287, 2009. doi:10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009.

OLUDE, M. A., MUSTAPHA, O. A., ADEROUNMU, O. A., OLOPADE, J. O., IHUNWO, A. O. Astrocyte morphology, heterogeneity, and density in the developing African giant rat (*Criceto-mys gambianus*). **Front Neuroanat** 9: 67, 2015. doi:10.3389/fnana.2015.00067.

ORIA RB, MURRAY-KOLB LE, SCHARF RJ, PENDERGAST LL, LANG DR, KOLLING GL, *et al.* Early-life enteric infections: relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. **Nutr Rev.** (2016) 74:374–86. doi: 10.1093/nutrit/nuw008

PENG, H., GEIL NICKELL, C. R., CHEN, K. Y., MCCLAIN, J. A., NIXON, K. PETERI, U.-K., NIUKKANEN, M., AND CASTRÉN, M.L. (2019). Astrocytes in neuropathologies affecting the frontal cortex. **Frontiers in cellular neuroscience. Physiol (Lond)** 595:1929–1945. <https://doi.org/10.1113/JP272134>

PINHEIRO, A.R.O. et al. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutr.**, 17(4): 523-533, 2004.

PONATH, G.; PARK, C.; PITT, D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. **Front. Immunol.** 2018, 9, 217.

POTOKAR, M., KREFT, M., LI, L., DANIEL ANDERSSON, J., PANGRSIC, T., CHOWDHURY, H. H., ZOREC, R. (2007). Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. **Traffic**, 8, 12–20.

PRAZERES, Flávia Guerra et al. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 1, p. 7-16, 2004.

PREVOT, V., DEHOUCK, B., SHARIF, A., CIOFI, P., GIACOBINI, P., CLASADONTE, J. (2018). The versatile tanycyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. **Endocrine reviews** 39, 333-368.

PROEBSTL D, VOISIN M-B, WOODFIN A, WHITEFORD J, D'ACQUISTO F, JONES GE *et al.* Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. **J Exp Med** 2012;209:1219–1234.

PULGARON ER. Childhood obesity: a review of increased risk for physical and psychological comorbidities. **Clin Ther.** (2013) 35:A18–32. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.12.014

PÜSCHEL, GERHARD; HENKEL, JANIN. Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. **Biomedical Journal**. Portugal, Porto. v.12,p.114 – 116, jun. 2019.

RAI, A., MAURYA, S. K., SHARMA, R., & ALI, S. (2013). Down-regulated GFAPalpha: A major player in heavy metal induced astrocyte damage. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 23, 99–107.

RAUCH, S. REALE, E. (1968) The pericytes (Rouget cells) of the stria vascularis vessels [German]. **Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd** 192, 82–90.

RENSINK, A. A., OTTE-HOLLER, I., DE BOER, R., BOSCH, R. R., TEN DONKELAAR, H. J., DE WAAL, R. M., et al. (2004). Insulin inhibits amyloid beta-

induced cell death in cultured human brain pericytes. **Neurobiol. Aging** 25, 93–103.
doi: 10.1016/ s0197-4580(03)00039-3

RIBATTI, D., NICO, B., AND CRIVELLATO, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. **Int.J.Dev.Biol.**55,261–268.doi:10.1387/ijdb.103167dr

RIBEIRO XAVIER, A. L., KRESS, B. T., GOLDMAN, S. A. et al. (2015). A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. **J Neurosci** 35:11848–11861.<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015>

RICKMANN, M., WOLFF, J. R. S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. **Neuroscience** 67: 977–991, 1995. doi:10.1016/0306-4522(94)00615-C.

RITURAJ, N. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. **Mol. Neurobiol.**, 49 (2014), pp. 28-38.

ROBERTS, R.C., ROCHE, J.K., AND MCCULLUMSMITH, R.E. (2014). Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. **Neuroscience** 277, 522-540.

RODRIGUEZ-BAEZA, A., REINA-DE LA TORRE, F., ORTEGA-SANCHEZ, M., AND SAHUQUILLO-BARRIS, J. (1998) Perivascular structures in corrosion casts of the human central nervous system: a confocal laser and scanning electron microscope study **Anat Rec** 252, 176–184.

ROSE, C. F., VERKHRATSKY, A., PARPURA, V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. **Biochem Soc Trans.** 2013;41:1518-1524.

ROSSI, D., AND VOLTERRA, A. (2009). Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. **Brain research bulletin** 80, 224-232.

ROUGET, C. Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. **Arch Physiol Norm Path** 1873; 5: 603–663.

RUCKER, H. K., WYNDER, H. J., AND THOMAS, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. **Brain Res. Bull.** 51, 363–369. doi: 10.1016/s0361-9230(99) 00260-9

RUSTENHOVEN, J., JANSSON, D., SMYTH, L. C., AND DRAGUNOW, M. (2017). Brain pericytes as mediators of neuroinflammation. **Trends Pharmacol. Sci.** 38, 291– 304. doi:10.1016/j.tips.2016.12.001.

