

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**Restrição calórica: efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no
estado nutricional de ratos *wistar***

Cristiane Pereira

Pelotas, 2014

CRISTIANE PEREIRA

**Restrição calórica: efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no
estado nutricional de ratos *wistar***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig
Co- orientadoras: Prof^a. Dr^a. Sandra Costa Valle
Prof^a. Dr^a. Renata Torres Abib

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P436r Pereira, Cristiane

Restrição calórica : efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no estado nutricional de ratos wistar / Cristiane Pereira ; Elizabete Helbig, orientadora ; Sandra Costa Valle, Renata Torres Abib, coorientadoras. — Pelotas, 2014.

115 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Restrição calórica. 2. Hipocampo. 3. Neuroproteção. 4. Perfil lipídico. 5. Paraoxonase. I. Helbig, Elizabete, orient. II. Valle, Sandra Costa, coorient. III. Abib, Renata Torres, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig

Prof^a. Dr^a. Sandra Costa Valle

Prof^a. Dr^a. Renata Torres Abib

Prof. Dr. Augusto Schneider

Prof^a. Dr^a. Elizandra Braganhol

Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Agradecimentos

À minha família e amigos pelo apoio, carinho e bons momentos proporcionados. Ao meu marido Fábio por sempre ter acreditado em mim e ter me ajudado a superar as dificuldades que surgiram.

Às Prof.^a Dra. Elizabete Helbig, Sandra Costa Valle e Renata Torres Abib pela orientação, oportunidade e confiança.

Às mestrandas e amigas Fabrícia Rehbein Nörnberg, Pamela Vitória Salermo e Roberta Foerstnow Szczepaniak pelo apoio e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

À aluna Fernanda Wendler Zarnott o meu reconhecimento pelo empenho e comprometimento em todos os momentos e pela oportunidade de co-orientar seu trabalho de conclusão.

Aos meus colegas do Centauros Rugby Clube, que comigo praticam e disseminam este esporte que prega respeito, humildade, garra, hombridade, altruísmo e, acima de tudo, retidão de caráter.

À UFPel e ao Programa de Pós graduação em Nutrição e Alimentos pela oportunidade de realizar o mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À técnica do laboratório de Nutrição Experimental e amiga Renata Ramirez por tornar tão agradável o dia-a-dia no laboratório e por toda colaboração, incentivo e atenção despendida neste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, Prof. CA, Prof^a. Carmen e Prof. Guilhian pelo profissionalismo com que me receberam e à Daniela, Patrícia e Mateus pelo auxílio prestado nas análises dos parâmetros de estresse oxidativo.

Ao laboratório do Prof. Francisco Del Pino pela disposição no empréstimo de equipamentos.

À Turma da Nutrição Experimental pelo apoio e incentivo em minha docência orientada.

À amiga Graciele Cardozo que presencialmente ou à distância me acompanhou e incentivou em todos os momentos dessa trajetória.

Aos componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e contribuições favorecendo o enriquecimento desta pesquisa.

Resumo

PEREIRA, Cristiane. **Restrição calórica: Efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no estado nutricional de ratos Wistar**. 2014. 115f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Restrição Calórica (RC) tem sido associada a inúmeros benefícios à saúde, como redução do peso e gordura corporal, melhora no perfil lipídico e aumento de enzimas antioxidantes que resultam na prevenção de diversas doenças, como as cardiovasculares (DCV) e na prevenção e atenuação de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade em diversas espécies animais. No entanto, há poucos estudos que avaliam o impacto da RC iniciada em ratos jovens comparada com a iniciada em ratos adultos e sobre diferentes períodos de tratamento. O presente estudo avaliou o estado nutricional e metabólico, risco cardiovascular (CV) associado ao perfil lipídico sérico, parâmetros comportamentais e oxidativos em ratos Wistar submetidos à intervenção nas fases de vida jovem e adulta. Ratos com 40 ou 70 dias de vida foram alimentados *ad libitum* ou submetidos à RC por 12 ou 16 semanas. Nossos resultados mostraram que o peso corporal (PC) dos ratos submetidos à RC foi inferior – 21% nos jovens e 16% nos adultos, comparados aos controles ($p < 0,05$). Os parâmetros bioquímicos séricos avaliados indicaram bom estado de saúde. Após 12 semanas, a RC diminuiu o colesterol total (CT), HDL, o colesterol não-HDL e a razão LDL/HDL nos ratos jovens e triacilgliceróis (TG) e razão TG/LDL nos adultos – neste último com aumento de LDL e da razão LDL/HDL ($p < 0,05$). O prolongamento da intervenção não resultou em mudança do risco CV associado ao perfil lipídico sérico. A atividade da paraoxonase 1 (PON1) foi mantida com a RC e a maior relação PON1/HDL foi encontrada nos jovens submetidos à RC por 12 semanas ($p < 0,05$). Após 12 semanas, no hipocampo, a RC aumentou os níveis de glutathione (GSH) nos jovens e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica nos adultos, comparados aos controles ($p < 0,05$). A GSH e a atividade da glutathione peroxidase (GPx) parecem aumentar com a idade independente do tratamento. Nenhuma alteração foi observada na memória, na atividade da superóxido dismutase (SOD) e na produção de óxido nítrico (ON). A idade *per se* não ocasionou diferenças nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Este estudo indica que a RC iniciada precocemente e mantida por 12 semanas proporcionou redução do risco CV associado ao perfil lipídico sérico quando comparada a iniciada na fase adulta. Já seu prolongamento não manteve esse efeito benéfico. A atividade da PON1 foi mantida com a RC independentemente da idade de início e do tempo de tratamento. Ainda, a RC resultou em melhora significativa de parâmetros celulares de autodefesa do hipocampo, tanto iniciada em jovens, quanto na fase adulta. Contudo, a RC iniciada em ratos jovens alterou de forma positiva e expressiva um importante tampão redox do hipocampo.

Palavras chave: restrição calórica, hipocampo, neuroproteção, perfil lipídico, paraoxonase.

Abstract

PEREIRA, Cristiane. **Calorie Restriction: Effects on oxidative and behavioral parameters and nutritional status of *wistar* rats.** 2014. 115f. Dissertation (Master). Pos Graduate Program in Nutrition and Food. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Caloric restriction (CR) has been associated to numerous health benefits such as weight and body fat reduction, lipid profile improvement and increased antioxidant enzymes that result in prevention of various diseases such as cardiovascular disease (CVD) and prevention and attenuation of age-related neurodegenerative diseases in several animal species. However, there are few studies that assess the impact of CR initiated in young rats compared with adult rats and started in on different treatment periods. The present study evaluated the nutritional and metabolic status, cardiovascular (CV) risk associated with serum lipid profile, behavioral and oxidative parameters in *Wistar* rats subjected to intervention in young and adult phases of life. Rats with 40 or 70 days old were fed *ad libitum* or subjected to CR for 12 or 16 weeks. Our results showed that CR-fed rats had lower body weight (BW) - 21% in young rats and 16% in adults rats compared to controls ($p < 0.05$). The serum biochemical parameters indicated good health. After 12 weeks, in hippocampus, the CR decreases total cholesterol (TC), HDL, non-HDL cholesterol and LDL/HDL ratio in young rats and triacylglycerols (TG) and TG/LDL ratio in adults - the latter with increased LDL and LDL/HDL ratio ($p < 0.05$). The extension of the intervention resulted in no change in CV risk associated with serum lipid profile. Paraoxonase 1 (PON1) activity was maintained with CR and PON1/HDL highest ratio was found in young rats underwent CR for 12 weeks ($p < 0.05$). After 12 weeks, the CR increased glutathione (GSH) levels in young rats and decreased reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation in adult rats compared to controls ($p < 0.05$). GSH and glutathione peroxidase (GPx) activity seem to increase with age regardless of treatment. No change was observed in memory, superoxide dismutase (SOD) activity and nitric oxide (NO) production. Age *per se* did not cause differences in oxidative stress parameters evaluated. This study indicates that CR maintained for 12 weeks resulted in an reduction CV risk associated with serum lipid profile when initiated in young rats compared to initiated in adulthood. The extension has not kept this beneficial effects. PON1 activity was maintained with CR regardless the age at onset and treatment time. Still, CR resulted in a significant improvement in hippocampus cellular self-defense parameters, both begun in youth, as in adulthood. However, the CR initiated in young rats changed positively and significantly an important hippocampus redox buffer.

Keywords: calorie restriction, hippocampus, neuroprotection, lipid profile, paraoxonase.

