



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LANNI SARMENTO DA ROCHA

EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA RICA EM TRIHEPTANOÍNA SOBRE A
MEMÓRIA E O TRANSPORTE DE GLICOSE CEREBRAL EM CAMUNDONGOS
JOVENS E IDOSOS

MACEIÓ - AL

2022

LANNI SARMENTO DA ROCHA

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA RICA EM TRIHEPTANOÍNA SOBRE A
MEMÓRIA E O TRANSPORTE DE GLICOSE CEREBRAL EM CAMUNDONGOS
JOVENS E IDOSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ximenes da Silva, professora associada do Instituto de Ciências da Saúde da UFAL.

MACEIÓ - AL

2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

R672e Rocha, Lanni Sarmiento da.
 Efeito da dieta cetogênica rica em triheptanoína sobre a memória e o
 transporte de glicose cerebral em camundongos jovens e idosos / Lanni
 Sarmiento da Rocha. – 2022.
 76 f. : il., grafs., tabs. color.

 Orientadora: Adriana Ximenes da Silva.
 Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas.
 Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
 Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

 Bibliografia: f. 66-75.
 Anexos: f. 76.

 1. Triheptanoína. 2. Dieta cetogênica. 3. Envelhecimento. 4. Memória
 animal. 5. Cérebro. I. Título.

CDU: 591.53.063:599.323

Dedico esse trabalho ao meu filho Tomás, que no momento desta defesa de doutorado, ainda não havia nascido, mas já era o motivo e a força que precisei para conseguir estar
nesta reta final.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Arnaldo Perciano da Rocha** e **Tatiana Tavares Sarmento**, por toda uma vida em que não mediram esforços para nos ver, eu e minhas irmãs, felizes e seguras de nossas capacidades de realizar nossos objetivos e sonhos.

Às minhas irmãs, **Lissa Sarmento de Souza** e **Milzi Sarmento da Rocha**, pelo companheirismo, a torcida, e a certeza que tenho de que sempre estarão presentes quando eu precisar.

Ao meu marido **Walber Silva de Oliveira**, por ter estado do meu lado nesses quatro anos, compreendendo minhas ausências e apoiando minhas escolhas. Obrigada, meu amor, pelas vindas ao laboratório nos finais de semana e feriados, por me ajudar a construir equipamentos para os experimentos e por todo amor a mim dedicado.

Aos meus avós maternos, **Milzi Sarmento da Rocha** e **José Tavares Sarmento** (*in memoriam*) pelo amor dedicado à nossa família e por serem meus grandes exemplos dos seres humanos que objetivo ser.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Adriana Ximenes da Silva**, por me aceitar em seu laboratório sem ao menos me conhecer e pelo esforço dedicado à realização desse projeto. A senhora será sempre um exemplo da grande professora que é, que ensina o que aprende, lê, pesquisa com entusiasmo e dedicação.

À minha coorientadora, **Prof.^a Dr.^a Sônia Salgueiro Machado**, por abrir as portas de seu laboratório e atenção e disponibilidade dedicada à mim.

Aos meus companheiros do LEMC, **Carmelita Bastos**, **Cibelle Bastos**, **Giselma Alcântara**, **Guilherme Albuquerque**, **Jaqueline Santos**, **José Clementino**, **Lucas Chagas**, **Maísa Araújo** e **Rodrigo Lima** pelos bons momentos no laboratório em que pudemos nos tornar amigos além de colegas de pesquisa. Gostaria de agradecer especialmente à **Carmelita**, com quem dividi as angústias de um doutorado na pandemia, por toda a disponibilidade e vontade de me ajudar nos momentos que mais precisei.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS/UFAL)**, por compartilharem seus conhecimentos nas disciplinas, seminários e outras oportunidades.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por proporcionar a formação de novos mestres e doutores.

A empresa **Ultragenyx Pharmaceutical Inc** pela doação da triheptanoína, sem a qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Muito obrigada!

RESUMO

O envelhecimento do cérebro leva à redução da captação e utilização de seu principal substrato energético, a glicose. Esse chamado hipometabolismo da glicose parece estar na base da perda de função cognitiva observada no envelhecimento. No entanto, a capacidade de utilizar corpos cetônicos é similar entre o cérebro adulto e o idoso. Diante disso, a dieta cetogênica, um regime alimentar com restrição severa de carboidratos (~20g/dia) e rica em gorduras, vem sendo apontada como uma abordagem capaz de, pelo menos parcialmente, reverter o hipometabolismo. No entanto, a restrição de carboidratos pode comprometer o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT) e trazer prejuízos energéticos. A hipótese do presente estudo é de que a suplementação da dieta cetogênica com um triglicerídeo anaplerótico, a triheptanoína, tem efeito positivo no CAT e com isso melhora a memória de camundongos idosos. Sendo assim, o objeto do estudo foi avaliar se a dieta cetogênica suplementada com triheptanoína melhora a função cognitiva no envelhecimento. O presente trabalho é composto por uma introdução, uma ampla revisão da literatura com os principais achados a respeito da base bioenergética do envelhecimento do cérebro, dieta cetogênica, anaplerose e memória e um artigo de resultado intitulado “*Triheptanoin, an odd-medium-chain triglyceride, impacts brain cognitive function in young and aged mice*”. No artigo, camundongos C57/BL6 adultos (12 semanas) e idosos (22 meses de idade) foram submetidos aos seguintes tratamentos dietéticos: (1) DC, (2) DC+T7 ou (3) dieta controle durante 12 semanas. O teste no labirinto em Y, no qual foram avaliados a alternância espontânea e tempo gasto em braço previamente fechado; e o teste de reconhecimento de objeto novo (NORT), que avaliou o tempo interagindo com um objeto desconhecido foram utilizados para a avaliação da memória. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no lobo pré-frontal, cérebro e cerebelo foi avaliada. A expressão de GLUT3 no lobo pré-frontal também foi analisada pelo método de Western blot. A dieta cetogênica (DC) diminuiu a alternância espontânea (memória de trabalho espacial) em camundongos idosos (idoso CTRL = $52,5 \pm 5,2\%$; idoso DC = $46,6 \pm 7,7\%$; idoso DC+T7 = $57,2 \pm 6,5\%$), levou à menor atividade da AChE no lobo frontal (idoso CTRL = $0,975 \pm 0,010$; idoso DC = $0,760 \pm 0,016$; idoso DC+T7 = $0,962 \pm 0,029$ U/mg proteína) e cerebelo (idoso CTRL = $0,284 \pm 0,011$; idoso DC = $0,169 \pm 0,008$; idoso DC+T7 = $0,160 \pm 0,001$ U/mg proteína) de camundongos idosos e nos lobo parieto-temporal-occipital dos animais adultos (adulto CTRL = $0,716 \pm 0,026$; adulto DC = $0,623 \pm 0,001$; adulto DC+T7 = $0,902 \pm 0,003$ U/mg de proteína). Além disso, a DC levou à menor expressão de GLUT3 no lobo pré-frontal de camundongos adultos (adulto CTRL = $100 \pm 14,5$; adulto DC = $72,9 \pm 6,5$; adulto DC+T7 = $68,2 \pm 9,1$ % expressão relativa). A suplementação de triheptanoína à DC evitou o comprometimento da memória nos animais idosos, apresentou valores semelhantes de atividade de AChE em ambos os adultos e idosos e expressão de GLUT3 nos adultos semelhante aos controles. Nossos dados sugerem um papel potencial da triheptanoína na melhora da função cognitiva. Em conclusão: a DC piorou a função cognitiva e a função colinérgica dos camundongos idosos, efeito não observado nos animais suplementados com triheptanoína.

Palavras-chaves: Triheptanoína; dieta cetogênica; envelhecimento; memória; cérebro.

ABSTRACT

The aging brain presents reduced glucose uptake and utilization, a process known as hypometabolism. This hypometabolism underlies impairment seen in cognitive function in the aged. Nonetheless, the aging brain preserves the capacity of ketone body utilization. Ketogenic diet (KD), a food regimen with severe carbohydrate restriction (~20g/d) and high-fat composition, emerges as an approach to counterbalance hypometabolism. However, KD could compromise the Tricarboxylic Acid Cycle (TAC), impairing energy metabolism. Here, we hypothesize that KD supplementation with an anaplerotic triglyceride, the triheptanoin, could improve TAC and improve memory in aged mice. The aim was to evaluate whether the ketogenic diet supplemented with triheptanoin ameliorates cognitive function in the aged. This thesis consists of an introduction, a literature review on the bioenergetic basis of the aging brain process, KD, memory, and anaplerosis, and an article named "Triheptanoin, an odd-medium-chain triglyceride, impacts brain cognitive function in young and aged mice". In the article, C57/BL6 adult (12 weeks) and aged (22-month-old) mice were given (1) KD, (2) KD supplemented with triheptanoin, and (3) control diet for 12 weeks. Y-maze test, which evaluated spontaneous alternation (spatial working memory) and time spent in the previously closed arm and, novel object recognition test (NORT) accessed mice memory. Acetylcholinesterase (AChE) activity was measured in the prefrontal lobe, brain, and cerebellum. GLUT3 expression from the frontal lobe was analyzed by the western blot method. KD reduced spontaneous alternation in aged mice (aged CTRL = $52,5 \pm 5,2\%$; aged KD = $46,6 \pm 7,7\%$; aged DC+T7 = $57,2 \pm 6,5\%$), led to lower AChE activity in adults and aged, besides lower GLUT3 expression in the prefrontal lobe (aged CTRL = $0,975 \pm 0,010$; aged KD = $0,760 \pm 0,016$; aged KD+T7 = $0,962 \pm 0,029$ U/mg protein) and cerebellum (aged CTRL = $0,284 \pm 0,011$; aged KD = $0,169 \pm 0,008$; aged KD+T7 = $0,160 \pm 0,001$ U/mg protein) of aged mice and, parieto-temporal-occipital lobe of adult mice (adult CTRL = $0,716 \pm 0,026$; adult KD = $0,623 \pm 0,001$; adult KD+T7 = $0,902 \pm 0,003$ U/mg de protein). Furthermore, KD decreased GLUT3 expression in the frontal lobe of adult mice (adult CTRL = $100 \pm 14,5$; adult KD = $72,9 \pm 6,5$; adult KD+T7 = $68,2 \pm 9,1$ % relative expression). Triheptanoin supplementation prevented memory impairment e showed similar AChE activity and GLUT3 levels compared to controls. Our data suggest a potential role of triheptanoin in brain bioenergetic, cognitive function. In conclusion, KD worsened cognitive and cholinergic function in aged mice, effect not observed in mice supplemented with triheptanoin.

Key words: Triheptanoin, ketogenic diet, aging, memory, brain.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Unidade neurovascular..... Pág. 20

FIGURA 2. Síntese de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos livres (AGL) e transporte para o cérebro para oxidação via Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT). BHB: betahidroxibutirato; MCT: transportador de monocarboxilatos. **FONTE:** autor, 2021..... Pág. 22

FIGURA 3. Transportadores de monocarboxilatos (MCTs) e transportadores de glicose (GLUTs) expressos na barreira hematoencefálica. **FONTE:** traduzido e adaptado de SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI (2007)..... Pág. 24

FIGURA 4. Efeito anaplerótico da triheptanoína a partir de sua conversão em succinil-CoA. PC: piruvato carboxilase; PDH: piruvato desidrogenase. **FONTE:** adaptado de TEFERA et al.,2017..... Pág. 31

FIGURA 5. Fornecimento de energia para os neurônios a partir do heptanoato. O heptanoato é convertido em acetil-CoA no astrócito e entra no ciclo do ácido Tricarboxílico (CAT). Um dos intermediários do CAT, o α -cetoglutarato pode ser desviado para a síntese de glutamato (1), depois convertido em glutamina (2) e transportada para os neurônios (3). No neurônio, a glutamina (Gln) é convertida em glutamato (4), podendo ser utilizado como fonte de energia por sua reconversão em o α -cetoglutarato (5). **FONTE:** autor, 2021..... Pág. 34

RESULTADOS

FIGURA 1. *Bodyweight monitoring of the adults (A) and aged (B) groups. Bodyweight (g) was measured weekly before and during all the experimental periods.....* Pág. 51

FIGURA 2. *Glycemia (A and C) and β -hydroxybutyrate (B and D) levels. Samples from the tail vein were obtained at baseline and every three weeks for 12 weeks at the same time of the day.....* Pág. 52

FIGURA 3. Behavioral tests to access spatial memory (Y maze, A and B) and short-term working memory (NORT; C, and D) Pág. 53

FIGURA 4. Acetylcholinesterase (AChE) activity of the prefrontal lobe (A), the whole brain (B), and the cerebellum (C)..... Pág. 54

FIGURA 5. Cell and/or nuclear area counting of the prefrontal cortex (A and B), medial brain cortex (C and D), and cerebellum (E) slicesPág. 55

FIGURA 6. GLUT3 expression in the prefrontal lobe (A) was quantified by the intensity of the GLUT3 bands using the western blot method in triplicate..... Pág. 56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composition of control, ketogenic (KD) and ketogenic supplement with triheptanoin (KDT7) diets..... Pág. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC1 - Acetil-CoA carboxilase 1

APOE4 - Alelo 4 do gene da Apolipoproteína E

ATP - Adenosina trifosfato

BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor* = Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHB - β -hidroxibutirato

BHE – Barreira hematoencefálica

C5 - Corpos cetônicos com 5 carbonos da cadeia

CAT - Ciclo do Ácido Tricarboxílico

CCs - Corpos cetônicos

DA - Doença de Alzheimer

DC - Dieta cetogênica

DP - Doença de Parkinson

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GLUT1 - *Glucose Transporter protein isoform 1* = Transportador de glicose isoforma 1

GLUT3 - *Glucose Transporter protein isoform 3* = Transportador de glicose isoforma 3

HIF-1 - *Hypoxia inducible factor-1 α* = fator 1- α induzível por hipóxia

IMC – Índice de massa corporal

LDL - *Low density lipoprotein* = lipoproteína de baixa densidade

M1 – Receptor muscarínico 1

MCT - *Monocarboxylate transporter* = transportador de monocarboxilato

NF- κ B - Fator nuclear kappa β

NMDA - N-metil D-Aspartato

Nrf2 - *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* = Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

OMS - Organização Mundial de Saúde

PET-SCAN - Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons

PPAR α – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

T7 - Triheptanoína

TCM - Triglicerídeo de cadeia média

UCP - Uncoupling protein = Proteína desacopladoras

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
2	Revisão da Literatura.....	16
2.1	O envelhecimento do cérebro e o desenvolvimento de doenças.....	16
2.2	Metabolismo energético do Sistema Nervoso Central no adulto e no idoso.....	18
2.3	Metabolismo da dieta cetogênica como uma terapia alternativa.....	23
2.4	Metabolismo da triheptanoína e possíveis benefícios.....	30
2.5	Memória, neurotransmissores e dieta cetogênica.....	34
2	Objetivos.....	39
3	Resultados.....	41
4	Considerações Finais.....	63
5	Referências.....	64
6	Anexos.....	76

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em nível biológico, o envelhecimento é associado ao acúmulo de danos moleculares e celulares, levando a uma perda gradual das reservas fisiológicas e aumentando o risco do desenvolvimento de doenças e incapacidades em geral (OMS, 2015). Embora este processo seja heterogêneo entre os indivíduos, o envelhecimento causa mudanças em todos os órgãos e sistemas, incluindo o sistema nervoso central e seu órgão principal: o cérebro (WYSS-CORAY, 2016).

Dentre as modificações ocasionadas pelo envelhecimento cerebral, a captação e utilização de substratos energéticos tem sido relacionado com comprometimento da função cognitiva e desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento (CUNNANE et al., 2016). A redução na captação cerebral de glicose foi demonstrada há cerca de 40 anos por Leon et al. (1983), estudo em que pacientes com demência senil apresentaram menor captação de glicose em comparação com idosos saudáveis. Essa redução se correlacionou com função cognitiva reduzida.

Posteriormente, esse achado foi confirmado utilizando tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-SCAN). Nesses estudos, a captação de glicose foi menor em idosos com comprometimento cognitivo moderado ou doença de Alzheimer (DA) instalada (CASTELLANO et al., 2014; CROTEAU et al., 2018). Idosos saudáveis também tiveram a captação de glicose cerebral avaliada por PET-SCAN. Foi demonstrado que esses idosos saudáveis (sem comprometimento cognitivo e/ou alteração neurológica evidente em exame de imagem) tem menor captação de glicose em relação a adultos jovens (NUGENT et al., 2016).

Em modelos animais, observou-se uma redução na captação de glicose no cérebro de um modelo de envelhecimento precoce (*senescence-accelerated prone mouse strain 9 – SAMP8*), além de menor expressão de transportadores de glicose (ZHANG et al., 2013), mesmo sem doença neurodegenerativa observada. Astrócitos de ratos idosos, quando colocados em um meio de cultura, mostraram menor captação de glicose e menor expressão do transportador de glicose isoforma 1 (GLUT1) em relação aos astrócitos de animais jovens (SOUZA et al., 2015). Essas evidências sugerem a existência de um comprometimento metabólico em que a captação de glicose está reduzida e, consequentemente, menos utilizada como fonte de energia pelo cérebro que envelhece,

em um processo chamado de hipometabolismo do cérebro (HERTZ; CHEN; WAAGEPETERSEN, 2015).

Os estudos também mostram que essa captação reduzida de glicose é maior em indivíduos que possuem fatores de risco para o desenvolvimento de doença de Alzheimer como histórico familiar (MOSCONI et al., 2011), expressão da lipoproteína APOE4 (HERTZ; CHEN; WAAGEPETERSEN, 2015; WU; ZHANG; ZHAO, 2018) e diabetes mellitus (NGUYEN et al., 2020). Esses achados evidenciam o hipometabolismo como um dos mecanismos chaves da falha energética cerebral, resultando na morte neuronal vista em doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento (GANO; PATEL; RHO, 2014). Esse processo de falha energética pode se instalar anos e até décadas antes de que se perceba qualquer prejuízo nas funções cerebrais (CUNNANE et al., 2016).

No entanto, essa redução na utilização de glicose a medida em que o cérebro envelhece não é homogênea entre as regiões, sendo algumas áreas mais vulneráveis ao hipometabolismo que outras. Em ratos, foi observado um tônus inibitório, com redução de atividade bioquímica e eletrofisiológica no córtex pré-frontal, porém uma hiperatividade na sub-região CA3 no hipocampo (HERNANDEZ et al., 2018). Em humanos, a taxa metabólica cerebral da glicose foi de 11 a 17% menor no córtex frontal superior, no córtex frontal médio caudado e no núcleo caudado de idosos, mesmo na ausência de qualquer comprometimento cognitivo ou doença neurodegenerativa diagnosticada (NUGENT et al., 2014). Além disso, foi observada a uma menor taxa de glicólise aeróbica no cerebelo e no lobo médio temporal de seres humanos, em relação às outras áreas do cérebro (VAISHNAVI et al., 2010)

O nível de mielinização dos axônios nas diferentes regiões do cérebro poderia explicar a diferença encontrada: axônios mielinizados utilizam menos energia na transmissão do impulso nervoso devido à condução saltatória e, sendo assim, seriam menos prejudicados com a redução da disponibilidade de glicose. Por outro lado, áreas do cérebro com axônios menos mielinizados, ou desmielinizados, utilizam mais ATPases na condução do impulso nervoso e mais energia seria consumida por esses neurônios. Nessas regiões, o comprometimento energético tenderia a se instalar primeiro (MAMELAK, 2017).

Durante o jejum prolongado, ou em qualquer momento em que o organismo que seja submetido à privação de glicose, o cérebro é capaz de utilizar corpos cetônicos como fonte alternativa de energia para manter seu funcionamento (RUSEK et al., 2019). No entanto, diferente do que é observado com a captação de glicose, estudos revisados por

Cunnane et al. (2016) não encontraram redução na captação de corpos cetônicos no cérebro nos idosos em relação aos adultos.

Além disso, o hipometabolismo parece não estar relacionado à diminuição da função mitocondrial e sim a alterações na via glicolítica. A redução da glicólise parece levar à redução dos transportadores de glicose no cérebro (CUNNANE et al., 2016). Sendo assim, uma abordagem que fosse capaz de fornecer energia para o cérebro sem que a via glicolítica seja necessária, poderia melhorar a produção de ATP e assim preservar a função neuronal.

Neste contexto, muitos grupos de pesquisa no mundo inteiro têm estudado terapias alternativas que forneçam energia para o metabolismo cerebral excluindo a captação de glicose do processo (BROWNLOW et al., 2017; HUANG et al., 2019; ZHANG et al., 2018). Dentre essas terapias alternativas, a dieta cetogênica (DC) foi extensivamente estudada como uma possível abordagem capaz de cumprir este papel. Devido a sua composição, a DC estimula a síntese endógena de corpos cetônicos pelo fígado, que, por não os utilizar como fonte de energia, libera os corpos cetônicos para serem captados pelo cérebro (GANO; PATEL; RHO, 2014).

Estudos com humanos idosos tem demonstrado que, ao menos no curto prazo, a cetose induzida por dieta cetogênica ou por suplementação com triglicerídeos de cadeia média (TCM) pode melhorar ou inibir deterioração da memória (RUSEK et al., 2019). Em relação aos estudos em modelos animais, Brownlow et al. (2017) observaram que a dieta cetogênica melhora a memória de curto prazo em ratos adultos, porém, Huang et al. (2019) não encontraram efeito positivo da dieta em camundongos também adultos. Alguns poucos estudos utilizando camundongos idosos observaram melhora da memória com DC, maior atividade locomotora, além de aumento na sobrevivência dos animais (NEWMAN et al., 2017; XU et al., 2010).