SAGARE, A. P., BELL, R. D., ZHAO, Z., MA, Q., WINKLER, E. A., RAMANATHAN, A., et al. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. **Nat. Commun.** 4:2932. doi:10.1038/ncomms3932

SARKER, Gitalee; PELEG-RAIBSTEIN, Daria. Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 7, 2019.

SCHACHTER J, MARTEL J, LIN CS, CHANG CJ, WU TR, LU CC, et al. Effects of obesity on depression: a role for inflammation and the gut microbiota. **Brain Behav Immun.** (2018) 69:1–8. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.026

SCHMITT, A., ASAN, E., PÜSCHEL, B., KUGLER, P. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. **J Neurosci** 17: 1–10, 1997. **Science** 330:841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

SENGILLO, J. D., WINKLER, E. A., WALKER, C. T., SULLIVAN, J. S., JOHNSON, M., AND ZLOKOVIC, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood brain barrier disruption in Alzheimer's disease. **Brain Pathol.** 23, 303–310. doi: 10.1111/bpa.12004

SHANG *et al.* Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. **Lipids in health and disease**. China, Wuhan.v.65,p.17, mar. 2017.

SHERWOOD, C.C., STIMPSON, C.D., RAGHANTI, M.A., WILDMAN, D.E., UDDIN, M., GROSSMAN, L.I., GOODMAN, M., REDMOND, J.C., BONAR, C.J., ERWIN, J.M. (2006). Evolution of increased glia–neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 13606-13611.

SILVA *et al.* Influence of glycemic index and glycemic load of the diet on the risk of overweight and adiposity in childhood. **Revista Paulista de pediatria**. Brazil, São Paulo.v.34,p.293 – 300. abr, 2016.

SMITH SE, FIGLEY SA, SCHREYER DJ, PATERSON PG. Protein-energy malnutrition developing after global brain ischemia induces an atypical acute-phase response and hinders expression of GAP-43. **PLoS ONE** (2014) 9:e107570. doi: 10.1371/journal.pone.0107570

SOLTIS *et al.* Hepatic Dysfunction Caused by Consumption of a High-Fat Diet. *Cell Reports*. USA, **Crambridge**.v.12, p. 3317 – 3328. dez. 2017.

specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia. **Front Cell**

SPENCER SJ, D'ANGELO H, SOCH A, WATKINS LR, MAIER SF, BARRIENTOS RM. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal- and amygdalar-dependent memory. **Neurobiol Aging** (2017) 58:88–101. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.014

STANGL D, THURET S. Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. **Genes Nutr.** (2009) 4:271–82. doi: 10.1007/s12263-009-0134-5

STEINER, J., BERNSTEIN, H. G., BIELAU, H., BERNDT, A., BRISCH, R., MAWRIN, C., KEILHOFF, G., BOGERTS, B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. **BMCNeurosci**8: 2, 2007. doi:10.1186/1471-2202-8-2.

STRAIN W. D. AND PALDANIUS P. M. (2018) Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. **Cardiovasc. Diabetol.** 17, 57.

SUPANC V, BILOGLAV Z, KES VB, DEMARIN V. Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke. **Ann Saudi Med.** (2011) 31:365–70. doi: 10.4103/0256-4947.83217

SWEENEY, M. D., AYYADURAI, S., AND ZLOKOVIC, B. V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. **Nat. Neurosci.** 19, 771–783. doi:10.1038/nn.4288

TAKAHASHI, H., TAKATA, F., MATSUMOTO, J., MACHIDA, T., YAMAUCHI, A., DOHGU, S., *et al.* (2015). Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 457, 532–537. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.016

TAKESHITA, Y.; RANSOHOFF, R.M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: Chemokine regulation and in vitro models. **Immunol. Rev.** 2012, 248, 228–239.

TATEYA S, KIM F, TAMORI Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Front Endocrinol (Lausanne).** 2013 Aug 8;4:93.

TAVARES G, MARTINS M, CORREIA JS, SARDINHA VM, GUERRA-GOMES S, DAS NEVES SP, *et al.* Employing an open-source tool to assess astrocyte tridimensional structure. **Brain Struct Funct.** (2017) 222:1989–99. doi: 10.1007/s00429-016-1316-8

TAVERNA, E., GÖTZ, M., HUTTNER, W.B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. **Annual review of cell and developmental biology** 30, 465-502.

TAY, T. L., SAVAGE, J. C., HUI, C. W. ET AL (2017). Microglia across the Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid

TREFTS, ELIJAH; GANNON MAUREEN; WASSERMAN DAVID. The liver. *Current Biology*, **Nashville, Tennessee**, v.27, n° 21, p.3225 – 3402, nov. 2017.