Lista de Figuras

Projeto de Pesquisa e Revisão Bibliográfica

Figura 1	Delineamento experimental do estudo.....	22
Figura 2	Estrutura de duas moléculas de glutathiona (A) na forma reduzida (GSH) e (B) na forma oxidada (GSSG).....	35
Figura 3	Reação da cascata de peroxidação lipídica.....	36

Artigo 1

Figura 1	Delineamento experimental do estudo. 48 Ratos <i>Wistar</i> com 70 e 40 dias de vida (adultos e jovens) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais e alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) por 12 ou 16 semanas, eutanásia com 22 (adultos e jovens com prolongamento) ou 18 (jovens) semanas de vida.....	68
Figura 2	Evolução do peso corporal de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica -RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste <i>t</i> de <i>Student</i>	69
Figura 3	Perfil lipídico sérico de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste <i>t</i> de <i>Student</i> . a indica diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, <i>pos hoc</i> <i>Tukey</i>	70

Figura 4	Atividade arilesterase da PON1 (A) e relação PON1/HDL (B) de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste <i>t</i> de <i>Student</i> . Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, <i>pos hoc Tukey</i>	71
----------	--	----

Artigo 2

Figura 1	Delineamento experimental do estudo. 32 Ratos <i>Wistar</i> com 40 dias e 70 de vida (jovens e adultos) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) por 12 semanas, eutanásia com 18 (jovens) ou 22 (adultos) semanas de vida.....	97
Figura 2	Evolução do peso corporal de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste <i>t</i> de <i>Student</i>	98
Figura 3	Efeitos da RC na taxa de reconhecimento de objetos 24 horas após o treino de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. a indica diferença significativa entre animais do C, teste <i>t</i> de <i>Student</i>	99

- Figura 4 Conteúdo de glutathiona (GSH) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC e, **a** indica diferença significativa entre animais do C, teste *t* de *Student*..... 100
- Figura 5 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. **a** indica diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, teste *t* de *Student*..... 101
- Figura 6 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) **(A)** e peroxidação lipídica **(B)** no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*..... 102

Lista de Tabelas

Projeto de Pesquisa e Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Espécies reativas de oxigênio.....	32
----------	------------------------------------	----

Artigo 1

Tabela 1	Análises bioquímicas séricas de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida adulta, jovem e jovem com prolongamento.....	65
Tabela 2	Risco cardiovascular e metabólico associado ao perfil lipídico sérico em ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida adulta, jovem e jovem com prolongamento.....	66

Artigo 2

Tabela 1	Composição centesimal da dieta oferecida durante o tratamento experimental.....	92
Tabela 2	Análises bioquímicas séricas de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.....	93
Tabela 3	Atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.....	94
Tabela 4	Produção de óxido nítrico (ON) no hipocampo de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.....	95

Lista de abreviaturas e siglas

AOAC	Association of Analytical Communities
APOA-1	Apoproteína A-1
APOB	Apoproteína B
C	Controle
CA	Controle adulto
CJ	Controle jovem
CJ12	Controle jovem 12 semanas de tratamento
CA12	Controle adulto 12 semanas de tratamento
CJ16	Controle jovem 16 semanas de tratamento
CAT	Catalase
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
DCF	Diclorofluoresceína
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HDL	High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
LDL-ox	LDL oxidado
MDA	Malonaldeído
NO ₃	Nitrato
NO ₂	Nitrito
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
ON	Óxido nítrico
PC	Peso corporal
PON1	Paraoxonase 1
PT	Proteínas totais
RCJ12	Restrição calórica jovem 12 semanas de tratamento

RCA12	Restrição calórica adulto 12 semanas de tratamento
RCJ16	Restrição calórica jovem 16 semanas de tratamento
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triacilgliceróis
VLDL	Very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)

Sumário

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. PROJETO DE PESQUISA	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
4. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO	43
5. ARTIGO 1: Restrição calórica moderada: efeito no risco cardiovascular associado ao perfil lipídico e atividade arilesterase da paraoxonase 1 em ratos wistar adultos e jovens	45
6. ARTIGO 2: Efeito diferencial da restrição calórica moderada em parâmetros basais redox do hipocampo de ratos wistar	72
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS	104
Apêndices	113
Anexos	115

1 Introdução geral

A restrição calórica (RC), redução na ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem má-nutrição é uma das formas de intervenção nutricional amplamente discutida para estender o tempo de vida em várias espécies, inclusive mamíferos (Trepanowski et al., 2011; Roth e Polotski, 2012).

Estudos em modelos animais têm demonstrado que a RC diminui ou previne a progressão de doenças relacionadas à idade, dentre as quais diabetes (He et al., 2012), câncer (Klebanov, 2007) e as doenças cardiovasculares (Weiss e Fontana, 2011). Além disso, a RC diminui a neurodegeneração, previne a perda neuronal, assim como uma variedade de doenças neurodegenerativas que estão associadas à idade (Levenson e Rich, 2007).

O estresse oxidativo, desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, está associado ao processo de envelhecimento e a doenças como as cardiovasculares (Halliwell & Gutteridge, 2006; Valko, 2007). Estudos mostram que a RC é capaz de atenuar os danos oxidativos por meio de ações como inibição da produção intracelular de ERO e aumento de defesas antioxidantes (Yu 2005a; Yu 2005b).

A modulação do estresse oxidativo promovida pela RC associa-se a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV). Além disso, a RC diminui fatores de risco cardiovascular (CV), com redução de triacilgliceróis (TG) e aumento do HDL (Cruzen e Colman, 2009). Contudo, os benefícios da RC sobre a redução do colesterol total (CT) e do LDL mostram-se dependentes da idade de início e do protocolo de intervenção utilizado (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b). Atualmente, a razão de apolipoproteínas aterogênicas/antiaterogênicas e a identificação das diferentes partículas de LDL e HDL têm sido indicadas como medidas adicionais de risco CV. Entretanto, são escassos os estudos que abordam o efeito da RC sobre esses parâmetros.

Nesse contexto, uma importante enzima antiaterogênica e anti-inflamatória associada ao HDL, a paraoxonase 1 (PON1), tem sido investigada quanto a seu papel na redução do risco CV e seu comportamento frente à RC. A ação antiaterogênica conferida ao HDL é, em parte, atribuída a PON1, uma esterase sintetizada e secretada no fígado, unida às apolipoproteínas AI e J (apo A-I e apo-J) das partículas de HDL (Deakin & James, 2004; NG et al, 2008). Estudos têm

demonstrado que a RC relaciona-se a diminuição da atividade sérica da enzima (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b; Skrha, 2009).

O excesso de ERO, que ocorre com o avançar da idade, provoca danos a lipídios, proteínas e DNA e está associado a inúmeras doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006). O hipocampo é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo que ocorre durante o envelhecimento devido à capacidade reduzida dos neurônios em manter a homeostase redox (Serrano e Klann, 2004). Uma vez que o hipocampo está envolvido na aprendizagem e na memória (Morris, 2006), o dano oxidativo a esta área do cérebro pode causar prejuízos nas funções cognitivas (Serrano e Klann, 2004). A manutenção equilibrada do estado redox em neurônios do hipocampo é, portanto, importante na prevenção do declínio cognitivo durante o envelhecimento.

A fim de se proteger de danos ocasionados pelas ERO, o organismo conta com uma série de mecanismos de defesa. Dentre os mais importantes estão, por exemplo, os antioxidantes, glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α – tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides, bem como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e paraoxonase 1 (PON1). Estes mecanismos de defesa antioxidantes podem ser regulados de acordo com a produção de espécies reativas e a peroxidação lipídica (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b; Valko et al., 2007). No entanto, apesar de protegerem as células contra o excesso de ERO, essas defesas não são completamente eficazes na prevenção dos danos relacionados com o envelhecimento. Estudos têm demonstrado que o aumento do dano oxidativo no encéfalo é devido ao aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e diminuição nos níveis de GSH e enzimas antioxidantes (Dröge e Schipper, 2007).

A maioria dos estudos avalia os efeitos benéficos da RC em animais adultos e idosos e ainda existe questionamento se a RC iniciada em ratos adultos e jovens, assim como sua ampliação nos jovens, possa ocasionar benefícios diferenciais.

2 Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos



Projeto de Dissertação

Restrição calórica: Efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no estado
nutricional de ratos *Wistar*

Cristiane Pereira – Mestranda

Elizabeth Helbig – Orientadora

Sandra Costa Valle – Co-orientadora

Renata Torres Abib – Co-orientadora

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (Registro nº 9827).

Cadastro no COCEPE – 23110.009827/2012-89

Pelotas, 2012

Sumário

2.1 INTRODUÇÃO.....	16
2.1.1 HIPÓTESES.....	18
2.1.2 OBJETIVOS.....	19
2.1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.2. 1 MATERIAIS.....	20
2.2.1.1 MODELO BIOLÓGICO.....	20
2.2.1.2 DIETA.....	20
2.2.2 MÉTODOS.....	20
2.2.2.1 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS...20	20
2.2.2.2 AVALIAÇÕES.....	23
2.2.2.2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	23
2.2.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DA DIETA.....	23
2.2.2.2.3 DETERMINAÇÃO E MONITORAMENTO DO GANHO DE PESO.....	23
2.2.2.2.4 ESQUIVA INIBITÓRIA.....	24
2.2.2.2.5 RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	24
2.2.2.2.6 DOSAGENS SÉRICAS.....	25
2.2.2.2.7 DETERMINAÇÃO DA CATALASE.....	26
2.2.2.2.8 DETERMINAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	26
2.2.2.2.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	26
2.2.2.2.10 DANO OXIDATIVO DE LIPÍDIOS.....	27
2.2.2.2.11 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	27
2.2.2.2.12 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA.....	27
2.2.2.2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
2.3 PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE ATIVIDADES PARA A EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA.....	29
2.4 ORÇAMENTO.....	30

2.1 Introdução

A restrição calórica (RC), redução na ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem má-nutrição é uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para estender o tempo de vida em várias espécies, inclusive mamíferos (Trepanowski, Canale, Marshall, Kabir & Bloomer, 2011; Roth, 2012).

O primeiro estudo que utilizou uma dieta de restrição calórica foi realizado em 1935 em ratos e demonstrou que a RC, quando implementada após a puberdade, aumenta a expectativa média e máxima de vida, além de prevenir ou atenuar a severidade de doenças crônicas (McCay, Crowell & Maynard, 1935).

Desde então, os possíveis benefícios da dieta de RC têm sido investigados sendo preconizado pela maioria dos estudos uma restrição de 20 a 40% da densidade energética consumida ao longo de 24 horas, com a garantia da ingestão adequada de todos os nutrientes (Cantó & Auwerx, 2009; Trepanowski, Canale, Marshall, Kabir & Bloomer, 2011).

