

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI -UFVJM**

DIRCEU DE SOUSA MELO

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA DESDE O NASCIMENTO
SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS ADULTOS**

DIAMANTINA - MG

2013

DIRCEU DE SOUSA MELO

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA DESDE O
NASCIMENTO SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS
ADULTOS**

**Dissertação apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia,
nível mestrado, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.**

Orientador: Professor Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto - UFVJM

Coorientadora: Professora Dra. Sílvia Carolina Guatimosim - UFMG

DIAMANTINA - MG

2013

Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

Melo, Dirceu de Sousa
M528e Efeitos da restrição calórica desde o nascimento sobre o coração
2013 de ratos adultos. / Dirceu de Sousa Melo. – Diamantina: UFVJM,
2013.
73 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sílvia Carolina Guatimosim

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.

1. Restrição calórica intensa. 2. Função cardíaca. 3. Cardiomiócitos
. 4. Via de sinalização da Akt. 5. Transiente de cálcio. I. Peixoto,
Marco Fabrício Dias. II. Guatimosim, Sílvia Carolina. III. Título.

CDD 571.1

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA DESDE O NASCIMENTO
SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS ADULTOS**

Dirce Souza Melo

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 16 / 08 / 2013

Prof. *Jader dos Santos Cruz* – UFMG

Prof. Fabiano Trigueiro Amorim – UFVJM

Prof. Marco Fabrício Dias Peixoto – UFVJM

Presidente

DIAMANTINA

2013

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização da presente, em especial: a minha mãe Maria do Carmo e ao meu orientador Marco Fabrício.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por iluminar sempre meu caminho.

A minha mãe, pelo amor incondicional e por crer e apoiar todos os meus sonhos. Seu otimismo e bom humor nos momentos difíceis me ajudaram a seguir em frente sempre.

A meu pai, meus irmãos e familiares que mesmo distantes sempre me apoiaram nessa jornada.

A meu orientador Professor Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto pela confiança, incentivo, amizade e tantos ensinamentos.

À Professora Dr^a. Tania Regina Riul por todos os ensinamentos durante minha jornada, desde o início da graduação, e por fornecer as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Sílvia Carolina Guatimosim pela orientação, suporte na execução deste trabalho e acolhimento em seu laboratório.

À Professora Dr^a. Elizabethe Adriana Esteves pelo incentivo, conselhos e todas as discussões científicas.

Ao Professor Dr. Anderson José Ferreira pelo suporte constante e oportunidades de aprendizado.

A minha fiel escudeira e irmã de coração Liliane por todo o auxílio e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos pelo apoio constante e momentos de descontração, em especial a Letícia, Cosme e Emília que me acompanharam de perto em mais uma etapa.

A todos os “Pangarés”: Camila; Lauane; Lidiane; Maria Cecília; Nayara; Sueli e Talita. Pela amizade, companheirismo e por todos os bons momentos que passamos juntos. A presença de vocês ao longo dessa jornada tornou tudo mais suave e agradável.

Ao Alexandre por todo o suporte, paciência e amizade.

A todos os que contribuíram com a execução deste projeto, em especial, a Patrícia, Pedro, Mariana, Márcia, Késia, Kelly, Gabriela, Bárbara e Karine. A contribuição de cada um fez possível a realização deste trabalho.

A todos os colegas e professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela amizade e incentivo.

Aos animais experimentais por doarem suas vidas em prol do desenvolvimento científico.

RESUMO

Evidências recentes sugerem que a restrição calórica intensa (RCI) (>40%) exerce efeitos benéficos sobre o coração de ratos. No entanto, a maioria destes estudos avaliaram os efeitos da RCI em corações de ratos que iniciaram esta restrição já na idade adulta. Neste trabalho, investigamos as conseqüências de uma restrição calórica de 50% desde o nascimento sobre a função e morfologia cardíaca de ratos adultos e avaliamos os possíveis mecanismos envolvidos nestas adaptações. Desde o nascimento até a idade de 90 dias ratos RC50 tiveram sua alimentação restrita a 50% do consumo do grupo *ad libitum* (AL). Durante o período de 90 dias os animais tiveram sua ingestão alimentar, peso corporal e pressão arterial monitorados. Após este período, foi realizado um teste de capacidade aeróbica máxima para avaliar indiretamente a função cardiovascular global. Quarenta e oito horas após este teste os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado para análise do hematócrito, bioquímica sérica e estresse oxidativo e o músculo sóleo retirado para análise do estresse oxidativo. A tíbia foi retirada para aferição do comprimento e fígado, baço, supra-renais, testículos e gordura visceral removidos para aferição do peso. O coração foi retirado e o índice de desenvolvimento de tensão máxima (+dT/dt) e mínima (-dT/dt) do miocárdio foram analisados pela preparação de coração isolado. Também foi realizada análise do estresse oxidativo cardíaco e o diâmetro, número e densidade de cardiomiócitos, assim como os níveis de fibrose cardíaca foram obtidos através da análise histológica. Miócitos ventriculares foram isolados para avaliação do transiente de Ca^{2+} em microscopia confocal e os níveis de fosforilação da Akt e expressão da SERCA2 foram avaliados pela técnica de Western blot. Comparado ao grupo AL, os animais RC50 apresentaram menor peso corporal e de órgãos, menor comprimento da tíbia, menor glicemia, maior colesterol HDL, menor pressão arterial, menor estresse oxidativo cardíaco, maior

desempenho aeróbio e da função cardíaca, como mostrado pelo aumento $\pm dT/dt$. Apesar do menor diâmetro dos cardiomiócitos, ratos RC50 apresentaram aumento na relação coração/peso corporal, aumento do número e densidade dos cardiomiócitos, e níveis semelhantes de fibrose cardíaca em comparação aos animais AL. Os níveis de fosforilação da Akt foram superiores nos cardiomiócitos dos animais RC50 e não houve diferenças significativas no transiente de Ca^{2+} e na expressão de SERCA2 entre os cardiomiócitos dos animais RC50 e AL. Em conjunto, estas observações revelaram efeitos positivos de uma RCI de 50% desde o nascimento sobre a função, estrutura cardíaca e vias de sinalização da sobrevivência de cardiomiócitos em ratos adultos.

ABSTRACT

There has been growing evidence suggesting that a severe caloric restriction (SCR) (above 40%) leads to beneficial effects on heart rats. However, most of the reports are focused on the effects of SCR on hearts of rats which started this restriction at adulthood. In this work, we investigated the consequences of a 50% caloric restriction since birth on cardiac morphology and function in adult rats and evaluated the possible mechanisms involved in these adaptations. From birth up to the age of 90 days CR50 rats were fed restricted at 50% of the Ad Libitum group (AL). During the period of 90 days the animals had their food intake, body weight and blood pressure monitored. After this period, a maximal aerobic test was performed in order to indirectly evaluate the global cardiovascular function. Forty-eight hours after this test the animals were euthanized the blood collected for analysis of hematocrit, serum biochemistry and oxidative stress and soleus muscle collected for oxidative stress analysis. The tibia was removed for measurement of length and liver, spleen, adrenals, testes and visceral fat were removed for measurement of weight. The heart was removed and the index of velocity of myocardial contraction (+dT/dt) and relaxation (-dT/dt) was analyzed by isolated heart preparation. We also carried out analysis of cardiac oxidative stress and cardiomyocyte diameter, number, density and myocardium collagen content were obtained through histological analysis. Ventricular myocytes were isolated by standard methods in order to evaluate phosphorylated AKT levels and the expression of SERCA2a was assessed by Western blot. Compared to AL, CR50 animals had lower body and organs weight, lower tibia length, lower blood glucose, higher HDL cholesterol, lower blood pressure, lower oxidative stress in the heart and blood, increased aerobic performance and cardiac function, as shown by increased \pm dT/dt. Despite the smaller cardiomyocyte diameter, CR50 rats presented increased heart/body

weight ratio, increased cardiomyocyte density and number, and similar levels of myocardium collagen content compared to AL rats. AKT was hyperphosphorylated in cardiomyocytes from CR50 rats and no significant differences in Ca^{2+} transient and SERCA2 levels were found between cardiomyocytes of CR50 and AL rats. Collectively, these observations revealed beneficial effects of a 50% caloric restriction from birth on cardiac function, structure and signaling pathways for survival of adult rat cardiomyocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental.....	28
Figura 2 - Parâmetros corporais e de ingestão alimentar.....	33
Figura 3 - Efeitos da RCI sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.....	39
Figura 4 - Efeitos da RCI sobre o desempenho aeróbio máximo em piscina.....	41
Figura 5 - Efeito da RCI sobre a função cardíaca através da técnica de coração isolado.....	42
Figura 6 - Efeito da RCI sobre o número, densidade e morfometria de cardiomiócitos.....	44
Figura 7 - Efeito da RCI sobre os níveis de peroxidação lipídica e atividade da CAT e SOD no músculo esquelético e coração.....	46
Figura 8 - Efeito da RCI sobre os níveis de fosforilação de Akt em cardiomiócitos.....	47
Figura 9 - Efeito da RCI sobre transiente de cálcio e tempo de decaimento do transiente em cardiomiócitos.....	48
Figura 10 - Efeito da RCI sobre os níveis de expressão de SERCA2 em cardiomiócitos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos gerais da RC.....	15
Tabela 2 – Efeitos da RC sobre o coração.....	18
Tabela 3 – Efeitos da RCI sobre o coração.....	21
Tabela 4 – Caracterização dos parâmetros corporais para os grupos RC50 e AL.....	35
Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos séricos e hematócrito para os grupos RC50 e AL.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+Dt/dt – Máximo desenvolvimento de tensão (índice de contratilidade cardíaca)

-Dt/dt – Mínimo desenvolvimento de tensão (índice de relaxamento cardíaco)

Akt – Proteína quinase B

AMPK – Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

Bcl-2

CAT – Catalase

CR50 – Grupo restrição calórica de 50%

DP – Índice duplo-produto

eNOS – Óxido nítrico sintase forma endotelial

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

GPX – Glutathione peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IRS-1- Substrato receptor de insulina-1

NCX – Trocador cálcio/sódio

O₂^{·-} Ânion superóxido

PAS – Pressão arterial sistólica

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

p-Akt – Proteína quinase B fosforilada

PLB - fosfolamban

RC – Restrição Calórica

RCI – Restrição Calórica Intensa

RCM – Restrição Calórica Moderada

SERCA2 – Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SOD – Superóxido Dismutase

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Breve histórico sobre a restrição calórica.....	12
2.2. Benefícios gerais da restrição calórica.....	13
2.3. Efeitos da restrição calórica moderada sobre o coração.....	16
2.4. Mecanismos moleculares envolvidos com a cardioproteção da restrição calórica.....	18
2.5. Restrição calórica intensa e seus efeitos sobre o coração.....	20
2.6. Desenvolvimento pós-natal do coração.....	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Animais e condições experimentais.....	26
4.2. Avaliação do peso corporal e eficiência alimentar.....	27
4.3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares.....	27
4.4. Protocolo desempenho aeróbio máximo.....	27
4.5. Eutanásia e coleta de amostras.....	28
4.6. Análises bioquímicas séricas e hematócrito.....	29
4.7. Função cardíaca <i>ex vivo</i>	29
4.8. Avaliações histológicas do tecido cardíaco.....	29
4.9. Avaliações de estresse oxidativo.....	30
4.10. Isolamento de cardiomiócitos.....	31
4.11. Avaliação do transiente de cálcio.....	31
4.12. Western blotting.....	32

4.13. Análise estatística.....	33
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6- CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	51
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Anexo I – Artigo publicado.

Melo DS, Riul TR, Esteves EA, Moraes PL, Ferreira FO, Alves MNM, Almeida PWM, Guatimosim S, Ferreira AJ, Dias-Peixoto MF. 2013. Effects of severe restriction from birth on the hearts of adult rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. **38**: 879-885.

1. INTRODUÇÃO

A restrição calórica moderada (RCM) (20-40%) é conhecida como uma das mais importantes estratégias não farmacológicas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (Dolinsky & Dyck, 2011; Han & Ren, 2010; Marzetti et al., 2009; Sohal & Wondrich, 1996; Wondrich et al., 1992). Especificamente sobre o coração, a RCM está envolvida com a preservação da função contrátil (Han et al., 2012), melhor recuperação da função cardíaca durante a reperfusão após a indução de isquemia (Yamagishi et al., 2010; Sung et al., 2011; Peart et al., 2012), redução do dano oxidativo tecidual (Sohal et al., 1994), aumento da sensibilidade a insulina (Long et al., 2002), atenuação do processo inflamatório (Kalani et al., 2005), redução dos processos de apoptose e ativação da autofagia (Han et al., 2012; Phillips & Leeuwenburg, 2005).

Já os efeitos de uma restrição calórica intensa (RCI) (> 40%) sobre o coração são pouco conhecidos e, além disso, os resultados são controversos. Alguns trabalhos mostram que uma RCI exerce efeitos negativos (Okoshi et al., 2001; Sugizaki et al., 2005; Sugizaki et al., 2009; Tomasi et al., 2009) e outros efeitos positivos (Mcknigh et al., 1999; Broderick et al., 2002, Peron et al., 2005, Yamagishi et al., 2010; Han & Ren, 2010) sobre o coração. A principal explicação para esta divergência de resultados parece estar relacionada aos diferentes desenhos experimentais, mais especificamente, pela utilização de diferentes durações e intensidades de RCI, além da idade em que os animais iniciam a RCI. Em relação a este último ponto todos os trabalhos supracitados iniciaram o protocolo de RCI com animais já na fase adulta. Em uma recente revisão de literatura, Han & Ren (2010) concluíram que os benefícios da RCM parecem ser proporcionais à sua intensidade e mais pronunciados quando iniciada imediatamente após o nascimento. Apesar disso, ainda não são encontrados estudos na literatura que avaliaram os efeitos de uma RCI de longo prazo imposta desde o nascimento sobre a função, morfologia cardíaca e vias de sinalização intracelular em cardiomiócitos de ratos adultos.

Durante o desenvolvimento fetal, o crescimento do miocárdio do roedor ocorre principalmente devido à proliferação dos cardiomiócitos. Por outro lado, após o nascimento ocorre uma baixa proliferação de cardiomiócitos e o crescimento do coração ocorre especialmente pela hipertrofia dos cardiomiócitos. Já no início da idade adulta os cardiomiócitos hipertrofiados dos roedores podem sofrer apoptose permitindo um

aumento da deposição de matriz extracelular no miocárdio conduzindo a um padrão pró-fibrótico que pode contribuir para o surgimento da disfunção cardíaca em fases mais tardias da vida (Rudolph, 2000; Molkenin & Dorn, 2001). Neste contexto, uma RCI imposta desde o nascimento até a idade adulta, poderia levar a uma menor hipertrofia dos cardiomiócitos, favorecendo uma redução da taxa de apoptose e, conseqüentemente, promovendo um maior número de células na vida adulta, o que estaria associado com uma melhora global da função cardíaca.