No entanto, algumas questões envolvendo dieta cetogênica e metabolismo cerebral precisam ser esclarecidas. A glicose, além de fornecer energia, através de sua conversão em oxalacetato pelo enzima piruvato carboxilase, tem papel de fornecer oxalacetato para o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT), chamado efeito anaplerótico da glicose. O oxalacetato, por sua vez, mantém o pool de intermediários do CAT, que são utilizados para a síntese de outras moléculas, como a acetilcolina. Diferentemente da glicose, os corpos cetônicos fornecidos pela DC não possuem esse efeito anaplerótico, o que poderia comprometer o CAT com o uso prolongado da dieta (MARIN-VALENCIA et al., 2013). Assim, o comprometimento do CAT poderia reduzir a síntese de acetilcolina

no longo prazo, piorando funções neurais envolvidas com esse neurotransmissor, como a memória (ROE; MOCHEL, 2006).

Acetilcolina é um neurotransmissor conhecido inicialmente por seu papel chave na junção neuromuscular. Porém, a acetilcolina produzida por núcleos colinérgicos do tronco encefálico possui também papel neuromodulador central, sendo capaz de coordenar respostas dos circuitos neuronais em muitas áreas do cérebro, modificando a excitabilidade neuronal, alterando a liberação pré-sináptica de outros neurotransmissores e coordenando o disparo de grupos de neurônios. Dentre essas funções, a acetilcolina possui papel importante na atividade cortical, com participação importante em circuitos ligados à atenção, detecção de pistas, memória e aprendizagem (para revisão detalhada sobre o papel central da acetilcolina, consultar PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012). Os níveis de acetilcolina foram reduzidos e se associaram com comprometimento da memória em animais com hipercolesterolemia induzida por dieta, um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ULLRICH; PIRCHL; HUMPEL, 2010). Nesse estudo, os ratos hipercolesterolêmicos apresentaram uma redução no número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert, além de maior ativação da micróglia, o que pode explicar o comprometimento cognitivo e os menores níveis de acetilcolina.

A ligação entre neurodegeneração, redução de acetilcolina e comprometimento cognitivo parece ter base bioquímica e anaplerótica. A acetilcolina é produto, em parte, da conversão de glicose em acetil-CoA e citrato na mitocôndria, com posterior exportação do citrato para o citoplasma, onde seria utilizado na síntese da acetilcolina (DIENEL, 2019). O hipometabolismo da glicose presente no processo natural de envelhecimento, somada às vias metabólicas aqui citadas, explicam a sugestão de que o comprometimento do CAT é um fator relevante para a função cognitiva, como a memória.

Para que a dieta cetogênica promova a síntese de corpos cetônicos sem comprometer a anaplerose do CAT, a triheptanoína surge como uma possível solução. A triheptanoína é um triglicerídeo no qual cada um dos ácidos graxos possui uma cadeia de sete carbonos, o ácido heptanoico (BORGES et al., 2020). Por ter um número ímpar de carbonos, o ácido heptanoico é convertido em corpos cetônicos com cinco carbonos no fígado e posteriormente convertido em propionil-CoA e succinil-CoA em outros tecidos, como o cérebro (MCDONALD et al., 2014). O succinil-CoA, sendo um intermediário do CAT, é responsável pelo efeito anaplerótico do ácido heptanoico, o que traria benefício adicional à DC para o metabolismo cerebral durante o envelhecimento. O efeito

anaplerótico da triheptanoína foi estudado em modelo animal de DA (ASO et al., 2013), além de doenças em que o CAT está comprometido como a epilepsia (BORGES et al., 2020) e a doença de Huntington (ADANYEGUH et al., 2015). Todos os estudos encontraram algum efeito positivo em pelo menos um dos parâmetros utilizados para avaliar melhoria da eficiência bioenergética quando comparados com os animais que receberam DC clássica. Além disso, a adição de triheptanoína à DC reduziu a velocidade da depressão alastrante em ratos jovens. Esse fenômeno é apontado como um dos possíveis mecanismos envolvidos na enxaqueca tipo aura, bem como no desenvolvimento de crises epiléticas (ALMEIDA RABELLO OLIVEIRA, DE et al., 2008). Porém, o efeito da triheptanoína no envelhecimento fisiológico do cérebro ainda não foi avaliado.

Sendo assim, a pergunta que conduziu a realização do presente estudo foi: a dieta cetogênica suplementada com triheptanoína melhora a memória, na função colinérgica e na expressão de transportadores de glicose no cérebro de camundongos idosos? A partir destas perguntas chave e embasamento literário, nossa hipótese é de que a dieta cetogênica adicionada de triheptanoína melhora a memória e o metabolismo cerebral de camundongos machos adultos e idosos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O envelhecimento do cérebro e o desenvolvimento de doenças

Assim como ocorre em todos os órgãos e sistemas fisiológicos, o cérebro perde progressivamente suas capacidades funcionais a medida em que envelhece (MATTSON; ARUMUGAM, 2018). Esse declínio funcional tem uma velocidade variável (COLE; FRANKE, 2017; OSCHWALD et al., 2019), e é observado pela redução da memória de trabalho, da memória episódica, entre outras funções tanto em humanos quanto em animais (ALEXANDER et al., 2012). O envelhecimento normal do cérebro sofre um processo de aceleração a partir dos 50 anos de idade (MENDONCA et al., 2017), momento a partir do qual se observa redução de massa cinzenta e massa branca, aumento dos ventrículos cerebrais, além de grande morte neuronal e regressão dendrítica (MATTSON; ARUMUGAM, 2018). A velocidade com que essas perdas ocorrem pode predizer o risco de um indivíduo desenvolver comprometimento cognitivo e demência.

Além de heterogênea entre indivíduos, a velocidade de envelhecimento do cérebro é também diferente entre suas regiões, sendo as áreas mais afetadas os lobos frontal e temporal (JACK et al., 1997). Estimativas da diferença de volume da massa cinzenta entre idades sugerem um padrão em que regiões anteriores do cérebro, a exemplo do córtex pré-frontal, apesar de atingirem o amadurecimento tardiamente, são as primeiras regiões a reduzirem a espessura. Por outro lado, regiões mais posteriores, como o córtex auditivo, atingem a maturidade de forma precoce, porém se mostram menos vulneráveis ao envelhecimento e com menor velocidade de atrofia (OSCHWALD et al., 2019).

Considerando o cérebro como um todo, uma metanálise com 22 estudos longitudinais observou uma redução de 0,2% de volume por ano a partir dos 35 anos de idade, e uma aceleração da perda para 0,5% de perda por ano a partir dos 65 anos de idade (HEDMAN et al., 2012).

Dentre as alterações teciduais características do envelhecimento, a revisão de Mattson e Arumugam (2018) elenca marcadores que, por serem interdependentes, não ocorrem de forma isolada. Dentre eles, estão a (1) disfunção mitocondrial, (2) o acúmulo intracelular de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios oxidados, (3) a desregulação do metabolismo energético, (4) o prejuízo na função dos lisossomos e proteassomos, (5) a menor resposta adaptativa ao estresse oxidativo, (6) o comprometimento no reparo do DNA, (7) atividade disfuncional dos circuitos neuronais, (8) desregulação do Ca^{2+}

neuronal, (9) a redução na neurogênese e (10) neuroinflamação. A desregulação do metabolismo energético vem sendo apontada como um importante fator para o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, sendo as principais a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (CUNNANE et al., 2021).

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais prevalente no mundo inteiro, sendo classificada como de origem familiar ou esporádica. A DA familiar é determinada por mutações genéticas em genes altamente penetrantes, como o gene que codifica a proteína precursora amiloide. Indivíduos portadores dessas mutações certamente desenvolverão DA, independente dos fatores ambientais (MAMELAK, 2017). A DA esporádica se desenvolve pela interação entre fatores genéticos menos penetrantes (ou seja, predisposição genética) e fatores ambientais, como o estilo de vida (HENDERSON, 2008).

Os marcadores clínicos da DA incluem o comprometimento cognitivo, levando ao declínio progressivo da memória (inicialmente, a memória de curto prazo é afetada), à desorientação, à capacidade de autocuidado limitada e mudanças de personalidade (RUSEK et al., 2019), resultando no comprometimento da qualidade de vida do indivíduo. O cérebro do indivíduo com DA possui marcadores bem estabelecidos, como a presença de atrofia, sinapses com alterações patológicas, vesículas autofágicas, neuroinflamação e angiopatia amiloide. Além disso, a microcirculação do cérebro também está comprometida pela DA, com redução da densidade capilar, perda de endotélio e quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (MAMELAK, 2017).

Além dos marcadores já bem estabelecidos, é interessante observar que as mesmas alterações teciduais encontradas na autópsia do cérebro de idosos com DA (ex.: acúmulo de proteína TAU e β -amiloide) estão também presentes em idosos cognitivamente saudáveis (WYSS-CORAY, 2016). Além disso, a formação de enovelados neurofibrilares de TAU foi observada em animais adultos jovens nos núcleos subcorticais e no tronco encefálico. Sendo assim, permanece o debate de se essa observação patológica é precursora da DA ou fazem parte do processo normal de envelhecimento do cérebro (MAMELAK, 2017), em que o acúmulo de proteínas forma um continuum entre o envelhecimento normal e a neurodegeneração. Os neurônios vulneráveis aos agregados TAU possuem duas características em comum: são neurônios de projeção com altas concentrações de neurofilamentos e possuem axônios longos e finos, com pouca ou nenhuma mielina (MAMELAK, 2017). Esses enovelados se formam a partir da hiperfosforilação da proteína TAU, comprometendo o transporte axonal. Foi sugerido que

a disfunção mitocondrial observada em idosos, levando ao estresse oxidativo e à redução na capacidade de gerar substratos energéticos dos axônios, seria um dos fatores pelo aumento da fosforilação da TAU (YAO; DIAZ BRINTON, 2011).

Particularmente do ponto de vista metabólico, o envelhecimento do cérebro tem demonstrado reduzir a captação e utilização de glicose cerebral, comprometendo a capacidade de utilizar esse substrato energético para a manutenção das funções normais, um processo conhecido como hipometabolismo cerebral (CUNNANE et al., 2021). A revisão de Hertz, Chen, Waagepetersen (2015) descreve a destruição precoce dos núcleos noradrenérgicos no tronco encefálico (locus ceruleus, mais especificamente) como uma possível explicação para essa redução, pois estes núcleos são conhecidos por estimular o metabolismo da glicose.

Outro mecanismo proposto para explicar o hipometabolismo cerebral é a redução da expressão de GLUT1 na barreira hematoencefálica e GLUT3 nos neurônios, respectivamente. O estresse oxidativo observado no envelhecimento oxidaria o fator de indução de hipóxia (HIF-1 α), inativando-o. Essa inativação reduziria os transportadores de glicose, pois o HIF-1 α estimula sua expressão (LIU et al., 2008). Diferente do que ocorre com o achado histológico, o padrão de redução da oxidação de glicose no cérebro difere no envelhecimento saudável e na DA: no primeiro caso ocorre redução principalmente no córtex frontal, sendo na DA os lobos parietais e *precuneus* os mais afetados (KATO et al., 2016).

2.2. Metabolismo energético do Sistema Nervoso Central (SNC) no adulto e no idoso

Apesar de representar cerca de 2% do peso corporal de um adulto, o cérebro humano é responsável por 20% do gasto energético diário, demandando grande quantidade de energia para seu funcionamento adequado. Em situações basais, em que o indivíduo se alimenta com quantidades normais de calorias e carboidratos, o cérebro utiliza majoritariamente a oxidação da glicose como fonte de energia (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Sendo assim, as vias energéticas que compõem a glicólise e o ciclo do ácido Tricarboxílico (CAT) são essenciais para a manutenção da atividade cerebral.

A captação de glicose pelo cérebro ocorre através de um conjunto de células denominado unidade neurovascular (Fig. 1), composto pelas células endoteliais dos capilares cerebrais, pelos pericitos, astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e neurônios

(CHENG et al., 2018). Essa captação de glicose será maior quanto maior for a demanda energética para a atividade neuronal e não está relacionada com a concentração de glicose nos capilares (CUNNANE et al., 2021; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Quando em alta atividade condutora (alta frequência de disparo), os axônios liberam traços de glutamato que estimulam receptores NMDA nos oligodendrócitos. Essa estimulação do receptor de glutamato promove a expressão de proteínas transportadoras de glicose e seu transporte para a membrana axonal, levando ao aumento da captação de glicose no local (SAAB et al., 2016). Sendo assim, as áreas cerebrais com maior atividade neuronal captarão mais glicose, e por este motivo são mais vulneráveis a falhas no processo de fornecimento de energia para o cérebro.

A captação de glicose ocorre através de transportadores de glicose (GLUTs), que são proteínas de membrana facilitadoras do transporte de glicose, ou seja, transportam do espaço de maior concentração para o de menor concentração. Esse processo não utiliza a energia do ATP para acontecer, e sim a energia do gradiente de concentração da glicose (VANNUCCI et al., 1994). Foram descritos 14 isoformas de GLUTs, porém, no sistema nervoso central (SNC), apenas algumas delas são expressas. As principais isoformas encontradas no cérebro são o GLUT1 e o GLUT3, estando a primeira presente nas células endoteliais e nas células da glia e a última nos neurônios (NAGAMATSU et al., 1992; VANNUCCI; MAHER; SIMPSON, 1997).

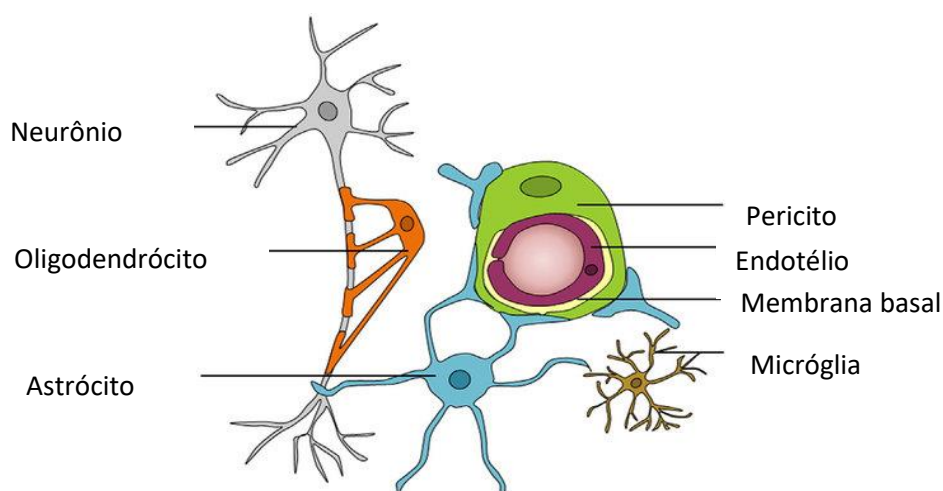


FIGURA 1 - Unidade neurovascular. **FONTE:** NELSON et al., 2015

Estudos tem demonstrado que, durante o envelhecimento do cérebro, há uma redução da expressão de transportadores GLUT1 nos astrócitos (SOUZA et al., 2015) e GLUT3 no hipocampo de ratos idosos (FATTORETTI et al., 2001). Os autores destes trabalhos discutem que a redução na captação de glicose seria um dos fatores determinantes para o hipometabolismo cerebral. Em humanos, a redução na captação de glicose é cerca de 8% nos idosos em relação aos adultos, considerando o cérebro como um todo, porém 15% menor comparando o córtex frontal e 14% menor nos núcleos subcorticais (NUGENT et al., 2014).

O hipometabolismo da glicose é observado nos idosos com risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ex.: histórico familiar de doenças, diabetes mellitus) muitos anos antes do aparecimento de qualquer sintoma de DA, sugerindo que o processo faz parte do desenvolvimento de doenças (CUNNANE et al., 2016). Outro aspecto importante que contribui para o hipometabolismo é a neuroinflamação: a micróglia ativada apresenta uma alta demanda energética e maior captação de glicose, desviando a energia que seria captada pelos neurônios (ALDANA, 2019).

Em humanos, uma coorte iniciada nos anos 50 mostrou uma maior concentração de glicose, menores níveis de enzimas glicolíticas e do transportador de glicose GLUT3 no cérebro pós morte de idosos com DA quando comparado a idosos sem doença (AN et al., 2018). Os autores propõem que a falha na utilização de glicose seja, pelo menos em parte, responsável pelo aparecimento e desenvolvimento dessa neurodegeneração.

Do ponto de vista molecular, os prejuízos no metabolismo da glicose comprometem o transporte de íons através de membranas, a reciclagem de vesículas e a sinalização sináptica, em última instância comprometendo a liberação de neurotransmissores e a manutenção do potencial de repouso das membranas neuronais (ASHRAFI et al., 2017). Essas alterações podem levar à hiperexcitabilidade, comprometimento dos circuitos neurais, bem como da eficiência energética do cérebro, pois com menos energia, a manutenção do potencial de membrana fica prejudicado (CUNNANE et al., 2021). Além disso, o hipometabolismo da glicose agrava o acúmulo de proteínas neurotóxicas, assim como as proteínas neurotóxicas agravam o quadro de hipometabolismo reciprocamente através do aumento do estresse oxidativo e da neuroinflamação (CARBONELL; ZIJDENBOS; BEDELL, 2020; SINTINI et al., 2019).

É importante ressaltar que o cérebro não possui reserva significativa de energia para seu funcionamento. Na ausência do suprimento de substratos, o órgão consegue manter a produção de ATP somente por poucos minutos (WAITT et al., 2017). Em situações desafiadoras como o jejum prolongado, o cérebro depende de substratos energéticos alternativos para manter seu funcionamento. Esses substratos são os corpos cetônicos e o lactato.

Os corpos cetônicos são sintetizados no fígado quando, pela redução na concentração de insulina plasmática no jejum, ocorre aumento na atividade da enzima lipase hormônio sensível e grande mobilização e hidrólise de triglicerídeos do tecido adiposo para obtenção de energia. Esses ácidos graxos liberados pelos adipócitos alcançam o fígado e sofrem betaoxidação para formar acetil-CoA (NEWMAN; VERDIN, 2014). No fígado, devido à redução na síntese de oxalacetato, o acetil-CoA é desviado para a síntese de corpos cetônicos (CCs), que são o β -hidroxibutirato (BHB), o acetoacetato e a acetona. Como o fígado não possui enzimas para oxidá-los, os corpos cetônicos são liberados na corrente sanguínea, podendo ser captados pela unidade neurovascular através de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) para serem oxidados para obtenção de energia (Fig. 2), além de serem captados por outros tecidos como o músculo esquelético e o músculo cardíaco.

A dependência do cérebro em relação aos corpos cetônicos sintetizados no fígado quando na ausência do fornecimento de glicose foi confirmada em um estudo recente. Nesse experimento, apesar do cérebro expressar as enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos e, provavelmente, os astrócitos serem capazes de produzir corpos cetônicos, o fornecimento de CCs foi insuficiente para a manutenção da atividade cerebral nos animais *knockout* para a enzima carnitina palmitoiltransferase no fígado, ou seja, animais que não são capazes de transportar Acil-CoA para a matriz mitocondrial e, portanto, não sintetizam CCs hepático (WHITE et al., 2020).

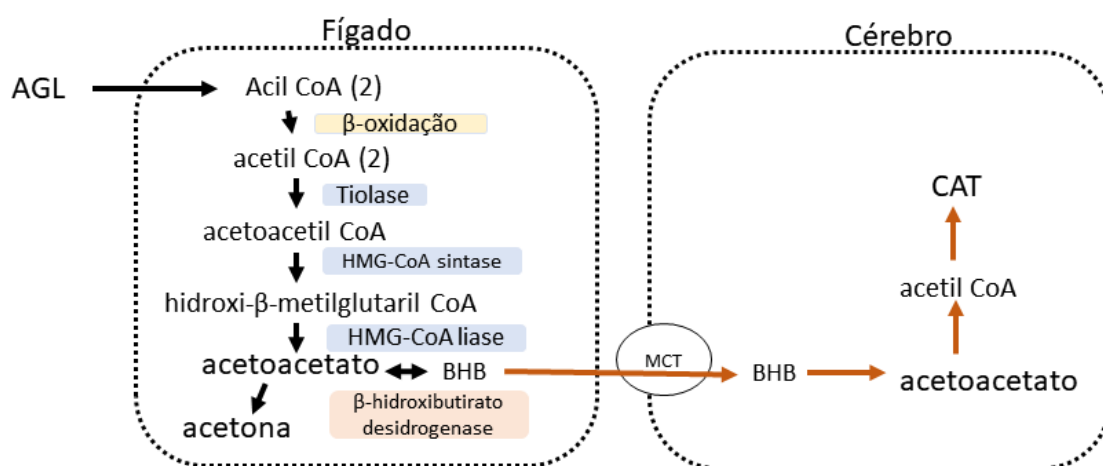


Figura 2 - Síntese de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos livres (AGL) e transporte para o cérebro para oxidação via Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT). BHB: betahidroxibutirato; MCT: transportador de monocarboxilatos. **FONTE:** autor, 2021.

Diferente do que ocorre com a captação de glicose, que depende da demanda local de energia, a captação de corpos cetônicos será maior quanto maior for a concentração plasmática do substrato. Foi demonstrado através de tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN) que aumentar o suprimento de corpos cetônicos para o cérebro, isto é, aumentar a concentração plasmática de CCs, aumenta a taxa metabólica cerebral do substrato (COURCHESNE-LOYER et al., 2017). O referido estudo encontrou que, após 4 dias sem ingestão de fontes de glicose, a taxa de metabolização cerebral do acetoacetato aumentou de 2 para 17% da energia utilizada (estimado 33% da energia obtida de corpos cetônicos totais), com redução da taxa de metabolização cerebral de glicose e sem mudança na taxa metabólica total. Também diferente da glicose, estudo utilizando método semelhante mostrou que a captação de corpos cetônicos pelo cérebro não é comprometida pelo envelhecimento (NUGENT et al., 2014), sendo comparável entre adultos e idosos.