O mecanismo biológico responsável pelo efeito da RC na longevidade ainda é desconhecido, mas, algumas hipóteses têm sido propostas: hipótese da redução da gordura corporal e sinalização da insulina e hipótese da redução da produção de espécies reativas de oxigênio e atenuação dos danos oxidativos (Masoro, 2005).

Estudos têm demonstrado associação entre a RC e o prolongamento da vida de muitas espécies como leveduras, vermes, moscas, roedores e macacos (Fontana, Partridge & Longo, 2010) e à menor incidência de doenças relacionadas à idade incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, câncer e demência em roedores, primatas não humanos e humanos (Colman et al, 2009; Fontana, Partridge & Longo, 2010; Trepanowski, Canale, Marshall, Kabir & Bloomer, 2011). Além disso, a RC diminui a neurodegeneração, previne a perda neuronal, assim como uma variedade de doenças neurodegenerativas que estão associadas à idade (Levenson & Rich 2007).

O encéfalo é propenso a danos oxidativos uma vez que apresenta uma maior captação de O₂ em relação a outros órgãos/tecidos, tem uma menor atividade antioxidante enzimática e contém grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, os quais são alvos de peroxidação (Halliwell, 2006b). O hipocampo, portanto, estrutura que desempenha um papel crucial na aprendizagem e memória

(Izquierdo & Medina, 1997) e que está envolvido na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo et al, 1998), também é afetado por tais processos.

Estudos têm demonstrado que a RC é suficiente para induzir a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Lee et al., 2002), aumentar a plasticidade sináptica em ratos em envelhecimento (Fontan-Lozano et al, 2008), modular funções astrocíticas por meio do aumento na captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase (Ribeiro et al, 2009; Santin et al, 2011) e proporcionar menores déficits no aprendizado e na coordenação motora relacionados com o envelhecimento (Mattson & Magnus, 2006).

Ribeiro et al (2012) demonstraram que, em ratos adultos, a RC induz modulação no hipocampo e córtex resultando em mudanças metabólicas que, por sua vez, melhoram o estado basal de parâmetros importantes de defesa celular, tais como aumento no conteúdo de glutatona e diminuição no dano ao DNA.

Apesar dos grandes avanços já obtidos nas pesquisas direcionadas para o esclarecimento dos mecanismos de ação que proporcionam o aumento da expectativa máxima de vida com a administração da restrição calórica, muito ainda precisa ser estudado, principalmente no que tange à ação da restrição calórica no Sistema Nervoso Central (SNC). Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos da RC quando iniciada logo após o período de amamentação, se são mantidos com o passar do tempo ou se, proporcionam maiores benefícios do que quando iniciada em uma idade posterior, como a adulta.

2.1.1 Hipóteses

Os ratos submetidos à RC não apresentarão alterações em seu estado nutricional.

No hipocampo, a produção de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação estarão diminuídas e os níveis de glutathione e de enzimas antioxidantes estarão aumentadas.

A capacidade de aprendizado e memória serão maiores nos animais submetidos à RC comparado ao controle.

Os ratos submetidos a um maior tempo de RC terão maiores benefícios nos parâmetros avaliados.

A exposição de ratos jovens a RC mostrará maiores benefícios nos parâmetros avaliados comparada a RC iniciada na idade adulta.

2.1.2 Objetivos

2.1.2.1 Objetivo geral

Avaliar em ratos *Wistar* machos em diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes tempos de tratamento o efeito neuroprotetor da restrição calórica.

2.1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o estado nutricional e metabólico: dosagem em soro de proteínas totais, albumina, glicose, creatinina, uréia e triacilgliceróis;
- b) Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo: enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase), produção de espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação, além de óxido nítrico e glutathione (GSH);
- c) Avaliar os parâmetros comportamentais aprendizado e memória: teste da esQUIVA inibitória e de reconhecimento de objetos.

2. 2 Materiais e Métodos

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Modelo Biológico

No estudo serão utilizados 48 ratos machos (*Rattus Novergicus*) da linhagem *Wistar/UFPel*, 32 animais com 25 dias de idade (imediatamente após o desmame), e 16 animais adultos, com 55 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

2.2.1.2 Dieta

A dieta utilizada será a ração padrão para roedores marca Nuvilab.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Composição dos Grupos Experimentais e Procedimentos

O experimento será conduzido num total de 119 dias, sendo os 5 primeiros destinados à adaptação dos animais ao ambiente e ao controle do consumo da dieta. De modo a evitar eventual estresse aos animais e de acordo com as recomendações a este modelo experimental (Ribeiro et al, 2009; Santin et al 2011), a restrição calórica será progressiva. Na primeira semana a restrição calórica será de 10%, na segunda, 20% e a partir da terceira até o final do experimento, 30%. O percentual da RC da primeira semana será calculado a partir da média de consumo alimentar dos animais nos 5 dias de adaptação; após, a média do consumo alimentar do grupo controle será recalculada semanalmente e, a partir deste valor, será efetuada a RC na semana posterior ao cálculo.

Serão utilizados 48 animais divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais com 8 animais cada um e seus respectivos controles, conforme apresentado seguir:

Grupo dieta restrição calórica 30 (GRC30): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 30 dias de vida e terão 84 dias de tratamento.

Receberão ração marca Nuvilab e serão submetidos à restrição calórica progressiva de 10 a 30%, água será oferecida *ad libitum*.

Grupo dieta restrição calórica 30+ (GRC30+): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 30 dias de vida e terão 114 dias de tratamento. Receberão ração marca Nuvilab e serão submetidos à restrição calórica progressiva de 10 a 30%, água será oferecida *ad libitum*.

Grupo dieta restrição calórica 60 (GRC60): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 60 dias de vida e terão 84 dias de tratamento. Receberão ração marca Nuvilab e serão submetidos à restrição calórica progressiva de 10 a 30%, água será oferecida *ad libitum*.

Grupo controle 30 (GC30): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 30 dias de vida e terão 84 dias de tratamento. Receberão ração marca Nuvilab e água *ad libitum*.

Grupo controle 30+ (GC30+): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 30 dias de vida e terão 114 dias de tratamento. Receberão ração marca Nuvilab e água *ad libitum*.

Grupo controle 60 (GC60): será composto por 8 animais os quais iniciarão o tratamento com 60 dias de vida e terão 84 dias de tratamento. Receberão ração marca Nuvilab e água *ad libitum*.

Os animais serão mantidos em gabinetes ventilados, em gaiolas metabólicas individuais, com as seguintes características: medidas 27x19x20cm, produzida em arame de aço Inox Aisi 304 com polimento eletrostático, com pés de 35 cm de altura; comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL, rolha de borracha anti-ácida e bico de aço inoxidável, curvo; com funil para recepção das fezes e becker para coleta de urina (Modelo MA122 - Marca Beiramar).

O ensaio biológico será desenvolvido no Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPel, com temperatura e umidade relativa de 22-24°C e 65-75%, respectivamente, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Antes do início do período experimental os modelos biológicos serão adaptados ao ambiente e ao controle do consumo da dieta durante 5 dias.

A eutanásia ocorrerá em dois períodos: 32 animais serão eutanasiados no 84º dia de tratamento (um grupo que iniciou o experimento com 25 dias de vida e outro que iniciou o experimento com 55 dias de vida) e 16 aos 114º dia de tratamento (um

grupo que iniciou o experimento com 25 dias de vida), sempre 8 animais do grupo controle e 8 do grupo submetido à restrição calórica (Figura 1).

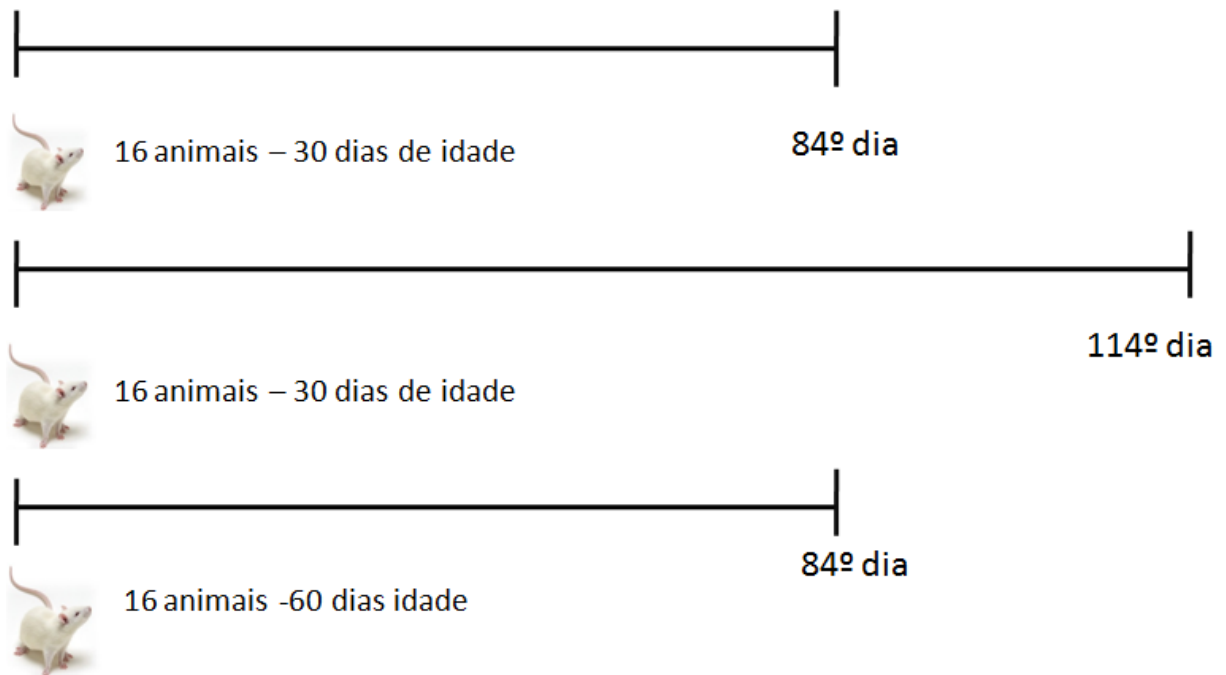


Figura 1 – Delineamento experimental do estudo

Previamente à eutanásia, os ratos serão deixados em jejum de 12 horas (ração e água) durante a noite, e em seguida submetidos ao procedimento de decapitação conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de junho de 2002, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004). O sangue será coletado no momento da decapitação e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos em centrífuga modelo Eppendorf/Centrifuge 5415, para se obter o soro, este será transferido para Eppendorfs e congelado a -20°C até o momento das análises. O encéfalo será removido, as estruturas dissecadas e colocadas em solução tampão salina/fosfato (PBS) em pH 7,4, pesadas e colocadas em frascos Eppendorf e congeladas a -70 °C em nitrogênio líquido até o momento das dosagens. Antes da realização das análises, imediatamente após o descongelamento, o hipocampo será cortado em cortes transversais de 0.3 mm por meio do Mcllwain Tissue Chopper, A estrutura será mantida em solução tampão salina/fosfato (PBS) em pH 7,4.