Neste trabalho avaliamos as conseqüências de uma RCI de 50% imposta desde o nascimento sobre a função e morfologia cardíaca de ratos *Wistar* adultos de 90 dias. Para compreender os possíveis mecanismos envolvidos nestas adaptações avaliamos também o desempenho aeróbio máximo, pressão arterial, parâmetros bioquímicos séricos, hematócrito e estresse oxidativo tecidual. No plano celular, investigamos as vias de sinalização intracelulares envolvidas com a contratilidade e sobrevivência de cardiomiócitos, mais especificamente, as vias de sinalização do transiente de Ca^{2+} e os níveis de fosforilação da AKT, respectivamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico sobre a restrição calórica

A restrição calórica (RC) é definida como uma redução na ingestão calórica abaixo dos valores consumidos habitualmente, fornecendo todos os minerais e vitaminas essenciais à vida sem gerar desnutrição, restringindo de forma proporcional todos os componentes energéticos da dieta (carboidratos, proteínas e lipídeos) (Han & Hen, 2010; Weiss & Fontana, 2011; Sung & Dyck, 2011). Os efeitos da RC sobre a saúde têm sido investigados a aproximadamente 100 anos. Inicialmente, os estudos de Osborne et al., (1917) mostraram pela primeira vez que uma RC promovia efeitos positivos sobre a longevidade e desempenho reprodutivo de ratos. No entanto, este trabalho obteve pouco impacto no meio científico por apresentar alguns erros metodológicos que foram bastante questionados. Um pouco mais tarde, em 1935, McCay et al., (1935) publicaram o estudo considerado como pioneiro para os modelos experimentais de RC. Neste estudo foi observado que ratos submetidos à RC de 30% após a puberdade, além de apresentarem um aumento na longevidade em aproximadamente 40%, tiveram atenuação na severidade de doenças crônicas. Esta descoberta inédita despertou o interesse dos pesquisadores pelos efeitos da RC e também levou ao surgimento de alguns questionamentos, por exemplo, se os efeitos da RC ocorreriam pela redução de algum nutriente específico ou pela redução global do fornecimento de energia. Ao longo de quase um século de investigações as evidências apontam fortemente para a hipótese da redução da oferta de energia em detrimento da redução de um nutriente específico, embora alguns estudos comprovem que a redução de determinados componentes, como a proteína possa também exercer efeitos positivos sobre a longevidade (Yu et al., 1985; Masoro, 2005). Os estudos de Yu et al., (1985), por exemplo, mostraram que ratos submetidos a uma redução de 40% na ingestão de proteínas tiveram aumento da longevidade, mas quando comparado ao grupo submetido a RC global de 40% esse efeito foi bem menor. Apesar da importância destes estudos, foi a partir da década de 70 que os efeitos da RC foram mais intensamente investigados confirmando os impactos positivos da RC sobre a longevidade, prevenção e tratamento de doenças crônicas (Maeda et al., 1985 ;Roe et al., 1995; Weiss & Fontana, 2011; Sung & Dyck 2011). A seguir destacamos alguns estudos que confirmam estes efeitos.

2.2 Benefícios gerais da restrição calórica

O estudo dos efeitos da RC sobre a longevidade é um dos principais focos de discussão atualmente e a maioria dos estudos mostra uma relação inversa entre a redução da ingestão calórica e o aumento da longevidade (Yu et al., 1982; Weindruch, 1996; Merry, 2002; Merry, 2005; Han & Ren, 2010). O estudo de Yu et al., (1982), foi o primeiro a observar esta relação. Neste estudo foi observado que ratos adultos submetidos a redução de 30% e 50% na ingestão de calorias tiveram um aumento proporcional de aproximadamente 30% e 50% na longevidade, respectivamente. Recentemente o trabalho de Speakman & Mitchell, (2011) sugere que o efeito máximo sobre a longevidade está na faixa de 40-45% de RC, sendo que RC muito severas podem ter efeitos negativos.

Alguns estudos sugerem que quanto mais cedo se inicia a RC maior o seu efeito sobre a longevidade (Weindruch & Walford, 1982; Pugh et al., 1999; Mattson, 2005), indicando que a idade em que os animais iniciam o protocolo também influencia nos seus efeitos. No estudo de Mattson (2005), por exemplo, foi observado que ratos submetidos a uma redução de 30 e 60% na ingestão de calorias no início da vida (logo após o desmame) tiveram um aumento proporcional de aproximadamente 30 e 60% na longevidade, respectivamente. Neste mesmo estudo um grupo de ratos iniciou uma RC de 44% aos 12 meses de idade e, apesar da longevidade também ser prolongada, esta foi de apenas 10-20%. Já foi demonstrado também que se a RC for imposta tardiamente esta pode ter efeitos prejudiciais (Foster et al., 2003). No estudo de Foster et al., (2003), camundongos de 2 anos de idade submetidos a RC de 40% apresentaram redução da longevidade. Portanto, podemos constatar que os benefícios da RC sobre a longevidade são dependentes da intensidade e da fase de vida em que é iniciada. Os mecanismos envolvidos com o aumento da longevidade ainda não são bem compreendidos e acredita-se que seja multifatorial, possivelmente resultado de diferentes alterações fisiológicas promovidas pela RC, gerando adaptações positivas no organismo que melhoram e/ou mantêm o funcionamento dos diversos órgãos e sistemas.

Além da longevidade, outros estudos investigaram os efeitos da RC sobre a prevenção e tratamento de doenças crônicas degenerativas como o câncer, obesidade,

diabetes tipo 2, doenças neuro-degenerativas e cardiovasculares e observaram efeitos positivos da RC (Qin et al., 2006; Marzetti et al., 2009; Dolinsky et al., 2011; Han & Ren, 2010; Long & Fontana, 2010).

As diferentes alterações fisiológicas em modelos experimentais de RC podem estar envolvidas com seus benefícios a saúde. Dentre estas alterações podemos destacar: a redução da temperatura corporal e taxa metabólica basal; redução do estresse oxidativo; redução do tecido adiposo e melhora do perfil lipídico; aumento na sensibilidade à insulina e melhora na tolerância à glicose além de redução da pressão arterial. Na **Tabela 1** estão listados alguns trabalhos que encontraram estes efeitos.

A redução da taxa metabólica basal e a menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) decorrente da RC vêm sendo apontada como um dos principais mecanismos envolvidos com a prevenção/tratamento de doenças crônicas e aumento da longevidade (Duff et al., 1990; Sohal & Wendruch, 1996; Bevilacqua et al., 2004; Bevilacqua et al., 2005). Nos estudos de Bevilacqua et al., (2004), por exemplo, ratos de 6 meses de idade foram submetidos a RC de 40% por 6 meses e apresentaram alterações metabólicas, especialmente a nível mitocondrial, com redução do consumo de oxigênio (VO_2 mitocondrial) e menor produção de ERO, mostrando uma maior eficiência na atividade das mitocôndrias. Alguns estudos têm mostrado que a RC diminui a produção de ERO, e ainda aumenta as defesas antioxidantes, minimizando assim os danos oxidativos (Sohal et al., 1994; Sohal & Wendruch, 1996; Kowaltowski, 2011; Corbj et al., 2012). No estudo de Sohal et al., (1994), foi observado que ratos submetidos a RC de 40% apresentaram aumento da longevidade de 43%, o que foi associado com uma redução na produção de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e proteína carbonilada no cérebro, coração e rim. Recentemente, Stankovic et al., (2013) mostraram um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPX) no fígado e plasma de ratos submetidos a RC de 30-40%.

Tabela 1. Alterações fisiológicas positivas em modelos experimentais de RC.

Variáveis	Modelo animal	Idade	Intensidade da RC	Duração da RC	Referência
Redução da taxa metabólica e da temperatura corporal	Ratos Fischer 344	4 meses	40%	18 meses	Duffy et al., 1990
	Ratos Fischer 344	6 meses	40%	2 e 6 meses	Bevilacqua et al. 2004
	Ratos Fischer 344	6 meses	40%	12 e 18 meses	Bevilacqua et al. 2005
	Camundongo C57BL/6	2 meses	40%	14 e 16 meses	Ferguson et al., 2007
Redução do tecido adiposo e melhora do perfil lipídico	Ratos Wistar	2 meses	30%	11 dias	Yamagishi et al. 2010
	Ratos Sprague-Dawley	2.5 meses	40%	5 meses	Bagga et al., 1995
	Ratos Sprague-Dawley	6 e 24 meses	40%	6 meses	Niemann et al., 2010
	Ratos SHR	4 meses	40%	5 semanas	Dolinsky et al., 2010
	Ratos Sprague-Dawley	4 meses	45%	14 meses	Barzilai et al., 1998
Redução nos níveis de glicose e melhora da sensibilidade a insulina	Ratos Wistar	8 e 24 meses	20%	3 meses	Escrivá et al., 2007
	Ratos Fischer 344	7 e 22 meses	30%	3 meses	Park et al., 2006
	Camundongos C57BL/6	30 meses	30%	5 semanas	Ripp et al., 2009
	Ratos Fischer 344	4 meses	40%	20 dias	Carrie et al., 2003
Redução da pressão arterial e melhora da função vascular	Ratos Sprague-Dawley	6 e 12 meses	40%	6 meses	Nieman et al., 2010
	Ratos Sprague-Dawley	2.5 meses	40%	3 meses	Mager et al., 2006
	Ratos Sprague-Dawley	3.5 meses	40%	4 semanas	Overton et al., 1997
	Ratos SHR	4 meses	40%	5 semanas	Dolinsky et al., 2010
	Ratos SHR	3.5 meses	40%	7 semanas	Casto et al., 1996

A redução do peso e mudanças na composição corporal são muito evidentes nos modelos animais de RC e estas alterações ocorrem principalmente pela redução do tecido adiposo (Bagga et al., 1995; Barzilai et al., 1998; Speakman & Mitchell, 2011). No estudo de Bagga et al., (1995) foi observado que ratos adultos submetidos a RC de 40% por 5 semanas apresentaram peso corporal 37% menor quando comparado ao controle *ad libitum*. Já em relação ao tecido adiposo o efeito é bem mais significativo, sendo observada uma redução de 89% da gordura abdominal. Adicionalmente, a redução do

conteúdo de tecido adiposo também é acompanhado de uma melhora no perfil lipídico sérico, com redução dos níveis circulantes de triglicerídeos, ácidos graxos livres e colesterol (Niemann et al., 2010; Yamagishi et al., 2010).

Outro mecanismo importante envolvido com os efeitos positivos da RC é a melhora da sensibilidade insulínica e tolerância à glicose (Carrie et al., 2003; Park et al., 2006; Escrivá et al., 2007; Rippe et al., 2009; Speakman & Mitchell, 2011). No estudo de Carrie et al., (2003), ratos submetidos a RC de 40% apresentaram uma melhora na sensibilidade à insulina, com redução dos níveis circulantes de insulina e aumento na expressão do receptor de insulina (IRS-1) no músculo esquelético. Adicionalmente, Park et al., (2006) mostraram em ratos que uma RC de 30% por 90 dias reduziu a área sobre a curva no teste de tolerância a glicose.

A RC também está associada à redução da pressão arterial (Overton et al., 1997; Casto et al., 1997; Mager et al., 2006; Nieman et al., 2010; Dolinsky et al., 2010). O estudo de Young et al., (1978), mostrou pela primeira vez que a RC exerce um efeito hipotensor. Neste estudo uma RC de 50% reduziu em 10% a pressão arterial de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). Recentemente, Dolinsky et al., (2010) confirmaram estes efeitos em animais SHR submetidos a RC de 40% por 5 semanas por um mecanismo dependente da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e da óxido nítrico sintase forma endotelial (eNOS).

Destacamos acima diferentes alterações fisiológicas promovidas pela RC envolvidas com os benefícios à saúde. A nível tecidual, o coração se destaca como um importante alvo de estudo dos efeitos da RC. A seguir destacamos os principais estudos que avaliaram os efeitos da RCM especificamente sobre o coração.

2.3 Efeitos da restrição calórica moderada sobre o coração

A maioria das pesquisas com animais que avaliaram os efeitos da RCM sobre o coração encontraram resultados positivos. Nutter et al., (1979) foram os primeiros a observarem alterações positivas da RC sobre o coração. Neste estudo os pesquisadores observaram que ratos adultos (75 dias) que tiveram sua dieta restrita a ingestão de 10g diárias por 6 semanas apresentaram redução da hipertrofia e aumento da contratilidade

cardíaca. Estes resultados foram considerados pelos pesquisadores como surpreendentes, pois não esperavam encontrar tais efeitos e não conseguiram uma explicação para esses resultados. Em seguida outros pesquisadores se interessaram pelos efeitos da RCM sobre o coração e confirmaram seus efeitos positivos (Freund & Holroyde, 1986; Kemi et al., 2000; Han et al., 2012). Uma relação de trabalhos que mostram os efeitos positivos da RCM sobre o coração está apresentada na **Tabela 2**. Os estudos de Klebanov et al., (1997) observaram pela técnica de coração isolado uma melhora da função cardíaca basal em ratos adultos (10-13 meses) submetidos a RC de 40% por aproximadamente 8 semanas. Além da melhora na função cardíaca basal também foi demonstrado que a RCM protege o coração de insultos, como a isquemia-reperusão. Long et al., (2002), mostraram que ratos de 4 meses de idade submetidos a uma RC de 40% durante 6 semanas apresentaram melhor recuperação da função cardíaca após a indução de isquemia-reperusão. Além das alterações funcionais, também foram encontradas alterações morfológicas positivas do tecido cardíaco, como a redução da hipertrofia cardíaca, fibrose e apoptose de cardiomiócitos (Peron et al., 2005; Shinmura et al., 2008; Dolinsky et al., 2010; Ahmet et al., 2011). No estudo de Ahmet et al., (2011) ratos de 24 meses submetidos a RC de 40% por 3 meses apresentaram menor fibrose cardíaca e cardiomiócitos em maior densidade e menor diâmetro comparado ao grupo AL, mostrando que a RC atenua as alterações morfológicas observadas no envelhecimento do coração.

Atualmente são especulados alguns mecanismos que podem estar envolvidos com a cardioproteção exercida pela RC. Estes mecanismos podem ser divididos em duas classes, os mecanismos fisiológicos em um ponto de vista sistêmico e os mecanismos moleculares a nível celular.

Em relação aos mecanismos a nível sistêmico podemos destacar a redução da pressão arterial, alterações na modulação autonômica com aumento da variabilidade da frequência cardíaca, redução na formação de placas de arteriosclerose, melhora da função endotelial, da sensibilidade à insulina e do perfil lipídico (Long & Fontana, 2010; Han & Ren, 2010; Weiss & Fontana, 2011; Speakman & Mitchell, 2011).

Tabela 2. Efeitos da RCM sobre o coração.

Variáveis	Modelo animal	Idade	Intensidade da RC	Duração da RC	Referência
Melhora e/ou preservação da função cardíaca basal	Ratos Sprague-Dawley	36 dias	35%	13 e 26 meses	Kemi et al., 2000
	Ratos Fischer 344	45 dias	40%	8 meses	Klebanov et al., 1997
	Ratos Fischer 345	2 meses	40%	22 e 27 meses	Ahmet et al., 2011
	Ratos SHR	4 meses	40%	5 semanas	Dolinsky et al., 2010
	Ratos Sprague-Dawley	6 e 24 meses	40%	6 meses	Niemann et al., 2010
	Camundongos C57BL6	4 meses	40%	5 meses	Han et al., 2012
	Ratos SHR	2 meses	40%	3 meses	Sugizaki et al., 2008
Melhora na resposta a isquemia-reperfusão	Ratos Fischer 344	12 meses	35%	6 meses	Shinmura et al., 2008
	Ratos Sprague-Dawley	20 meses	40%	6 meses	Long et al., 2002
	Ratos Wistar	6 e 24 meses	40%	5 e 12 meses	Abete et al., 2002
	Ratos Fischer 344	12 meses	40%	12 meses	Chandrasekar et al., 2001
	Camundongos C57BL6	15 semanas	40%	5 semanas	Sung et al., 2011
	Camundongos C57BL6	12 meses	40%	14 semanas	Peart et al. 2012

A seguir destacamos os principais mecanismos moleculares descritos na literatura que podem fazer parte da cardioproteção da RC.

2.4 Mecanismos moleculares envolvidos com a cardioproteção da restrição calórica

Poucos trabalhos investigaram os mecanismos moleculares envolvidos com a cardioproteção da RC e apontam para alterações na via de sinalização da contratilidade e sobrevivência de cardiomiócitos.

Funcionalmente, a dinâmica intracelular do cálcio em cardiomiócitos é um mecanismo central envolvido na regulação da contratilidade cardíaca (Bers 2002). Shinmura et al., (2011), mostraram que ratos de 8 meses de idade que realizaram uma RC de 40% durante 22 meses apresentaram uma redução no declínio da função cardíaca, comumente observada com o avanço da idade, e estas alterações foram relacionadas à

melhora do perfil do transiente de cálcio em cardiomiócitos, com aumento da expressão da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e redução do tempo de relaxamento. Já Sugizaki et al., (2011), mostraram que ratos submetidos à RC de 50% por 12 semanas apresentaram aumento na expressão de fosfolamban (PBL), do trocador cálcio/sódio (NCX) e do canal de cálcio tipo L no miocárdio. De forma semelhante Yamagishi et al., (2010) também encontraram um aumento na expressão de PBL em ratos *Wistar* de 60 dias submetidos a uma RC de 70% por 11 dias. Estes achados sugerem a existência de uma relação entre RC e melhora na dinâmica intracelular do Ca^{2+} em cardiomiócitos.