A presença do alelo 4 do gene da Apolipoproteína E (APOE4) é um dos mais conhecidos e significativos genótipos que aumentam o risco de desenvolver neurodegeneração. Em animais transgênicos com o APOE4 humano, a atividade da hexoquinase – e a utilização de glicose – está reduzida em relação aos animais que possuem o alelo APOE3, neutro em relação ao risco de doenças neurodegenerativas (WU; ZHANG; ZHAO, 2018). Nesse estudo, os animais APOE4 apresentaram uma expressão de genes envolvidos na captação e no metabolismo de corpos cetônicos que se equiparou aos animais sem risco, corroborando com a hipótese de que, mesmo quando o hipometabolismo da glicose é observado, o metabolismo de CCs está preservado. Esses dados são animadores, apesar de estudos anteriores mostrarem que indivíduos APOE4 não se beneficiam de terapias cetogênicas (HENDERSON et al., 2009).

2.3. Metabolismo da dieta cetogênica como uma terapia alternativa

Na sessão anterior, foi descrito como o cérebro obtém energia para o seu funcionamento, como ele lida com situações adversas como o jejum e como essas vias energéticas são afetadas pelo envelhecimento. Dado que o envelhecimento compromete a captação de glicose, mas não compromete a captação de corpos cetônicos pelo cérebro, uma abordagem que seja capaz de fornecer corpos cetônicos para os neurônios poderia contornar ou minimizar o hipometabolismo da glicose, pois não dependeria do transporte de glicose através da membranas.

Neste contexto, a dieta cetogênica (DC) surge como uma abordagem nutricional que, ao simular o ambiente metabólico do jejum prolongado – estímulo mínimo da liberação de insulina, mobilização das reservas corporais de ácidos graxos, aumento dos níveis plasmáticos de corpos cetônicos – seria capaz de fornecer energia para o cérebro hipometabólico (HENDERSON, 2008; KRIKORIAN et al., 2012; REGER et al., 2004). A DC é um regime alimentar extremamente restrito em carboidratos (cerca de 20g por dia), na qual o carboidrato é substituído basicamente por gorduras, com quantidade mantida de proteínas, capaz de induzir um aumento significativo na concentração de corpos cetônicos.

Após alguns dias com a DC, as reservas hepáticas e os níveis sanguíneos de glicose se tornam insuficientes para atender a demanda do cérebro. Com a falta de glicose, o cérebro deverá utilizar os corpos cetônicos como fonte de energia (LUTAS; YELLEN, 2013). Em condições fisiológicas, as concentrações de CCs são muito baixas, assim como

a taxa de captação através da barreira hematoencefálica. Na cetogênese, o aumento da concentração dessas moléculas faz com que o SNC passe a utilizá-las como fonte de energia. Os corpos cetônicos são captados pelo sistema nervoso central através dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs) nas isoformas 1, 2 e 4 (Fig. 3). O MCT1 é expresso no endotélio dos capilares, oligodendrócitos e astrócitos; MCT2 na membrana dos neurônios e o MCT4, nos astrócitos (ZHANG et al., 2021). O cérebro utiliza o acetoacetato convertendo-o em acetoacetil-CoA, e depois em duas moléculas acetil-CoA, que serão utilizadas no CAT (HENDERSON, 2008; LUTAS; YELLEN, 2013).

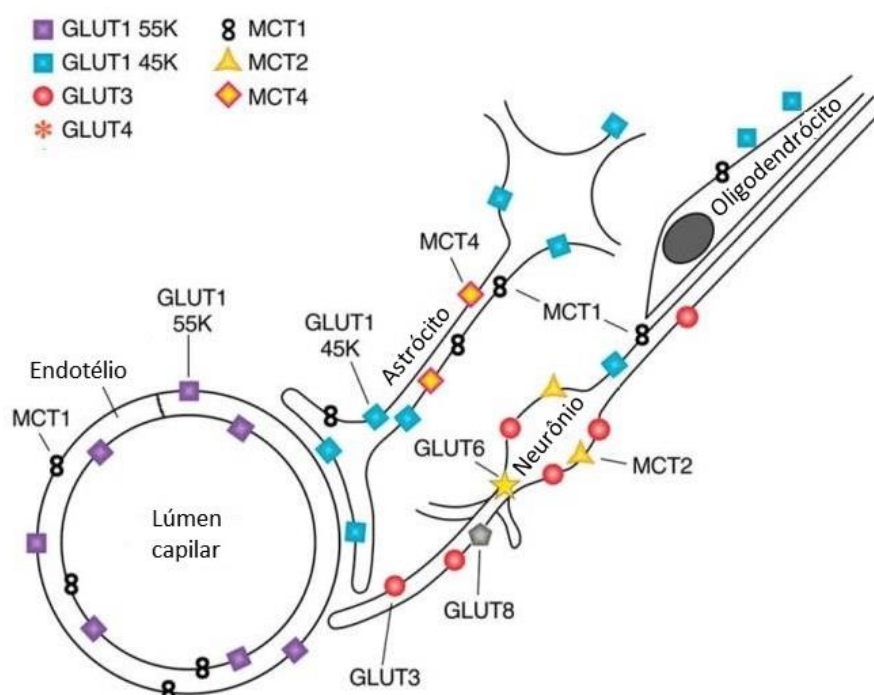


Figura 3 - Transportadores de monocarboxilatos (MCTs) e transportadores de glicose (GLUTs) expressos na barreira hematoencefálica. **FONTE:** traduzido e adaptado de SIMPSON; CARRUTHERS; VANNUCCI, S. J., (2007).

Vale ressaltar que mesmo com uma ingestão tão baixa de carboidratos, a glicemia permanece dentro da faixa de normalidade em organismos não-diabéticos. Essa glicose é fornecida pela gliconeogênese hepática e tem três fontes: os aminoácidos glicogênicos, o glicerol liberado da oxidação dos triglicerídeos e o lactato proveniente da glicólise anaeróbica. Da mesma maneira, os corpos cetônicos não causam alteração significativa no pH sanguíneo, pois o cérebro e outros tecidos como músculo esquelético e coração oxidam essas moléculas em quantidades significativas (PAOLI et al., 2014). O jejum prolongado, assim como a DC, causa uma elevação dos corpos cetônicos de 0,1 mM/L para 6-8 mM/L, sem modificar o pH sanguíneo de maneira perigosa para a saúde,

enquanto a cetoacidose diabética pode exceder 20 mM/L de concentrações de corpos cetônicos no plasma, esta última sendo bastante deletéria para os tecidos do corpo (HASHIM; VANITALLIE, 2014).

A importância da dieta cetogênica para o tratamento de quadros de epilepsia refratários ao uso de medicamentos antiepiléticos já está bem estabelecida, principalmente em crianças e adolescentes (KOPPEL; SWERDLOW, 2018; SIMEONE; SIMEONE; RHO, 2017). Está cada vez mais claro que a epilepsia tem semelhanças biológicas com o envelhecimento, como uma excitação anormal no hipocampo (HERNANDEZ et al., 2018), o que tem levado grupos de pesquisa a estudar e obter bons resultados utilizando a DC em animais idosos e modelos de doenças neurodegenerativas.

Em estudo pré-clínico sobre os mecanismos da DC na epilepsia, a dieta aumentou a expressão de genes hipocampais de enzimas envolvidas no metabolismo energético em ratos adultos, sendo considerada uma terapia energética capaz de melhorar a síntese de ATP mitocondrial e assim o metabolismo cerebral (BOUGH et al., 2006). Os autores propõem a biogênese mitocondrial e melhora das reservas de energia como um possível mecanismo pelo qual a DC exerce efeito anticonvulsivante.

Além disso, muitos estudos têm demonstrado a importância da DC para indivíduos com deficiência congênita de GLUT1 (Síndrome de DeVivo), pois essa deficiência resulta em hipometabolismo cerebral e em prejuízos de desenvolvimento e da função do sistema nervoso (VIVO, DE et al., 1991). Ao submeter indivíduos e animais experimentais a cetose, observa-se uma melhora na produção energética cerebral via acetil-CoA proveniente dos corpos cetônicos. Essa melhora na produção de energia leva a melhora dos sintomas relacionados à essa doença, como dificuldade de aprendizado, crises epiléticas e movimentos alterados (GORDON; NEWTON, 2003; KASS et al, 2016; VYKUNTARAJU et al., 2014).

Outros modelos experimentais têm testado os benefícios da dieta cetogênica para o cérebro. Brownlow et al. (2017) submeteram ratos adultos à DC e à dieta suplementada com triglicerídeos de cadeia média (TCM) por oito semanas, período em que os animais passaram por eventos estressores diariamente. O estresse crônico reduziu a expressão de GLUT1 e aumentou a expressão de GLUT3 no hipocampo dos animais controles, efeito que não foi observado com as dietas experimentais. Os autores sugerem que a presença de corpos cetônicos como substrato energético alternativo pode ter um efeito tamponante sobre o desbalanço induzido pelo estresse nas demandas energéticas do hipocampo. Outro modelo avaliado foi o de lesão na medula espinal, no qual a DC acelerou a velocidade de

recuperação dos ratos, atenuou o estresse oxidativo e a inflamação na lesão. Nesse estudo, observou-se a ativação de Nrf2, a redução da atividade da via do NfκB e redução da expressão de citocinas inflamatórias nos animais cetogênicos (LU et al., 2018).

Considerando animais que não são modelos de doença ou qualquer evento estressor, Huang et al. (2019) encontraram um aumento do limiar para convulsão após 3 meses de DC em camundongos adultos, mas falharam em encontrar diferença no desempenho cognitivo em testes de comportamento para avaliar memória e aprendizagem de curto e de longo prazo. Sendo assim, especulou-se que a DC poderia ser mais efetiva no cérebro quando em condições que comprometam o desempenho cognitivo, como o envelhecimento e o aparecimento de doenças.

Para avaliar o efeito da DC em camundongos idosos, Newman et al. (2017) submeteram camundongos à DC em semanas alternadas e avaliaram o impacto da dieta na longevidade e em parâmetros cognitivos através de uma série de testes de comportamento. Os autores utilizaram a dieta com restrição total de carboidratos, pois foi a dieta que levou ao maior aumento na concentração de BHB, que era o objetivo principal dos autores. Nesse estudo, a DC melhorou a memória de curta duração – avaliada pelo teste de reconhecimento de objeto novo – e a atividade exploratória no teste em cruz elevada, além de reduzir a mortalidade na meia vida (24 meses de idade), mas sem aumentar a expectativa de vida total dos animais.

O desempenho cognitivo de ratos idosos que receberam dieta cetogênica por três semanas foi equivalente ao dos animais adultos com dieta controle e melhor do que o desempenho de idosos com dieta controle (XU et al., 2010). Nesse estudo, os autores encontraram uma maior expressão de HIF-1 α (fator indutor de hipóxia) nos idosos com DC, além de uma densidade capilar (avaliada indiretamente pela expressão de GLUT1) que aumentou de maneira comparável ao efeito de submeter os animais à hipóxia. Os autores especulam que a DC revitalizou a unidade neurovascular nos animais idosos, contribuindo para a melhora da função cognitiva observada.

A melhora da memória também foi observada em modelo transgênico de DA após oito meses de dieta enriquecida com ésteres de BHB, porém sem restrição de carboidrato, quando comparado com animais que receberam dieta padrão de laboratório (KASHIWAYA et al., 2013). Os autores sugerem que o fornecimento de corpos cetônicos no longo prazo pode ser capaz de retardar a progressão da doença.

Do nosso conhecimento, o primeiro estudo clínico mostrando o efeito dos corpos cetônicos na cognição foi conduzido por VENEMAN et al. (1994). Nesse estudo, os

autores induziram hipoglicemia com insulina e infundiram BHB ao mesmo tempo em adultos saudáveis. O BHB retardou o aparecimento do comprometimento cognitivo característico da hipoglicemia associada à jejum prolongado e a exercícios físicos extenuantes, mostrando que corpos cetônicos funcionam como um substrato energético alternativo para manter as funções cerebrais quando a disponibilidade de glicose está reduzida.

Para testar se esse efeito positivo também é observado em idosos, 23 idosos com comprometimento cognitivo moderado foram submetidos a DC por seis semanas e melhoraram sua performance em testes de memória verbal (KRIKORIAN et al., 2012). Nesse estudo, os níveis de corpos cetônicos se correlacionaram positivamente com a melhora da memória. Outro estudo semelhante adicionou triglicerídeos de cadeia média (TCM) à DC para avaliar o efeito no desempenho cognitivo de indivíduos já apresentando algum grau de demência (TAYLOR et al., 2018). O TCM, por ter uma cadeia de carbonos menor que os triglicerídeos encontrados na grande maioria dos alimentos, é absorvido diretamente pelo sistema porta-hepático e rapidamente convertido em corpos cetônicos pelo fígado, aumentando o efeito cetogênico da dieta. Além disso, o TCM torna a dieta mais palatável, menos aterogênica e fornece mais corpos cetônicos por caloria (BALIETTI et al., 2010). Taylor et al. (2018) administraram a DC com TCM por três meses em 10 idosos e observaram uma melhora na escala cognitiva. No entanto, o desempenho cognitivo voltou para os níveis pré-dieta após um mês do término do experimento.

Achado semelhante foi encontrado por Reger et al. (2004): os níveis de BHB plasmáticos se correlacionaram positivamente com o teste de memória aplicado. Porém, nesse estudo, não houve intervenção na dieta dos indivíduos, e sim a administração de uma bebida contendo TCM ou placebo em um único momento, com aplicação do teste 90 minutos após a ingestão da bebida. Uma única dose de suplemento à base de TCM não influenciou no desempenho cognitivo de 20 idosos japoneses em ensaio recente (OTA et al., 2019). Porém, após oito e doze semanas de suplementação, os idosos apresentaram melhora na memória verbal e na velocidade de processamento de informações.

Os estudos clínicos acima descritos são promissores, porém com uma amostra pequena e um tempo de intervenção limitado. O estudo de Henderson et al. (2009) avaliou o efeito da administração de um suplemento à base de corpos cetônicos por 90 dias em 152 pacientes idosos com DA de leve a moderada. Os autores também encontraram

melhora no desempenho cognitivo através da escala cognitiva para DA e esse desempenho foi ainda melhor entre os pacientes APOE4 negativos.

Recentemente, um estudo com 20 idosos com risco de desenvolver DA – pré-diabéticos com queixas subjetivas de memória – mostrou que uma DC modificada possui efeitos benéficos. A DC com baixo teor de gordura saturada, objetivando ser mais saudável e não induzir um quadro inflamatório, ofertada por seis semanas, melhorou a cognição, a perfusão em algumas áreas cerebrais e a captação de corpos cetônicos, sem influenciar na captação de glicose cerebral (NETH et al., 2020). Os autores atribuem esses efeitos positivos à, além do efeito conhecido dos CCs, à possível melhora da inflamação sistêmica, corroborando com o achado de que dieta rica em gordura saturada aumenta o risco de desenvolver demência (BARNARD; BUNNER; AGARWAL, 2014).

Os efeitos neuroprotetores para além do fornecimento de energia dos corpos cetônicos, mais especificamente do BHB, vem sendo extensivamente estudado desde que Kashiwaya et al. (2000) observaram que o BHB protegeu neurônios dos efeitos tóxicos da proteína β -amiloide em um meio de cultura. O BHB mostrou ter efeito antioxidante (1) através da ativação do fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2), um fator indutor da expressão de genes envolvidos no sistema antioxidante celular endógeno, como os genes que expressão as enzimas detoxificantes superóxido dismutase e catalase, e (2) do aumento a eficiência da cadeia transportadora de elétrons através da indução da expressão de proteínas desacopladoras (PINTO et al., 2018). Além disso, o BHB aumentou em 46% o número de mitocôndrias em cortes do giro denteado de ratos adolescentes (BOUGH et al., 2006). Este último efeito é de particular importância para a função sináptica adequada, pois as novas mitocôndrias sintetizadas no soma do neurônio são transportadas pelo fluxo anterógrado axonal para os terminais sinápticos. Nesta região, as mitocôndrias são responsáveis por fornecer energia para sustentar a comunicação sináptica (ex.: liberação de neurotransmissores, transporte de vesículas).

Considerando os estudos de biologia molecular que avaliaram mecanismos envolvendo os corpos cetônicos e metabolismo energético, os estudos com modelos animais de envelhecimento e de DA e os ensaios clínicos com idosos, a utilização de DC ou qualquer outra abordagem que aumente os níveis de corpos cetônicos no plasma parece promissora para a manutenção da função cerebral durante o envelhecimento do cérebro. No entanto, Baliatti et al. (2010) argumentam que os benefícios da DC estariam relacionados à restrição calórica e à restrição de glicose e não a um efeito direto dos corpos cetônicos em si.

Em outro estudo, animais adultos foram submetidos a uma semana de DC para avaliar a expressão de genes ligados ao metabolismo energético. O transcriptoma demonstrou que a DC estimula a via do PPAR α e suprime vias de sinalização da insulina e síntese de ácidos graxos (NEWMAN et al., 2017), corroborando com o argumento de que o benefício da DC estaria ligado à restrição calórica. Além disso, nem todos os estudos encontram resultados positivos com a DC. Hernandez et al. (2018) demonstraram que 12 semanas de DC reduziu a expressão de GLUT3 no hipocampo de camundongos idosos, sem alterar a expressão de GLUT1, sugerindo um efeito antagônico na captação de glicose pelo cérebro.

A dieta cetogênica é formulada à base de grande quantidade de gordura, sendo a maior parte dessa gordura fornecida na forma saturada. Por este motivo, é considerada uma dieta com potenciais efeitos deletérios à saúde cardiovascular (KOSINSKI; JORNAYVAZ, 2017). No entanto, ensaios clínicos com duração entre 6 e 12 semanas conduzidos em pacientes com comprometimento cognitivo, DA ou DP diagnosticadas não encontraram alterações em marcadores clássicos de risco cardiovascular como peso corporal, LDL ou triglicerídeos elevados (BRANDT et al., 2019; KRIKORIAN et al., 2012, 2019; PHILLIPS et al., 2018; TAYLOR et al., 2018). Não foram encontradas diferenças no IMC, na espessura da carótida ou na pressão arterial em indivíduos com deficiência de GLUT1 que fizeram tratamento com DC por 10 anos ou mais quando comparado com uma amostra de 550 pessoas de perfil semelhante da população geral (HEUSSINGER et al., 2018).

Uma metanálise elencou os principais efeitos adversos relatados com a utilização de DC em indivíduos portadores de epilepsia refratária a medicamentos. Entre eles, os mais comuns são perda de peso, LDL e colesterol total elevados. No curto prazo, os sintomas gastrintestinais (vômitos, diarreia, constipação, halitose) são os mais comuns, sendo no longo prazo o aparecimento de cálculos renais o mais frequente (LIU et al., 2018). No entanto, os autores argumentam que todos esses efeitos são possíveis de serem prevenidos ou tratados para aumentar a adesão e a eficácia do tratamento. A fraqueza muscular durante a indução da cetose também é um relato comum.

Como a composição da DC pode variar em relação à qualidade dos nutrientes utilizados, a definição dos efeitos deletérios se torna limitada. A DC levou à esteatose hepática não alcoólica e resistência à insulina em camundongos (ELLENBROEK et al., 2014; JORNAYVAZ et al., 2010), porém melhorou a resistência à insulina em humanos obesos e/ou diabéticos (FOSTER et al., 2003; SAMAHA et al., 2003). Essa controvérsia

pode ser explicada pela diferença na composição das dietas quando utilizadas em animais e humanos: em animais, a dieta tem uma maior proporção de gordura saturada para que adquira uma consistência pastosa e menos líquida, possibilitando a administração em caixas experimentais. Já em humanos, estudos mais recentes tem demonstrando uma preocupação em reduzir o risco cardiovascular da dieta, ofertando alimentos com quantidade menor de gordura saturada, além de alimentos rico em nutriente antioxidantes (NAGPAL et al., 2019; NETH et al., 2020).

2.4. Metabolismo da triheptanoína e possíveis benefícios

A triheptanoína (T7) é um triglicerídeo de cadeia média (TCM) com sete carbonos em cada um de seus três ácidos graxos (ácido heptanoico). Da mesma maneira que o TCM com número par de carbonos, a triheptanoína é hidrolisado no trato gastrointestinal em glicerol e ácidos graxos. Por possuir menos carbonos na cadeia, ambos glicerol e ácido heptanoico são absorvidos pelo sistema porta-hepático e captados pelos hepatócitos (PAPAMANDJARIS; MACDOUGALL; JONES, 1998). No fígado, o heptanoato pode ser convertido em glicose através da gliconeogênese e liberada na corrente sanguínea. Uma outra via metabólica possível é a conversão do ácido heptanoico em corpos cetônicos de cinco carbonos (C5), o β -hidroxipentanoato e o β -cetopentanoato (KINMAN et al., 2006). Os C5 são captados pelo cérebro através dos transportadores de monocarboxilatos (MCT), porém o heptanoato também atravessa a barreira hematoencefálica e pode ser captado por astrócitos (BORGES; SONNEWALD, 2012). A administração de triheptanoína via trato gastrointestinal não levou a níveis detectáveis de heptanoato no plasma, sugerindo que nenhum heptanoato absorvido escapou da depuração pelo fígado, sendo totalmente oxidado em C5 e glicose (KINMAN et al., 2006).