2.2.2.2 Avaliações

2.2.2.2.1 Composição centesimal das dietas experimentais

A composição centesimal será determinada em amostras das dietas experimentais, segundo os respectivos procedimentos: Umidade: Pearson (1976); Proteínas: AOAC (1995), utilizando 6,25 como fator de conversão de nitrogênio para proteína; Lipídeos: Bligh & Dyer (2009); Cinzas: Lees (1979); Fibra Bruta: Angelucci et al. (1987); Os teores de carboidrato serão determinados através do cálculo de diferença centesimal dos constituintes da amostra, ou seja: $100 - (\% \text{umidade} + \% \text{proteína bruta} + \% \text{lipídios totais} + \% \text{fibra bruta} + \% \text{cinzas})$, sendo os resultados expressos em % de carboidratos, e o valor calórico será determinado a partir da soma do produto da multiplicação, dos valores de: proteína, gordura e carboidrato, por 4, 9 e 4 kcal/g respectivamente, segundo RDC nº 40/01 (BRASIL, 2001).

2.2.2.2.2 Determinação do Consumo de Dieta

A ingestão alimentar será monitorada diariamente em balança eletrônica e será calculada pela diferença em gramas entre a quantidade ofertada e a quantidade restante no dia seguinte, e os dados anotados em planilhas de controle.

2.2.2.2.3 Determinação e Monitoramento do Ganho de Peso

Todos os animais serão pesados, em balança eletrônica, semanalmente, para determinação do ganho e/ou perda de peso. Os dados serão anotados em planilhas de controle. O peso final de cada animal será subtraído do peso do inicial, sendo o resultado considerado a alteração de peso do animal. Será realizado um monitoramento semanal do ganho e/ou perda de peso a fim de acompanhar a evolução de peso dos animais.

2.2.2.2.4 Esquiva inibitória

Será utilizado o método de Netto e Izquierdo (1985) e será realizado em 79°/109° dias de tratamento. O equipamento da esquiva inibitória consiste em uma caixa de condicionamento automatizada, medindo 40X25X25 cm, o assoalho é constituído de uma grade de barras de bronze paralelas com 1 mm de diâmetro comum espaço de 1 cm entre as barras onde é possível aplicar uma diferença de potencial elétrico variável. A caixa contém uma plataforma de madeira compensada revestida por fórmica.

O método consiste em duas etapas, uma etapa de treino e uma etapa de teste que será realizada 24 horas depois do treinamento. Na etapa de treino o animal é colocado gentilmente sob a plataforma do equipamento, e é medido o tempo que o animal leva para descer da plataforma e colocar as quatro patas sob a grade abaixo da plataforma. A seguir o animal recebe descargas elétricas intermitentes de 0,7 mA por 5 segundos. Na etapa de teste, o animal é colocado sobre a plataforma e é medido o tempo que ele permanece sob a plataforma, com um limite máximo de 180 segundos. Nessa etapa os animais não recebem descargas elétricas se descenderem da plataforma. A diferença entre os tempos de permanência sobre a plataforma nas duas etapas é tomada como uma medida de memória.

O teste da esquiva inibitória reflete o tipo de memória emocional, que é formada no dia-a-dia, e que nenhum outro teste é capaz de reproduzir. O choque, não causa dano físico aos animais, pois é, somente, um sinal de advertência. Com o choque o animal entende que determinado local é de acesso proibido e evita retornar ao mesmo. Esse tipo de memória é de fixação rápida, fielmente reproduzível e aceita no meio científico. Além disso, esse tipo de experimento tem base etológica sendo vivenciada por qualquer animal (experimental ou selvagem) quando enfrenta outra espécie (predadora ou não) (Silva, 2012).

2.2.2.2.5 Reconhecimento de objetos

O método utilizado seguirá a proposta de Deschaux, Bizot e Goyffon (1997). No 79°/109° dias do tratamento os animais serão colocados em uma caixa de madeira de tamanho 40X50 cm e com altura de 50 cm, com uma parede de vidro

frontal, que estará localizada em uma sala com baixa iluminação. Os animais terão dois minutos para habituação ao ambiente, o qual estará sem objetos. 24 horas após o período de exploração ocorrerá o treinamento, durante 5 minutos, no qual os animais serão colocados individualmente na caixa contendo dois objetos idênticos (A 1 e A 2 brinquedos Lego) posicionados em cantos opostos a 10 cm das paredes.

A exploração será definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz ou patas dianteiras. A sessão de teste ocorrerá 24 horas após o treinamento, em que os ratos poderão explorar a caixa por 5 minutos na presença de um objeto já conhecido (A) e um objeto novo (B). Todos objetos utilizados possuirão tamanho, cor e textura semelhantes, porém formas distintas. Após o treinamento e teste os objetos serão limpos com etanol 10% para descartar cheiros ou resíduos. O índice de reconhecimento será calculado para cada animal segundo Lima et al (2005) que é expresso pela taxa de $TB / (TA + TB)$ [TA= tempo em explorar o objeto familiar A; TB= Tempo gasto na exploração do novo objeto B].

2.2.2.2.6 Dosagens Séricas

As proteínas totais serão determinadas de acordo com o método reativo de biureto descrito por Wolfson et al. (1948) e a albumina será dosada por meio de método colorimétrico, com utilização de verde de bromocresol, conforme descrito por Doumas, Watson e Biggs (1971). A glicose sérica será determinada utilizando-se monitor com tiras de teste para determinação da glicemia (glicosímetro) por fotômetro de refletância da marca *Accu-Chek®*, Laboratório Roche Diagnósticos, Alemanha. A creatinina será quantificada por meio de kit comercial enzimático marca Bioclin (teste UV) e a ureia por meio de kit comercial enzimático marca Bioclin (teste UV). Os triacilgliceróis séricos serão determinados segundo método descrito por Haug & Hostimark (1987) e quantificados por sistema enzimático (lípase, glicerolquinase, glicerol 3-fosfato oxidase e peroxidase Labtest Diagnóstica® (GPO-ANA cat. 59-4/50). Os resultados serão expressos em mg/dL.

2.2.2.2.7 Determinação da Catalase

A atividade da CAT será determinada conforme descrito por Aebi (1984) que se baseia no acompanhamento da decomposição de H_2O_2 determinada espectrofotometricamente a 240 nm. As amostras do hipocampo homogeneizado serão incubadas em um tampão específico na presença de peróxido de hidrogênio. Serão centrifugadas 300 μL de amostra, acrescentando-se 1 mL de tampão fosfato 14 mM com H_2O_2 (40 μL) a 100 μL do sobrenadante. Absorbância será monitorada por 60 segundos em 240 nm. Os resultados serão expressos em unidades de atividade de catalase por mg de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 por minuto por mg de proteína).

2.2.2.2.8 Determinação da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD será determinada por meio do método descrito por Klamt et al. (2002), quantificada em 60 μg das amostras do hipocampo homogeneizado, as quais serão incubadas em 35 μL de tampão específico (pH=5,5) na presença de adrenalina a 37°C. A absorbância será monitorada por 60s em 480 nm pela taxa de inibição da reação auto-catalítica adrenocromo, em solução tampão contendo 1 mM de Madrenaline/50 glicina-NaOH (pH=10.2) / 1 mM catalase. O resultado será expresso em U SOD.mg de proteína-1 (uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%).

2.2.2.2.9 Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção intracelular de ERO será detectada usando um composto celular permeável não fluorescente, 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). As amostras homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio, pH 7,4 com 140 mM de KCl serão tratadas com DCF-DA (10 μM) durante 30 min a 37° C. A fluorescência será medida em leitor (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm, como descrito por LeBel & Bondy (1992),

com adaptações para análise em fatias de tecido. Os valores serão obtidos como unidade de fluorescência/mg de proteína e são expressos como percentagem de controle.

2.2.2.2.10 Dano Oxidativo de Lipídios

A formação de malonaldeído (MDA), um índice de peroxidação lipídica, será avaliada pela quantificação com o ácido tiobarbitúrico com espécies reativas (TBARS), segundo descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990). A amostra de hipocampo será incubada com 600 µL de TCA 10%, depois de centrifugado (10.000×g; 10 min), onde será removido 500 µL do sobrenadante que será incubado com 500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (TBA). Após, a amostra será aquecida em banho de água fervente por 15 minutos. Será determinada a absorbância em 532 nm. Os resultados serão expressos em nmol TMP.mg⁻¹ proteína.