A apoptose é o processo de morte celular programada, resultando em autodestruição celular, um mecanismo essencial para numerosos processos biológicos, incluindo embriogênese, desenvolvimento, renovação celular e homeostase dos tecidos (Kerr et al., 1972). No entanto, a perda acelerada de células com baixa capacidade de proliferação, como os cardiomiócitos, pode contribuir para a perda de função associada à idade e levar ao surgimento de doenças cardíacas. Evidências recentes indicam que a RC reduz a apoptose de cardiomiócitos. No estudo de Lee et al., (2002) utilizando a técnica de microarranjo foi observado que camundongos submetidos a RC de 40% por 16 meses apresentaram redução da expressão de genes pró-apoptóticos e um aumento nos genes anti-apoptóticos no tecido cardíaco. Neste contexto, a proteína quinase B (Akt) é considerada uma proteína chave no processo de sobrevivência celular. Sua ativação é dependente de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e, em sua forma ativa, fosforila uma série de proteínas como eNOS, PKC, p70S6K e GSK3beta, regulando de forma negativa o processo de apoptose e estimulando a autofagia, aumentando assim a sobrevivência celular (Franke et al., 2003). No coração a ativação de Akt, na maioria das vezes, exerce efeitos cardioprotetores e alguns estudos observaram aumentos nos níveis de expressão e/ou fosforilação desta proteína no coração de animais submetidos à RC. Nos estudos de Sung et al., (2011) e Peart et al., (2012) foram observadas melhoras na resposta à isquemia-reperfusão de corações isolados de camundongos submetidos a RC de 40% e estes resultados foram associado aos maiores níveis de fosforilação da Akt. No estudo de Katare et al., (2009) ratos submetidos a indução de infarto do miocárdio seguidos de 100 dias de alimentação intercalada com jejum apresentaram redução da apoptose de cardiomiócitos com maior expressão de Akt e Bcl-2. Giani et al., (2008) também

observaram aumento na fosforilação da Akt em corações de camundungos após 12 meses de RC de 30%, o que foi associado à melhora da sensibilidade à insulina no tecido cardíaco destes animais.

Apesar dos estudos acima apontarem que a RC exerce efeitos positivos sobre o coração e alguns estudos sugerirem como principais mecanismos moleculares a ativação das vias de sinalização da contratilidade e sobrevivência de cardiomiócitos, os resultados dos estudos que investigaram especificamente os efeitos de uma RCI (>40%) sobre o coração ainda são controversos. A seguir destacamos estes estudos.

2.5. Restrição calórica intensa e seus efeitos controversos sobre o coração

Como relatado anteriormente, vários trabalhos apontam que a RCM ($\leq 40\%$) exerce efeitos positivos sobre o coração. No entanto, restrições mais intensas com valores superiores a 40% foram pouco investigados e os efeitos ainda são controversos. A **Tabela 3** apresenta uma relação de trabalhos que avaliaram os efeitos da RCI sobre o coração.

Em condições basais o estudo de Cicogna et al., (2001) observou um aumento dos índices de contratilidade e relaxamento (+DT/dt e -DT/dt) em preparação de músculo papilar isolado de ratos *Wistar* adultos submetidos a uma RCI de 50% por 30 dias. De forma semelhante, McKnight et al., (1999), mostraram um aumento do desempenho cardíaco de ratos *Sprague-Dawley* após 7 dias de RCI a 70%. Entretanto quando os corações foram submetidos ao processo de isquemia/reperfusão constatou-se uma melhor resposta da função cardíaca durante o período de reperfusão nos corações dos animais submetidos à RCI. Em outro estudo, Yamagishi et al., (2010) utilizaram animais mais jovens (ratos *Wistar* de 2 meses) e uma RCI mais intensa (70%), porém de duração mais curta (11 dias), e encontraram resultados semelhantes aos estudos de Broderick et al., (2002). Peron et al., (2005) mostraram que uma RCI de 50% exerce efeito protetor no infarto do miocárdio. Neste trabalho, ratos adultos foram submetidos à RCI de 50% por seis semanas e logo depois foram submetidos a uma cirurgia de indução do infarto do miocárdio. Três semanas após a indução do infarto o grupo RCI apresentou menores danos no tecido cardíaco e maior capacidade contrátil em preparações de músculo papilar isolado comparado ao grupo *ad libitum*.

Tabela 3. Efeitos de uma RCI sobre o coração.

Variáveis	Modelo animal	Idade	Intensidade da RCI	Duração da RCI	Técnica	Efeitos da RCI	Referência
Efeitos positivos							
Função cardíaca basal	Ratos Wistar	ao nascimento	50%	3 meses	CI - Lang	Aumento das +/- dT/dt	Melo et al., 2013
	Ratos Wistar	ao nascimento	50%	45 dias	CI - Lang	Manutenção das +/- dT/dt	Fioreto et al., 2002
	Ratos Wistar	2 meses	50%	30 dias	MPI	Aumento das +/- dT/dt	Cicogna et al., 2001
	Ratos SHR	2 meses	50%	3 meses	MPI	Manutenção das +/- dT/dt	Gut et al., 2008
	Ratos Sprague-Dawley	3 meses	75%	7 dias	CM	Aumento da pressão ventricular esquerda	McKnight et al., 1999
Função cardíaca a pós insultos	Ratos Wistar	10 meses	45%	8 meses	CI - Lang	Aumentou a pressão ventricular e fluxo coronariano na reperfusão	Broderick et al., 2002
	Ratos Wistar	2 meses	70%	11 dias	CI - Lang	Aumentou a +/- dP/dT na reperfusão	Yamagishi et al., 2010
	Ratos Wistar	12 meses	50%	6 semanas	MPI	Manutenção das +/- dT/dt após indução de infarto do miocárdio	Peron et al., 2005
Efeitos negativos sobre a função cardíaca	Ratos Wistar	2 meses	50%	3 meses	MPI	Prolongamento das fases de contração e relaxamento, maior rigidez do miocárdio	Okoshi et al., 2001
	Ratos Wistar	12 meses	50%	3 meses	ECG e MPI	Redução da performance cardíaca e fibrose	Sugizaki et al., 2005
	Ratos Wistar	2 meses	50%	3 meses	MPI	redução da +/- dT/dt	Cicogna et al., 2001
	Ratos Wistar	2 meses	50%	3 meses	MPI	redução da +/- dT/dt	Sugizaki et al., 2009
	Ratos Wistar	2 meses	50%	3 meses	MPI	redução da +/- dT/dt	Tomasi et al., 2009

*Técnicas: CI-Lang (coração isolado em sistema Iagendorff); MPI (preparação de músculo papilar isolado); ECG (ecocardiograma); CM (cateter de Millar)

No entanto, outros estudos encontraram efeitos prejudiciais de uma RCI sobre o coração (Okoshi et al., 2001; Sugizaki et al., 2005; Sugizaki et al., 2009; Tomasi et al., 2009). No estudo de Okoshi et al., (2001), por exemplo, ratos *Wistar* adultos (60 dias) submetidos a RCI de 50% por 3 meses apresentaram função cardíaca reduzida, com aumento do tempo de contração e relaxamento, além de fibrose cardíaca. Adicionalmente, Sugizaki et al., (2005) com protocolo idêntico ao de Okoshi et al., (2001), porém iniciando com animais aos 12 meses de idade observaram alterações mínimas na função cardíaca por ecocardiografia e músculo papilar isolado, mas foram verificadas algumas alterações morfológicas no tecido cardíaco, com aumento da fibrose, desorganização dos miofilamentos e das cristas mitocondriais.

Como destacado em tópico anterior, os efeitos da RC dependem da intensidade da RC e também da idade em que os animais iniciaram o protocolo. Mais especificamente, estes estudos sugerem que quanto mais cedo se inicia o protocolo de RC maiores são os benefícios. Cabe aqui ressaltar que isto pode ser verdade para o período pós-natal uma vez que vários estudos demonstram efeitos negativos da RC durante o período intrauterino (Williams et al., 2005; Xu et al., 2006). Xu et al., (2006), por exemplo, encontraram alterações na função e estrutura cardíaca da prole de ratas Sprague-Dawley submetidas a RCI durante a gestação. Estes animais na idade adulta (aos 4 e 7 meses de idade) apresentaram redução na função diastólica, piora na resposta a isquemia-reperfusão e aumento da fibrose cardíaca.

Em um único trabalho que avaliou os efeitos da RCI sobre o coração de ratos desde o nascimento, Fioretto et al., (2002), mostraram que ratos *Wistar* submetidos a RCI de 50% avaliados aos 60 dias de idade não apresentaram alterações na função cardíaca basal. Neste contexto, as informações sobre os efeitos de uma RCI imposta logo após o nascimento em corações de ratos adultos ainda são escassas e carecem de um maior aprofundamento.

A seguir destacamos uma breve explicação acerca do desenvolvimento cardíaco pós-natal.

2.6. Desenvolvimento pós-natal do coração

O coração é um dos primeiros órgãos a se formar e a entrar em funcionamento no embrião, iniciando a atividade cardíaca ao final da quinta semana de desenvolvimento em humanos. O aumento da massa cardíaca durante a vida fetal surge predominantemente como consequência da hiperplasia dos cardiomiócitos. Os cardiomiócitos são células cilíndricas, ramificadas, com aproximadamente 10-20 μm de diâmetro e 80-140 μm de comprimento, com extremidades irregulares, possuem núcleo central único ou duplo, e o citoesqueleto forma estriações transversais no citoplasma. Cardiomiócitos adultos são células altamente especializadas, muito ativas e com uma baixa capacidade de renovação (Thornburg et al., 2011).

Em roedores, durante o desenvolvimento fetal, a proliferação dos cardiomiócitos ocorre em duas fases. Primeiramente ocorre uma intensa proliferação dos cardiomiócitos, aumentando rapidamente o número de células com limitado crescimento, a duração desta fase vai aproximadamente até o 12º dia do desenvolvimento fetal. Num segundo momento, os cardiomiócitos continuam a duplicar seu material genético, porém não ocorre a citocinese, formando geralmente células binucleadas, que se tornam progressivamente maiores aumentando seu volume, transformando-se em cardiomiócitos maduros e reduzindo sua capacidade proliferativa. Esta fase compreende a última semana de desenvolvimento perinatal até aproximadamente a terceira semana de vida pós-natal, em que as células possuem volumes 50% maiores e proporcionalmente 80% são binucleadas (Ahuja et al., 2006).

Ao nascimento o coração já se apresenta com a configuração anatômica do coração adulto, mas com dimensões menores e a partir desse momento seu crescimento é intensificado. Na vida neonatal de roedores ocorre uma transição do perfil hiperplásico para o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos, sendo a hipertrofia destas células o principal responsável pelo aumento da massa ventricular (Thornburg et al., 2011; Ahuja et al., 2006). No entanto, alguns estudos mostram que, apesar de baixa, existe uma capacidade de proliferação dos cardiomiócitos após o nascimento, especialmente durante as três primeiras semanas de vida, diminuindo à medida que o animal envelhece (Clubb & Bishop, 1984; Porrelo et al., 2011; Sedmera et al., 2011).

Durante o desenvolvimento pós-natal o coração precisa se adequar a crescente demanda do crescimento corporal, para isso ocorre o aumento da espessura da parede e da massa ventricular esquerda, especialmente. O aumento da massa miocárdica é resultado, principalmente da hipertrofia dos cardiomiócitos em resposta ao estresse mecânico causado pelo aumento da tensão nas paredes das câmaras cardíacas. Alterações relacionadas ao envelhecimento sobre o coração humano e de roedores incluem a redução do número de miócitos, devido ao processo de apoptose, a fibrose cardíaca pela substituição de células contráteis por matriz extracelular, redução no transporte de cálcio através da membrana do retículo sarcoplasmático, e alteração na resposta à estimulação β -adrenérgica (Weber & Brilla, 1991; Cohn et al., 2000). Coletivamente, estas alterações contribuem para depressão da função cardíaca dependente da idade e maior propensão ao estabelecimento de doenças cardiovasculares.

Neste contexto, estudos que avaliaram os efeitos da RC sobre o desenvolvimento do coração são escassos e não há estudos disponíveis na literatura que mostrem os efeitos de uma RCI de longo prazo desde o nascimento sobre a função, morfologia cardíaca e vias de sinalização intracelular em cardiomiócitos de ratos adultos. Neste sentido, apresentamos a seguir os objetivos deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as consequências de uma RCI desde o nascimento sobre a função e morfologia cardíaca, bem como os mecanismos envolvidos nestas adaptações cardíacas em ratos Wistar adultos de 90 dias.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar em ratos Wistar adultos de 90 dias submetidos a uma RCI desde o nascimento:

- a) o índice de eficiência alimentar, peso corporal e dos órgãos e comprimento da tíbia;
- b) os parâmetros bioquímicos séricos e o hematócrito;
- c) a pressão arterial, frequência cardíaca *in vivo* e duplo produto.
- d) a função cardíaca utilizando um teste indireto *in vivo* de desempenho aeróbio máximo em piscina e um teste *in vitro* pela avaliação das Dt/dt máxima e mínima em corações isolados.
- e) o número, densidade e morfometria de cardiomiócitos, e os níveis de fibrose cardíaca por análise histológica do tecido cardíaco.
- f) os níveis de peroxidação lipídica sanguínea, teciduais e atividade da superóxido dismutase e catalase teciduais.
- g) o transiente de Ca^{2+} e níveis de expressão da SERCA2, importante via de sinalização envolvida com a contratilidade em cardiomiócitos.
- h) os níveis de fosforilação de Akt em cardiomiócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e condições experimentais

Os animais foram mantidos, manipulados e sacrificados de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório do “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health*” (NIH Publication, 1996). O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da UFVJM (protocolo 002/2010).

Fêmeas grávidas da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* (n = 12) provenientes da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com cerca de 80 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais e mantidas em sala climatizada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a dieta e água. Imediatamente após o nascimento das crias, metade das ratas (n = 6) foram designadas para compor o grupo alimentado *ad libitum* (controle) e outra metade (n = 6) para o grupo submetido à RC. Utilizou-se como dieta a ração comercial para roedores Nuvilab CR1 (Nuvilab Nutrients LTDA, Colombo, PR, Brasil), composta por aproximadamente 22,5% de proteínas, 4% lipídeos, 54% carboidratos, 8% de fibras e 12,5% de umidade. Ambos os grupos tiveram livre acesso à água.

As ninhadas (conjunto da matriz e seus filhotes) designadas ao grupo com RC tiveram sua dieta restrita a 50% do consumo das ninhadas do grupo *ad libitum*. A ingestão alimentar do grupo *ad libitum* foi avaliada diariamente subtraindo a oferta de ração pela sobra do dia seguinte, e estes valores usados para o cálculo da oferta de 50% para o grupo submetido à RC. O protocolo experimental teve início logo após o nascimento das crias, sendo as ninhadas composta pela matriz e oito filhotes machos. O período de amamentação (fase de lactação) foi de 21 dias. Após o desmame (fase de pós-lactação), os filhotes foram alojados em gaiolas individuais e receberam o mesmo tratamento que suas respectivas mães até a idade de 90 dias. Constituindo dois grupos: I) ratos com alimentação *ad libitum* (AL, n = 13) e II) ratos em restrição calórica intensa (RC50, n = 15).

4.2. Avaliação do peso corporal e eficiência alimentar

A ingestão alimentar foi avaliada diariamente e o peso corporal semanalmente. Com os dados de ingestão total e ganho de peso ao final do período experimental foi

calculado o índice de eficiência alimentar, através da divisão do ganho de peso pela ingestão alimentar. Este índice representa a eficiência em que o animal converte grama de alimento ingerido em grama de peso corporal.

4.3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares

A pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram aferidas aos 45, 70 e 90 dias de idade pelo método não invasivo de pletismografia de cauda. Os animais foram mantidos em cilindro de acrílico sobre restrição de movimento e submetidos a aquecimento moderado em caixa contendo uma lâmpada incandescente (40° C, por 10 min) para provocar vasodilatação das artérias caudais. O procedimento de registro foi realizado através da inserção da cauda em um manguito de borracha, ligado ao esfigmomanômetro, na região proximal da cauda e, logo após, um transdutor pneumático foi utilizado para detecção dos pulsos permitindo o registro no sistema (ADInstruments Ltd, UK). Através do registro de pulso foi determinado o valor de PAS e derivada a FC, com estes valores foram calculados o índice de duplo produto (resultado da multiplicação da FC versus a PAS) para avaliação da sobrecarga cardíaca.