Ambos C5 e heptanoato podem entrar na mitocôndria independentemente do sistema da carnitina palmitoiltransferase, necessário para a captação de ácidos graxos de cadeia longa nos tecidos periféricos (ROE; MOCHERL, 2006). Dentro da mitocôndria, a betaoxidação do heptanoato e dos C5 levam a formação de acetil-CoA e propionil-CoA, esse último podendo ser convertido em succinil-CoA e assim repor o CAT com um de seus intermediários (HADERA et al., 2016), como ilustrado na Figura 4.

Por toda a sequência de reações metabólicas descritas acima, a triheptanoína tem a capacidade de repor o CAT com esqueletos de carbono, exercendo um efeito

anaplerótico (FOGLE et al., 2019). Anaplerose é o processo no qual esqueletos contendo quatro ou cinco carbonos entram no CAT independente do acetil coenzima A. Essa reposição de intermediários do ciclo é importante, pois moléculas são perdidas em um processo oposto à anaplerose, a cataplerose. No processo de cataplerose, intermediários do CAT são desviados para a síntese de lipídios (no cérebro, para a mielinização), de aminoácidos e do neurotransmissor acetilcolina (CUNNANE et al., 2021). Diante disso, é possível afirmar que moléculas anapleróticas são determinantes na manutenção do metabolismo e das funções cerebrais e poderiam favorecer condições em que a deficiência energética seja a base do problema (WEHBE; TUCCI, 2020).

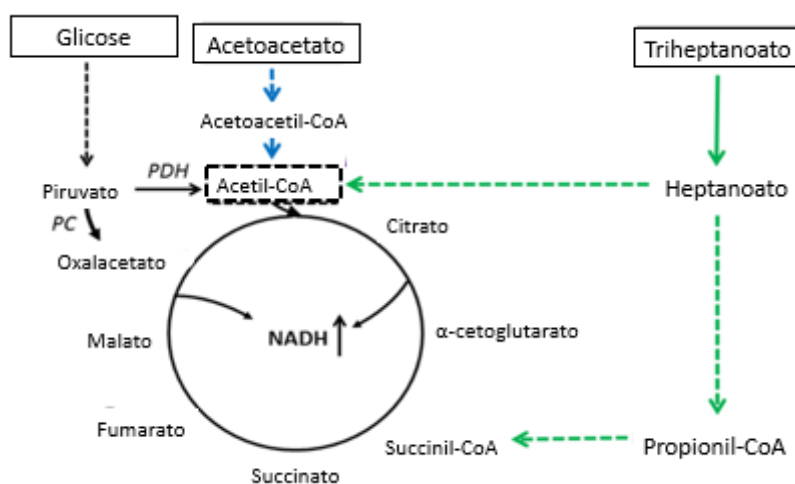


Figura 4 - Efeito anaplerótico do triheptanoína a partir de sua conversão em succinil-CoA. PC: piruvato carboxilase; PDH: piruvato desidrogenase. **FONTE:** adaptado de TEFERA et. al., 2017.

A principal molécula anaplerótica é a glicose, pois quando convertida em oxalacetato pela enzima piruvato carboxilase, participa da primeira etapa do CAT: a conversão do oxalacetato e da acetil-CoA em citrato (HADERA et al., 2016). A dieta cetogênica e seu fornecimento escasso de glicose, quando administrada por longos períodos, reduz a entrada de novas moléculas no CAT, podendo comprometer a anaplerose e o funcionamento do cérebro. Essa hipótese foi confirmada por estudo em que a DC reduziu as crises epiléticas em modelos animais de deficiência de GLUT1, porém com impacto limitado nas funções cognitivas, na ataxia e nos espasmos musculares apresentados (WANG et al., 2006). Os autores atribuem essa persistência de sintomas à oxidação completa dos ácidos graxos de cadeia par ao final do CAT, processo que não contribui para a síntese de intermediários e, consequentemente, de neurotransmissores e outros compostos.

O primeiro estudo mostrando o efeito do T7 em doenças metabólicas observou que o T7 levou a uma rápida melhora clínica de pacientes com deficiência de acil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia longa. Foi observado o desaparecimento completo da cardiomiopatia, rabdomiólise e fraqueza muscular (ROE. et al., 2002). A revisão de Borges e Sonnewald (2012) reúne estudos mostrando os benefícios da via anaplerótica do T7 (propionil-CoA para metilmalonil-CoA e depois succinil-CoA) em tecidos periféricos como o músculo esquelético, o fígado e o coração.

Em relação ao cérebro, Almeida Rabello Oliveira, De et al. (2008) foi o primeiro estudo a demonstrar que o T7 reduz a excitabilidade cerebral de ratos jovens quando administrado por 10 dias, avaliando-se a propagação da Depressão Alastrante Cortical em ratos. O mesmo grupo demonstrou que a dieta cetogênica não causou alterações do metabolismo hepático (DE MELO LUCENA et al., 2010).

Além disso, o T7 mostrou ter efeito positivo na epilepsia induzida por pilocarpina, pois aumentou o limiar de convulsão dos animais epiléticos (WILLIS et al., 2010), além de restaurar os níveis de propionil-CoA e metilmalonil-CoA reduzidos pelas crises convulsivas. Um dado interessante desse estudo é que o T7 não aumenta os níveis de intermediários em cérebros não epiléticos, mostrando que sua função anaplerótica é de reposição em situações em que a cataplerose está aumentada. Outro estudo do mesmo grupo confirmou a propriedade anaplerótica do T7 no metabolismo cerebral de animais epiléticos (HADERA et al., 2014).

A influência da triheptanoína no metabolismo cerebral foi confirmada quando, após a infusão intravenosa de heptanoato marcado em camundongos, observou-se uma quantidade grande de metabólitos cerebrais com carbono marcado (MARIN-VALENCIA et al., 2013). Demonstrar que o ácido heptanoico e os C5 estão sendo oxidados no cérebro é desafiador, pois a glicose sintetizada no fígado com o T7 marcado poderia entrar no cérebro e, em um exame de imagem, seria observada a oxidação da glicose e não do T7 ou C5. Os autores contornaram esse problema marcando o ácido heptanoico de uma forma que se consiga o diferenciar do consumo da glicose no cérebro (nos carbonos 5, 6 e 7). Nesse mesmo estudo, os níveis de glutamina marcada foram maiores que de glutamato no cérebro dos animais, consistente com a informação de que T7 e C5 são metabolizados principalmente na glia.

Posteriormente, a oferta de dieta contendo T7 aumentou a quantidade dos intermediários do CAT succinato e malato no córtex e na formação hipocampal de camundongos epiléticos em relação aos que receberam dieta com TCM de 8 carbonos

(T8) (MCDONALD et al., 2014). Além disso, o T8 aumentou consideravelmente os níveis de glicose-6-fosfato, frutose-6-fostato, porém drástica redução de frutose-1,6-bifosfato, mostrando que a enzima fosfofrutoquinase foi inibida. A mesma alteração não foi encontrada nos animais T7, sugerindo que o T7 não interfere negativamente na glicólise. Essa sugestão foi confirmada por um estudo recente do mesmo grupo de pesquisa, no qual animais epiléticos induzidos por pilocarpina tiveram uma redução de intermediários da glicólise e do CAT. Após duas semanas com DC enriquecida com T7, a infusão de glicose marcada aumentou os níveis de intermediários marcados de ambas as vias, mostrando uma melhora na utilização da glicose (MCDONALD et al., 2020).

Em modelo de DA familiar, a DC adicionada de T7 melhorou o desempenho cognitivo no teste de reconhecimento de objeto novo tanto em relação a DC clássica quando em relação aos animais controles (ASO et al., 2013). Além disso, a DC com T7 reduziu a expressão de interferon- γ no cérebro (indicando uma redução da neuroinflamação) e aumentou a expressão de genes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os autores sugerem que a DC com T7 pode ser benéfica nos estágios iniciais da DA, retardando o comprometimento cognitivo pela melhora do metabolismo energético.

Um mecanismo pelo qual a captação de heptanoato pelos astrócitos pode fornecer energia para o CAT neuronal foi proposto. O heptanoato é captado pelo astrócitos e carboxilado a propionil-CoA ou metabolizado a acetil-CoA, e assim podem entrar no CAT astrocítico. No CAT, o intermediário α -cetoglutarato pode ser desviado para a síntese de glutamato por reações de transaminação ou pela glutamato desidrogenase e depois convertido em glutamina. Por fim, a glutamina pode ser liberada e captada pelos neurônios, fornecendo uma fonte de energia para o CAT neuronal (MCDONALD et al., 2014; MOCHEL, 2017) como mostra a figura 5.

Os resultados pré-clínicos promissores foram testados em um ensaio clínico com paciente com doença de Huntington (ADANYEGUH et al., 2015) e dois ensaios em pacientes com epilepsia refratária ao uso de medicamentos realizados pelo mesmo grupo (BORGES et al., 2019, 2020). Um mês de suplementação com triheptanoína melhorou o metabolismo cerebral dos pacientes com Huntington avaliado pela relação entre o fosfato inorgânico e a creatinafostato (Pi/PCr) cerebrais, um indicador de ativação mitocondrial. Um ensaio clínico randomizado em pacientes com epilepsia, a suplementação com triheptanoína não foi superior à suplementação com TCM T8 e T10 na redução da frequência de crises convulsivas após oito semanas (BORGES et al., 2019). Quando o

grupo tentou avaliar o efeito no longo prazo (48 semanas), apenas dois de onze participantes completaram o protocolo do estudo (BORGES et al., 2020), o que torna inviável a obtenção de conclusões.

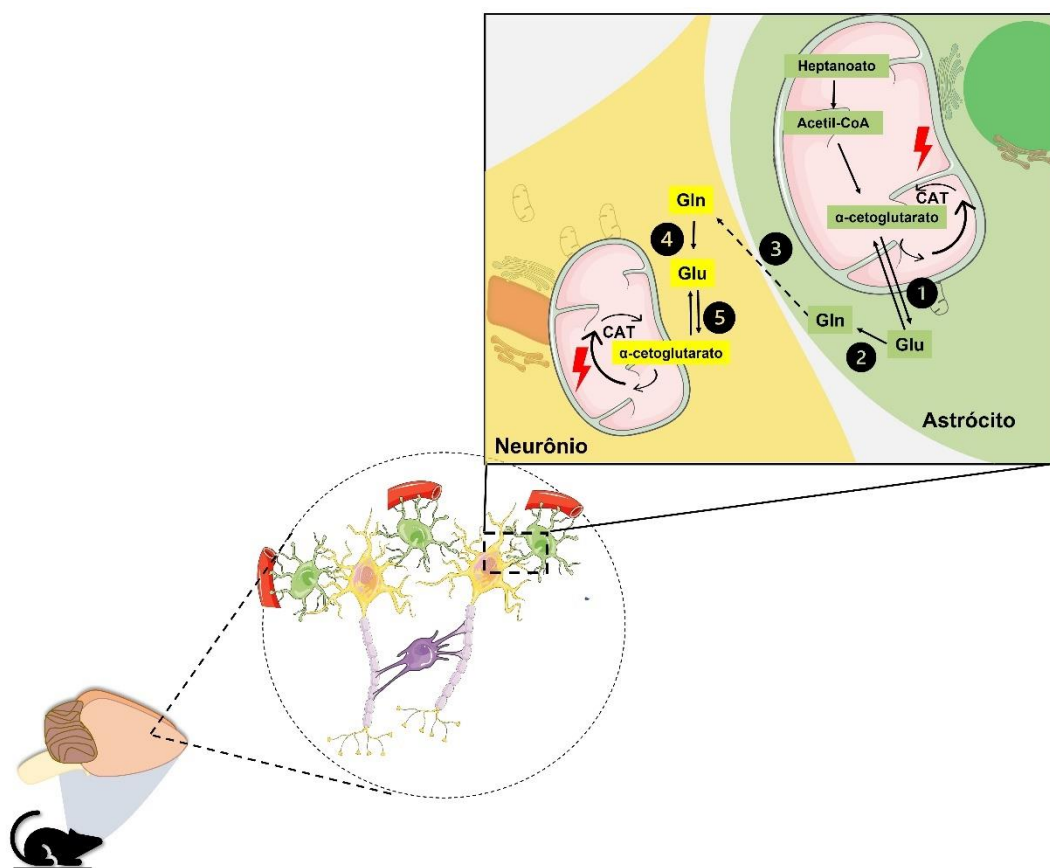


Figura 5 - Fornecimento de energia para os neurônios a partir do heptanoato. O heptanoato é convertido em acetil-CoA no astrócito e entra no ciclo do ácido Tricarboxílico (CAT). Um dos intermediários do CAT, o α -cetoglutarato pode ser desviado para a síntese de glutamato (1), depois convertido em glutamina (2) e transportada para os neurônios (3). No neurônio, a glutamina (Gln) é convertida em glutamato (4), podendo ser utilizada como fonte de energia por sua reconversão em o α -cetoglutarato (5). **FONTE:** autor, 2021.

2.5. Memória, neurotransmissores e dieta cetogênica

Os processos de memória são classificados quanto ao seu tempo de retenção, podendo ser ultrarrápido, de curta duração ou de longa duração, ou quanto à sua natureza, dividida em explícita, implícita e operacional (KHAN et al., 2014). Cada um desses processos possui características específicas e está mais ou menos relacionada a áreas delimitadas do encéfalo, formando sistemas que funcionam de maneira paralela ou em conjunto (GOLD. et al., 2013). Por exemplo, a memória operacional é dependente do funcionamento adequado do córtex pré-frontal, área através da qual as informações são armazenadas temporariamente para utilização imediata ou para a resolução de problemas.

Caso a informação de memória tenha um componente espacial, a participação do hipocampo se torna necessária (KIROVA; BAYS; LAGALWAR, 2015).

A aquisição de memórias é modulada (isto é, estimulada ou enfraquecida) pela ação de neurotransmissores como a dopamina (BÄCKMAN et al., 2000), o glutamato (BAUDRY et al., 2011), a noradrenalina (KATSUKI; IZUMI; ZORUMSKI, 1997) e a acetilcolina (HAAM; YAKEL, 2017), sendo o último o mais bem descrito na literatura. Os sistemas moduladores colinérgicos são compostos por fibras que se originam em núcleos do tronco encefálico, no diencéfalo e no prosencéfalo e terminam de modo difuso em diversas áreas do sistema nervoso central, como o hipocampo e o córtex cerebral (IKEGAMI, 1994).

O bloqueio de receptores colinérgicos com drogas antagonistas demonstrou que a acetilcolina modula o processo de codificação da memória, por exemplo, modificando a alternância espontânea de ratos (NEWMAN; GOLD, 2016) e a memória operacional de macacos (UPRIGHT; BAXTER, 2021). A deleção de um receptor pré-sináptico de acetilcolina, comprometendo a modulação e aumentando de forma desregulada de sua liberação, teve impacto negativo na memória dos animais em testes em que a consolidação das informações eram necessárias. Porém, no mesmo estudo, os animais melhoraram nos testes em que a atenção e apenas a etapa de codificação da memória era necessária (ROMBERG et al., 2018). Esses experimentos demonstram o papel da acetilcolina nos diversos sistemas de memória.

O envelhecimento do cérebro tem efeito variável nos processos de memória. Evidências sugerem que a modificação da memória nessa fase da vida é similar entre as espécies, sendo os modelos animais valiosos aliados no objetivo de compreender as alterações neurais presentes no envelhecimento (ERICKSON; BARNES, 2003). Estudo com ratas fêmeas idosas mostrou que algumas ratas possuem desempenho semelhante aos animais jovens, enquanto outras pioram seu desempenho (BIRTHELMER et al., 2003). Embora ainda seja uma área de grande debate e controvérsias, alguns mecanismos foram propostos para explicar esse comprometimento associado ao envelhecimento. A piora do desempenho em testes de memória com animais idosos se associou com a redução dos níveis de acetilcolina no hipocampo e no córtex cerebral (GIOVANNINI et al., 1998; IKEGAMI, 1994), com a redução do tamanho e número de células colinérgicas no prosencéfalo basal (FISCHER et al., 1991), além da menor expressão de colina acetiltransferase, uma enzima envolvida na síntese de acetilcolina (DUNBAR et al., 1993; GALLAGHER et al., 1990). No entanto, a piora da memória não se associou à redução

da acetilcolina em outro estudo, apesar dos animais idosos terem apresentado níveis menores comparado aos animais jovens (BIRTHELMER et al., 2003).

O processo de neurogênese no giro dentado do hipocampo é reduzido pelo envelhecimento, sendo outro fator apontado como determinante no comprometimento da memória nessa fase da vida (TAKEI, 2019). No entanto, esse comprometimento parece não estar acompanhado de maior perda de neurônios, mas sim a uma menor excitabilidade neuronal, menor plasticidade sináptica e maior perda de sinapses (CUESTAS TORRES; CARDENAS, 2020). Considerando as evidências de que o cérebro idoso preserva sua neuroplasticidade ao longo da vida (GREENWOOD; PARASURAMAN, 2010), é possível sugerir que os prejuízos cognitivos podem ser, pelo menos em parte, prevenidos e/ou revertidos.

Em seres humanos, o declínio da memória é observado, em média, a partir dos 50 anos, e cerca de 40% dos indivíduos com mais de 65 anos podem ser diagnosticados com algum comprometimento relacionado à idade (FOSTER, 2006). Os sistemas de memória que requerem maior atenção, como a memória operacional e a habilidade de cumprir mais de uma tarefa ao mesmo tempo (do inglês, *multitasking*), são os mais frequentemente comprometidos em idosos, mostrando que mudanças no córtex pré-frontal são frequentes nessa população (ALEXANDER et al., 2012).

Um importante biomarcador associado à perda de memória em humanos é a redução do volume de estruturas cerebrais como o hipocampo (MORRISON; HOF, 1997) e córtex pré-frontal (FROUDIST-WALSH et al., 2018), mas essa alteração parece estar associada com perda dendrítica e não com morte neuronal. Outros marcadores sistêmicos vem sendo apontados, como os níveis de colesterol (TEUNISSEN et al., 2003), o estresse oxidativo (BERR et al., 2000) e a inflamação de baixo grau (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004).

Estudos com objetivo de melhorar o desempenho cognitivo de animais corroboram com a relação entre melhor ação colinérgica e melhor memória. O aumento da expressão de vesículas de acetilcolina induzido experimentalmente melhorou a memória de camundongos idosos (NAGY; AUBERT, 2015). Ratas fêmeas que receberam tamoxifeno, uma droga antiestrogênica conhecida por causar prejuízos na memória, melhoraram seu desempenho nos testes após receberem micro injeção de nicotina no CA1 hipocampal (TAJIK et al., 2016). Outro estudo com ratos jovens e idosos avaliou o efeito de extrato de semente de uva rico em polifenóis e do exercício físico na memória e no sistema colinérgico. Nos animais idosos, os autores observaram uma

melhora do desempenho nos testes somente com a suplementação e somente com o exercício, porém um efeito maior quando eram combinados. Além disso, essa melhora se correlacionou com a maior expressão do receptor M1 de acetilcolina no córtex pré-frontal e hipocampo e com menor atividade da acetilcolinesterase nas mesmas áreas (ABHIJIT; SUBRAMANYAM; DEVI, 2017). O uso de mahanimbina, um alcaloide presente na folha de curry, melhorou a memória de ratos idosos, além de aumentar dos níveis de acetilcolina no cérebro (MANI et al., 2021).

A relação entre o desempenho de memória e a bioenergética do cérebro vem sendo demonstrada. A inibição da glicogenólise nos astrócitos de ratos adultos comprometeu a memória de uma maneira dose dependente (NEWMAN; KOROL; GOLD, 2011). O comprometimento foi revertido tanto com a infusão de lactato quanto de glicose. O mesmo estudo bloqueou o transportador de lactato para os neurônios MCT2, o que também comprometeu a memória. Porém, neste caso, a perda de memória não foi revertida com a infusão de glicose ou lactato. Esses experimentos demonstram claramente que o fornecimento de energia pelo astrócito para os neurônios tem papel importante nos mecanismos de memória.

Considerando que o cérebro é um tecido com alta demanda energética e exclusivamente oxidativo, a manutenção e a melhora da respiração mitocondrial vem sendo sugerida como um potencial alvo para melhora de função cognitiva (GONZALEZ-LIMA; BARKSDALE; ROJAS, 2014). A administração de dois fármacos promissores para o tratamento da DA inibiu a enzima acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1), aumentando os níveis de acetil-CoA no cérebro de camundongos SAMP8. Maior disponibilidade de acetil-CoA melhorou o desempenho dos animais nos testes de memória (CURRAIS et al., 2019).

O fornecimento de corpos cetônicos para o cérebro aumenta a eficiência energética cerebral, aumentando os níveis de fosfocreatina, além de outros metabólitos energéticos (BOUGH et al., 2006), e a expressão de enzimas antioxidantes no cérebro (SHIMAZU et al., 2013). A dieta cetogênica melhorou a cognição em modelos animais de doença neurodegenerativa, doença conhecida por comprometer a função e a biogênese mitocondrial no cérebro (KASHIWAYA et al., 2013; ZHANG, J. et al., 2013). No entanto, um estudo recente demonstrou que a restrição severa de carboidratos não é necessária para a captação de corpos cetônicos no cérebro, pois a infusão de ésteres de corpos cetônicos induziram cetose, aumentaram os níveis de acetil-CoA e intermediários

do CAT no cérebro de camundongos alimentados com dieta padrão (SUISSA et al., 2021).