2.2.2.2.11 Produção de Óxido Nítrico

Metabólitos do óxido nítrico (NO), nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂) serão determinados de acordo com Hevel & Marletta (1994). De modo resumido, homogenatos de fatias do hipocampo serão misturados com 25% de tricloroacético (TCA) e centrifugados a 1800 g por 10 min. O sobrenadante será imediatamente neutralizado com 2 M de bicarbonato de potássio. NO₃ será reduzido a NO₂ pela nitrato redutase. O total de NO₂ na incubação será medido por análise colorimétrica a 540 nm, com base na reação de Griess. Uma curva padrão será realizada usando nitrato de sódio (0-80 µM). Os resultados serão expressos como µmolar de nitrito/MG proteína.

2.2.2.2.12 Determinação da Glutationa (GSH)

O conteúdo de glutathione será determinado conforme o método descrito por Browne (1998). As fatias do hipocampo serão homogeneizadas em um tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) contendo 5 mM EDTA e a proteína será precipitada com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante será analisado com o-ftaldialdeído (1mg/mL de metanol) à temperatura ambiente durante 15 segundos. A

fluorescência será medida utilizando excitação e emissão de comprimentos de onda de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração será realizada com soluções padrão de glutathione (0-500 μ M). As concentrações de GSH serão expressas como nmol / mg de proteína.

2.2.2.2.13 Análise Estatística

Os dados que tiverem distribuição normal serão analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% para comparação das médias, através do programa STATISTICA versão 7.0 (STATISTICA, 2004).

2.3 Plano de trabalho e cronograma de atividades para execução do projeto de pesquisa

Quadro 1 - Plano de trabalho e cronograma de atividades

ATIVIDADES	SEMESTRE							
	1º/2012		2º/2012		1º/2013		2º/2013	
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Padronização de técnicas			X	X				
Desenvolvimento do ensaio biológico					X	X		
Análises comportamentais					X	X		
Análises físico – químicas/bioquímicas					X	X	X	
Análise dos resultados e tratamento estatístico					X	X	X	
Redação de trabalho para congressos e artigos						X	X	X
Confecção da dissertação							X	X

2.4 Orçamento

Quadro 2 - Orçamento

Item	Unid	Quant	Descrição do item	Valor unit.	Valor total
1	Pct	1	Papel filtro 7cm pct c/100	3,00	3,00
2	Pct	1	Papel filtro 9cm pct c/100	5,00	5,00
3	Pct	1	Papel filtro 12,5cm pct c/100	9,00	9,00
4	Pct	1	Papel filtro 15cm pct c/100	9,00	9,00
5	Pct	1	Papel filtro 40x40cm pctc c/100	40,00	40,00
6	Pct	1	Papel filtro 50x50cm pctc c/100	50,00	50,00
7	Cx	5	Luva de látex tam P cx /100	26,00	130,00
8	Cx	5	Luva de látex tam M cx /100	26,00	130,00
9	Rl	2	Algodão rl c/500g	22,00	44,00
10	Pct	1	Tubo falcon 50ml pct c/50	39,00	39,00
11	Pct	1	Pipeta pasteur de plástico 3ml,não estéril,pct c/500	89,00	89,00
12	Cx	1	Lâmina p/bisturi nº 10,11,12,15,21,22,23,24 cx c/100	38,00	38,00
13	Pct	1	Eppendorf 1,5ml marca Cralplast pct c/1000	39,00	39,00
14	Fr	1	Cloreto de sódio 500g	8,00	8,00
15	Fr	1	Fosfato de sódio mono 500g	28,00	28,00
16	Fr	1	Fosfato de sódio biba anidro 500g	39,80	39,80
17	Cx	1	Tiras reagente p/glicosímetro ACCU-CHEK marca Roche 25 tiras	180,00	180,00
18	Kit	1	Uréia enzimática marca Bioclin 500ml	229,00	229,00
19	Kit	1	Creatinina colorimétrica marca Bioclin 200ml	120,00	120,00
20	Kit	1	Triglicerídios enzimático, marca Bioclin 200 ml	410,00	410,00
21	Kit	1	Albumina (método bromocresol) marca Analisa 250ml	128,00	128,00
22	Kit	1	Proteína total (método biureto) marca Analisa 250ml	150,00	150,00
23	Kit	1	Catalase marca Sigma 10mg	890,00	890,00
24	Fr	1	Superóxido Dismutase marca Sigma	990,00	990,00

25	Fr	1	Papel toalha (pardo) pct c/500	22,00	22,00
26	Um	48	Ratos (<i>Rattus Novergicus</i>) linhagem <i>Wistar/UFPeI</i>	10,00	480,00
Total					4.299,80

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Mais de 90% do oxigênio que ingressa nas células é usado para a produção mitocondrial de 80% da adenosina trifosfato (ATP) necessária pelas células humanas. Durante este processo, quatro elétrons são adicionados a cada molécula de oxigênio, resultando na formação de duas moléculas de água (Friedman 2011). No entanto, parte dos elétrons desvia da rota e reduz cerca de 20% do oxigênio presente nas células, ou seja, estes recebem somente um elétron e se tornam radicais livres ou espécies reativas (Friedman 2011).

O radical livre é uma estrutura química que possui um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, ocupando orbitais atômicos ou moleculares sozinhos. Isso o torna instável, reativo e com enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas, levando a oxidação de proteínas, lipídios e DNA (Halliwell, & Gutteridge, 2006; Valko et al, 2007).

Há muitos tipos de radicais livres, tais como de oxigênio, nitrogênio, cloro e bromo e muitos termos têm sido utilizados na literatura para descrevê-los. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2006), em relação aos radicais de oxigênio, a terminologia mais correta é a de espécies reativas de oxigênio (ERO), um descritor coletivo que não engloba apenas os radicais de oxigênio, como também alguns derivados não radicais de O_2 , como H_2O_2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio

Radicais	Não Radicais
Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)
Radical Hidroxila ($OH^{\cdot}$)	Ac. Hipocloroso ($HOCl$)
Radical Peroxil ($RO_2^{\cdot}$)	Ozônio (O_3)
Radical Alcoxil ($RO^{\cdot}$)	Oxigênio Singlet ($O_2^1\Delta_g$)
Hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$)	Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)

Fonte: Halliwell, 2006a.

A maioria das ERO, bem como as demais espécies reativas, são produzidas como subprodutos do metabolismo celular, tendo como locais principais de produção a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo enzimático citocromo P-450 e as células fagocíticas (Gemma, 2007).

A produção de ERO é, portanto, parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. Estas espécies podem desempenhar importantes funções biológicas, como na defesa contra agentes infecciosos, na coordenação de respostas inflamatórias e na indução celular a apoptose - tendo ação anti-tumorigênica. No entanto, o excesso de ERO pode ocasionar efeitos extremamente deletérios ao organismo, estado já bem estabelecido na literatura o seu envolvimento em patologias como câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e no envelhecimento (Halliwell & Gutteridge, 2006; Valko, 2007).

O termo “estresse oxidativo” refere-se a um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes. Sies (1991) o define como “um distúrbio no balanço pró-oxidante-antioxidante, em favor do pró, que leva ao dano”, Halliwell & Whiteman (2004) o entendem como “Dano biomolecular causado pelo ataque de espécies reativas contra constituintes do organismo vivo”. O aumento nos danos oxidativos pode resultar não somente de um estresse oxidativo maior, mas também de falhas no reparo ou na substituição de biomoléculas danificadas. Pode ser resultado da diminuição dos níveis de antioxidantes, por exemplo, da diminuição nos níveis de MnSOD (superóxido dismutase dependente de manganês), como também da depleção de antioxidantes provenientes da dieta e de outros constituintes dietéticos - cobre, ferro, zinco e magnésio (Halliwell, 2006a).

O encéfalo é particularmente vulnerável aos danos oxidativos, devido ao seu alto consumo de oxigênio, elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados oxidáveis, e pela presença de metais redox ativos (Cobre, Ferro). O estresse oxidativo aumenta com a idade e, portanto, pode ser considerado um importante fator na causa de várias doenças neurodegenerativas, típicas de indivíduos idosos (Valko, 2007).

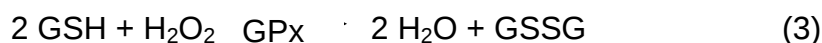
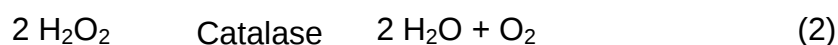
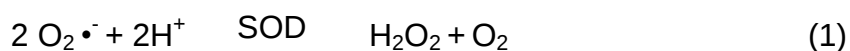
3.2 Enzimas antioxidantes

A fim de se proteger de danos ocasionados por ERO, as células desenvolveram uma série de mecanismos de defesa. Dentre os mais importantes estão, por exemplo, os antioxidantes, glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α – tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides, bem como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Valko, 2007).

O sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular. A enzima SOD existe em duas formas Cu/Zn SOD, presente no citosol (dimérica), lisossomos, núcleo e no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e, a MnSOD, encontrada nas mitocôndrias. Esta enzima é responsável por catalizar a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 (Equação 1) (Vasconcelos, 2007).

A CAT, enzima que contém grupo heme em seu sítio ativo está enclausurada nos peroxissomos - organelas responsáveis pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. Esta enzima atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O (Equação 2) (Vasconcelos, 2007).