4.4. Protocolo de desempenho aeróbio máximo

Para avaliação de um parâmetro cardiovascular sistêmico que auxiliasse na interpretação dos resultados da função cardíaca, os animais foram submetidos a um teste de desempenho aeróbio máximo em piscina aos 90 dias de idade. O protocolo de exercício consistiu em um teste de carga progressiva até exaustão, realizado 48 horas após o período de aclimação. Antes da realização do teste os animais foram pesados para que, a partir da massa corporal dos mesmos, fossem confeccionadas sobrecargas correspondentes a 2% de sua massa corporal. O teste foi realizado individualmente, na mesma raia, com água na temperatura de $31 \pm 1^\circ \text{C}$ (termoneutra em relação à temperatura corporal do animal). A partir do momento em que o animal, com uma sobrecarga de 2% afixada na cauda, foi lançado na água o cronômetro foi disparado. O teste foi de caráter contínuo, pois não houve necessidade de retirar o animal da água quando adicionada a sobrecarga, a cada três minutos, até a exaustão. O estado de exaustão foi caracterizado pela imersão do animal por 4 segundos. O desempenho aeróbio máximo foi definido pela carga suportada relativizada pelo peso corporal (Almeida et al., 2009).

4.4. Eutanásia e coleta de amostras

Após 48 horas do teste de desempenho aeróbio máximo os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e em seguida decaptados. Amostras de sangue coletadas para análises bioquímicas séricas (colesterol total, HDL, triglicérides e glicose) e do hematócrito. O coração foi removido, sendo parte direcionada às análises de função, histologia, estresse oxidativo (n = 21) e outra parte (n = 7) direcionada ao isolamento de cardiomiócito para avaliação do transiente de cálcio e análises de western blot. O músculo sóleo também foi retirado para avaliação do estresse oxidativo. A tibia foi retirada para avaliação do comprimento e a gordura visceral, fígado, baço, rim e testículo retirados, limpos e os seus pesos aferidos. Uma ilustração do desenho experimental está presente na **Figura 1**.

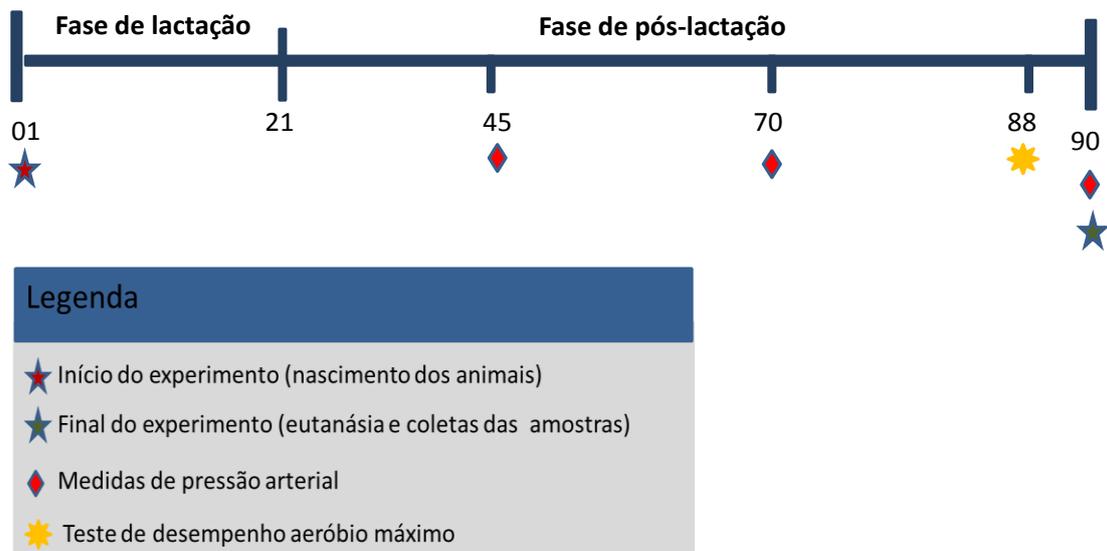


Figura 1. Desenho experimental do estudo.

4.5. Análises bioquímicas séricas e hematócrito

Uma pequena amostra de sangue total coletado em heparina foi separada para a avaliação do volume percentual de hemácias em capilares de microhematócrito. O restante do sangue foi centrifugado a 1800 rpm e obtidas amostras de soro utilizadas posteriormente

para a determinação dos níveis séricos de colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose, utilizando kits de determinação apropriados (Labtest Diagnóstica LTDA, Brasil) de acordo com procedimentos recomendados pelo fabricante.

4.6. Função cardíaca *ex vivo*

O coração removido teve a aorta ascendente seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquiocefálico) e fixada a cânula, acoplando o órgão ao sistema de perfusão com pressão constante, tomando o cuidado de preservar a integridade da válvula aórtica.

Para registro da força contrátil, um pequeno gancho de aço inoxidável foi fixado ao ápice do ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor de força. Aplicando uma tensão de aproximadamente $1,0 \pm 0,2g$, mantida constante durante o experimento. A frequência cardíaca (FC) e o desenvolvimento de tensão (Dt/dt) máxima e mínima foram calculados a partir das medidas diretas de tensão. Os sinais foram amplificados e registrados por meio de um sistema de aquisição e análise de dados analógico-digital (MP100 - AcqKnowledge III, Biopac System Inc., EUA). O tempo de estabilização da preparação foi de 20 a 30 minutos. Após adicionais 30 minutos de coleta dos dados, a atividade cardíaca foi interrompida com a infusão de KCl 10%.

4.7. Avaliações histológicas do tecido cardíaco

Inicialmente foi realizada a avaliação da razão peso do coração pelo peso corporal, uma medida indireta da hipertrofia cardíaca. Após serem pesados os corações foram fixados com Bouin a 4% por 24h, submetido à desidratação com gradiente crescente de álcool (70, 80, 90 e 100%) e posterior infiltração e inclusão em paraplast. Após a montagem dos blocos, as amostras foram submetidas à microtomia em secções de 5 μm com intervalos de 20 cortes. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para análise do número, densidade e diâmetro dos cardiomiócitos. Para a análise de número e densidade foi utilizado corte transversal do miocárdio, aproximadamente 25 campos foram analisados por animal, sendo contados todos os cardiomiócitos com núcleo central visível. Já para a avaliação do diâmetro foram usados cortes longitudinais do miocárdio, considerando para análise apenas cardiomiócitos com núcleo central visível e limites

laterias bem definidos, o valor do diâmetro dos cardiomiócitos por animal foi obtido pela média de aproximadamente 100 células avaliadas. Também foi utilizada a técnica de tricrômico de Masson para avaliação da fibrose cardíaca, em que foi analisado o tamanho das áreas positivas para o tecido conjuntivo intersticial, em relação à área total avaliada, sendo o resultado apresentado em valores percentuais. Para todas as avaliações histológicas as imagens foram capturadas com microscopia de campo claro.

4.8. Avaliação do estresse oxidativo

4.8.1. Peroxidação lipídica

Os níveis de TBARS foram mensurados no músculo cardíaco e sóleo de acordo com o método descrito por Ohkawa et al., (1979). Alíquotas da amostra (0,1mL) foram adicionadas em duodecil sulfato de sódio a 8,1%, ácido acético 2,5M (pH 3,4) e ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95° C e a leitura realizada em espectrofotômetro a 532nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

4.8.2. Atividade da superóxido dismutase

O ensaio foi realizado de acordo com Del Maestro & McDonald, (1985) conforme descrito por Barreto et al., (2011). Resumidamente foi adicionado 1mL de tampão fosfato de sódio (50mM, pH 7,8) contendo 1mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) a 0,05mL do homogenato. A reação foi iniciada com a adição de pirogalol (0.2mM) e a leitura realizada durante 3 minutos a 37°C no espectrofotômetro a 420 nm. A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase em U/mg foi determinada a partir da capacidade de inibição da autoxidação do pirogalol, em que 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.

4.8.3. Atividade da catalase

O ensaio para a catalase foi realizado conforme o método de Nelson & Kiesov (1972), com algumas modificações, conforme descrito em Barreto et al., (2011). Adicionou-se 2 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7.0) a uma alíquota (0,1mL) do

homogenato, e em seguida adicionados 0,06mL de substrato (H_2O_2 , 3M). A leitura foi realizada durante 1 minuto a 25°C em espectrofotômetro a 240nm. A atividade da catalase foi expressa em $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade da enzima durante um minuto.

4.9. Isolamento dos cardiomiócitos

Os miócitos ventriculares cardíacos foram isolados de acordo com o protocolo descrito por Mitra & Morad (1985) e mantidos em DMEM (Sigma). Parte dos cardiomiócitos foi utilizada para os experimentos do transiente de cálcio e outra parte foi utilizada para a extração de proteínas e análises de western blot.

4.10. Avaliação do transiente de cálcio (Ca^{2+})

Os cardiomiócitos foram incubados com $6 \mu\text{mol}/\text{L}$ Fluo-4 AM (Molecular Probes) por 30 minutos a temperatura ambiente e, a seguir, lavados com DMEM. As células foram então excitadas no comprimento de onda de 488nm e com emissão em 515nm. Durante o experimento as células cardíacas foram estimuladas na frequência de 1,0 Hertz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 30v. Após a aplicação de 8 pulsos elétricos foi realizada uma varredura repetitiva ao longo de uma linha no eixo longitudinal das células utilizando-se o microscópio confocal Zeiss 510 Meta (Guatimosim et al. 2001). A liberação global de Ca^{2+} foi analisada pelo software IDL 6,0 (Research System, Inc., Boulder, CO). A amplitude do transiente de Ca^{2+} foi obtida pela razão de F/F_0 , onde F_0 demonstra a fluorescência basal de Ca^{2+} .

4.11. Western blotting

As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão de lise (100mM NaCl, 50mM Tris-base, 5mM EDTA-2Na, 50mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$, 1mM MgCl_2 pH=8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0.3% e Sodium deoxycholate 0.5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200mM, benzamidina 15.7mg/mL,

pepstatina 10 μ M, aprotinina 10mg/mL) e inibidores de fosfatase (20mM NaF e 1mM Na₃VO₄). Ao fim desse procedimento, o conteúdo foi centrifugado por 12 minutos, à 4°C e a 8000rpm. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). 60mg de proteína foram então diluídas em tampão de amostra (5X - 2M Tris pH=6.8, 20% Glicerol, 30% SDS, 25% b-mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate poliacrilamida) em concentração de 10 - 15%, dependendo da massa molecular da proteína estudada, e 4% o gel de concentração. Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). A membrana foi então lavada com PBS/TBS contendo 0.1% Tween 20 (PBS-T/TBS-T) e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (PBST/ TBS-T com 5% de leite desnatado) a fim de bloquear ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* em câmara fria, com temperatura 4°C, com o anticorpo primário específico anti-Akt, anti-pAkt e anti-SERCA2. Para detecção das bandas foi utilizado um kit quimioluminescente. A quantificação das proteínas foi realizada pela normalização com anticorpo anti-GAPDH. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com PBS-T/TBS-T (5 vezes por 5 minutos). E então incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000) por 1 hora. As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência e a intensidade das mesmas avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™.

4.13. Análise estatística

Para análise estatística dos dados utilizou-se o *software* Statistica (v8.0, StatSoft, Inc). Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Para variáveis que foram avaliadas ao longo do período experimental foi utilizada o teste Anova de medidas repetidas seguidas pelo post-hoc Tukey. Para comparações das demais variáveis foi utilizado o teste *t student*. O nível de significância foi estabelecido para * $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente realizamos uma caracterização do modelo em relação aos parâmetros corporais e de ingestão alimentar. Os dados estão apresentados na **Figura 2** (A-F).

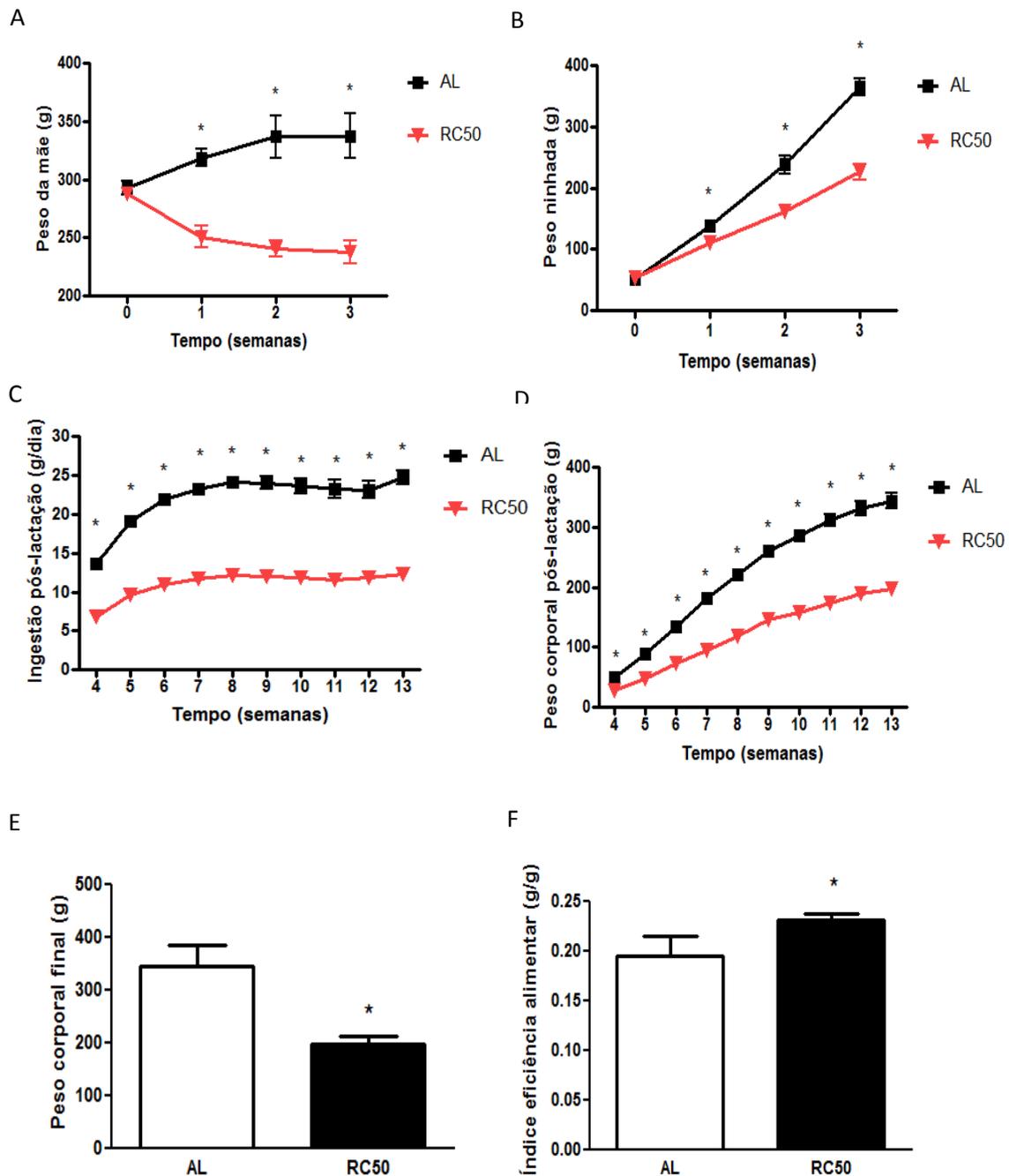


Figura 2. Parâmetros corporais e de ingestão alimentar. Peso corporal materno (A) e peso da ninhada (B) durante a fase de lactação. Ingestão alimentar (C) e curva de crescimento (D) na pós-lactação. Peso corporal final (E) e índice de eficiência alimentar (F). * $p < 0,05$.