Por fim, as evidências de que (1) o envelhecimento causa prejuízos nas funções bioenergéticas do cérebro e de que (2) o desempenho cognitivo está diretamente ligado à capacidade do órgão de obter energia pela via oxidativa para suas funções estão crescendo e se tornando robustas. Nesse contexto, surge o interesse em investigar se o fornecimento de intermediários para o CAT através de um triglicerídeo anaplerótico, a triheptanoína, melhorando os processos oxidativos no envelhecimento, é capaz de modificar marcadores de atividade colinérgica e assim melhorar a memória dos animais. Estudar os processos que envolvem a prevenção de prejuízo cognitivo durante o envelhecimento é de grande importância, pois a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, doenças nas quais os tratamentos disponíveis não são capazes de retardar a progressão, causando imenso prejuízo social e financeiro para os países.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação da dieta cetogênica com triheptanoína na memória e em parâmetros do metabolismo cerebral de camundongos C57/BL6 adultos e idosos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o consumo alimentar;
- Aferir o peso corporal;
- Mensurar o perfil bioquímico;
- Avaliar o desempenho de memória dos animais;
- Quantificar a expressão de GLUT3 cerebral;
- Avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase no cérebro;
- Conduzir a caracterização histológica do cérebro.

4. RESULTADOS

Triheptanoin, an odd-medium-chain triglyceride, impacts brain cognitive function in young and aged mice

LS da ROCHA^a, S Salgado^b and, A Ximenes-da-Silva^{a*}

^a*Department, University, City, Country;* ^b*Department, University, City, Country*

*Corresponding author

Adriana Ximenes-da-Silva, PhD

aximenes@ccbi.ufal.br

Av. Paulo Holanda, 143 - Cidade Universitária, Maceió – AL

+558232141684

LS da Rocha is a Ph.D. student, and Ximenes-da-Silva is an associate professor.

To be submitted to Nutritional Neuroscience.

Triheptanoin, an odd-medium-chain triglyceride, impacts brain cognitive function in young and aged mice

The brain aging process triggers cognitive function impairment, such as memory loss and compromised quality of life. Cognitive impairment is based on the bioenergetic status, with reduced glucose uptake and metabolism in aged brains. To assess whether the improvement in oxidative capacity ameliorates cognitive function in aging adults (12 weeks), and aged (22-month-old) C57/BL6 mice received (1) ketogenic, (2) ketogenic supplement with triheptanoin, or (3) a control diet for 12 weeks. Spontaneous alternation and time spent in a previously closed arm in the Y-maze test and time interacting with an unknown object in the novel object recognition test (NORT) were used to evaluate memory. Acetylcholinesterase (AChE) activity in the prefrontal lobe, brain, and cerebellum was also evaluated. GLUT3 expression in the prefrontal lobe was analyzed by western blotting. The ketogenic diet (KD) reduced spontaneous alternation in aged mice, led to lower AChE activity in aged prefrontal lobe (aged CTRL = $0,975 \pm 0,010$; aged KD = $0,760 \pm 0,016$; aged KD+T7 = $0,962 \pm 0,029$ U/mg protein) and cerebellum (aged CTRL = $0,284 \pm 0,011$; aged KD = $0,169 \pm 0,008$; aged KD+T7 = $0,160 \pm 0,001$ U/mg protein) and, parieto-temporal-occipital lobe of adult mice. Furthermore, KD decreased GLUT3 expression in the frontal lobe of adult mice (adult CTRL = $100 \pm 14,5$; adult KD = $72,9 \pm 6,5$; adult DC+T7 = $68,2 \pm 9,1$ % relative expression). Supplementation of KD with triheptanoin prevented memory impairment and showed similar values of AChE activity and GLUT3 expression compared to the controls. Our data suggest that triheptanoin has a potential role in the bioenergetic capacity of the brain, although it improves cognitive function.

Keywords: triheptanoin; ketogenic diet; aging, memory, brain

Introduction

The aging process determines functional loss in the central nervous system (CNS), that is, a reduction in memory and neuronal cells (Wyss-Coray 2016). These losses form the basis of a bioenergetic crisis, with a decreased capacity of the aged brain to oxidase substrates and provide energy for proper metabolism. Glucose is the major substrate for

the brain; however, aged brains present reduced glucose uptake along with reduced glucose transporter expression and reduced glycolysis, known as hypometabolism, within neuronal cells, triggering an ATP deficiency (Castellano et. al. 2014).

Hypometabolism of glucose contributes to cognitive loss during aging (Cunnane et. al., 2021), which increases the risk of developing neurodegenerative diseases. This energetic impairment in aged brains occurs years or decades before the onset of any disease (Cunnane et al. 2016). The most prevalent type of dementia is Alzheimer's disease (AD), which is the main cause of dementia worldwide (Li et al. 2016).

In contrast to glucose uptake, ketone body (KB) uptake remains similar in young and old brains. An approach that provides an energetic substrate to the brain bypassing the glucose uptake in the membrane cell is likely to minimize the bioenergetic crisis and ameliorate ATP synthesis (Nugent et. al. 2014). Restoring ATP levels can decelerate cognitive loss and the aging process in the brain. Clinical studies have shown improvement in memory tasks in patients with Alzheimer's disease after acute intake of ketogenic compounds (Taylor et. al. 2018).

The ketogenic diet (KD) comprises a food regimen carbohydrate-restricted (< 20 g/day) and very high fat (>90% calories), able to provide acetyl-CoA from ketone bodies to the brain (Rusek et. al. 2019). KD improves memory in aged models (Newman et. al. 2017) but accelerated apoptosis and inhibited neurogenesis in the hippocampus in another model (Irfannuddin et. al. 2021); however, the role of KD in cognitive function is yet to be understood. Furthermore, KD could compromise bioenergetics by limiting the refilling of intermediary molecules to the tricarboxylic acid cycle (TAC), a process known as anaplerosis, whereas glucose is the main anaplerotic molecule (Marin-Valencia et. al 2013). Limited anaplerosis leads to impaired oxidative capacity in the brain, which can

reduce neurotransmitter synthesis, such as acetylcholine. Here, we suggest that the addition of an anaplerotic and ketogenic compound to the diet could bypass this problem.

Triheptanoin is an odd-medium-chain triglyceride with seven carbons in each fatty acid that provides KB with five carbons (β -ketopentanoate and β -hydroxypentanoate). Triheptanoin is anaplerotic, given that five-carbon-KB can enter the cycle as succinyl-CoA and replenish TAC (Marin-Valencia et. al. 2013). The anaplerotic capacity of triheptanoin has been tested in metabolic disorder models, including GLUT1 deficiency (Kass et. al. 2016), with positive results. This study aimed to evaluate the effect of a ketogenic diet supplemented with triheptanoin on memory, cholinergic function and, brain metabolism in adult and aged mice.

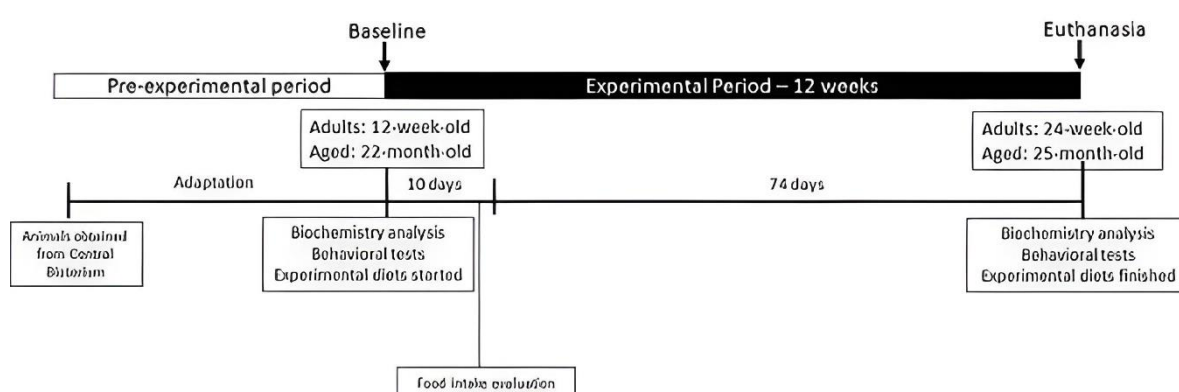
Material and methods

Animal husbandry

Male C57/BL6 mice (*Mus musculus*) were obtained from the Central Vivarium of the Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN - UFAL) at two different ages: adults (12 weeks old) weighing an average of 24 g and aged mice (22-month-old) weighing approximately 32 g (n = 12 per group). The mice were acclimatized for $\geq$ five days before the experiments and maintained in a temperature-controlled (20 ± 2 °C) room with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Animals were housed in 2-3 mice per cage in the sectorial Bioterium and fed a chow diet (Nuvilab) until the initiation of the experimental period. The use of animals in this experiment was approved by the University Animal Care and Use Committee of the UFAL and was guided by the European Communities Council Directives (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures.

Experimental design

Mice were divided into six experimental groups: (1) adult control, (2) adults receiving ketogenic diet (KD), (3) adults receiving ketogenic diet supplemented with triheptanoin (KD + T7), (4) aged controls, (5) aged ketogenic (KD), and (6) aged ketogenic with triheptanoin (KD + T7). Mice received the experimental or control diets for 12 weeks: 12 for 24-week-old for the adults and 22 for 25-month-old for the aged mice. The experimental design is described as follows.



To monitor adaptation to diets, we measured body weight weekly until euthanasia, and food intake was measured for ten consecutive days at the beginning of the experimental period.

Dietetic treatments

Table 1 shows the diets used in this study based in our previous study (Almeida Rabello Oliveira et. al. 2008). Except for the carbohydrate and lipid proportions, all other nutrients were similar to those of the control diet. The ketogenic diet was provided read for use by Rhoister (São Paulo, Brazil). The ketogenic diet supplemented with triheptanoin was partially supplied by Rhoister, except for triheptanoin oil, which was kindly donated by Ultragenyx Pharmaceutical Inc (California, USA).

Table 1. Composition of control, ketogenic (KD), and ketogenic supplement with triheptanoin (KDT7) diets.

Constituent (g/kg)	Control	Ketogenic	Ketogenic with triheptanoin
Corn starch	495,9	0	0
Dextrinized corn starch	132	0	0
Casein	200	200	200
Cellulose	50	50	50
Mineral mixture AIN-93 G	35	35	35
Vitamin mixture AIN-93	10	10	10
L-cysteine	3	3	3
L-methionine	1.6	1,6	1.6
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
t-butylhydroquinone	0.014	0.14	0.14
Soybean oil	70	297.9	40
Triheptanoin	0	0	257.9
Margarine	0	400	400

Blood Biochemistry

To assess ketogenic status, glycemia and β -hydroxybutyrate levels were measured at baseline and three, six, nine, and 12 weeks during the experimental period. Animals were briefly restrained, and blood was obtained from the lateral tail vein for biochemical measurement using glucose test strips (Accu-Chek Active) and β -hydroxybutyrate strips (FreeStyle Abbott). We conducted the measurements during the same period of the day for all groups and at all time points.

Y Maze Test

The Y-maze test evaluates animal spatial memory based on the innate preference of animals to explore an arm that was not available (intentionally closed) or the arm last seemed the longest. The Y-maze had three identical arms (arm width, 5 cm; arm length, 35 cm; arm height, 10 cm). On the first day, mice (n = 8-12 per group) were placed in the apparatus for 5 min to evaluate spontaneous alternation, calculated as $[(\text{number of alternations})/(\text{total number of arm entries} - 2)] \times 100$ (Ghafouri et. al. 2016). On the second day, the animals were placed in the apparatus with one arm closed for 10 min.

Four hours later, the animal was returned to the apparatus with the three arms opened for 5 min of exploration. After each trial, the apparatus was cleaned with 70% (v/v) alcohol to minimize olfactory cues. The time spent (seconds) in the previously closed arm was recorded for further comparison between groups. The mean of three blinded subjects were used for analysis.

Novel Object Recognition Test (NORT)

To assess short-term memory, we performed a novel object recognition test. First, animals (n = 8-12 per group) were placed with a muzzle turned towards the apparatus wall without any object for adaptation for 3 min to the field. Subsequently, two identical objects were placed on opposite sides along with the apparatus, and animals were allowed to explore for more than 3 min. An hour later, we replaced one object with a novel one. The animals were given 3 min to explore the objects. Working memory was evaluated by the exploration index (time exploring the novel object/time exploring both objects $\times$ 100) in the last trial. The apparatus and the objects were cleaned after each trial. The test was performed at the baseline and after 12 weeks. The mean of three blinded subjects were used for analysis.

Acetylcholinesterase (AChE) Activity

AChE activity was measured using Ellman's assay method (Ellman et. al. 1961). Briefly, aliquots of the prefrontal lobe, brain left hemisphere, and cerebellum homogenates (1 mL saline [0.9%] for each 80 mg tissue) from three animals per group were sonicated for 15 s (five times) and then diluted in saline [0.9%] in a 1:5 ratio. Fifty microliters of the diluted aliquot were added to 1.39 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) and 50 μ L of 0.01 M 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Next, 10 μ L acetylthiocholine (ATCh) iodide solution (0.075 M) was added to the reaction mixture. For the blank, ATCh

was replaced with ultrapure water. The absorbance was read in triplicate using a UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2) at a wavelength of 412 nm, and the change in absorbance was recorded for 3 min. The rate of AChE activity was measured following an increase in the color produced from thiocholine when it reacted with DTNB. The cholinesterase activity unit (U) represents the amount of enzyme catalyzing 1 μmol of substrate hydroxylation per minute ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) and was calculated as previously described (Ellman et. al. 1968). AChE activity was expressed in U/mL, and the specific activity of AChE was expressed in U/mg of protein.

Protein quantification was performed using the Bradford method (1976). Briefly, the calibration curve was determined using bovine serum protein and was used for standardization. A diluted aliquot (100 μL) was added to the 2.5 mL Bradford reagent, and the absorbance was read at 595 nm. The assays were conducted in triplicate.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry and H&E staining, the animals ($n = 3$ for each group) were anesthetized with thiopental [20-40 mg/kg], perfused with saline [0.9%], and paraformaldehyde [4%], and dissected for brain collection. The brains were post-fixed in paraformaldehyde [10%] at 4 °C for 24 h, then embedded in paraffin, and cut into coronal sections (7 μm) of the prefrontal lobe, medial brain, and cerebellum.

For immunohistochemistry, slides were subjected to antigen retrieval with citrate buffer (0.01 M, pH = 6.4) for 10 min at 80-90 °C and 20 min at room temperature (Namimatsu et al., 2005), incubated for 10 min in hydrogen peroxide 1% diluted in phosphate-buffered saline 0.1 M (PBS), washed twice in PBS for 5 min (twice) and then incubated in 1.5% blocking serum (ImmunoCruz®) for one hour. After that, the slides were incubated for two hours at room temperature with primary antibodies diluted in

1.5% blocking serum (anti-GLUT3 1:100, Invitrogen), washed with PBS for 5 min (three times), and incubated with biotinylated secondary antibody (ImmunoCruz®) for 1.5 hours. After another wash with PBS for 5 min (three times), the slides were incubated with AB enzyme reagent for 30 min and then incubated with peroxidase substrate for 10 min. The slides were washed in deionized water for 5 min and counterstained with hematoxylin. The sections were then observed under an optical microscope (Nikon).

H&E Staining

To access if the experimental diets affected the cell density in the brain, the hematoxylin-eosin (H&E) staining was performed in slides containing 7 μ m coronal sections from the pre-frontal lobe, the medial brain, and the cerebellum (n = three per group). Briefly, after deparaffinization and rehydration, sections were stained with hematoxylin solution for 15 seconds (twice) and then rinsed in distilled water. Then the sections were stained with eosin solution for 1 min and followed by dehydration with graded alcohol and clearing in xylene. The mounted slides were then examined and photographed using an optical microscope (Nikon™). The quantification of the selected areas was analyzed by the ImageJ image program and expressed in absolute value.

Western Blot

For the GLUT-3 brain expression analysis, three animals per group were anesthetized with thiopental and decapitated. The brain was rapidly dissected on ice and divided into the prefrontal lobe, right hemisphere, and cerebellum. The tissues were added to the protein extraction buffer PEB (Tris 1 M pH 7.6; EDTA 0.5 M; NaCl 1.5 M, TRITON 10%; NP40, protease inhibitors; Sigma Aldrich). Each tissue was homogenized by mechanical processing, centrifuged for 20 min at 12000 rpm and 4 °C, and the supernatant

was aliquoted and stored at -80 °C until further analysis. The lysates were then used to measure brain expression of the glucose membrane transporter GLUT-3 by western blotting. The proteins were quantified using the Bradford method (1976).

Briefly, 30 µg of protein was loaded in triplicate and separated using 12% gel SDS-PAGE at a constant voltage. The gel was then transferred by electrophoresis in Tris-glycine buffer (pH 7.4 buffer (350 mA constant at 4 °C for 1.5 hours) onto a nitrocellulose membrane. Non-specific binding sites were blocked in a solution containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature (RT) and then incubated with anti-GLUT-3 (1:1000, Invitrogen) primary antibody solutions (BSA 3%) overnight at 4 °C. After rinsing in TBST (four times) the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:1000) for 2 h at RT. Signal detection and quantification of the optical density were performed using ChemiDoc and Image Lab software (Bio-Rad ®).

Statistical Analysis

For all the variables analyzed in the present experiment, the difference between the conditions was determined using one-way, two-way, or mixed ANOVA. A Bonferroni post-test was used to compare the groups if significance was reached using analysis of variance. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, United States).

Results

During the 12-week-period, three mice from aged CTRL, four mice from aged KD and, three mice from aged KD+T7 groups died from unknown causes. Adults receiving KD

supplemented with triheptanoin ingested more calories than those receiving KD not supplemented. Both experimental diet groups ingested more than the control adult group (CTRL = 13.6; KD = 17.1; KD+T7 = 20.6 kcal/animal/day; $p < 0.001$). In the aged groups, only mice supplemented ingested more calories than the other groups (CTRL = 13.2; KD = 16.2; KD+T7 = 26.3 kcal/animal/day; $p < 0.001$). Both adults and aged KD lost weight during the first week of the experimental period when adapting to the diet, although the means did not reach significance compared to the other groups. Weight loss was not observed during the first week in the supplemented groups (Figure 1). After six weeks of the experimental diet, the supplemented group remained heavier than other groups between adults, with no difference in aged groups. Considering the weight change from the baseline value, the supplemented adults gained more weight than the KD group. In the aged groups, weight change varied: all controls lost weight, the KD group lost half and gained half, and in the supplemented group, seven gained, two lost, and one animal did not change the weight (Figure 1).

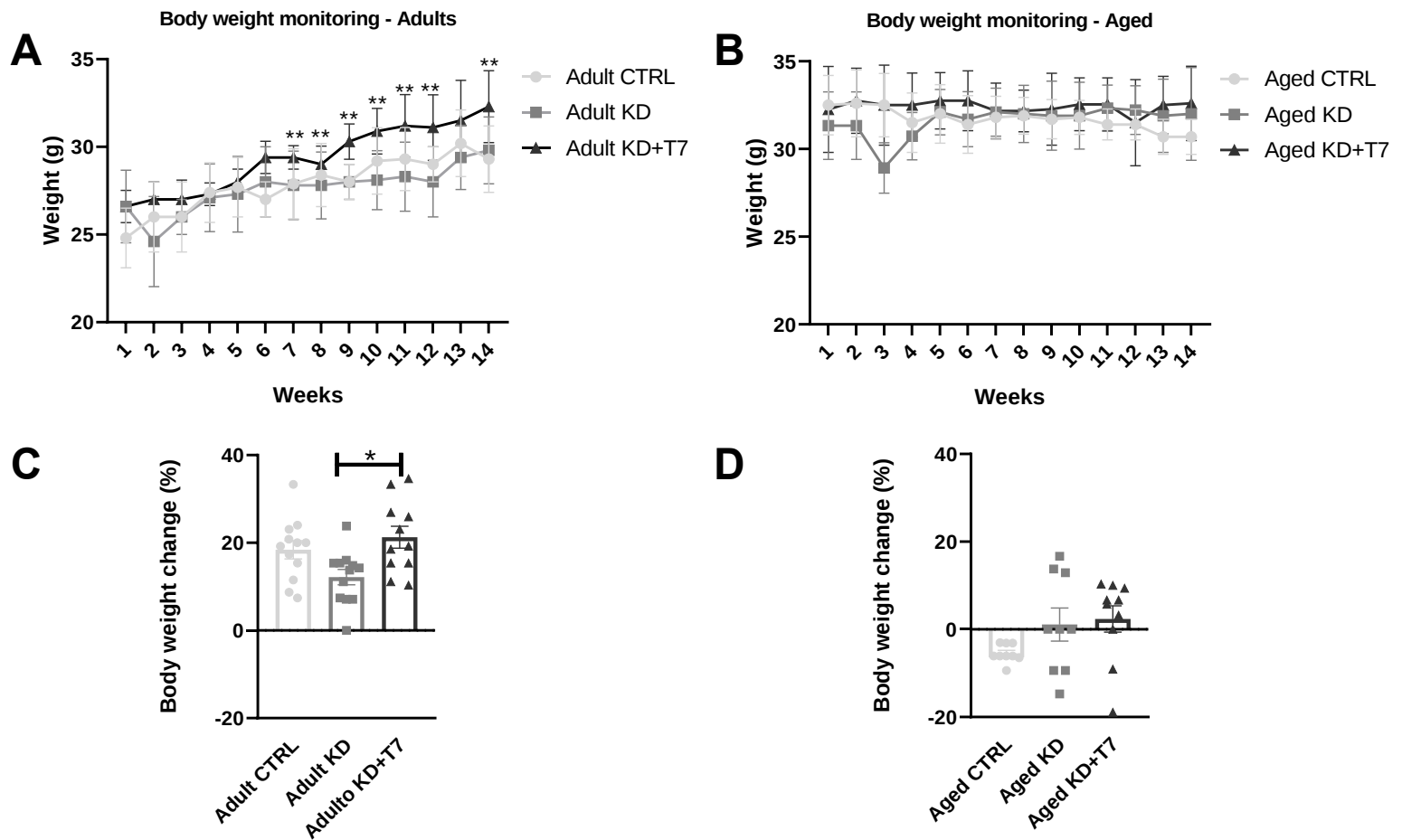


Figure 1. Bodyweight monitoring of the adults (A) and aged (B) groups. Bodyweight (g) was measured weekly before and during all the experimental periods. Bodyweight change of adults (C) and aged (D) considering the baseline and 12-week weight, in percentual. (A and B) Each dot represents the mean of the group (n= 8-12 per group). (C) Bars represent mean and SEM. (D) Each dot represents the result of an animal and horizontal lines represent the mean of the group. *p < 0.05; **p<0.01 KD x KD+T7.