Glutathione Peroxidase (GPx) é o nome genérico dado a uma família de isoenzimas que integram o grupo de selenoproteínas, as quais apresentam selênio (Se) em seu sítio ativo (Vasconcelos, 2007). Há pelo menos quatro tipos distintos de GPx: a GPx 1, encontrada nos eritrócitos, pulmões, fígado e rins; GPx 2, no trato gastrointestinal; GPx 3, presente em diferentes órgãos como pulmões, rins, placenta, vesícula seminal e coração e, GPx 4, também amplamente distribuída nos diferentes tecidos. As GPx convertem H_2O_2 a água ou álcool usando a glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons (Equação 3) (Margis, 2008).



3.3 Glutathiona (GSH)

O antioxidante GSH é o principal tiol presente no encéfalo e o mais importante tampão redox celular (Reynolds et al., 2007). É um tripeptídeo (Glicina-Cisteína-Glutamato) que pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) (Figura 2). Na forma oxidada, as moléculas são unidas por uma ligação dissulfeto entre os grupos tiol das cisteínas (Halliwell, 2006a). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (Valko, 2007).

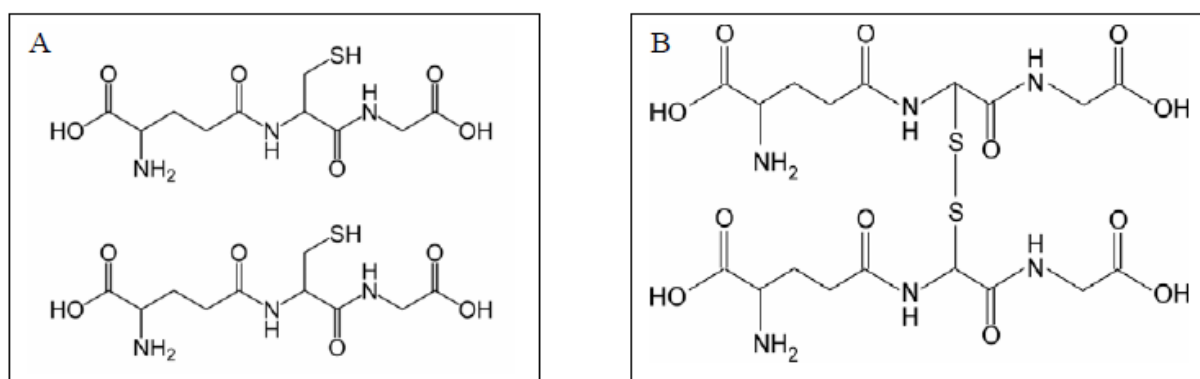


Figura 2 - Estrutura de duas moléculas de glutathiona (A) na forma reduzida (GSH) e (B) na forma oxidada (GSSG).

Fonte: RIBEIRO, 2009, p. 19.

No SNC, os astrócitos secretam GSH, contribuindo para diminuir a produção de ERO. Além disso, estas células fornecem os precursores para a síntese de GSH neuronal, cuja redução tem sido relacionada à morte celular em muitas doenças neurodegenerativas (Dringen 2003). Um sistema GSH comprometido tem sido associado ao estresse oxidativo que ocorre em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Cacciatore, 2012).

3.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um radical livre gerado a partir do aminoácido arginina na reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase. O NO atua em mecanismos de sinalização celular em uma ampla variedade de processos como na regulação da

pressão arterial, relaxamento de músculos lisos, mecanismos de defesa, regulação imune e neurotransmissão. Existem três isoformas da óxido nítrico sintase: a neuronal, a endotelial e a induzível (Valko, 2007; Vasconcelos, 2007). No entanto, na presença do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) forma o peroxinitrito ($ONOO^-$) (equação 4) o qual é rapidamente protonado formando o ácido peroxinitroso, potente agente oxidante, causador de danos a lipídios, proteínas e DNA (Halliwell, 2006a). Este também pode sofrer fissão hemolítica e dar origem a outros produtos nocivos (equação 5).



3.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um processo que se inicia a partir de uma cascata de reações e formação de peróxido lipídico. A reação inicia-se quando um lipídio insaturado reage com um $OH^{\bullet}$, gerando um radical lipídico o qual pode reagir com o oxigênio e formar um radical lipídico peroxil. Este radical, por sua vez, reage com um lipídio insaturado formando um lipídio peroxidado e mais um radical lipídico (Figura 3). Este processo gera vários produtos, dentre os quais se destacam os aldeídos como o malonaldeído (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-hexanal e o 4-hidroxi-2-nonenal (Montine et al, 2002).

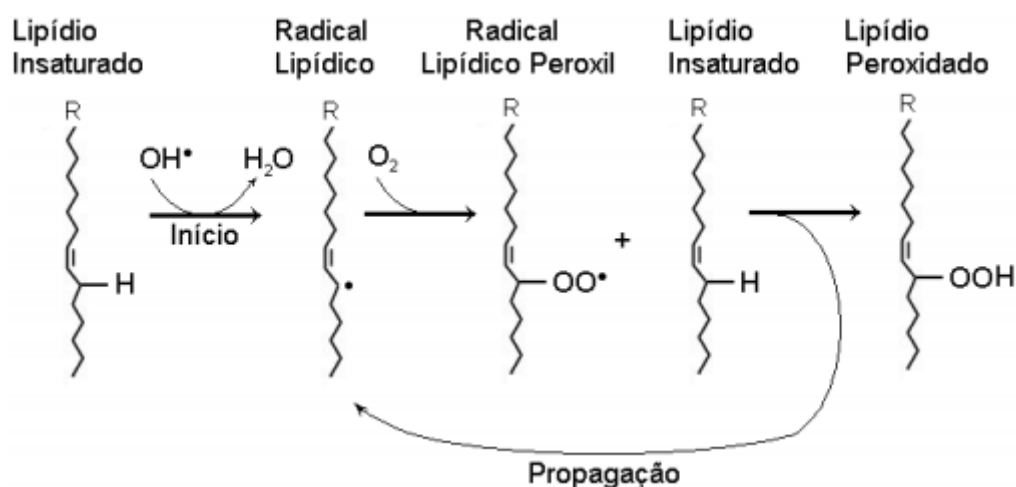


Figura 3 - Reação da cascata de peroxidação lipídica

Fonte: ALABARSE, 2011, p. 20.

3.6 Relação entre hipocampo e restrição calórica

O aprendizado e a memória são os mais importantes mecanismos pelos quais o ambiente altera o comportamento dos animais, inclusive seres humanos. O aprendizado é o processo de aquisição de informações provenientes tanto do ambiente quanto de representações introspectivas do ambiente, enquanto memória é o processo por meio do qual essas informações são codificadas e armazenadas, podendo depois, conforme a necessidade, serem decodificadas e lembradas (Silva, 2009).

As memórias podem ser classificadas: 1) quanto ao tempo de retenção de informação armazenada em ultra-rápida, curta e de longa duração ou 2) quanto à natureza de seu conteúdo em declarativa, não declarativa e operacional (Squire e Zola, 1996; Squire e Kandel, 2003).

A memória operacional é um tipo de memória de curto prazo, que dura poucos segundos, cuja função é armazenar as informações somente enquanto uma determinada tarefa está sendo realizada. É desempenhada pelos neurônios do córtex pré-frontal e depende, apenas, da atividade elétrica dos neurônios dessa região (Izquierdo, 2002).

Por outro lado, a memória de longa duração pode durar dias, meses ou até anos, pois a informação é fixada de forma permanente, por meio de um processo denominado consolidação de memória. O mecanismo ocorre por meio da potenciação de longa duração (LTP), que consiste no aumento de respostas pós sinápticas durante horas, dias ou semanas após a breve estimulação repetitiva de aferentes pré-sinápticos e ocorre principalmente no hipocampo (Izquierdo, 2002; Izquierdo et al, 2008). Este é um dos principais mecanismos sinápticos, através dos quais traços de memória são codificados e armazenados no hipocampo, córtex cerebral e em outras regiões do sistema nervoso central (Martin; Grimwood; Morris, 2000).

A região do cérebro em que os mecanismos celulares de consolidação mais têm sido investigados é o sistema hipocampal, devido principalmente ao conhecimento prévio de que este sistema desempenha um papel crucial na consolidação de memórias declarativas em todas as espécies de mamíferos, inclusive humanos (Squire e Zola, 1996).

O hipocampo, portanto, é uma estrutura que desempenha um papel crucial na aprendizagem e memória (Izquierdo & Medina, 1997) e está envolvido na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo et al, 1998). Esta estrutura é altamente vulnerável aos danos oxidativos durante o envelhecimento, devido à reduzida capacidade dos neurônios de manter a homeostase redox (Serrano e Klann, 2004). Uma vez que o hipocampo está envolvido na aprendizagem e na memória (Morris, 2006), o dano oxidativo a esta área do cérebro pode causar prejuízos nas funções cognitivas (Serrano e Klann, 2004). A manutenção de um estado redox normal em neurônios do hipocampo, portanto, é importante na prevenção do declínio cognitivo durante o envelhecimento.

Os danos oxidativos podem resultar de um estresse oxidativo maior como também de falhas no reparo ou na substituição de biomoléculas danificadas. Pode ser resultado da diminuição dos níveis de antioxidantes, por exemplo, da diminuição nos níveis de MnSOD, como também da depleção de antioxidantes provenientes da dieta e de outros constituintes dietéticos - cobre, ferro, zinco e magnésio (Halliwell, 2006a). Do mesmo modo, um maior conteúdo de enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT, GSH, bem como de vitamina C, vitamina E, carotenóides e flavonóides está associado a menores danos oxidativos (Valko, 2007).