Já na primeira semana da fase de lactação (0 a 21 dias) foram encontradas diferenças significativas no peso corporal das matrizes (A) e dos filhotes (B) mostrando que a restrição imposta à mãe logo após o parto afetou o crescimento dos filhotes. Para a fase pós-lactação (22 a 90 dias) são apresentados os dados de ingestão (C), curva de ganho de peso (D), peso corporal final (E) e o índice de eficiência alimentar (F). A ingestão média diária dos grupos durante o período experimental foi de $22,06 \pm 0,62$ g vs. $11,06 \pm 0,33$ g para os grupos AL e RC50, respectivamente. Os animais RC50 apresentaram peso corporal inferior durante todo o período experimental, sendo cerca de 40% menor aos 90 dias comparado ao grupo AL (AL: $343,9 \pm 12,5$ g vs. RC50: $196,8 \pm 4,64$ g). De maneira interessante, o índice de eficiência alimentar (F) foi superior no grupo RC50 comparado ao AL, mostrando uma maior eficiência na conversão do alimento ingerido em peso corporal, indicando possivelmente uma redução na taxa metabólica basal dos animais RC50.

Em consonância com estes resultados alguns trabalhos relatam que a RC, especialmente a RCI, provoca no organismo um efeito de conservação de energia, em outras palavras, o organismo se adapta a um ambiente de baixa oferta alimentar conservando energia (Duff et al., 1990). Um resultado comumente encontrado na literatura que vai de encontro a esta adaptação é a redução da taxa metabólica basal após um período prolongado de RC (Bevilacqua et al., 2004; Bevilacqua et al., 2005; Ferguson et al., 2007). Os estudos de Bevilacqua et al., (2005), por exemplo, mostraram que ratos adultos submetidos a RC de 40% durante 12 semanas apresentaram uma redução de 11,1% da massa corporal e 34,6% do consumo de oxigênio pelos tecidos em relação ao grupo *ad libitum*.

Na **Tabela 4** estão apresentados os valores de comprimento da tíbia e peso de órgãos.

Como esperado, comparado ao grupo AL os animais RC50 apresentaram menor comprimento da tíbia, peso da gordura visceral e peso dos órgãos, incluindo o coração, exceto para os testículos. A redução no crescimento e do peso dos órgãos estão em concordância com estudos anteriores de RC (Maeda et al., 1985 ;Roe et al., 1995; Weiss & Fontana, 2011; Sung & Dyck, 2011), resultado da adaptação a baixa oferta de energia.

Apesar da redução do peso dos órgãos, estudos indicam a preservação da função (Weiss & Fontana, 2011).

Já a relação peso do coração/peso corporal foi maior no grupo RC50, indicando uma relativa preservação do tecido cardíaco durante a RCI. De forma semelhante alguns estudos confirmam que esta relação está aumentada em animais submetidos a diferentes protocolos de RCI. Isto foi observado, por exemplo, em ratos de 2,5 meses submetidos a uma RCI de 70% durante 6 semanas (Nutter et al., 1979), em ratos de 3 meses de idade submetidos a uma RCI de 45% durante 8 semanas (Broderick et al., 2002) e em ratos de 3 meses submetidos a uma RCI de 50% durante 6 semanas (Peron et al., 2005). De forma interessante, todos estes trabalhos encontraram melhora da função e alterações positivas sobre a morfologia cardíaca, relacionando estes efeitos a maior relação peso do coração/peso corporal nos animais submetidos à RCI.

Tabela 4. Comprimento da tíbia e peso de órgãos. Dados apresentados como média \pm DP, RC50 vs. AL. * $p < 0,05$.

	AL (n = 13)	RC50 (n = 15)	Valor p
Tibia (cm)	4.0 \pm 0,04	3.63 \pm 0.09*	0,0001
Peso corporal (g)	325.3 \pm 30.3	148.9 \pm 22.5*	0,0001
Peso coração (g)	1.21 \pm 0.12	0.67 \pm 0.09*	0,0001
Peso coração/corpo (mg/g)	3.73 \pm 0.26	4.53 \pm 0.24*	0,0001
Gordura visceral (g)	11.34 \pm 1.95	2.52 \pm 0.27*	0,0001
Fígado (g)	10.73 \pm 1.75	5.97 \pm 0.45*	0,0001
Rim (g)	1.15 \pm 0.09	0.62 \pm 0.04*	0,0001
Supra renal (g)	0.03 \pm 0.01	0,02 \pm 0.01*	0,0001
Baço (g)	0.84 \pm 0.11	0.52 \pm 0.07*	0,0001
Testículos (g)	1.44 \pm 0.26	1.39 \pm 0.12	0,59

Outro dado interessante na Tabela 4 é a massa de gordura visceral. A diferença entre os grupos é discrepante, comparado ao grupo AL os animais RC50 apresentaram uma redução de 77% na gordura visceral. A redução do tecido adiposo, mesmo em animais e humanos não obesos saudáveis, tem sido associado como um dos benefícios cardiovasculares da RC por diversos autores (Speakman & Mitchell, 2011; Weiss & Fontana, 2011; Han & Hen, 2010; Sohal & Wondrich, 1996), pois o menor acúmulo de gordura visceral está associado a uma redução dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares como a hipertensão e aterosclerose (Weiss & Fontana, 2011). Especificamente nos modelos animais de RCI, Speakman & Mitchell, (2011) relatam que as mudanças na composição corporal são muito acentuadas e, proporcionalmente, a redução do tecido adiposo supera a redução do peso corporal e afeta preferencialmente o conteúdo de gordura visceral. Estes autores também fazem uma relação entre a redução da gordura visceral com a melhora da função cardíaca uma vez que esta redução está associada com a redução dos níveis circulantes de leptina e aumento dos níveis circulantes de adiponectina. Estas alterações promovem adaptações positivas sobre o metabolismo e função cardíaca.

Nosso próximo passo foi avaliar os parâmetros bioquímicos e cardiovasculares que podem influenciar diretamente a função cardíaca, mais especificamente, avaliamos os níveis séricos de glicose, colesterol, triglicérides, o hematócrito, a pressão arterial, a frequência cardíaca *in vivo* e o duplo produto.

Os parâmetros bioquímicos séricos e o hematócrito estão apresentados na **Tabela 5**. De forma geral notamos uma melhora do perfil bioquímico sérico nos animais RC50. Constatamos que, em relação aos animais AL, os animais RC50 não apresentaram alterações significativas no hematócrito, triglicérides, colesterol total e LDL, entretanto, estes animais apresentaram menores níveis séricos de glicose e maiores níveis da fração do colesterol HDL.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos. Dados apresentados como média \pm DP, RC50 vs. AL.* $p < 0,05$.

	AL (n = 13)	RC50 (n = 15)	p-Value
Hematócrito (%)	45,50 \pm 3,83	50,25 \pm 4,36	0,055
Glicose (mg/dL)	130,40 \pm 12,58	113,00 \pm 11,56	0,004
Triglicérides (mg/dL)	115,00 \pm 24,12	106,40 \pm 11,21	0,4
Colesterol (mg/dL)	59,85 \pm 8,37	61,47 \pm 7,21	0,7
HDL (mg/dL)	20,21 \pm 2,01	23,37 \pm 1,69	0,01
LDL (mg/dL)	21,01 \pm 9,80	13,42 \pm 2,49	0,13

Em relação ao resultado que encontramos de redução da glicemia de jejum nos animais RC50, é importante ressaltar que existe uma considerável variação nos valores normais de glicemia em ratos. No levantamento realizado por Harkness & Wagner (1993) foi apontado que, em ratos *Wistar*, os valores estão dentro da faixa de normalidade quando não são superiores a 135 mg/dL). Os níveis elevados de glicemia afetam negativamente a função cardíaca, pois podem levar à toxicidade celular, conhecida como glicotoxicidade, em que ocorre um aumento da oxidação da glicose e geração mitocondrial de superóxido o que aumenta o estresse oxidativo, a fibrose e a apoptose dos cardiomiócitos (Hayat et al., 2004; Wang et al., 2004). Além disso, existem evidências entre a associação do aumento dos níveis de glicose sanguínea e redução da expressão e/ou atividade de SERCA2 e do receptor de rianodina com consequente piora da contratilidade, relaxamento e aumento da rigidez do miocárdio (Bidasse et al., 2003; Poornina et al., 2006). Entretanto, é importante ressaltar que o grupo AL apresentou valores de glicemia dentro dos valores de normalidade e a RCI imposta promoveu um efeito benéfico, uma vez que esta redução, dentro dos valores de homeostasia, confere um efeito preventivo.

O mecanismo celular mais conhecido que promove uma redução da glicemia em resposta a uma RC é a melhora da sensibilidade insulínica tecidual. Alguns estudos na literatura mostram que a RC reduz os níveis de insulina circulante e os tecidos insulino-dependentes se tornam mais responsivos à insulina (Weiss & Fontana, 2011; Speakman &

Mitchell, 2011). De fato, resultados preliminares de nossas pesquisas (ainda não concluídos) indicam que os animais RC50 apresentam maior tolerância à glicose.

Muitos dos fatores de risco para doenças cardiovasculares estão relacionados aos níveis circulantes aumentados de triglicerídeos e lipoproteínas. A fração HDL do colesterol, especificamente, exerce um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular. Estudos epidemiológicos mostram que o aumento de cada 1mg/dL de HDL reduz em 2 a 3% o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas (Gotto, 2002). Sua ação protetora está relacionada principalmente a sua capacidade de promover o transporte reverso do colesterol, removendo-o da periferia e direcionando ao fígado para ser metabolizado. Além disso, os estudos de Navab et al., (2001), constataram que a fração HDL possui também atividade anti-inflamatória.

A **Figura 3** mostra que nosso protocolo de RCI também exerceu efeitos positivos sobre a pressão arterial independentes das alterações da frequência cardíaca *in vivo*. Podemos observar que já aos 45 dias de idade os animais RC50 apresentaram menores níveis de pressão arterial (45 dias: $130,9 \pm 9,0$ mmHg (AL) vs. $113,7 \pm 16,0$ mmHg (RC50); 70 dias: $134,8 \pm 7,8$ mmHg (AL) vs. $119,7 \pm 15,4$ mmHg (RC50); 90 dias: $134,9 \pm 10,1$ mmHg (AL) vs. $123,2 \pm 7,8$ mmHg (RC50)). Entretanto, a frequência cardíaca *in vivo* não foi diferente entre os grupos (45 dias: 422 ± 37 bpm (AL) vs. 421 ± 25 bpm (RC50); 70 dias: 390 ± 29 bpm (AL) vs. 395 ± 44 bpm (RC50); 90 dias: 402 ± 30 bpm (AL) vs. 382 ± 23 bpm (RC50)). Consequentemente, os valores de duplo produto revelaram uma menor sobrecarga cardíaca nos animais RC50 (45 dias: 54600 ± 4659 mmHg/bpm (AL) vs. 49130 ± 6953 mmHg/bpm (RC50); 70 dias: 53250 ± 6808 mmHg/bpm (AL) vs. 47030 ± 7560 mmHg/bpm (RC50); 90 dias: 55490 ± 4287 mmHg/bpm (AL) vs. 46640 ± 5233 mmHg/bpm (RC50)).

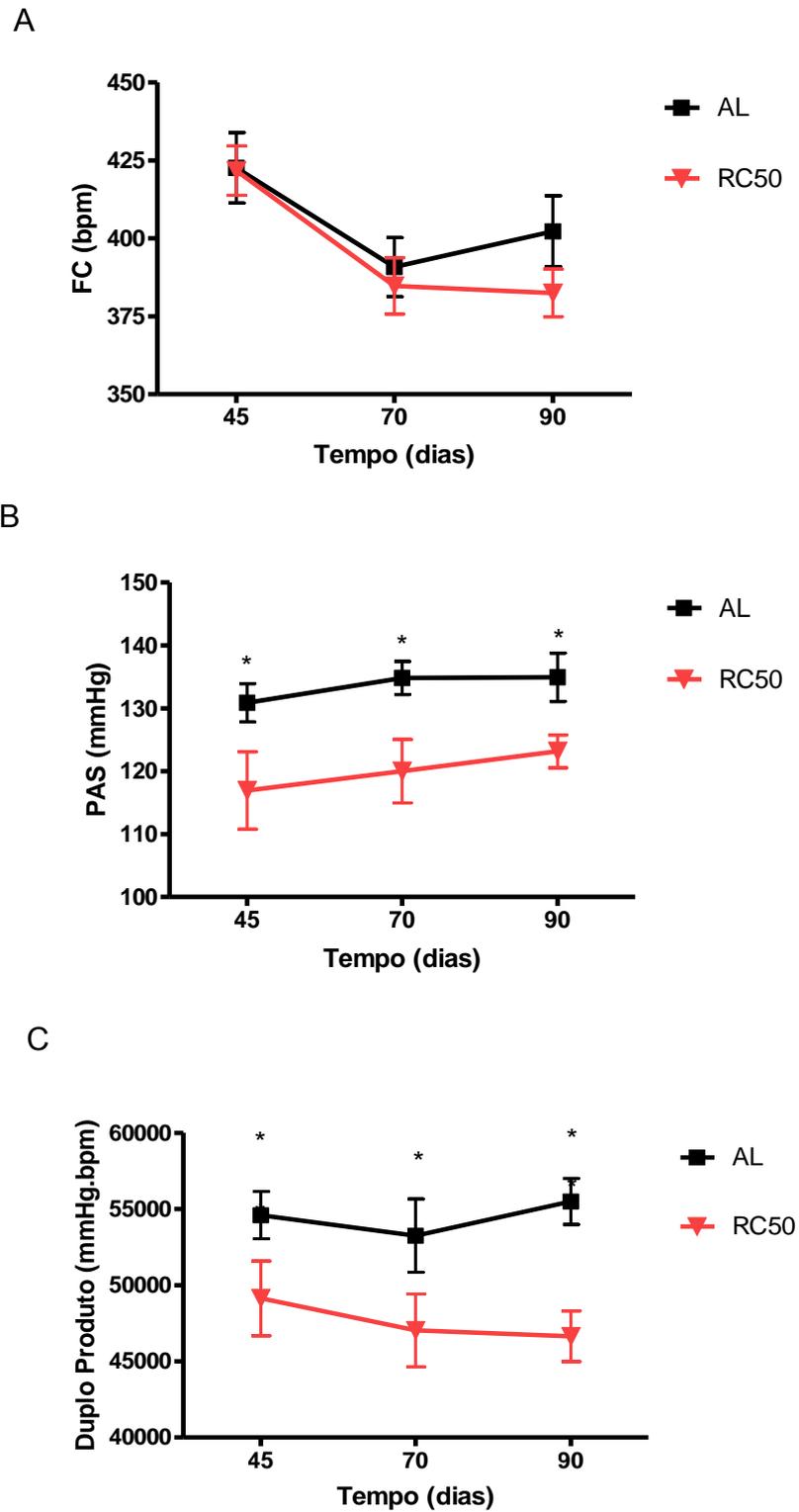


Figura 3. Parâmetros cardiovasculares. Valores de frequência cardíaca (A), pressão arterial sistólica (B) e duplo produto (C). * $p < 0,05$.

Em concordância com nossos achados, alguns estudos mostram que a RC está associada com a redução da pressão arterial tanto em animais normotensos (Thomas et al., 1993; Marger et al., 2006) quanto hipertensos (Young et al., 1978; Overton et al., 1997; Dolinsky et al., 2010). O efeito hipotensor da RCI ainda não está completamente esclarecido e, possivelmente, ocorre por diferentes mecanismos. Estudos que tentaram identificar o mecanismo hipotensor da RC apontam para alterações neurais, hormonais ou locais. Overton et al., (1997), por exemplo, sugerem que a RC promove redução da atividade simpática, já Thomas et al., (1993) sugerem que ocorre uma melhora da sensibilidade barorreflexa. Outros estudos sugerem ainda uma redução dos níveis circulantes das catecolaminas (Levay et al., 2010), aumento dos níveis circulantes de adiponectina e ativação da via AMPK/eNOS no endotélio vascular (Dolinsky et al., 2010).