Nine weeks of the KD diet reduced glycemia in adults, which was maintained at lower levels in the 12-week-analysis. No changes were observed in the aged group (Figure 2). Adult KD mice showed higher levels of beta-hydroxybutyrate (BHB) than other groups at all time points during the experimental period. In the aged groups, the KD diet increased BHB levels at the three and 12-week time points (Figure 2).

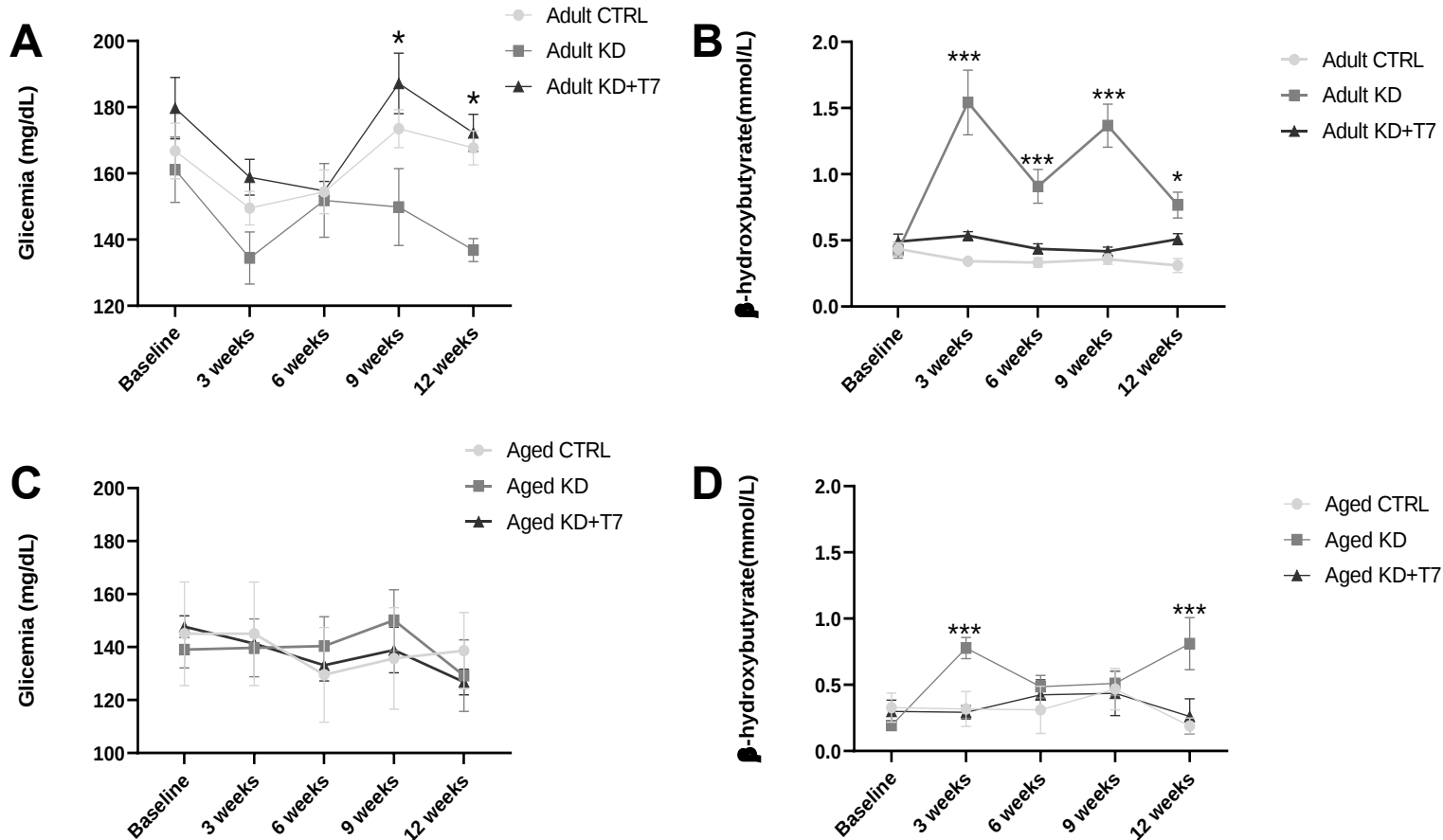


Figure 2. Glycemia (A and C) and β -hydroxybutyrate (B and D) levels. Samples from the tail vein were obtained at baseline and every three weeks for 12 weeks at the same time of the day. Each dot represents the group mean ($n = 8-12$ per group). * $p < 0.05$ KD x KD+T7; *** $p < 0.001$ KD x CTRL.

To determine whether KD and triheptanoin supplementation interfered with spontaneous alternation or spatial reference memory in mice, we conducted the Y-maze test. KD decreased spontaneous alternation in aged mice (diet x time $F = 9.8806$, $p = 0.0027$), with no effect in the other groups (Figure 3A). The number of entries was similar between the aged groups in the baseline and post-diet tests (data not shown), suggesting that the difference in spontaneous alternation was not due to the changes in locomotor activity. Diets did not influence the time spent in arm C in either adult or aged mice (diet

$\times$ time $F = 0.8216$, $p = 0.5398$). We observed an important variation in the percentage of time spent in the C arm by all groups, with mice reducing the time after the experimental period, and others increasing it (Figure 3B). Ketogenic diets did not change the mean discrimination index in the novel object recognition test (diet $\times$ time $F=1.79$, $p = 0.13$) (Figure 3C).

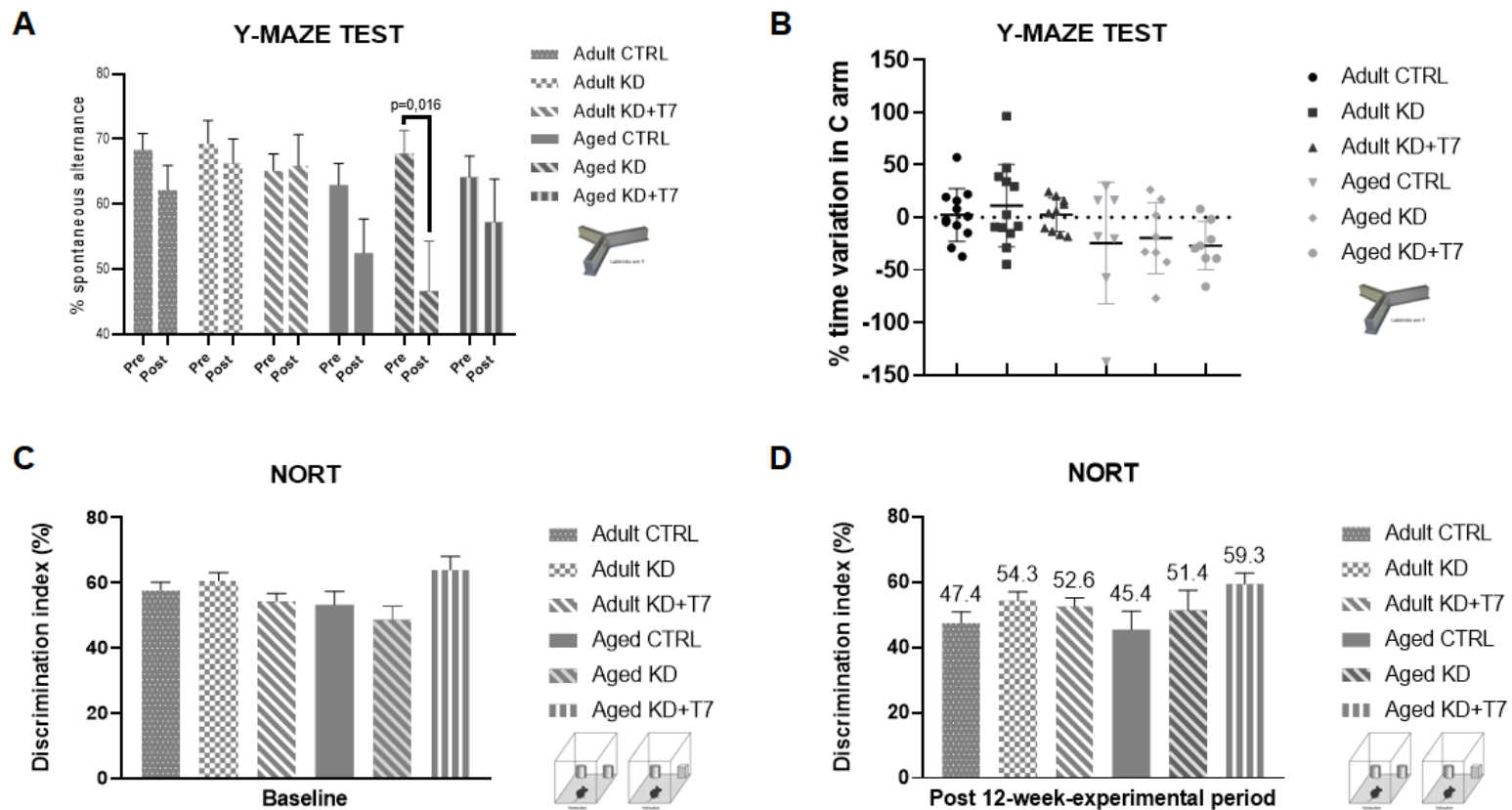


Figure 3. Behavioral tests to assess spatial memory (Y maze, A and B) and short-term working memory (NORT; C, and D). Trials were conducted at baseline and after the 12-weeks-experimental period. (A, C, D) Bars represent the mean of each group ($n= 8-12$ per group). (B) Each dot represents the variation of an animal, and horizontal lines represent the mean of the group.

AChE activity has been used as a marker of the status of the cholinergic system, which is known as the basis of cognitive performance. The aged KD group had a lower level of AChE activity in the prefrontal lobe than the aged control group ($p < 0.01$), which was not observed in the supplemented group. Triheptanoin KD led to higher AChE

activity in adults than in aged animals (Figure 4A). Considering the whole brain, KD led to lower levels and supplemented KD to higher AChE activity in the adult groups, with no difference in the aged groups (Figure 4B). In the cerebellum, both experimental diets led to lower enzymatic activities in the aged groups (Figure 4C).

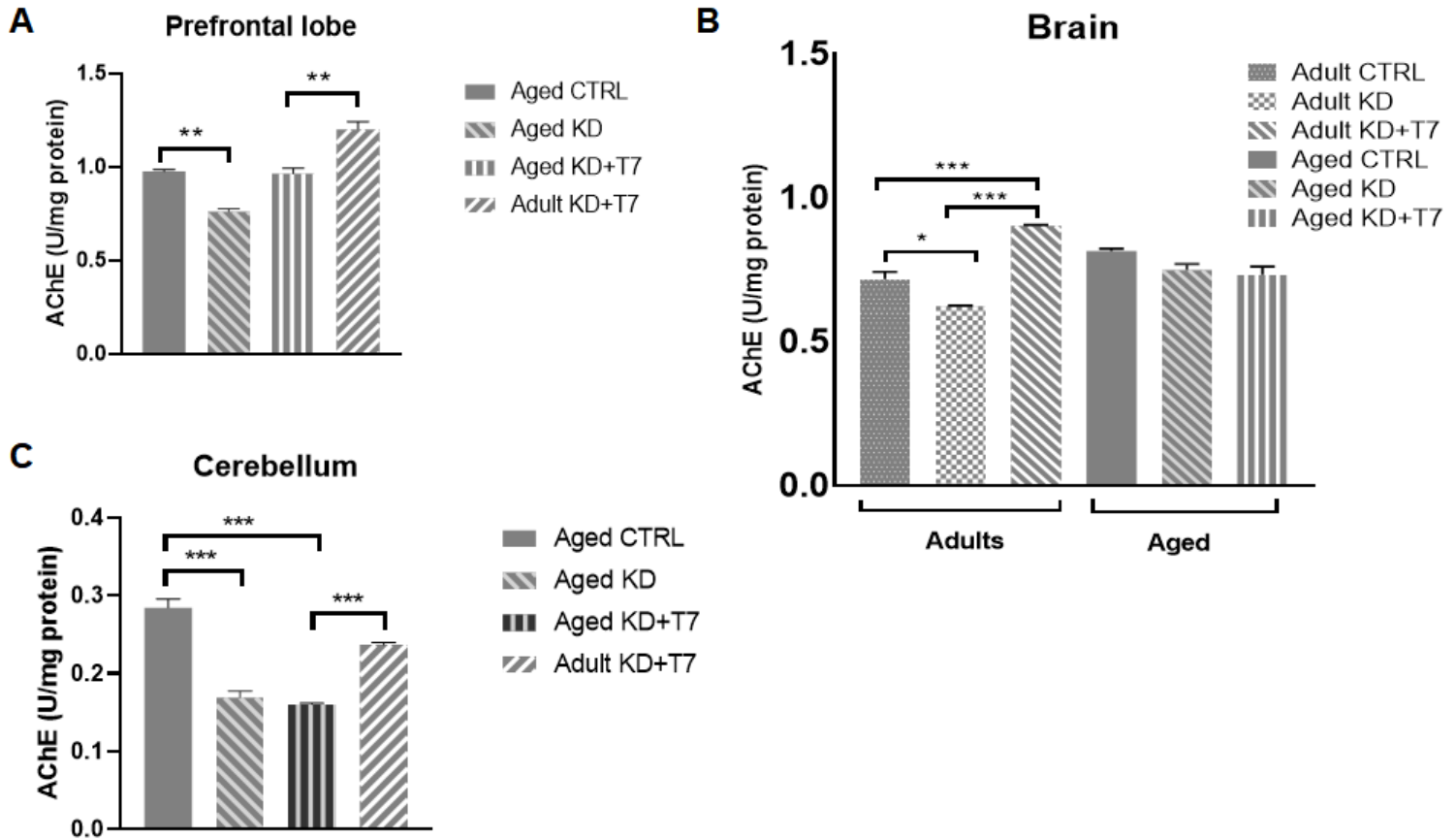


Figure 4. Acetylcholinesterase (AChE) activity of the prefrontal lobe (A), the whole brain (B), and the cerebellum (C). The unit of cholinesteratic activity (U) was measured using a spectrophotometric assay in triplicate and normalized by the total amount of protein, calculated by the Bradford method. Bars represent the group mean and horizontal lines represent the standard error (n = 3 per group). **p < 0.01; ***p < 0.001.

H&E staining was conducted to verify whether the experimental diets modified brain histology during aging. We found a lower number of cells (counted by hematoxylin-stained nuclei) in the triheptanoin group, but major nuclei size in the ketogenic group in the prefrontal cortex (Figure 5A-B). Comparing the cortex near the CA3 in medial slices,

the ketogenic groups showed a lower number of cells per area evaluated, with no difference in the area occupied by nuclei (Figure 5C-D). Furthermore, the number of cells in the cerebellum was similar among the aged groups (Figure 5E).

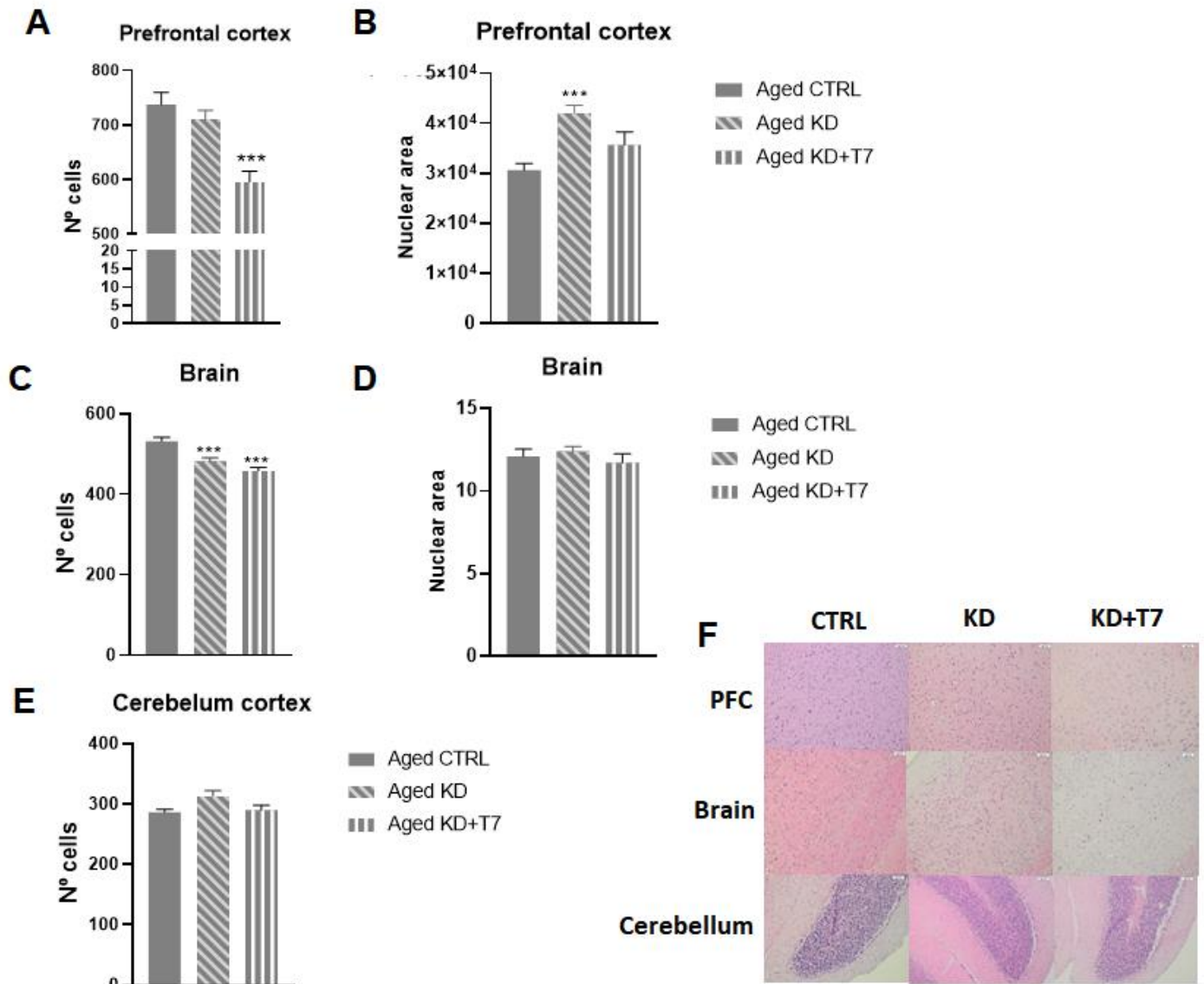


Figure 5. Cell and/or nuclear area counting of the prefrontal cortex (A and B), medial brain cortex (C and D), and cerebellum (E) slices. The counts were conducted in the Image J software in triplicate. Bars represent the group mean and horizontal lines represent the standard error ($n = 3$ per group). *** $p < 0.001$. Representative slices H&E stained of each aged group (F). White rectangles represent 50 μm (H&E, x20).

GLUT3 is the main glucose transporter expressed in the neurons. In adult mice, KD decreased GLUT3 expression in the frontal lobe by 40% of control expression, although this decrease was not significant. The KD group supplemented with triheptanoin showed GLUT3 expression similar to that in the controls. Compared to the aged groups, the experimental diets did not interfere with GLUT3 expression. GLUT3 expression was lower in the aged controls than in the adults (Figure 6).