A RC, uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para estender o tempo de vida em várias espécies, tem como uma das hipóteses de seu mecanismo de ação a capacidade de redução da produção de ERO e atenuação aos danos oxidativos (Masoro, 2005). Estudos em animais têm demonstrado que a RC aumenta de forma significativa a atividade de enzimas antioxidantes como CAT, SOD, e GPx (Koizumi et al, 1987; Rao et al, 1990; Gomi, et al, 1998). Assim, a RC por meio da supra-regulação de enzimas antioxidantes e dos mecanismos de reparo pode reduzir o estresse oxidativo e os danos aos lipídeos, proteínas e DNA. Ribeiro et al (2012) avaliaram os efeitos da RC no hipocampo e córtex de ratos adultos e evidenciaram que a RC foi capaz de aumentar o conteúdo de glutatona (GSH), diminuir a produção de ERO's e o dano ao DNA bem como de melhorar a performance locomotora dos animais.

A RC também foi relatada por atenuar déficits relacionados com o envelhecimento no desempenho de tarefas de memória e aprendizado dependentes do hipocampo em algumas estirpes de roedores, tais como ratos Fischer 344 X Brown Noruega (F344xBN) (Idrobo et al, 1987; Ingram et al, 1987; Markowska e

Savonenko, 2002; Pitsikas e Algeri, 1992; Pitsikas et al, 1990; Stewart et al, 1989). Esta atenuação sugere que RC modula processos neurobiológicos que auxiliam na cognição e que uma compreensão mais completa do impacto do CR nas bases neuronais da aprendizagem e memória durante o envelhecimento poderia conduzir a terapias para humanos que apresentam perda de memória.

No entanto, pouco se sabe se os efeitos da RC no hipocampo são mantidos com o passar do tempo ou se, caso iniciada em idades anteriores como logo após o período de amamentação, possa proporcionar maiores benefícios do que se iniciada em uma idade posterior, como a adulta.

3.7 Lipoproteínas, risco cardiovascular e Paraoxonase 1 (PON1)

Atualmente tem sido evidenciado que a RC e diferentes padrões dietéticos modulam o processo aterosclerótico, fatores de risco cardiovascular (CV) e fatores protetores, a exemplo da atividade da PON1 (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b; Santos et al., 2013). Estão intimamente associadas às doenças cardiovasculares (DCV) a elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e da fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de uma redução na fração das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Santos et al, 2009). Nesta situação, níveis de colesterol LDL, composto predominantemente por apolipoproteína B (apoB), estão aumentados quando comparados a níveis de HDL, com o componente antiaterogênico apolipoproteína A-I (apoA-I) (Kontush e Chapman, 2006). Assim, uma baixa concentração de HDL circulante é um fator de risco independente para doença arterial coronariana com consequente aumento de eventos mórbidos como acidente vascular cerebral e infarto agudo no miocárdio (SBC, 2007). Por outro lado, uma alta concentração de HDL protege contra o surgimento e o avanço das lesões endoteliais, com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiaterogênico (Schrader e Rimbach, 2011).

As HDL são constituídas por 50% de apoproteínas, A-I em maior quantidade, 20% de colesterol livre e esterificado, 15% de fosfolípidos e 5% de TG (Forti e Diamant, 2006). Quando fracionadas por ultracentrifugação são normalmente separadas em duas principais subfrações: HDL2 (d 1.063–1.125 g/ml) e HDL3 (d 1.125–1.21 g/ml). A separação por eletroforese resulta em cinco sub-populações

distintas de tamanho decrescente: HDL2b, 2a, 3a, 3b e 3c (Kontush e Chapman, 2006; Forti e Diament, 2006).

As partículas de HDL especialmente por possuírem apoA-I, podem mediar o efluxo de colesterol agindo como aceptores primários e assim, facilitar o transporte reverso de colesterol da parede arterial e tecidos periféricos para o fígado. O HDL ainda protege o LDL do dano oxidativo, tem ação anti-inflamatória nas células da parede arterial, além de possuir atividade antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombótica e anti-infecciosa. Estas propriedades antioxidantes do HDL estão atribuídas em grande parte a presença de apolipoproteínas e enzimas associadas, principalmente a apoA-I e a PON1 (Kontush e Chapman, 2006; Dunet et al., 2011).

A PON 1 é uma das enzimas que contribui significativamente com a propriedade antiaterogênica atribuída ao HDL (Schrader e Rimbach, 2011). É uma esterase cálcio-dependente sintetizada principalmente no fígado e circula no plasma exclusivamente ligada ao HDL, contribuindo com suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiaterogênicas ao prevenir o aumento da quantidade de ERO, hidrolisar os peróxidos lipídicos (prevenindo as partículas LDL de sofrer modificação oxidativa), diminuir a suscetibilidade do HDL à peroxidação e aumentar o efluxo de colesterol a partir de macrófagos. Níveis reduzidos de atividade da PON1 podem refletir aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento do risco CV (Durrington et al, 2001).

A PON1 exerce sua atividade enzimática com uma ampla gama de substratos. Originalmente, a enzima foi identificada por hidrolisar organofosfatos. O nome se refere à habilidade da PON1 para degradar paraoxon, o metabólito tóxico do pesticida parathion. Além desta atividade organofosfatase, a enzima exibe ainda atividade arilesterase e lactonase, de acordo com o substrato hidrolisado (Durrington et al, 2001).

A enzima é membro de uma família gênica composta por três genes (PON1, PON2, PON3) localizada no cromossomo humano 7. O gene da PON1 exibe 9exons e consiste de 354 aminoácidos (Primo-Parmo et al., 1996). A PON1 foi a primeira da família a ser descoberta em 1946, no entanto, o interesse pela enzima aumentou quando Mackness e seus colaboradores (2003) realizaram um estudo longitudinal prospectivo e revelaram que uma baixa atividade enzimática é fator de risco independente para eventos coronarianos em homens com alta pré-disponibilidade para DCV devido à doença pré-existente ou outros fatores de risco.

A associação da PON1 com HDL, mais especificamente com a apoA-I, é um pré-requisito para a estabilidade da atividade sérica da enzima. Entretanto, a apoA-I não é necessária para a secreção e ligação da PON1 com o HDL, uma vez que a enzima também pode estar ligada à apoA-II, apoE e apoJ. O HDL é um ótimo receptor fisiológico para a PON1 em termos de estimulação da secreção enzimática e estabilização do peptídeo secretado (Forti e Diament, 2006).

O tamanho e o formato da partícula de HDL parecem ser cruciais para a ligação da PON1. *In vivo*, a enzima se apresenta preferencialmente associada a partículas grandes, porém pode estar junto a partículas pequenas e densas através de ultracentrifugação. Como consequência, as partículas de HDL são heterogêneas quanto sua atividade antioxidante, sendo maior conforme aumenta a densidade: HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c. Portanto, o HDL3 atua de maneira mais potente ao proteger o LDL da oxidação *in vitro* quando comparado ao HDL2 (Kontush e Chapman, 2006).

A atividade anti-inflamatória do HDL é ilustrada por sua capacidade de reduzir a expressão de moléculas de adesão induzida por citocinas em células endoteliais e de inibir a adesão de monócitos a estas células. Esta capacidade está relacionada à presença de apoA-I, apoA-II, apoA-IV, e de espécies moleculares distintas de fosfolípidos. A ação anti-inflamatória também envolve a hidrólise de lípidos oxidados por enzimas associadas ao HDL, especialmente a PON1 (Kontush e Chapman, 2006). Estas enzimas associadas podem estar depletadas ou apresentando alterações funcionais sob condições inflamatórias, em doenças metabólicas que envolvam baixos níveis de HDL e na DCV prematura.

A atividade sérica da PON1 é importante para a proteção dos fosfolípidos do LDL contra oxidação. A retenção do LDL na parede arterial torna esta lipoproteína um importante substrato para oxidação. Diversos sistemas oxidativos contribuem potencialmente para a oxidação do LDL *in vivo*, entre eles NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, mieloperoxidase, óxido nítrico sintase desacoplada, lipoxigenases e também a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Madamanchi et al, 2005).

Partículas de LDL oxidado (LDL-ox) exibem múltiplas propriedades aterogênicas, bem como atividades pró-inflamatórias, imunogênicas, apoptóticas e citotóxicas. As atividades pró-inflamatórias incluem ação quimiotactante nos monócitos circulantes, indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, promoção da diferenciação de monócitos em macrófagos, indução da

síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas de macrófagos e ainda, inibição da motilidade dos macrófagos. Como resultado, a oxidação do LDL propaga o processo inflamatório da parede arterial, acelerando a aterogênese (Kontush e Chapman, 2006).

O estresse oxidativo, distúrbio no balanço pró-oxidante-antioxidante, em favor do pró, que leva ao dano, se caracteriza por uma situação em que uma produção excessiva de ERO normalmente está presente (Halliwell, 2006a). Os lipídeos e as lipoproteínas também são afetados pelo excesso de ERO. Assim, o estresse oxidativo está associado à peroxidação lipídica das lipoproteínas e das células arteriais, incluindo os macrófagos. Estes “macrófagos oxidados” possuem uma maior capacidade de converter LDL na sua forma nativa em LDL-ox. As partículas pequenas e densas de LDL são mais sensíveis à oxidação quando comparadas às partículas maiores (Fuhrman et al, 2002; Kontush e Chapman, 2006).

Estudos têm mostrado que a RC promove modulação do estresse oxidativo e este efeito associa-se a prevenção de DCV. Além disso, a RC diminui fatores de risco CV, com redução de TG e aumento das HDL (Cruzen e Colman, 2009). Contudo, os benefícios da RC sobre a redução do CT e das LDL mostram-se dependentes da idade de início e do protocolo de intervenção utilizado (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b). Atualmente, a razão de apolipoproteínas aterogênicas/antiaterogênicas e a identificação das diferentes partículas de LDL e HDL têm sido indicadas como medidas adicionais de risco CV. Entretanto, são escassos os estudos que abordam o efeito da RC sobre esses parâmetros.