Uma menor pressão arterial pode representar uma ação protetora cardíaca por reduzir a carga de trabalho do coração. Contudo, existe uma forma mais específica de se avaliar indiretamente o trabalho cardíaco, pelo índice produto pressão-frequência ou duplo produto. O duplo produto (DP) é um índice estimativo de trabalho cardíaco e possui correlação positiva com o consumo de oxigênio pelo miocárdio (MVO_2) (Farinatti & Assis, 2000). Em nosso estudo os animais RC50 apresentaram menor PAS e valores semelhantes de FC quando comparados ao grupo AL, o que resultou em um menor DP ao longo de todo período experimental no grupo RC50. Neste sentido, o menor DP em RC50 indica que os corações destes animais trabalham em condições de menor sobrecarga ao longo da vida, exercendo assim um efeito protetor sobre o coração.

Em conjunto, a redução da glicemia, o aumento do colesterol HDL e a redução da pressão arterial e do duplo produto nos deram fortes indícios de que os animais RC50 apresentariam alterações positivas da função cardíaca. Para determinação da função cardíaca foram realizados dois testes, sendo um *in vivo* e indireto e outro *ex vivo*. Para a avaliação *in vivo* foi realizado um teste de desempenho aeróbio máximo em piscina (**Figura 4**). Este teste é considerado uma importante ferramenta para avaliar a função cardiovascular global e cardíaca (Dickinson & Richards, 1988). O teste de desempenho aeróbio máximo revelou que a carga suportada pelos animais RC50 foi muito superior a do grupo AL, praticamente o dobro ($0,10 \pm 0,04$ vs $0,06 \pm 0,01$ g/g, respectivamente, $p = 0,001$).

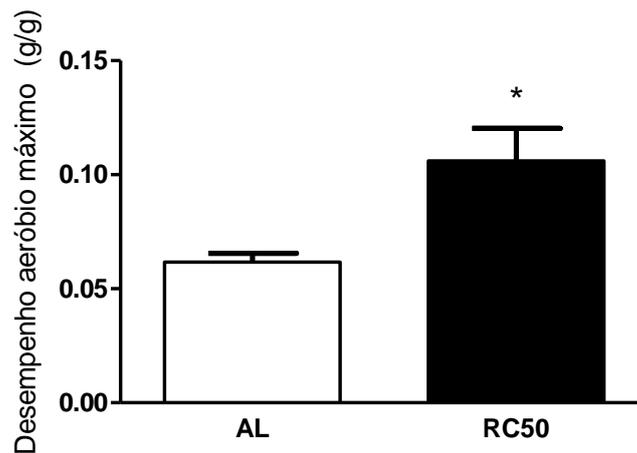


Figure 4. Desempenho aeróbio máximo, expresso pela carga suportada relativizada pelo peso corporal. * $p < 0.05$.

Apesar de ser um teste indireto da avaliação da função cardíaca e outros fatores como a capacidade de extração e utilização tecidual de oxigênio interferir diretamente nos resultados deste teste (Dickinson & Richards, 1988), a discrepância entre os valores chama atenção e indicam uma maior eficiência cardíaca no grupo RC50.

Em seguida realizamos o teste *ex vivo* através da técnica de coração isolado (**Figura 5**). Em consonância com o resultado anterior, os resultados dos experimentos de coração isolado apresentaram evidências diretas de uma função cardíaca aumentada nos animais RC50. Comparado ao grupo AL, os animais RC50 apresentaram maiores índices de contratilidade (+Dt/dt) (RC50: $311,3 \pm 57,8$ vs. AL: $251,7 \pm 52,8$ g/s/g, $p = 0,03$, **Fig. 5A**) e relaxamento cardíaco (-Dt/dt) (RC50: $256,0 \pm 40,5$ vs. AL: $201,5 \pm 56,33$ g/s/g, $p = 0,03$, **Fig. 5B**). Apesar do aumento de ambas as Dt/dt máxima e mínima, não foram encontradas diferenças significativas no fluxo coronariano (RC50: $6,4 \pm 1,1$ vs. AL: $6,7 \pm 1,0$ mL/min/g, $p = 0,54$, **Fig. 5C**), bem como na FC (RC50: $249,8 \pm 29,2$ vs. AL: $250,7 \pm 47,0$ bpm, $p = 0,95$, **Fig. 5D**) entre os animais AL e RC50. De maneira interessante, estes resultados indicam que uma RC de 50% aumenta a função cardíaca por um mecanismo intrínseco do miocárdio, uma vez que o fluxo e FC não foram alterados.

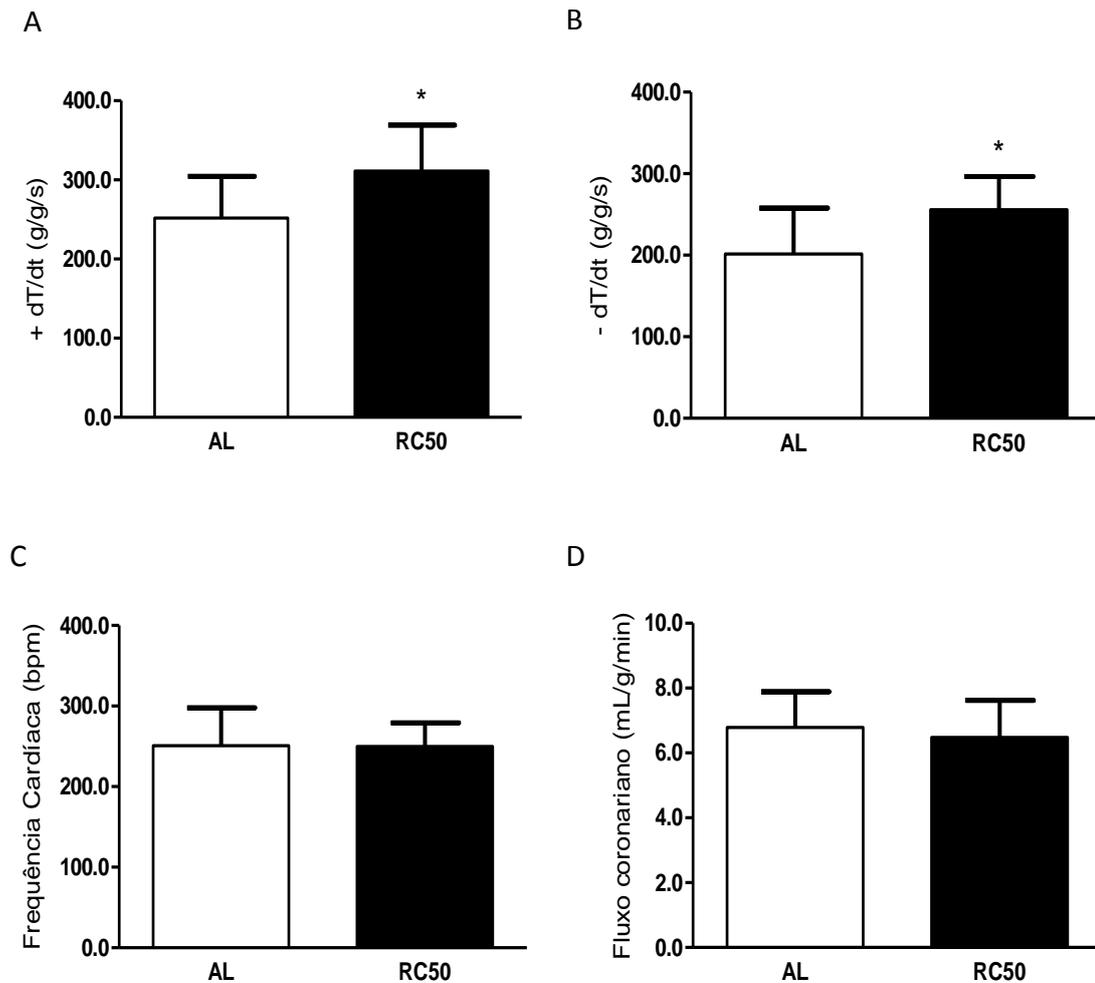


Figure 5. Função cardíaca basal pela técnica de coração isolado em sistema langendorff. Os valores de +dT/dt (A) e -dT/dt (B) foram superiores nos animais RC50 comparado ao grupo AL. Não foram encontradas diferenças na frequência cardíaca (C) e fluxo coronariano (D). * $p < 0,05$.

Um aumento da função cardíaca pode se dar em decorrência de uma adaptação transitória em resposta a perturbações hemodinâmicas e/ou metabólicas, como hipertensão e dislipidemias. No entanto, os dados apresentados anteriormente descartam estas possibilidades, pois os animais RC50 apresentam uma redução na pressão arterial, duplo produto e, ainda, uma melhora no perfil bioquímico sérico.

A maioria dos trabalhos mostram que a RCI preserva (Mcknigh et al., 1999; Cicogna et al., 2001; Fioretto et al., 2002; Broderick et al., 2002; Peron et al., 2005; Gut et al., 2008; Sugizaki et al. 2008; Yamagishi et al., 2010) ou diminui (Okoshi et al., 2001; Fioretto et al., 2004; Sugizaki et al., 2009; Tomasi et al., 2009) a função cardíaca basal em ratos. No entanto, estes estudos avaliaram os efeitos de uma RCI apenas em animais

adultos. Neste contexto, o aumento da função cardíaca basal dos animais RC50 sugere que quando a RCI é imposta desde o nascimento as adaptações cardíacas podem ser diferentes daquelas observadas em animais que iniciam a RCI já na idade adulta. De fato alguns estudos recentes apontam que quanto mais cedo se inicia a RC maiores são os benefícios desta ao longo da vida (Gredilla & Barja, 2005; Han & Ren, 2010).

Com o intuito de avaliar se o aumento da função cardíaca seria acompanhado de alterações positivas na estrutura cardíaca, nosso próximo passo foi avaliar a morfometria dos cardiomiócitos e os níveis de fibrose cardíaca nos animais RC50. Os resultados das análises histológicas estão apresentados na **Figura 6**. Em consonância com os resultados anteriores, a análise histológica do miocárdio revelou alterações positivas da RCI sobre a morfologia do tecido cardíaco. A Figura **6A** mostra micrografias representativas da morfometria cardíaca. Os animais RC50 apresentaram maior número (AL: $35,1 \pm 5,3$ unidades/área vs. RC50: $43,8 \pm 2,7$ unidades/área, $p = 0,01$, **Fig. 6B**) e densidade de cardiomiócitos (AL: $52,7 \pm 8,1$ unidades/ mm^2 vs. RC50: $76,4 \pm 8,0$, $p = 0,001$, **Fig. 6C**). Além disso, os cardiomiócitos dos animais RC50 apresentaram menor diâmetro (AL: $12,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ vs. RC50: $9,54 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $p = 0,0002$, **Fig. 6D**) e, adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de fibrose cardíaca entre os grupos AL e RC50 ($0,21 \pm 0,02\%$ vs. $0,20 \pm 0,02\%$, respectivamente, **Figs. 6E e 6F**).

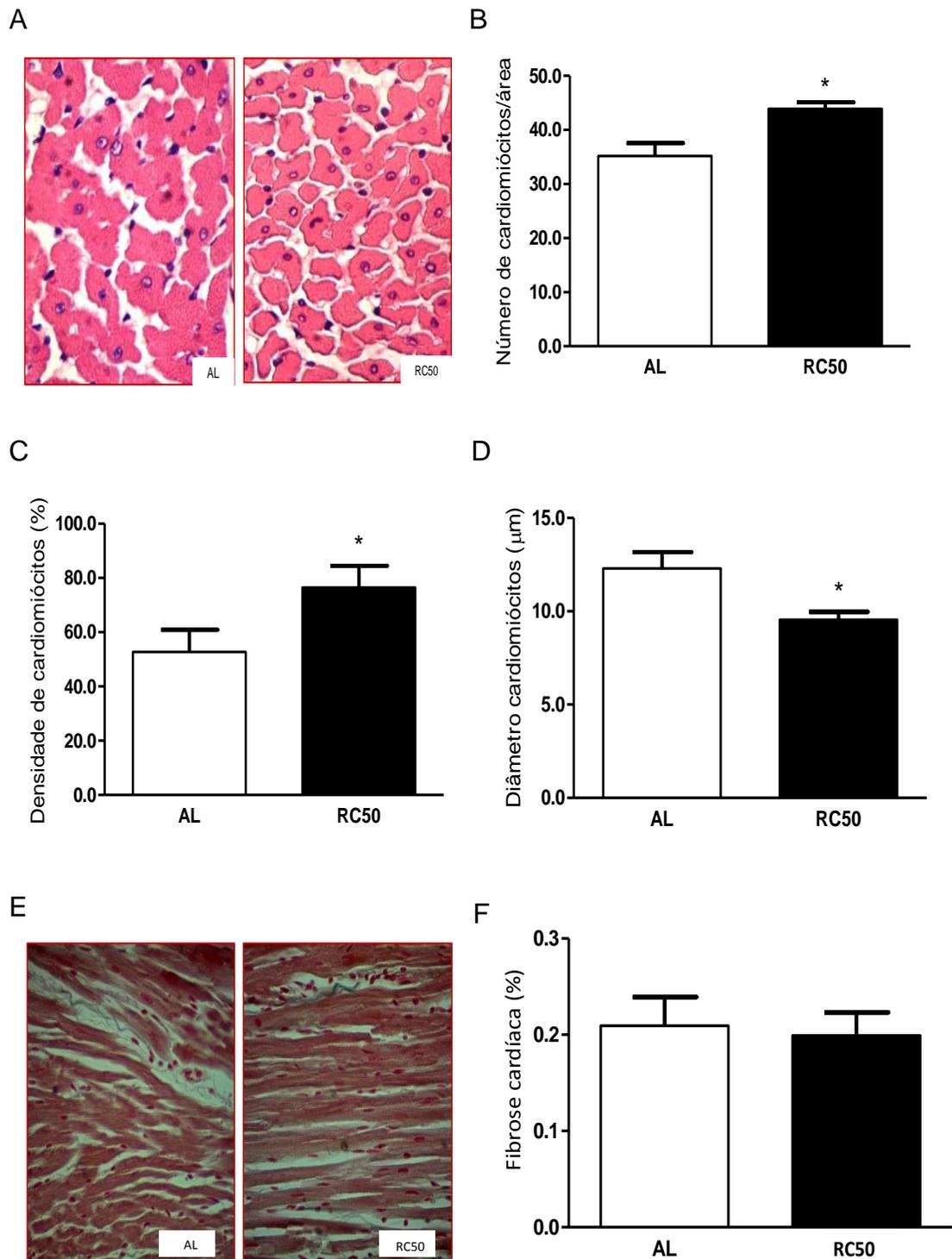


Figura 6. Avaliação da histologia cardíaca. Representativo da coloração H&E de corte transversal do miocárdio em (A). Os animais RC50 apresentaram cardiomiócitos em maior número (B), densidade (C) e menor diâmetro (D) quando comparado ao grupo AL. Em (E) o representativo para a coloração de tricômio de Masson. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de fibrose cardíaca (F). * $p < 0,05$.

Estas alterações são intrigantes, especialmente em relação ao aumento da densidade de cardiomiócitos encontrada nos animais RC50. A proliferação de cardiomiócitos no período pós-natal é restrita, mas como mencionado anteriormente, existem evidências que em roedores ocorre uma proliferação nas primeiras semanas de vida (Rudolph, 2000; Corstius et al., 2005; Porrelo et al., 2011). Neste sentido, não podemos descartar a hipótese de que o maior número e densidade de cardiomiócitos nos animais RC50 seja resultado de um aumento na proliferação dos cardiomiócitos. No entanto, estudos que observaram um aumento na contagem dos cardiomiócitos após a RCI em longo prazo em ratos sugerem uma redução da apoptose de cardiomiócitos como uma provável explicação e não uma proliferação de cardiomiócitos (Ahmet et al., 2011; Shinmura et al., 2011).

Apesar dos mecanismos envolvidos com as alterações promovidas pela RCI serem pouco conhecidos, estudos que mostraram efeitos benéficos de uma RC leve a moderada sobre a função cardíaca apontam como principais responsáveis a redução do estresse oxidativo plasmático e tecidual cardíaco (Sohal et al., 1994; Sohal & Wendruch, 1996; Marzetti et al., 2009), e as alterações em vias de sinalização da sobrevivência (Giani et al., 2008; Katare et al., 2009; Sung et al., 2011; Perat et al., 2012;) e do transiente de cálcio em cardiomiócitos (Yamagishi et al., 2010; Shinmura et al., 2011; Sugizaki et al., 2011).