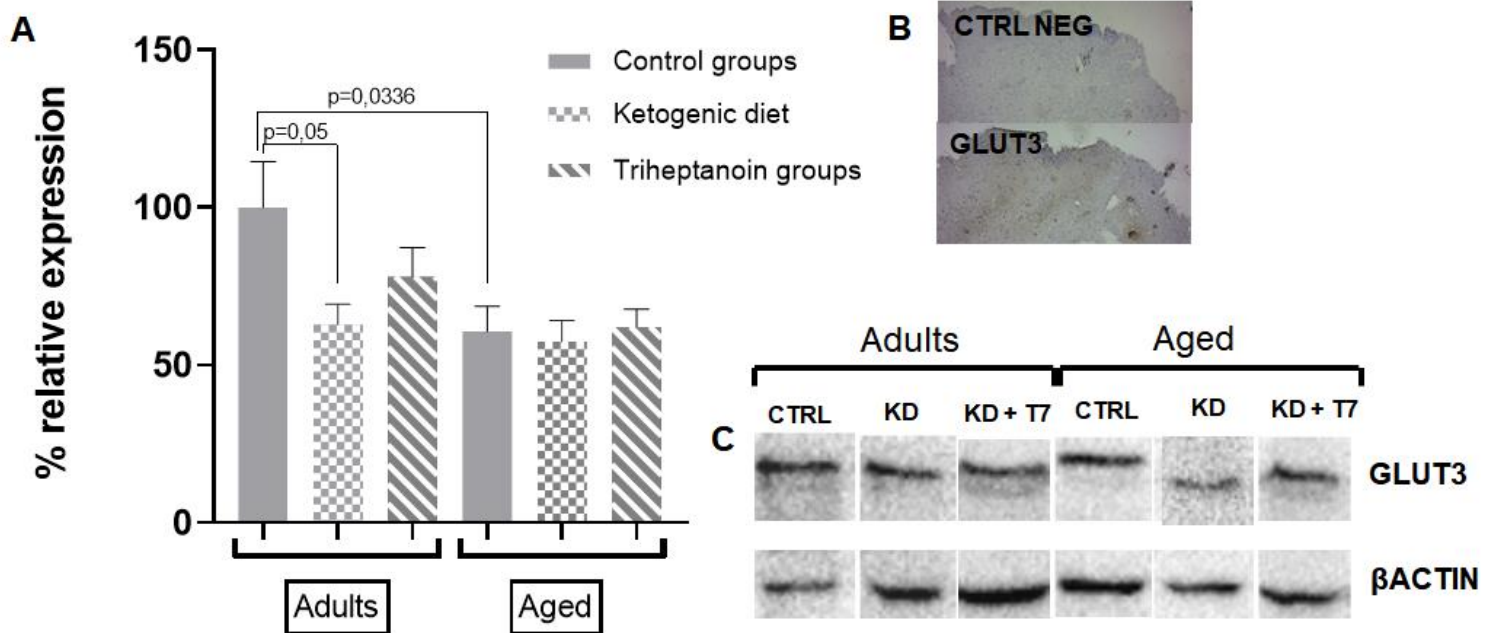


Figure 6. GLUT3 expression in the prefrontal lobe (A) was quantified by the intensity of the GLUT3 bands using the western blot method in triplicate. The b-actin bands normalized the GLUT3 expression in the same protein sample. Bars represent the mean of each group and horizontal lines represent SEM ($n = 3$ per group). (B) Representative immunostaining with anti-GLUT3 of prefrontal lobe slice; (C) Representative GLUT3 and β -actin bands of each experimental group.

Discussion

We aimed to evaluate whether a ketogenic diet supplemented with triheptanoin influences memory, cholinergic function in the brain and metabolism in adult and aged mice. Our rationale was to improve brain energy metabolism by providing an alternative source of energy for the aged brain, which is known to be affected by glucose hypometabolism.

The experimental diets altered body weight, biochemistry levels, performance in short-term working memory tests, and molecular parameters of cognitive function and energy metabolism. Our main finding is that adding triheptanoin to the ketogenic diet reverted some injuries found in cognitive function, analyzed by behavioral and molecular tests, in brains subjected to this high-fat and ketogenic approach.

The aged control group lost weight; this data is supported by the previous finding that physiological aging determines the loss of body weight (Hernandez et. al. 2018). Although the aged KD groups consumed more calories than the control group, higher food intake did not trigger a higher mean body weight. This was probably due to the high variance between the KD and KD+T7 groups. The diets differed changed mice biochemical levels. KD+T7 increased glycemia at two-time points in adults and did not influence BHB levels in either age group. A higher rate of triheptanoin metabolism (Roe et. al., 2002) could explain this effect, with the conversion of glycerol providing glucose more rapidly. T7 provides ketone bodies with five carbon atoms (Tefera et. al 2017), which were not detected by the BHB strips. As expected, KD increased BHB levels in both adult and aged mice.

Spontaneous alternation in the Y-maze test measures short-term spatial memory and is based on the natural curiosity of rodents to explore the arm visited last. The more spontaneous alternation the mice present, the more intact their prefrontal cortex function (Kraeuter et. al. 2019). The experimental diets did not interfere with spontaneous alternation in adults, suggesting that the ketogenic approach has no influence when factors such as age or disease do not compromise cognitive function. Huang et. al. (2019) found no difference in adult mice after three weeks of KD or control diets. However, KD reduced the spontaneous alternation in aged mice, an effect not observed in aged mice supplemented with triheptanoin. In contrast to our data, Hernandez et al. (2018) found

beneficial effects of KD in aged mice using another behavioral model test. The maintenance of physiological prefrontal function by the triheptanoin found here could provide a basis for this anaplerotic property (McDonald et. al. 2020). Anaplerotic compounds, such as triheptanoin, replenish the tricarboxylic acid cycle with intermediary molecules. The energetic improvement could ameliorate brain oxidative capacity and function.

Besides behavioral experiments, access to the status of the cholinergic neuronal system in the brain provides evidence that the underlying process of cognitive impairment is rising (Ullrich et. al. 2010). Acetylcholinesterase (AChE) enzyme hydrolyzes acetylcholine to choline and acetate in the synaptic left. AChE activity is used as a parameter of acetylcholine levels in preclinical brain studies (Paul and Borah 2017) since reduced AChE activity was found in neurodegenerative disease models (Mufson et. al. 2008). Here, KD led to lower AChE activity in the aged prefrontal cortex, with similar activity levels in aged controls and aged KD supplemented with triheptanoin. In the whole brain, AChE activity was lower in adults with KD but higher in adults when KD was supplemented with triheptanoin, compared to adult controls. Our enzymatic data corroborate the behavioral analysis since KD compromised the cholinergic system and supplementation with T7 showed a preventive role. To our knowledge, this study is the first to evaluate the effect of a ketogenic diet on brain AChE activity.

Isoform 3 of the glucose passive transporter (GLUT3) is mainly expressed in neurons, with a higher glucose affinity among GLUTs (Iancu et. al. 2022). GLUT3 correlates with regional brain glucose utilization; regions with more electrochemical activity express more membrane GLUT3 (Shah et. al. 2012). In this study, triheptanoin prevented the reduction in GLUT3 expression in the prefrontal cortex of adult mice. This finding suggests a potential role of triheptanoin in improving the energetic status within

the prefrontal cortex, which could have an impact on neuronal function and neurotransmission. A previous study found lower GLUT3 expression in the hippocampus of young and aged (20-month-old) rats after 12 weeks of KD enriched with medium-chain triglycerides (Hernandez et. al. 2018), without specifying whether it was an even-or odd-chain TCM.

Our study has methodological limitations. We lack the ketone bodies with five carbons (C5) measurement for the groups supplemented with triheptanoin. However, we strongly believe the C5 was synthesized in mice liver and delivered to plasma. The interindividual variability of the manual evaluation in the NORT is another limitation and could explain why we did not find a statistical difference between the aged groups. Lately, acetylcholine levels and GLUT1 brain expression were not evaluated directly. However, we believe that the power of our findings is maintained.

Several preclinical studies have shown the beneficial effects of a ketogenic diet on brain molecular pathways (Pinto et. al., 2018), ingestion of high amounts of fat can trigger neuroinflammation (Valsamakis et. al. 2021) and impair cognitive function in the long term. Ketone bodies, primarily BHB (Gonzalez-Lima et. al. 2014) showed beneficial effects in the brain. Given the potential injury role of the KD demonstrated here, future studies will determine whether the beneficial effects of BHB are obtained without the induction of ketosis by severely restricting carbohydrates. This is possible because the brain consumes ketone bodies at normal levels of glycemia (Suisse et. al. 2021). Furthermore, novel experiments will demonstrate whether dietary supplementation with triheptanoin has a positive role in the brain aging process by ameliorating the energetic function in the absence of ketosis.

In summary, the ketogenic diet impaired memory in aged mice, reduced acetylcholinesterase activity in aged and adult mice, and reduced GLUT3 expression in

the frontal lobe of adult mice. This impairment was prevented with the addition of the odd-medium-chain triglyceride triheptanoin, suggesting the beneficial role of triheptanoin in ameliorating memory and cholinergic function.

References

- [1] Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* [Internet]. 2016;539:180–186. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature20411>.
- [2] Castellano CA, Nugent S, Paquet N, et al. Lower brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake but normal 11C-acetoacetate metabolism in mild Alzheimer's disease dementia. *J Alzheimer's Dis*. 2014;43:1343–1353.
- [3] Cunnane SC, Trushina E, Morland C, et al. Neurodegenerative Disorders of Ageing. 2021;19:609–633.
- [4] Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, Vandenberghe C, et al. Can ketones help rescue brain fuel supply in later life? Implications for cognitive health during aging and the treatment of alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:1–21.
- [5] Li XY, Men WW, Zhu H, et al. Age- and brain region-specific changes of glucose metabolic disorder, learning, and memory dysfunction in early alzheimer's disease assessed in APP/PS1 transgenic mice using 18F-FDG-PET. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
- [6] Nugent S, Tremblay S, Chen KW, et al. Brain glucose and acetoacetate metabolism: A comparison of young and older adults. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014;35:1386–1395. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.027>.
- [7] Taylor MK, Sullivan DK, Mahnken JD, et al. Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2018;4:28–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.11.002>.
- [8] Rusek M, Pluta R, Ułamek-Kozioł M, et al. Ketogenic Diet in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20:3892. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/3892>.
- [9] Newman JC, Covarrubias AJ, Zhao M, et al. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab* [Internet]. 2017;26:547–557.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.004>.
- [10] Irfannuddin I, Sarahdeaz SFP, Murti K, et al. The effect of ketogenic diets on neurogenesis and apoptosis in the dentate gyrus of the male rat hippocampus. *J Physiol Sci* [Internet]. 2021;71. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00786-7>.
- [11] Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, et al. Heptanoate as a neural fuel: Energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2013;33:175–182. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2012.151>.
- [12] Kass HR, Winesett SP, Bessone SK, et al. Use of dietary therapies amongst patients with GLUT1 deficiency syndrome. *Seizure* [Internet]. 2016;35:83–87. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2016.01.011>.
- [13] de Almeida Rabello Oliveira M, da Rocha Ataíde T, de Oliveira SL, et al. Effects of short-term and long-term treatment with medium- and long-chain triglycerides ketogenic diet on cortical spreading depression in young rats. *Neurosci Lett*. 2008;434:66–70.
 - [14] Ghafouri S, Fathollahi Y, Javan M, et al. Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test. *Epilepsy Res* [Internet]. 2016;126:37–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.06.010>.
 - [15] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1961;7:88–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.
 - [16] Hernandez AR, Hernandez CM, Campos KT, et al. The Antiepileptic Ketogenic Diet Alters Hippocampal Transporter Levels and Reduces Adiposity in Aged Rats. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2018;73:450–458.
 - [17] Roe CR, Sweetman L, Roe DS, et al. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest*. 2002;110:259–269.
 - [18] Tefera TW, Tan KN, McDonald TS, et al. Alternative Fuels in Epilepsy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochem Res*. 2017;42:1610–1620.
 - [19] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:105–111.
 - [20] Hernandez AR, Hernandez CM, Campos K, et al. A Ketogenic Diet Improves Cognition and Has Biochemical Effects in Prefrontal Cortex That Are Dissociable From Hippocampus. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:1–16.
 - [21] McDonald T, Hodson MP, Bederman I, et al. Triheptanoin alters [U-13C6]-glucose incorporation into glycolytic intermediates and increases TCA cycling by normalizing the activities of pyruvate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase in a chronic epilepsy mouse model. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2020;40:678–691. Available from: <https://doi.org/10.1177/0271678X19837380>.
 - [22] Ullrich C, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2010;45:408–417. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.001>.
 - [23] Paul R, Borah A. Global loss of acetylcholinesterase activity with mitochondrial complexes inhibition and inflammation in brain of hypercholesterolemic mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17911-z>.
 - [24] Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, et al. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2008;8:1703–1718. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.8.11.1703>.
 - [25] Iancu C V., Bocci G, Ishtikhar M, et al. GLUT3 inhibitor discovery through in silico ligand screening and in vivo validation in eukaryotic expression systems. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12:1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05383-9>.

- [26] Shah K, DeSilva S, Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: Diabetes and Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2012;13:12629–12655.
- [27] Pinto A, Bonucci A, Maggi E, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ketogenic diet: New perspectives for neuroprotection in alzheimer's disease. *Antioxidants.* 2018;7.
- [28] Valsamakis G, Arapaki A, Balafoutas D, et al. Diet-induced hypothalamic inflammation, phoenixin, and subsequent precocious puberty. *Nutrients.* 2021;13:1–9.
- [29] Gonzalez-Lima F, Barksdale BR, Rojas JC. Mitochondrial respiration as a target for neuroprotection and cognitive enhancement. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;88:584–593. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.010>.
- [30] Suissa L, Kotchetkov P, Guignon JM, et al. Ingested ketone ester leads to a rapid rise of acetyl-coa and competes with glucose metabolism in the brain of non-fasted mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–17.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a avaliar o efeito da dieta cetogênica suplementada com triheptanoína, um triglicerídeo com efeito cetogênico e anaplerótico, na memória, na expressão da enzima acetilcolinesterase, um marcador de função colinérgica, e na expressão de GLUT3 no cérebro camundongos idosos. Animais roedores não desenvolvem doença neurodegenerativa espontaneamente, sendo modelos valiosos para se investigar o efeito de abordagens com efeito preventivo ou desacelerador de perdas na função cognitiva que ocorrem durante o envelhecimento natural.

A suplementação com triheptanoína preveniu a piora da memória operacional, aqui avaliada pela alternância espontânea, além de prevenir a redução da atividade da enzima AChE, e a redução da expressão do transportador de glicose GLUT3 no lobo pré-frontal. Embora essa última modificação tenha sido observada em animais adultos e não nos idosos, especulamos que o efeito anaplerótico da triheptanoína seja o responsável pelos resultados aqui observados.

Muito embora a cetose induzida por dieta cetogênica venha sendo apontada como um tratamento promissor para o hipometabolismo do cérebro idoso, estudos mais recentes têm mostrado que, ofertada no longo prazo, a dieta pode trazer prejuízos. Podemos especular, baseada em robusta literatura publicada sobre o efeito da gordura saturada na inflamação de baixo grau, que a composição da dieta, justamente por ser rica em gordura, induz neuroinflamação e prejuízos metabólicos não compensados pela maior oferta de corpos cetônicos.

6. REFERÊNCIAS

- ABHIJIT, S.; SUBRAMANYAM, M. V. V.; DEVI, S. A. Grape Seed Proanthocyanidin and Swimming Exercise Protects Against Cognitive Decline: A Study on M1 Acetylcholine Receptors in Aging Male Rat Brain. **Neurochemical Research**, 2017. v. 42, n. 12, p. 3573–3586. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-017-2406-6>>.
- ADANYEGUH, I. M. *et al.* Triheptanoin improves brain energy metabolism in patients with Huntington disease. **Neurology**, 2015. v. 84, n. 5, p. 490–495.
- ALDANA, B. I. Microglia-Specific Metabolic Changes in Neurodegeneration. **Journal of Molecular Biology**, 2019. v. 431, n. 9, p. 1830–1842. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.006>>.
- ALEXANDER, G. E. *et al.* Characterizing cognitive aging in humans with links to animal models. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2012. v. 4, n. SEP, p. 1–18.
- ALMEIDA RABELLO OLIVEIRA, M. DE *et al.* Effects of short-term and long-term treatment with medium- and long-chain triglycerides ketogenic diet on cortical spreading depression in young rats. **Neuroscience Letters**, 2008. v. 434, n. 1, p. 66–70.
- AN, Y. *et al.* Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, 2018. v. 14, n. 3, p. 318–329.
- ASHRAFI, G. *et al.* GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. **Neuron**, 2017. v. 93, n. 3, p. 606–615.e3. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.020>>.
- ASO, E. *et al.* Triheptanoin Supplementation to Ketogenic Diet Curbs Cognitive Impairment in APP/PS1 Mice Used as a Model of Familial Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, 2013. v. 10, n. 3, p. 290–297.
- BÄCKMAN, L. *et al.* Age-Related Cognitive Deficits Mediated by Changes in the Striatal Dopamine System. **American Journal of Psychiatry**, abr. 2000. v. 157, n. 4, p. 635–637. Disponível em: <<http://ajp.psychiatryonline.org/doi/10.1176/ajp.157.4.635>>.
- BALIETTI, M. *et al.* Ketogenic diets: An historical antiepileptic therapy with promising potentialities for the aging brain. **Ageing Research Reviews**, 2010. v. 9, n. 3, p. 273–279. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.003>>.
- BARNARD, N. D.; BUNNER, A. E.; AGARWAL, U. Saturated and trans fats and dementia: A systematic review. **Neurobiology of Aging**, 2014. v. 35, n. SUPPL.2, p. S65–S73. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.030>>.
- BAUDRY, M. *et al.* The biochemistry of memory: The 26year journey of a 'new and specific hypothesis'. **Neurobiology of Learning and Memory**, fev. 2011. v. 95, n. 2, p. 125–133. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742710002017>>.
- BERR, C. *et al.* Cognitive Decline Is Associated with Systemic Oxidative Stress: The EVA Study. **Journal of the American Geriatrics Society**, out. 2000. v. 48, n. 10, p. 1285–1291. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-5415.2000.tb02603.x>>.
- BIRTHELMER, A. *et al.* Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments. **Brain**

Research Bulletin, 2003. v. 60, n. 3, p. 283–296.

BORGES, K. *et al.* Randomized trial of add-on triheptanoin vs medium chain triglycerides in adults with refractory epilepsy. **Epilepsia Open**, 2019. v. 4, n. 1, p. 153–163.

_____. *et al.* Open-label long-term treatment of add-on triheptanoin in adults with drug-resistant epilepsy. **Epilepsia Open**, 2020. v. 5, n. 2, p. 230–239.

_____.; SONNEWALD, U. Triheptanoin—A medium chain triglyceride with odd chain fatty acids: A new anaplerotic anticonvulsant treatment? **Epilepsy Research**, jul. 2012. v. 100, n. 3, p. 239–244. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121111002099>>.

BOUGH, K. J. *et al.* Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. **Annals of Neurology**, 2006. v. 60, n. 2, p. 223–235.

BRANDT, J. *et al.* Preliminary Report on the Feasibility and Efficacy of the Modified Atkins Diet for Treatment of Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2019. v. 68, n. 3, p. 969–981.

BROWNLOW, M. L. *et al.* Nutritional ketosis affects metabolism and behavior in sprague-dawley rats in both control and chronic stress environments. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2017. v. 10, n. May, p. 1–17.

CARBONELL, F.; ZIJDENBOS, A. P.; BEDELL, B. J. Spatially Distributed Amyloid- β Reduces Glucose Metabolism in Mild Cognitive Impairment. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2020. v. 73, n. 2, p. 543–557.

CASTELLANO, Christian Alexandre *et al.* Lower brain 18F-fluorodeoxyglucose uptake but normal 11C-acetoacetate metabolism in mild Alzheimer's disease dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2014. v. 43, n. 4, p. 1343–1353.

CHENG, Jinping *et al.* Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. **Acta Neuropathologica**, 2018. v. 136, n. 4, p. 507–523. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1893-0>>.

COLE, J. H.; FRANKE, K. Predicting Age Using Neuroimaging: Innovative Brain Ageing Biomarkers. **Trends in Neurosciences**, 2017. v. 40, n. 12, p. 681–690. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.10.001>>.

COURCHESNE-LOYER, A. *et al.* Inverse relationship between brain glucose and ketone metabolism in adults during short-term moderate dietary ketosis: A dual tracer quantitative positron emission tomography study. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2017. v. 37, n. 7, p. 2485–2493.

CROTEAU, E. *et al.* A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, 2018. v. 107, p. 18–26. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.004>>.

CUESTAS TORRES, D. M.; CARDENAS, F. P. Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging. **Reviews in the Neurosciences**, 2020. v. 31, n. 3, p. 245–268.

CUNNANE, Stephen C. *et al.* Can ketones help rescue brain fuel supply in later life? Implications for cognitive health during aging and the treatment of alzheimer's disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2016. v. 9, n. JUL, p. 1–21.

CUNNANE, Stephen C *et al.* Neurodegenerative Disorders of Ageing. 2021. v. 19, n. 9, p. 609–633.

CURRAIS, A. *et al.* Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. **eLife**, 2019. v. 8, p. 1–21.

DIENEL, G. A. Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function. **Physiological Reviews**, 2019. v. 99, n. 1, p. 949–1045.

DUNBAR, G. L. *et al.* Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats. **Brain Research**, fev. 1993. v. 604, n. 1–2, p. 266–272. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689939390378Z>>.

ELLENBROEK, J. H. *et al.* Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced β - and α -cell mass but no weight loss in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2014. v. 306, n. 5, p. 552–558.

ERICKSON, C. A.; BARNES, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Experimental Gerontology**, 2003. v. 38, n. 1–2, p. 61–69.

FATTORETTI, P. *et al.* Quantitative immunohistochemistry of glucose transport protein (glut3) expression in the rat hippocampus during aging. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 2001. v. 49, n. 5, p. 671–672.

FISCHER, W. *et al.* NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. **The Journal of Neuroscience**, 1 jul. 1991. v. 11, n. 7, p. 1889–1906. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.11-07-01889.1991>>.

FOGLE, K. J. *et al.* Ketogenic and anaplerotic dietary modifications ameliorate seizure activity in *Drosophila* models of mitochondrial encephalomyopathy and glycolytic enzymopathy. **Molecular Genetics and Metabolism**, abr. 2019. v. 126, n. 4, p. 439–447. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719218306838>>.

FOSTER, G. D. *et al.* A Randomized Trial of a Low-Carbohydrate Diet for Obesity. **New England Journal of Medicine**, 2003. v. 348, n. 21, p. 2082–2090.