TSHALA-KATUMBAY D, MWANZA JC, ROHLMAN DS, MAESTRE G, ORIA RB. A global perspective on the influence of environmental exposures on the nervous system. **Nature** (2015) 527:S187–92. doi: 10.1038/nature16034

TUCSEK Z, TOTH P, SOSNOWSKA D, GAUTAM T, MITSCHELEN M, KOLLER A, *et al.* Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** (2014) 69:1212–26. doi: 10.1093/gerona/glt177

UENO PM, ORIA RB, MAIER EA, GUEDES M, DE AZEVEDO OG, WU D, *et al.* Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** (2011) 301:G612–22. doi: 10.1152/ajpgi.00531.2010

ULLEN A, SINGEWALD E, KONYA V, FAULER G, REICHER H, NUSSHOLD C, *et al.* Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo. **PLoS ONE** (2013) 8:e64034. doi: 10.1371/journal.pone.0064034

UNDERLY, R. G., LEVY, M., HARTMANN, D. A., GRANT, R. I., WATSON, A. N., AND SHIH, A. Y. (2017). Pericytes as inducers of rapid, matrix metalloproteinase-dependent capillary damage during ischemia. **J. Neurosci.** 37, 129–140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2891-16.2016

VAN BODEGRAVEN, E.J., VAN ASPEREN, J.V., ROBE, P.A.J., HOL, E.M. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. **Glia.**, 67 (2019), pp. 1417-1433.

VAN ELDIK, L. J., WAINWRIGHT, M. S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restor Neurol Neurosci**21: 97–108, 2003.

VANLANDEWIJCK, M., HE, L., MÄE, M. A., ANDRAE, J., ANDO, K., DEL GAUDIO, F., *et al.* (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. **Nature** 14,1–34.

VASILE, F., DOSSI, E., ROUACH, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function** 222.

VERKHRATSKY, A., NEDERGAARD, M. (2018). Physiology of Astroglia **Physiological Reviews**, 98 (1), 239–389.

VILLABONA-RUEDA, A., ERICE, C., PARDO, C. A., STINS, M. F. The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. **Front Cell Neurosci.** 2019;13:405. Published 2019 Sep 20. doi:10.3389/fncel.2019.00405.

VILLARREAL, A., SEOANE, R., GONZÁLEZ TORRES, A., ROSCISZEWSKI, G., ANGELO, M. F., ROSSI, A., BARKER, P. A., RAMOS, A. J. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. **J Neurochem** 131: 190–205, 2014. doi:10.1111/jnc.12790.

VIZUETE, A. F. K., HENNEMANN, M. M., GONÇALVES, C. A., & DE OLIVEIRA, D. L. (2017). Phase-dependent astroglial alterations in Li–Pilocarpine induced status epilepticus in young rats. **Neurochemical Research**, 42, 2730–2742.

WALSON JL, BERKLEY JA. The impact of malnutrition on childhood infections. **Curr Opin Infect Dis.** (2018) 31:231–6. doi: 10.1097/QCO.0000000000000448

WANROOY BJ, KUMAR KP, WEN SW, QIN CX, RITCHIE RH, WONG CHY. Distinct contributions of hyperglycemia and high-fat feeding in metabolic syndrome-induced neuroinflammation. **J Neuroinflammation** (2018) 15:293. doi: 10.1186/s12974-018-1329-8

WARMKE, N., GRIFFIN, K. J., SLATER, C. I., WALKER, A. M. N., YULDASHEVA, N. Y., AND CUBBON, R.M.(2017).186 Reduced pericyte insulin signaling causes abnormal developmental angiogenesis. **Heart** 103,A127–A128.

WEINHARD, L., DI BARTOLOMEI, G., BOLASCO, G. et al. (2018). Maternal high-fat diet programs offspring emotional behavior in adulthood. **Neuroscience**, v. 388, p. 87-101, 2018.

WU YH, CHUANG SY, HONG WC, LAI YJ, CHANG GJ, PANG JH. Berberine reduces leukocyte adhesion to LPS-stimulated endothelial cells and VCAM- 1 expression both in vivo and in vitro. **Int J Immunopathol Pharmacol.** (2012) 25:741 50. doi: 10.1177/039463201202500320

YEH, C. Y., VERKHRATSKY, A., TERZIEVA, S., RODRÍGUEZ, J. J. Glutamine synthetase in astrocytes from entorhinal cortex of the triple transgenic animal model of Alzheimer's disease is not affected by pathological progression. **Biogerontology**14: 777–787, 2013. doi:10.1007/s10522-013-94561.

ZAMANIAN JL, XU L, FOO LC, NOURI N, ZHOU L, GIFFARD RG, *et al.* Genomic analysis of reactive astrogliosis. **J Neurosci.** (2012) 32:6391–410. doi:10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012

ZARATE *et al.* Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment. **Elsevier**. México, México city. v.86, p.163 – 169 jun. 2016.

ZHANG, G., LI, J., PURKAYASTHA, S., TANG, Y., ZHANG, H., YIN, Y., LI, B., Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. **Glia.**, 67 (2019), pp. 1417-1433.

ZHOU, M., KIMELBERG, H. K. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. **JNeurosci** 21: 7901–7908, 2001.

ZORITA *et al.* Relationship between Changes in Microbiota and Liver Steatosis Induced by High-Fat Feeding – A Review of Rodent Models. **Nutrients**. Espanha, Vitória. v9. p.11. set. 2019.

ZUTPHEN *et al.* Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction. **Journal of hepatology**. USA, Chicago.vol. 65. 1198 – 1208. jun. 2016.

ANEXOS