Nesta perspectiva, inicialmente avaliamos os níveis de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nos tecidos musculares cardíaco e esquelético (**Figura 7**). Podemos observar que os níveis de peroxidação lipídica no músculo esquelético (AL: $1,31 \pm 0,28$ nmol MDA/mg proteína vs. RC50: $1,37 \pm 0,31$ nmol MDA/mg proteína, $p = 0,34$, **Fig. 7A**) e a atividade da SOD (AL: $0,19 \pm 0,05$ U/mg proteína vs. RC50: $0,22 \pm 0,05$ U/mg proteína, $p = 0,08$, **Fig. 7B**) e CAT (AL: $0,012 \pm 0,01$ $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína vs. RC50: $0,014 \pm 0,01$ $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína, $p = 0,30$, **Fig. 7C**) muscular esquelética são similares entre os grupos AL e RC50. De forma surpreendente, no coração estas respostas foram diferentes. Constatamos que os níveis de peroxidação lipídica tecidual cardíaca estão reduzidos (AL: $2,46 \pm 0,45$ nmol MDA/mg proteína vs. RC50: $1,56 \pm 0,40$ nmol MDA/mg proteína, $p = 0,001$, **Fig. 7D**) e as atividades da SOD (AL: $0,06 \pm 0,02$ U/mg proteína vs. RC50: $0,16 \pm 0,09$ U/mg proteína, $p = 0,004$, **Fig. 7E**) e CAT (AL: $0,006 \pm 0,002$ $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína vs. RC50: $0,012 \pm 0,006$ $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$

proteína, $p = 0,01$, **Fig. 7F**) aumentadas nos corações dos animais RC50. Portanto, constatamos que a RCI reduz o EO especificamente no coração.

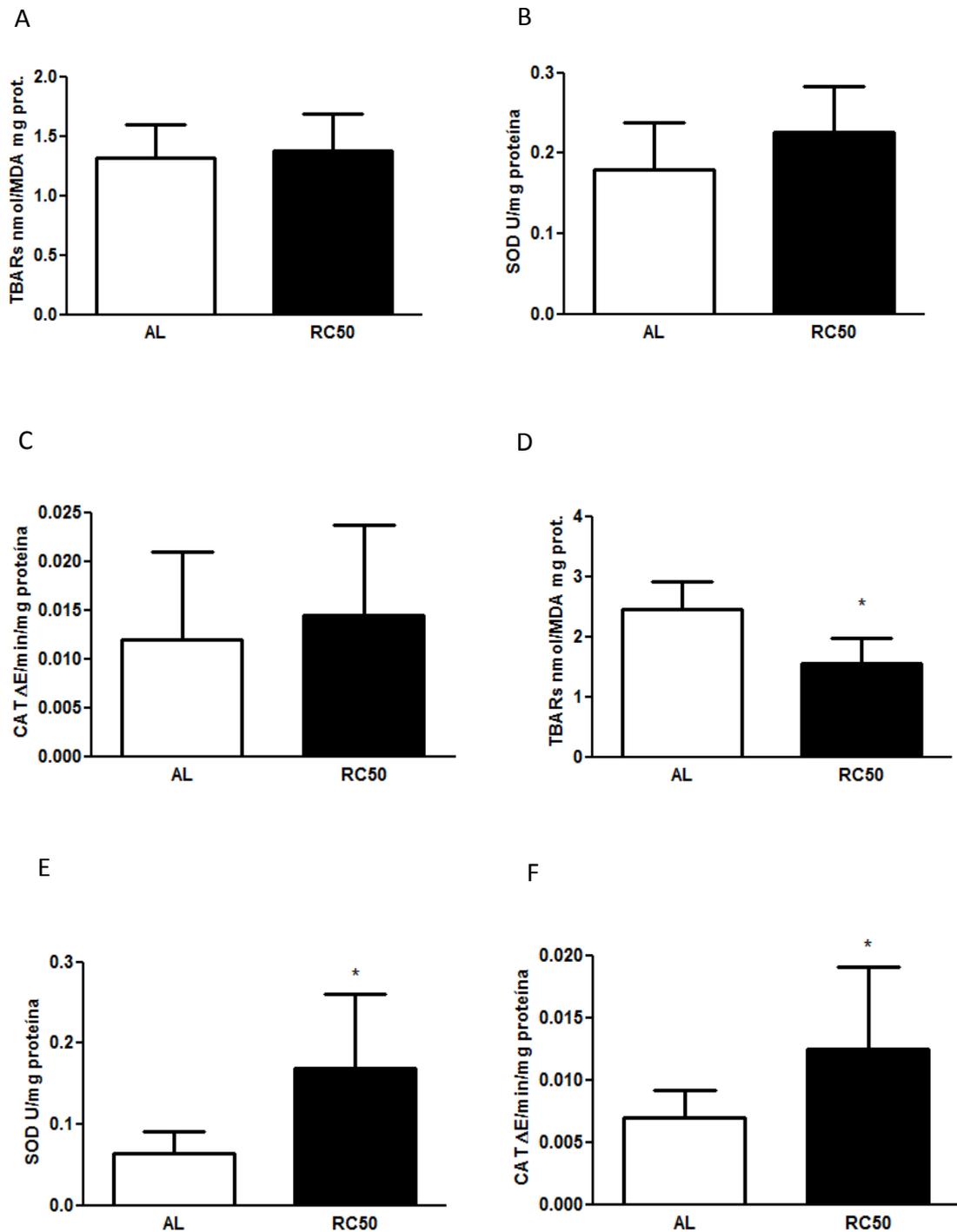


Figura 7. Avaliação do estresse oxidativo. No músculo esquelético não houve diferenças na peroxidação lipídica (A), atividade da SOD (B) e CAT (C). Já para o tecido cardíaco os animais RC50 apresentam menores níveis de peroxidação lipídica (E), maior atividade de SOD (F) e CAT (G) quando comparados a AL. * $p < 0,05$.

No coração, as ROS exercem importante papel na apoptose e contratilidade cardíaca. Uma produção excessiva de ROS aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial interna pelo aumento da relação Bax/Bcl-2, o que promove a abertura de poros na mitocôndria, impedindo a produção adequada de ATP. Além disso, ocorre a liberação do conteúdo mitocondrial para o citoplasma, incluindo o fator indutor de apoptose (AIF) e o citocromo C, que no citosol ativam as caspases que irão degradar diversas proteínas chave do metabolismo celular levando a apoptose (Kumar & Judutt, 2003). Além disso, as ROS podem promover redução da contratilidade cardíaca por alterar as vias de sinalização do transiente de cálcio (Luo et al., 2006). Dessa forma, levantamos a hipótese que o menor EO observado nos corações dos animais RC50 estaria envolvido com aumento do transiente de cálcio e a ativação de vias de sobrevivência em cardiomiócitos, o que explicaria o aumento da função cardíaca e densidade de cardiomiócitos nos animais RC50. Portanto, investigamos os níveis de fosforilação de Akt, uma proteína quinase chave envolvida com a sobrevivência e proliferação celular (Matsui et al., 1999) e o transiente de cálcio em cardiomiócitos. Em concordância com nossa hipótese os resultados mostram que a Akt está hiperfosforilada nos cardiomiócitos dos animais RC50. (AL: $0,38 \pm 0,03$ u.a. vs. RC50: $0,52 \pm 0,03$ u.a., $p = 0,01$, **Figura 8**).

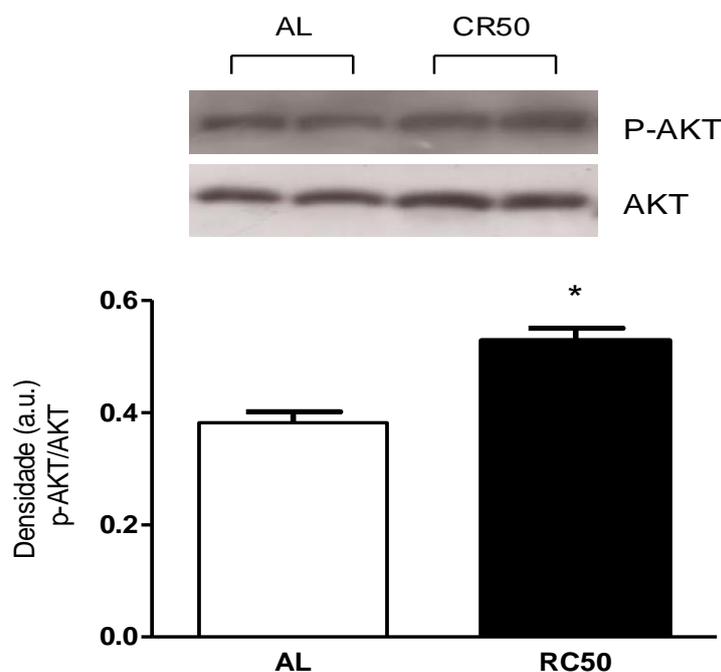


Figura 8. Avaliação do grau de fosforilação de Akt. O painel superior mostra uma imagem representativa do western-blotting. Os animais CR50 (n = 4) apresentaram níveis de Akt fosforilada superiores quando comparado ao grupo AL (n = 3). * p < 0,05.

Finalmente, com intuito de avaliar as consequências da RCI sobre o transiente de cálcio em cardiomiócitos, avaliamos o pico e decaimento do transiente de Ca^{2+} além da expressão da SERCA2 nos miócitos ventriculares isolados dos animais AL e RC50.

Inicialmente, os resultados não confirmaram nossa hipótese, pois não houve diferenças significativas no pico (AL: $3,6 \pm 1,8$ u.a. vs. RC50: $3,7 \pm 2,2$ u.a., p = 0,73, **Fig. 9A**) e no tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} (AL: $266,5 \pm 30,9$ ms vs. RC50: $269,1 \pm 54,4$ ms, p = 0,80, **Fig. 9B**) entre os cardiomiócitos de ratos AL e RC50. Em concordância com estes resultados, foram encontrados níveis semelhantes da expressão de SERCA2 entre os cardiomiócitos dos animais AL e RC50 (AL: $0,99 \pm 0,25$ u.a. vs. RC50: $0,94 \pm 0,09$ u.a., p = 0,73, **Fig. 10**).

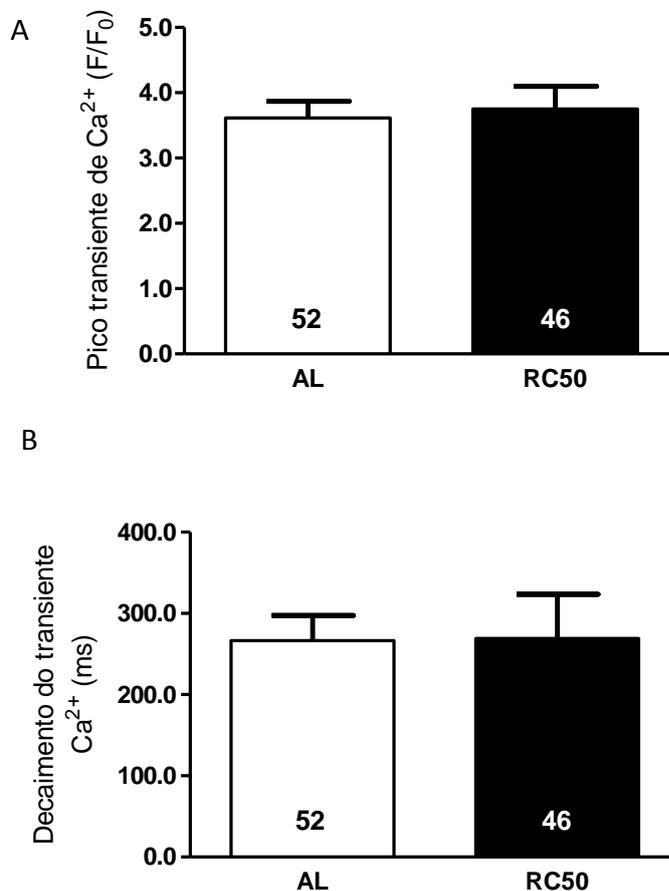


Figura 9. Avaliação do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos. Em (A) o pico do transiente de Ca^{2+} e (B) o tempo de decaimento do transiente após os cardiomiócitos serem estimulados eletricamente (1Hz). Não foram encontradas diferenças entre animais RC50 (n = 4) e AL (n = 3).

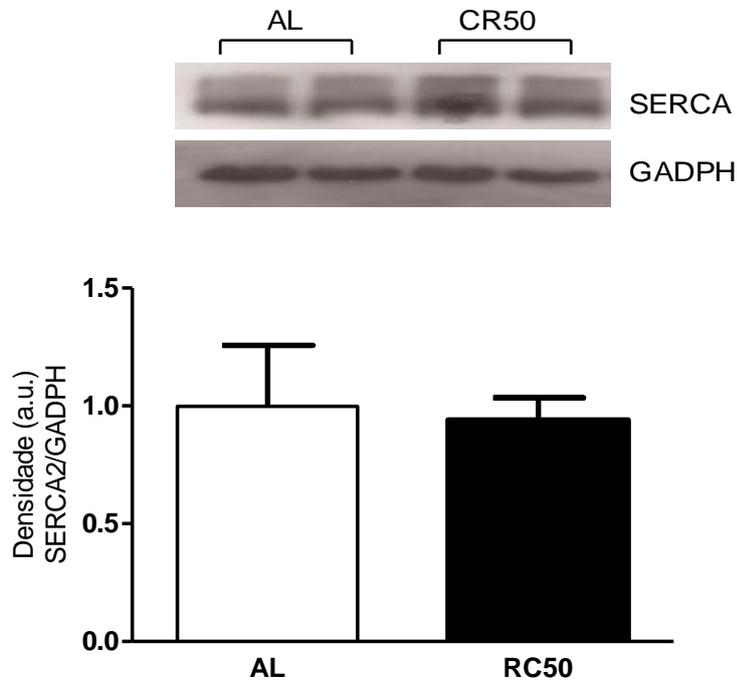


Figura 10. Avaliação da expressão da SERCA2 em cardiomiócitos. O painel superior mostra uma imagem representativa do western-blotting. Foram encontrados níveis semelhantes de expressão de SERCA2 em cardiomiócitos de animais RC50 (n = 4) e AL (n = 3).

Com base nestes resultados, podemos sugerir que a melhora da função cardíaca nos animais RC50 não pode ser explicada por um aumento do pico e/ou redução do tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos. Porém, não podemos descartar completamente a participação do Ca^{2+} nestas adaptações uma vez que um aumento da contratilidade cardíaca pode ocorrer por alterações no transiente, mas também pelo aumento na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (Bers, 2002). O estudo de Luo et al., (2006), por exemplo, mostra que o aumento das ROS reduz a sensibilidade dos miofilamentos cardíacos ao Ca^{2+} . Portanto, a avaliação da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} torna-se um experimento chave a ser realizado em estudos futuros.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em síntese, nosso estudo mostrou que uma RCI desde o nascimento promove efeitos benéficos sobre o coração de ratos adultos de 90 dias. Estes resultados podem fazer parte de um mecanismo adaptativo, permitindo uma contração mais eficiente do coração em condições de reduzida disponibilidade de energia. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que essas mudanças, aparentemente benéficas, possam ser consequência da caquexia. De fato, quando comparado com AL, os animais RC50 apresentam menor comprimento da tíbia, indicando o atraso no crescimento, e peso corporal 40% menor. Portanto, a função cardíaca aumentada nos animais RC50 pode ser uma consequência da diminuição da carga de trabalho cardíaca devido à considerável redução no ganho de peso e do crescimento dos tecidos em geral nestes animais.

Diante dos resultados apresentados surgem novas questões, tais como: *i)* o que ocorreria com os corações destes animais em RCI superiores a 50%? *ii)* os efeitos protetores da RCI encontrados aos 90 dias seriam também observados em fases mais tardias como na senilidade? *iii)* A maior função cardíaca nos animais RC50 seria observada em situações de estresse, como na isquemia-reperfusão ou mediante o estímulo com agonistas adrenérgicos? *iv)* A RCI imposta desde o nascimento protegeria os corações de animias adultos submetidos a insultos específicos como de indução de um infarto ou indução de uma hipertensão ou diabetes?