FOSTER, T. C. Biological markers of age-related memory deficits: Treatment of senescent physiology. **CNS Drugs**, 2006. v. 20, n. 2, p. 153–166.

FROUDIST-WALSH, S. *et al.* Plasticity in the Working Memory System: Life Span Changes and Response to Injury. **Neuroscientist**, 2018. v. 24, n. 3, p. 261–276.

GALLAGHER, M. *et al.* Markers for biogenic amines in the aged rat brain: Relationship to decline in spatial learning ability. **Neurobiology of Aging**, set. 1990. v. 11, n. 5, p. 507–514. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/019745809090111C>>.

GANO, L. B.; PATEL, M.; RHO, J. M. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. **Journal of Lipid Research**, 2014. v. 55, n. 11, p. 2211–2228.

GIOVANNINI, M. G. *et al.* Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. **Brain Research**, 1998. v. 784, n. 1–2, p. 218–227.

GOLD, Paul E. *et al.* Modulation of multiple memory systems: From neurotransmitters to metabolic substrates. **Hippocampus**, 2013. v. 23, n. 11, p. 1053–1065.

GONZALEZ-LIMA, F.; BARKSDALE, B. R.; ROJAS, J. C. Mitochondrial respiration as a

target for neuroprotection and cognitive enhancement. **Biochemical Pharmacology**, 2014. v. 88, n. 4, p. 584–593. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.010>>.

GORDON, N.; NEWTON, R. W. Glucose transporter type1 (GLUT-1) deficiency. **Brain and Development**, 2003. v. 25, n. 7, p. 477–480.

GREENWOOD, P. M.; PARASURAMAN, R. Neuronal and Cognitive Plasticity: A Neurocognitive Framework for Ameliorating Cognitive Aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2010. v. 2. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2010.00150/abstract>>.

HAAM, J.; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, ago. 2017. v. 142, n. 4, p. 111–121. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5958625/pdf/nihms960157.pdf>>.

HADERA, Mussie G. *et al.* Triheptanoin partially restores levels of tricarboxylic acid cycle intermediates in the mouse pilocarpine model of epilepsy. **Journal of Neurochemistry**, 2014. v. 129, n. 1, p. 107–119.

HADERA, Mussie Ghezu *et al.* Modification of astrocyte metabolism as an approach to the treatment of epilepsy: Triheptanoin and acetyl-L-carnitine. **Neurochemical Research**, 2016. v. 41, n. 1–2, p. 86–95.

HASHIM, S. A.; VANITALLIE, T. B. Ketone body therapy: from the ketogenic diet to the oral administration of ketone ester. **Journal of Lipid Research**, set. 2014. v. 55, n. 9, p. 1818–1826. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520356571>>.

HEDMAN, A. M. *et al.* Human brain changes across the life span: A review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies. **Human Brain Mapping**, 2012. v. 33, n. 8, p. 1987–2002.

HENDERSON, S. T. Ketone Bodies as a Therapeutic for Alzheimer's Disease. **Neurotherapeutics**, 2008. v. 5, n. 3, p. 470–480.

_____. *et al.* Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. **Nutrition and Metabolism**, 2009. v. 6, p. 1–25.

HERNANDEZ, A. R. *et al.* The Antiepileptic Ketogenic Diet Alters Hippocampal Transporter Levels and Reduces Adiposity in Aged Rats. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, 2018. v. 73, n. 4, p. 450–458.

HERTZ, L.; CHEN, Y.; WAAGEPETERSEN, H. S. Effects of ketone bodies in Alzheimer's disease in relation to neural hypometabolism, β -amyloid toxicity, and astrocyte function. **Journal of Neurochemistry**, 2015. v. 134, n. 1, p. 7–20.

HEUSSINGER, N. *et al.* 10 patients, 10 years – Long term follow-up of cardiovascular risk factors in Glut1 deficiency treated with ketogenic diet therapies: A prospective, multicenter case series. **Clinical Nutrition**, 2018. v. 37, n. 6, p. 2246–2251.

HUANG, J. *et al.* The effect of ketogenic diet on behaviors and synaptic functions of naive mice. **Brain and Behavior**, 2019. v. 9, n. 4, p. 1–12.

IKEGAMI, S. Behavioral impairment in radial-arm maze learning and acetylcholine content of the hippocampus and cerebral cortex in aged mice. **Behavioural Brain Research**, 1994. v. 65, n. 1, p. 103–111.

JACK, C. R. *et al.* Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. **Neurology**, 1997. v. 49, n. 3, p. 786–794.

JORNAYVAZ, F. R. *et al.* A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2010. v. 299, n. 5, p. 808–815.

KASHIWAYA, Y. *et al.* D-β-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000. v. 97, n. 10, p. 5440–5444.

_____ *et al.* A ketone ester diet exhibits anxiolytic and cognition-sparing properties, and lessens amyloid and tau pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 2013. v. 34, n. 6, p. 1530–1539.

KASS, H. R. *et al.* Use of dietary therapies amongst patients with GLUT1 deficiency syndrome. **Seizure**, 2016. v. 35, p. 83–87. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2016.01.011>>.

KATO, T. *et al.* Brain fluorodeoxyglucose (FDG) PET in dementia. **Ageing Research Reviews**, 2016. v. 30, p. 73–84. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.02.003>>.

KATSUKI, H.; IZUMI, Y.; ZORUMSKI, C. F. Noradrenergic Regulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampal CA1 Region. **Journal of Neurophysiology**, 1 jun. 1997. v. 77, n. 6, p. 3013–3020. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.1997.77.6.3013>>.

KHAN, Z. U. *et al.* Memory deficits in aging and neurological diseases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, 2014. v. 122, p. 1–29.

KINMAN, R. P. *et al.* Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2006. v. 291, n. 4, p. 860–866.

KIROVA, A. M.; BAYS, R. B.; LAGALWAR, S. Working Memory and Executive Function Decline across Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. **BioMed Research International**, 2015. v. 2015.

KOPPEL, S. J.; SWERDLOW, R. H. Neuroketotherapeutics: A modern review of a century-old therapy. **Neurochemistry International**, jul. 2018. v. 117, n. 10, p. 114–125. Disponível em: <[file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf](file:///C:/Users/Carla%20Carolina/Desktop/Artigos%20para%20acrescentar%20na%20qualifica%C3%A7%C3%A3o/The%20impact%20of%20birth%20weight%20on%20cardiovascular%20disease%20risk%20in%20the.pdf)>.

KOSINSKI, C.; JORNAYVAZ, F. R. Effects of ketogenic diets on cardiovascular risk factors: Evidence from animal and human studies. **Nutrients**, 2017. v. 9, n. 5, p. 1–16.

KRABBE, K. S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Experimental Gerontology**, maio. 2004. v. 39, n. 5, p. 687–699. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556504000531>>.

KRIKORIAN, R. *et al.* Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, 2012. v. 33, n. 2, p. 425.e19–425.e27.

_____ *et al.* Nutritional ketosis for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: A controlled pilot trial. **Clinical Parkinsonism & Related Disorders**, 2019. v. 1, p. 41–47. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prdoa.2019.07.006>>.

LEON, M. J. De *et al.* Mfmm15.Pdf. 1983. n. June, p. 568–571.

LIU, H. *et al.* Ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy in adults: A meta-analysis of observational studies. **Epilepsia Open**, 2018. v. 3, n. 1, p. 9–17.

LIU, Y. *et al.* Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. **FEBS Letters**, 23 jan. 2008. v. 582, n. 2, p. 359–364. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

LU, Y. *et al.* Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF- κ B signaling pathways. **Neuroscience Letters**, 2018. v. 683, p. 13–18. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.016>>.

LUTAS, A.; YELLEN, G. Cuerpos Cetonicos Y Excitabilidad Neuro. **Trends in neurosciences**, 2013. v. 36, n. 1, p. 32–40. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228828>>0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228828>.

MAGISTRETTI, Pierre J.; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. **Nature Reviews Neuroscience**, 2018. v. 19, n. 4, p. 235–249. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2018.19>>.

MAMELAK, M. Energy and the Alzheimer brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2017. v. 75, p. 297–313. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.001>>.

MANI, V. *et al.* Mahanimbine Improved Aging-Related Memory Deficits in Mice through Enhanced Cholinergic Transmission and Suppressed Oxidative Stress, Amyloid Levels, and Neuroinflammation. **Brain Sciences**, 23 dez. 2021. v. 12, n. 1, p. 12. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3425/12/1/12>>.

MARIN-VALENCIA, I. *et al.* Heptanoate as a neural fuel: Energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2013. v. 33, n. 2, p. 175–182. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2012.151>>.

MATTSON, M. P.; ARUMUGAM, T. V. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. **Cell Metabolism**, jun. 2018. v. 27, n. 6, p. 1176–1199. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413118303188>>.

MCDONALD, T. *et al.* Triheptanoin alters [U-13C6]-glucose incorporation into glycolytic intermediates and increases TCA cycling by normalizing the activities of pyruvate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase in a chronic epilepsy mouse model. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2020. v. 40, n. 3, p. 678–691. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0271678X19837380>>.

MCDONALD, T. S. *et al.* Alterations of hippocampal glucose metabolism by even versus uneven medium chain triglycerides. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2014. v. 34, n. 1, p. 153–160. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.184>>.

MENDONCA, G. V. *et al.* Impact of Aging on Endurance and Neuromuscular Physical Performance: The Role of Vascular Senescence. **Sports Medicine**, 2017. v. 47, n. 4, p. 583–598.

MOCHÉL, F. Triheptanoin for the treatment of brain energy deficit: A 14-year experience. **Journal of Neuroscience Research**, 2017. v. 95, n. 11, p. 2236–2243.

MORRISON, J. H.; HOF, P. R. Life and Death of Neurons in the Aging Brain. **Science**, 17 out. 1997. v. 278, n. 5337, p. 412–419. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.278.5337.412>>.

MOSCONI, L. *et al.* Reduced Mitochondria Cytochrome Oxidase Activity in Adult Children of Mothers with Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 29 nov. 2011. v. 27, n. 3, p. 483–490. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

NAGAMATSU, S. *et al.* Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. **Journal of Biological Chemistry**, 1992. v. 267, n. 1, p. 467–472.

NAGPAL, R. *et al.* Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment. **EBioMedicine**, 2019. v. 47, p. 529–542. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.032>>.

NAGY, P. M.; AUBERT, I. Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter enhances dendritic complexity of adult-born hippocampal neurons and improves acquisition of spatial memory during aging. **Neurobiology of Aging**, 2015. v. 36, n. 5, p. 1881–1889. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.021>>.

NETH, B. J. *et al.* Modified ketogenic diet is associated with improved cerebrospinal fluid biomarker profile, cerebral perfusion, and cerebral ketone body uptake in older adults at risk for Alzheimer's disease: a pilot study. **Neurobiology of Aging**, 2020. v. 86, p. 54–63. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.09.015>>.

NEWMAN, J. C. *et al.* Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. **Cell Metabolism**, 2017. v. 26, n. 3, p. 547–557.e8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.004>>.

_____; VERDIN, E. Ketone bodies as signaling metabolites. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, jan. 2014. v. 25, n. 1, p. 42–52. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276013001562>>.

NEWMAN, L. A.; GOLD, P. E. Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist. **Psychopharmacology**, 10 mar. 2016. v. 233, n. 5, p. 925–932. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00213-015-4174-9>>.

NEWMAN, Lori A.; KOROL, D. L.; GOLD, Paul E. Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing. **PLoS ONE**, 13 dez. 2011. v. 6, n. 12, p. e28427. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028427>>.

NGUYEN, T. T. *et al.* Type 3 diabetes and its role implications in alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. v. 21, n. 9, p. 1–16.

NUGENT, S. *et al.* Relationship of metabolic and endocrine parameters to brain glucose metabolism in older adults: do cognitively-normal older adults have a particular metabolic phenotype? **Biogerontology**, 2016. v. 17, n. 1, p. 241–255.

NUGENT, Scott; CASTELLANO, Christian Alexandre; *et al.* Glucose hypometabolism is highly localized, but lower cortical thickness and brain atrophy are widespread in cognitively

normal older adults. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2014. v. 306, n. 11, p. 1315–1321.

_____; TREMBLAY, Sebastien; *et al.* Brain glucose and acetoacetate metabolism: A comparison of young and older adults. **Neurobiology of Aging**, 2014. v. 35, n. 6, p. 1386–1395. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.027>>.

OSCHWALD, J. *et al.* Brain structure and cognitive ability in healthy aging: A review on longitudinal correlated change. **Reviews in the Neurosciences**, 2019. v. 31, n. 1, p. 1–57.

OTA, M. *et al.* Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, 2019. v. 690, n. October 2018, p. 232–236. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.048>>.

PAOLI, A. *et al.* Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, n. 2.

PAPAMANDJARIS, A. A.; MACDOUGALL, D. E.; JONES, P. J. H. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications. **Life Sciences**, 1998. v. 62, n. 14, p. 1203–1215.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 25 out. 1994. v. 91, n. 22, p. 10625–10629. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.22.10625>>.

PHILLIPS, M. C. L. *et al.* Low-fat versus ketogenic diet in Parkinson's disease: A pilot randomized controlled trial. **Movement Disorders**, 2018. v. 33, n. 8, p. 1306–1314.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. **Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior**. *Neuron*.

PINTO, A. *et al.* Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ketogenic diet: New perspectives for neuroprotection in alzheimer's disease. **Antioxidants**, 2018. v. 7, n. 5.

REGER, M. A. *et al.* Effects of β -hydroxybutyrate on cognition in memory-impaired adults. **Neurobiology of Aging**, 2004. v. 25, n. 3, p. 311–314.

ROE, C. R. *et al.* Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. **Journal of Clinical Investigation**, 2002. v. 110, n. 2, p. 259–269.

_____; MOCHEL, F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: Therapeutic potential. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 2006. v. 29, n. 2–3, p. 332–340.

ROMBERG, C. *et al.* Impaired object-location learning and recognition memory but enhanced sustained attention in M2 muscarinic receptor-deficient mice. **Psychopharmacology**, 2018. v. 235, n. 12, p. 3495–3508.

RUSEK, M. *et al.* Ketogenic Diet in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 9 ago. 2019. v. 20, n. 16, p. 3892. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/3892>>.

SAAB, A. S. *et al.* Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. **Neuron**, 2016. v. 91, n. 1, p. 119–132.

SAMAHA, F. F. *et al.* A Low-Carbohydrate as Compared with a Low-Fat Diet in Severe Obesity. **New England Journal of Medicine**, 2003. v. 348, n. 21, p. 2074–2081.

SHIMAZU, T. *et al.* Suppression of oxidative stress and β -OHB as endogenous histone deacetylase. **Science**, 2013. v. 339, n. 6116, p. 211–214.

SIMEONE, T. A.; SIMEONE, K. A.; RHO, J. M. Ketone Bodies as Anti-Seizure Agents. **Neurochemical Research**, 10 jul. 2017. v. 42, n. 7, p. 2011–2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-017-2253-5>>.

SIMPSON, I. A.; CARRUTHERS, A.; VANNUCCI, S. J. Supply and Demand in Cerebral Energy Metabolism: The Role of Nutrient Transporters. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 20 nov. 2007. v. 27, n. 11, p. 1766–1791. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/sj.jcbfm.9600521>>.

SINTINI, I. *et al.* Regional multimodal relationships between tau, hypometabolism, atrophy, and fractional anisotropy in atypical Alzheimer's disease. **Human Brain Mapping**, 2019. v. 40, n. 5, p. 1618–1631.

SOUZA, D. G. *et al.* Astrocytes from adult Wistar rats aged in vitro show changes in glial functions. **Neurochemistry International**, 2015. v. 90, p. 93–97.

SUISSA, L. *et al.* Ingested ketone ester leads to a rapid rise of acetyl-coa and competes with glucose metabolism in the brain of non-fasted mice. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021. v. 22, n. 2, p. 1–17.

TAJIK, A. *et al.* Activation of the dorsal hippocampal nicotinic acetylcholine receptors improves tamoxifen-induced memory retrieval impairment in adult female rats. **Neuroscience**, 2016. v. 327, p. 1–9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.008>>.

TAKEI, Y. Age-dependent decline in neurogenesis of the hippocampus and extracellular nucleotides. **Human Cell**, 2019. v. 0, n. 0, p. 0. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13577-019-00241-9>>.

TAYLOR, M. K. *et al.* Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, 2018. v. 4, p. 28–36. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.11.002>>.

TEUNISSEN, C. *et al.* Serum cholesterol, precursors and metabolites and cognitive performance in an aging population. **Neurobiology of Aging**, fev. 2003. v. 24, n. 1, p. 147–155. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458002000611>>.

ULLRICH, C.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 2010. v. 45, n. 4, p. 408–417. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.001>>.

UPRIGHT, N. A.; BAXTER, M. G. Effects of nicotinic antagonists on working memory performance in young rhesus monkeys. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2021. v. 184, n. August, p. 107505. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107505>>.

VAISHNAVI, S. N. *et al.* Regional aerobic glycolysis in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 12 out. 2010. v. 107, n. 41, p. 17757–17762. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1010459107>>.

VANNUCCI, S. J. *et al.* Glucose transport in developing rat brain: Glucose transporter proteins,

rate constants and cerebral glucose utilization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 1994. v. 140, n. 2, p. 177–184. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00926756>>.

_____; MAHER, F.; SIMPSON, I. A. Glucose transporter proteins in brain: Delivery of glucose to neurons and glia. **Glia**, set. 1997. v. 21, n. 1, p. 2–21. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1%3C2::AID-GLIA2%3E3.0.CO;2-C](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1%3C2::AID-GLIA2%3E3.0.CO;2-C)>.

VENEMAN, T. *et al.* Effect of hyperketonemia and hyperlacticacidemia on symptoms, cognitive dysfunction, and counterregulatory hormone responses during hypoglycemia in normal humans. **Diabetes**, 1994. v. 43, n. 11, p. 1311–1317.

VIVO, D. C. DE *et al.* Defective Glucose Transport across the Blood-Brain Barrier as a Cause of Persistent Hypoglycorrhachia, Seizures, and Developmental Delay. **New England Journal of Medicine**, 5 set. 1991. v. 325, n. 10, p. 703–709. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199109053251006>>.

VYKUNTARAJU, K. N. *et al.* Symptomatic west syndrome secondary to Glucose Transporter-1 (GLUT1) deficiency with complete response to 4:1 ketogenic diet. **Indian Journal of Pediatrics**, 2014. v. 81, n. 9, p. 934–936.

WAITT, A. E. *et al.* Emerging roles for glycogen in the CNS. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 2017. v. 10, n. March, p. 1–10.

WANG, D. *et al.* A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. **Human Molecular Genetics**, 2006. v. 15, n. 7, p. 1169–1179.

WEHBE, Z.; TUCCI, S. Therapeutic potential of triheptanoin in metabolic and neurodegenerative diseases. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 2020. v. 43, n. 3, p. 385–391.

WHITE, C. J. *et al.* Determining the Bioenergetic Capacity for Fatty Acid Oxidation in the Mammalian Nervous System. **Molecular and Cellular Biology**, 2020. v. 40, n. 10, p. 1–21.

WILLIS, Sarah *et al.* Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models. **Neurobiology of Disease**, 2010. v. 40, n. 3, p. 565–572.

WU, L.; ZHANG, Xin; ZHAO, Liqin. Human apoe isoforms differentially modulate brain glucose and ketone body metabolism: Implications for Alzheimer's disease risk reduction and early intervention. **Journal of Neuroscience**, 2018. v. 38, n. 30, p. 6665–6681.

WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, 9 nov. 2016. v. 539, n. 7628, p. 180–186. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature20411>>.

XU, K. *et al.* Diet-induced ketosis improves cognitive performance in aged rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2010. v. 662, p. 71–75.

YAO, J.; DIAZ BRINTON, R. Targeting Mitochondrial Bioenergetics for Alzheimers Prevention and Treatment. **Current Pharmaceutical Design**, 1 out. 2011. v. 17, n. 31, p. 3474–3479. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=17&issue=31&page=3474>>.

ZHANG, J. *et al.* 3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism. **Biomaterials**, out. 2013. v. 34, n. 30, p. 7552–7562. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213007588>>.

ZHANG, S. *et al.* Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. **Progress in Neurobiology**, 2021. v. 204, n. June, p. 102089. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102089>>.

ZHANG, Xuezhong *et al.* Age-related alteration in cerebral blood flow and energy failure is correlated with cognitive impairment in the senescence-accelerated prone mouse strain 8 (SAMP8). **Neurological Sciences**, 2013. v. 34, n. 11, p. 1917–1924.

ZHANG, Yifan *et al.* Impact of aging on metabolic changes in the ketotic rat brain: Glucose, oxidative and 4-HNE metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2018. v. 1072, p. 21–25.

7. ANEXOS

A – Folha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

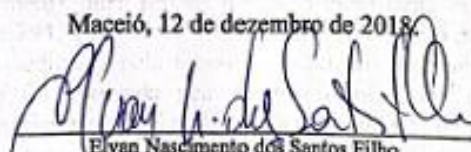


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *"Efeito da dieta cetogênica rica em triheptanoato sobre parâmetros do metabolismo cerebral de camundongos C57BL/6J"*, registrada com o nº 71/2018, sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra Adriana Ximenes da Silva, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 07 de dezembro de 2018.

Vigência da autorização	20.01.2019 a 31.10.2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / C57BJ/6L
Nº de animais	72
Peso/idade	25g e 35g / 12 e 72 semanas
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI)
Colaboradores	Lanni Sarmiento da Rocha

Maceió, 12 de dezembro de 2018


Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479