Todas essas possibilidades precisam ser examinadas em estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abete, P. et al. Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v.282, n.6, p. 1978–1987, 2002.

Ahmet, I. et al. Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v.51, p.263-271, 2011.

Ahuja, P; Sdek, P; Maclellan R.W. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* v.87, n.2, p. 521–544, 2006.

Bagga, D. et al. Adipose-tissue and the effects of fat and calories on breast tumorigenesis in rats. *J. Nutr. Biochem.* v.6, n.3, p. 667–672, 1995.

Barreto, T.O. et al. Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *Eur J Appl Physiol.* v. 112, n.7, p. 2523-2530, 2011.

Barzilai, N. et al. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J. Clin. Investigation.* v.101, n.7, p.1353–1361, 1998.

Barzilai, N. et al. Decreased visceral fat entirely accounts for the effects of caloric restriction on insulin action in aging rats. *Diabetologia.* v.43, p. 603-611, 2000.

Bers, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* v.415, n.68, p.198-205, 2002.

Bevilacqua, L. et al. *Effects of short-and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production.* *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v.286, n.5, p.852–861, 2004.

Bevilacqua, L. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v.289, v.3, p.429-438, 2005.

Bidasee, K.R. et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes.* v.52, n.7, p.1825-1836, 2003.

Broderick, T.L. et al. Effects of chronic caloric restriction on mitochondrial respiration in the ischemic reperfused rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* v.233, n.2, p.119-125, 2002.

Carrie E.M; Davidson R.T; Cartee G.D. Brief calorie restriction increases Akt2 phosphorylation in insulin-stimulated rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v.285, n.4, p.693-700, 2003.

Casto R.M; VanNess J.M; Overton J.M. Antihypertensive effects of food-intake restriction in aortic coarctation hypertension. *J. Hypertens.* v.15, n.11, p.1253–1262, 1997.

Chandrasekar, B. et al. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia–reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v.280, n.5, p. 2094–2102, 2001.

Cicogna, A.C. et al. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am. J. Med. Sci.* v. 320, n. 5, p.244–248, 2000.

Cicogna, A.C. The influence of temporal food restriction on them performance of isolated cardiac muscle. *Nutr. Res.* v. 21, n. 5, p. 639-648, 2001.

Clubb, Jr; Bishop S.P. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab. Invest.* v.50, p. 571-577, 1984.

Cohn, J.N; Ferrari, R; Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Am Coll Cardiol.* v.35, n.3, p.569-582, 2000.

Corbj, G. et al. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. *Front Biosci.* v.1, n.4, p. 768-778, 2012.

Corstius, H.B. et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr. Res.* v.57, n. 6, p. 796-800, 2005.

Cox, L.S; Mattison J.A. Increasing longevity through caloric restriction or rapamycin feeding in mammals: common mechanisms for common out comes? *Aging Cell.* v.8, n.5, p. 607–613, 2009.

Del Maestro, R.F; McDonald, W. Oxidative enzymes in tissue homoge- nates. In: Greenwald RA, ed. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Boca Raton, Fla: *CRC Press.* 291-296, 1985.

Dickinson, W; Richards L. New concepts in assessing cardiovascular function. *Circulation.* v.78, n.4, p. 1060-1071, 1988.

Dolinsky, V.W; Dyck, J.R.B. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Bioch. Bioph. Acta.* v.1812, n.11, p. 1477–1489, 2011.

Duffy, P.H. et al. Effect of chronic caloric restriction on the synchronization of various physiological measures in old female Fischer-344 rats. *Chronobiology Inter.* v.7, n.2, p. 113–124, 1990.

Duffy, P.H. et al. Effect of chronic caloric restriction on physiological variables related to energy metabolism in the male Fischer 344 rat. *Mech. Ageing. Dev.* v.48, n.2, p. 117–133, 1989.

Escriva, F. et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J. Endocrinology.* v.194, n.1, p.131–141, 2007.

Farinatti, P.T.V; Assis, B.B. Estudo da frequência cardíaca, pressão arterial e duplo-produto em exercícios contra-resistência e aeróbio contínuo. *Rev Bras Ativ. Fis. Saúde*. v.5, n.2, p. 5-16, 2000.

Ferguson, M. Effect of long-term caloric restriction on oxygen consumption and body temperature in two diferente strains of mice. *Mech Ageing Develop*. v.128, p. 539-545, 2007.

Fioretto, J.R. et al. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment Cardiac Ca²⁺ cycling mRNA during food restriction of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res*. v.37, n.2, p. 607-613, 2004.

Fioretto, J.R. et al. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v.282, n.4, p.1327-1333, 2002.

Fontana, L; Klein, S. Aging, adiposity and calorie restriction. *JAMA*. v.297, n.9, p. 986–994, 2007.

Forster, M.J; Morris, P; Sohal R.S. Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *Faseb Journal*. v.17, n.6, p. 690-699, 2003.

Franke, F.T. et al. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*. v.22, n.56, p. 8983–8998, 2003.

Freund, H.R; Holroyde, J. Cardiac Function during Protein Malnutrition and refeeding in the Isolated Rat Heart. *J. Parent. Ent. Nutr*. v.10, n.5, p. 470-473, 1986.

Giani, J.F. et al. Insulin signaling cascade in the hearts of long-lived growth hormone receptor knockout mice: effects of calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. v.63, n.8, p. 788-797, 2008.

Gotto, A.M. Low high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report. *Circulation*. v.103, p. 2213-2218, 2001.

Gredilla, R. et al. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *J FASEB*. v.15, p. 1589-1591, 2005.

Guatimosim, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* v.280, n.5, p. 1327-1339, 2001.

Gut, A.L. et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr. Res.* v.23, n.7, p. 911-919, 2003.

Gut, A.L. et al. Food restriction impairs myocardial inotropic response to calcium and beta-adrenergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res.* v.28, n.10, p. 722-727, 2008.

Han, X; Ren, J. Caloric restriction and heart function: is there a sensible link?. *Acta Pharmacol. Sinica*. v.31, p. 1111-1117, 2010.

Han, X. et al. Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice. *J. Nutr. Biochem.* v.23, n.12, p. 1592-1599, 2012.

Harkness, J.E; Wagner, J.E. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3^a ed. São Paulo: Roca, p.48, 1993.

Hayat, S.A. et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin Sci*. v.107, n.6, p.539-557, 2004.

Katare, R.G. et al. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol*. v.46, n.3, p. 405–412, 2009.

Kemi, M; Keenan, K.P; McCoy, C. The relative protective effects of moderate dietary restriction versus dietary modification on spontaneous cardiomyopathy in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* v.28, n.2, p. 285–296, 1999.

Kerr, J.F; Wyllie, A.H; Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* v.26, n.4, p. 239–257, 1972.

Kirchner, H. et al. Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes.* v.61, n.11, p. 2734-2742, 2012.

Klebanov, S; Herlihy, J.T; Freeman, G.L. Effect of long-term food restriction on cardiac mechanics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v.273, n.5, p. 2333-2342, 1997.

Kowaltowski, A.J. Caloric restriction and redox state: does this diet increase or decrease oxidant production? *Redox Rep.* v.16, n.6, p. 237-241, 2013.

Kumar, D; Jugdutt, B.I. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med.* v.142, n.5, p. 288-297, 2003.

Lee, C.K; Allison, D.B; Brand, J. Transcriptional profiles associated with aging and middle ageonset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci.* v.99, n.23, p. 14988–14993, 2002.

Levy, E.A. et al. Calorie restriction at increasing levels leads to augmented concentrations of corticosterone and decreasing concentrations of testosterone in rats. *Nutr. Res.* v.30, n.5, p. 366–373, 2010.

Long, P. Caloric restriction restores the cardioprotective effect of preconditioning in the rat heart. *Mech. Ageing Dev.* v.123, n.10, p. 1411–1413, 2002.

Long, V.D; Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends. Pharmacol. Sci.* v.31, n.2, p. 89–98, 2010.

Luo, J. et al. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force-frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. *J Mol Cell Cardiol.* v.40, n.1, p. 64-75, 2006.

Maeda, H. et al. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats. *Pathology. J. Gerontol.* v.40, n.6, p. 671-688, 1985.

Mager, D.E. et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats. *FASEB J.* v.20, n.6, p. 631–637, 2006.

Marzetti, E. et al. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. *Clin. Geriatr. Med.* v.25, n.4, p. 715-732, 2009.

Masayuki, E.M.I. et al. The Relative Protective Effects of Moderate Dietary Restriction versus Dietary Modification on Spontaneous Cardiomyopathy in Male Sprague-Dawley Rats. *Toxicol Pathol.* v.28, n.2, p. 285-294, 2000.

Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing. Dev.* v.126, n.9, p. 913–922, 2005.

Matsui, T. Adenoviral gene transfer of activated PI3-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation.* v.100, n.23, p. 2373-2379, 1999.

Mattson, M.P. 2005. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu. Rev. Nutr.* v.25, p. 237–260.

McCay, C.M; Crowell, M.F; Maynard, L.A. The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* v.10, n.1, p. 63-79, 1935.

McKnight, K.A. Biphasic changes in heart performance with food restriction in rats. *J. Appl. Physiol.* v.87, n.5, p. 1909-1913, 1999.

Melo, D.S. et al. Effects of severe restriction from birth on the hearts of adult rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* v.38, n.8, p. 879-885, 2013.

Merry, B.J. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *J. Biochem. Cel. Biology.* v.34, n.11, p. 1340–1354, 2002.

Merry, B.J. Dietary restriction in rodents – delayed or retarded ageing? *Mechanisms of Ageing and Development.* v.126, n.9, p. 951–959, 2005.

Mitra, R; Morad, M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol.* v.249, n.5, p. 1056-1560, 1985.

Molkentin, J.D; Dorn, G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* v.63, p. 391-426, 2001.

Navab, M; Berliner, J.A; Subbanagounder, G. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospho-lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v.21, p. 481-488, 2001.

Nelson, D.P; Kiesow, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* v.49, n.2, p. 474-478, 1972.

Niemann, B. et al. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. *Cardiovasc Res.* v.8, n.2, p. 267-276, 2010.

Nutter, D.O. et al. The effect of chronic protein-calorie undernutrition in the rat on myocardial function and cardiac function. *Circulation.* v.45, n.1, p. 144-152, 1979.

Ohkawa, H; Ohishi, N; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* v.95, n.2, p. 351–358, 1979.

Okoshi, M.P. et al. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol.* v.79, n.9, p. 754-760, 2001.

Osborne, T.B; Mendel, L.B; Ferry, E.L. The effect of retardation of rowth upon the breeding period and duration of life of rats. *Science.* v.45, n.1160, p. 294-295, 1917.

Overton, J.M; VanNess, J.M; Casto, J.M. Food restriction reduces sympathetic support of blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr.* v.127, n.4, p. 655–660, 1997.

Park, S.Y. et al. Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty rats. *Archiv. Bioch. Biophysics.* v.436, n.2, p. 276–284, 2005.

Peart, J.N. et al. Opposing effects of age and calorie restriction on molecular determinants of myocardial ischemic tolerance. *Rejuven. Res.* v.15, n.1, p. 59-70, 2012.

Peron, A.P. et al. Food restriction does not impair myocardial mechanics during the healing period of myocardial infarction in the rat. *Nutr. Res.* v.25, n.12, p. 1075-1084, 2005.

Phillips, T; Leeuwenburgh, C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* v.19, n.6, p. 668-670, 2005.

Poornima, I.G; Parikh P; Shannon, R.P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ. Res.* v.98, n.5, p. 596-605, 2006.

Porrello, E.R. et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science.* v.331, n.6020, p.1078–1080, 2011.

Pugh, T.D; Klopp, R.G; Weindruch, R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiology of Aging.* v.20, n.2, p. 157–165, 1999.

Qin, W, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem.* v.281, n.31, p. 21745–21754, 2006.

Rippe, C. et al. Short-term Caloric Restriction Improves Glucose Tolerance in Older Mice Independent of Changes in SIRT-1. *FASEB J.* v.23, p. 990.1033, 2009.

Roe, F.J.C. et al. The Biosure Study: influence of composition of diet and food consumption on longevity, degenerative diseases, and neoplasia in Wistar rats studied for up to 30 months post weaning. *Food Chem. Toxicol.* v.33, n.1, p. S1-S100, 1995.

Rudolph, A.M. Myocardial growth before and after birth: clinical implications. *Acta Paediatr.* v.89, n.2, p. 129-133, 2003.

Sedmera, D; Tompson R.P. Myocyte Proliferation in the Developing Heart. *Develop. Dynamics.* v.240, n.6, p. 1322-1334.

Selman, C. et al. Energy expenditure of calorically restricted rats is higher than predicted from their altered body composition. *Mech. Ageing Dev.* v.126, n.6, p. 783–793, 2005.

Shinmura, K; Bolli, T.R. Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v.295, n.6, p. 2348–2355, 2008.

Shinmura, K. et al. Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: Caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v.50, n.1, p. 117-127, 2011.

Sohal, R.S. et al. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev.* v.74, n.1-2, p. 21-33, 1994.

Sohal, R.S; Weindruch, R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science.* v.273, n.(5271), p. 59–63, 1996.

Speakman, J.R; Mitchell, S.E. Calorie restriction. *Molecular Aspects of Medicine*. v.32, n.3, p. 159–221, 2011.

Stankovic, M. et al. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys*. v.32, n.2, p. 277-283, 2013.

Sugizaki, M.M. et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. *J Biomed Sci*. v.12, n.4, p. 641-649, 2005.

Sugizaki, M.M. et al. Upregulation of mRNA myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and food restriction. *Arq Bras Cardiol*. v.97, n.1, p. 46-52, 2011.

Sugizaki, M.M. et al. Severe food restriction induces myocardial dysfunction related to SERCA2 activity. *Can J Physiol Pharmacol*. v.87, n.9, p. 666-673, 2009.

Sung, M.M. et al. Improved cardiac metabolism and activation of the RISK pathway contributes to improved post-ischemic recovery in calorie restricted mice. *J. Mol. Med*. v.89, n.3, p. 291–302, 2011.

Sung, M.M.Y; Dyck, R.B. Age-related cardiovascular disease and the beneficial effects of calorie restriction. *Heart Fail Rev*. v.17, n.(4-5), p. 707-719, 2012.

Thomas, J. et al. Long-Term caloric restriction improves baroreflex sensitivity in aging fischer 344 rats. *J. Gerontol*. v.48, n.4, p. 151-155, 1993.

Thornburg, K. et al. Regulation of the cardiomyocyte population in the developing heart. *Progress in Biophys Mol Biology*. v.106, n.1, p. 289-299, 2011.

Tomasi, L.C. et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca²⁺ channels. *Can J Physiol Pharmacol*. v.87, n.6, p. 426-431, 2009.

Wang, C.C; Goalstone, M.L; Draznin, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. v.53, n.11, p. 2735-2740, 2004.

Weber, K.T; Brilla, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. v.83, n.6, p. 1849-1865, 1991.

Weindruch, R; Walford, R.L. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age – effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*. v.215, n.4538, p. 1415–1418, 1982.

Weindruch, R. The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol. Pathol.* v.24, p. 742–745, 1996.

Weiss, E.P; Fontana, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v.301, n.4, p. 1205-1219, 2011.

Williams, S.J. et al. Differential effects of maternal hypoxia or nutrient restriction on carotid and femoral vascular function in neonatal rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v.288, n.2, p. 360-367, 2005.

Xu, Y. et al. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J*. v.20, n.8, p. 1251-1253, 2006.

Yamagishi, T. Severe, short-term food restriction improves cardiac function following ischemia/reperfusion in perfused rat hearts. *Heart Vessels*. v.25, n.5, p. 417-425, 2010.

Young, J.B; Mullen, D; Landsberg, L. Caloric restriction lowers blood pressure in the SHR. *Metab Clin Exp*. v.27, p. 1711–1714, 1978.

Yu, B.P; Masoro, E.J; McMahan, C.A. Life span study of SPF Fischer 344 male rats. I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol*. v.40, p. 657-670. 1985.

Yu, B.P. et al. Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass, and disease. *J. Gerontol*. v.37, n.2, p. 130-141, 1982.