Nesse contexto, a PON1 tem sido investigada quanto ao seu comportamento frente à RC e estudos têm demonstrado que a intervenção relaciona-se a diminuição da atividade sérica da enzima (Moya et al, 2006a; Moya, 2006b; Skrha, 2009). No entanto, ainda existe questionamento se a RC iniciada em ratos adultos e jovens, assim como sua ampliação nos jovens, possa ocasionar benefícios diferenciais sobre o risco CV associado ao perfil lipídico e sobre a atividade da PON1.

4 Relatório de trabalho de campo

Este relatório tem por objetivo apresentar as etapas que envolveram o trabalho de campo do presente estudo, que avaliou o estado nutricional e metabólico e risco cardiovascular (CV) associado ao perfil lipídico, parâmetros comportamentais e oxidativos em ratos Wistar.

Após a qualificação e aprovação, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEa/UFPeL) e foi aprovado (processo nº 23110.009827/2012-89/CEEa 9827). Após procedeu-se com a reserva de animais experimentais no Biotério da UFPeL.

O experimento iniciou no dia 06 de maio de 2013 e foi finalizado no dia 02 de setembro de 2013. Inicialmente, como consta no projeto, os animais ficariam alojados em gaiolas metabólicas individuais. Devido à disponibilidade de caixas moradia na ocasião do início do experimento e ausência de necessidade específica da utilização das gaiolas, optou-se pela alteração na forma de alocação dos animais com o objetivo de manter a organização com a qual os animais já estavam acostumados desde o nascimento, proporcionando uma melhor adaptação ao Laboratório de Nutrição Experimental.

Nas semanas posteriores ao término do experimento foram realizadas as análises bioquímicas na Universidade Federal de Pelotas e de estresse oxidativo na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com o Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Concomitante as análises ocorreu a tabulação dos dados em planilhas e em sequência, a análise estatística. Posterior a essas etapas deu-se início a escrita dos artigos e estruturação da dissertação.

Não foi possível realizar o teste da esQUIVA inibitória devido à inadequação do equipamento para ratos *Wistar*, fato que não se tinha conhecimento na elaboração e aprovação do projeto. A análise da atividade da catalase que constava no projeto não pode ser realizada devido a indisponibilidade de pessoal e materiais para a realização da técnica, como substituição, optou-se por realizar a análise da atividade da glutathione peroxidase.

A análise da atividade arilesterase da PON1 foi realizada devido à disponibilidade da técnica, equipamentos e reagentes, pela relação com o assunto da dissertação e também devido à lacuna na literatura sobre a atividade enzima e a RC. Aliada a essa análise, surgiu a possibilidade das dosagens do HDL e CT

fornecendo dados do perfil lipídico dos animais. A realização do teste comportamental reconhecimento de objetos tornou possível a realização dos testes comportamentais campo aberto e labirinto em cruz elevado que serão utilizados em um trabalho futuro.

A execução do presente projeto permitiu a elaboração de dois artigos e a possibilidade de exploração dos resultados sob outras perspectivas, visto que o tema encontra relevância e espaço no meio científico. No artigo intitulado **RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA: EFEITO NO RISCO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO AO PERFIL LIPÍDICO E ATIVIDADE ARILESTERASE DA PARAOXONASE 1 EM RATOS WISTAR ADULTOS E JOVENS** optou-se por manter todos os grupos inicialmente propostos por ser um artigo de caráter descritivo a fim de responder as questões propostas no projeto.

Para a redação do manuscrito **EFEITO DIFERENCIAL DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA EM PARÂMETROS BASAIS REDOX DO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR** optou-se por explorar resultados ainda pouco investigados e que se mostraram mais significativos sobre os parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Assim, foram utilizados os resultados de jovens e adultos submetidos à RC por 12 semanas. No entanto, os dados dos jovens mantidos em RC por 16 semanas serão explorados em momento posterior, sob outra perspectiva.

5 Artigo 1

Este manuscrito será submetido após a defesa da dissertação para a revista
Journal of Nutrition

RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA: EFEITO NO RISCO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO AO PERFIL LIPÍDICO E ATIVIDADE ARILESTERASE DA PARAOXONASE 1 EM RATOS WISTAR ADULTOS E JOVENS

Cristiane Pereira^{*a}, Renata T Abib^a, Sandra C Valle^a, Elizabete Helbig^a

a Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

**RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA: EFEITO NO RISCO CARDIOVASCULAR
ASSOCIADO AO PERFIL LIPÍDICO E ATIVIDADE DA LECITINASE DA
PARAOXONASE 1 EM RATOS WISTAR ADULTOS E JOVENS**

Cristiane Pereira^{*a}, Renata T Abib^a, Sandra C Valle^a, Elizabete Helbig^a

a Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

*** Autor para correspondência**

Cristiane Pereira, Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade
de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-
900, Pelotas, RS, Brasil, Tel.: 55 53 3921-1259; E-mail: crispnutri@yahoo.com.br

Título resumido: Efeitos da Restrição calórica sobre risco cardiovascular

Número de palavras: 4.408

Número de figuras: 4

Número de tabelas: 2

Resumo

A Restrição Calórica (RC) moderada está associada a inúmeros benefícios à saúde, como redução do peso e gordura corporal, melhora no perfil lipídico e aumento de enzimas antioxidantes que resultam na prevenção de diversas doenças, como as cardiovasculares (DCV). Nesse contexto, a Paraoxonase (PON1), uma importante enzima antiaterogênica e anti-inflamatória associada ao HDL, tem sido investigada quanto ao seu papel na redução do risco cardiovascular (CV) e seu comportamento frente à RC. No entanto, poucos estudos avaliam o impacto da RC iniciada em ratos jovens comparada com a iniciada em ratos adultos e sobre diferentes períodos de tratamento. O presente estudo avaliou os efeitos da RC moderada e crônica sobre o estado nutricional e metabólico, o risco cardiovascular associado ao perfil lipídico sérico e atividade arilesterase da PON1 em ratos *Wistar* submetidos à intervenção nas fases de vida adulta e jovem. Ratos com 70 e 40 dias de vida foram alimentados *ad libitum* ou submetidos à RC (30%) por 12 ou 16 semanas. Nossos resultados mostraram que o peso corporal (PC) dos ratos submetidos à RC foi 16% menor nos adultos e 21% menor nos jovens comparados aos controles ($p < 0,05$). Os níveis séricos de proteína total e albumina demonstraram manutenção do estado nutricional proteico. Os valores de glicose, creatinina e ureia estavam adequados para ratos *wistar* em todos os grupos. Após 12 semanas, a RC diminuiu o colesterol total (CT), HDL, o colesterol não-HDL e a razão LDL/HDL nos ratos jovens e os triacilgliceróis (TG) e a razão TG/LDL nos adultos – neste último com aumento do LDL e da razão LDL/HDL ($p < 0,05$). Conclui-se que a RC moderada iniciada precocemente e mantida por 12 semanas proporcionou redução do risco cardiovascular associado ao perfil lipídico quando comparada a iniciada na fase

adulta. Já seu prolongamento não manteve esse efeito, indicando que o avanço da idade possa ser um forte determinante dos parâmetros avaliados. Ainda, a RC manteve a atividade da PON1 independentemente da idade de início e do tempo de tratamento. Estudos adicionais são necessários para entender a modulação da atividade da PON1 iniciada em ratos jovens submetidos à RC e os efeitos do prolongamento da intervenção. Palavras chave: restrição calórica; perfil lipídico; paraoxonase; atividade arilesterase

Introdução

A restrição calórica (RC), redução na ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem má-nutrição é uma das formas de intervenção nutricional amplamente discutida para estender o tempo de vida em várias espécies, inclusive mamíferos^{1,2}. Estudos em animais e humanos mostram que a RC promove uma redução no peso e na gordura corporal^{2,3}. Essa redução na gordura corporal leva a uma menor liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α resultando em uma melhor sensibilidade a insulina^{4,5}. De fato, a RC tem se mostrado capaz de diminuir os níveis glicêmicos e aumentar a sensibilidade insulínica^{3,6}.

O estresse oxidativo, desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, está associado ao processo de envelhecimento e a doenças como as cardiovasculares^{7,8}. Estudos mostram que a RC é capaz de atenuar os danos oxidativos por meio de ações como inibição da produção intracelular de ERO e aumento de defesas antioxidantes^{9,10}.

A modulação do estresse oxidativo promovida pela RC associa-se a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV). Além disso, a RC diminui fatores de

risco cardiovascular (CV), com redução de triacilgliceróis (TG) e aumento do HDL³. Contudo, os benefícios da RC sobre a redução do colesterol total (CT) e do LDL mostram-se dependentes da idade de início e do protocolo de intervenção utilizado^{11,12}. Atualmente, a razão de apolipoproteínas aterogênicas/antiaterogênicas e a identificação das diferentes partículas de LDL e HDL têm sido indicadas como medidas adicionais de risco CV. Entretanto, são escassos os estudos que abordam o efeito da RC sobre esses parâmetros.

Nesse contexto, uma importante enzima antiaterogênica e anti-inflamatória associada ao HDL, a paraoxonase 1 (PON1), tem sido investigada quanto a seu papel na redução do risco CV e seu comportamento frente à RC. A ação antiaterogênica conferida ao HDL é, em parte, atribuída a PON1, uma esterase sintetizada e secretada no fígado, unida às apolipoproteínas AI e J (apo A-I e apo-J) das partículas de HDL^{13,14}. Estudos têm demonstrado que a RC relaciona-se a diminuição da atividade sérica da enzima^{11,12,15}.

Em diferentes espécies animais a RC tem sido associada à redução do dano oxidativo e celular, retardo do declínio imunológico associado à idade, melhora das defesas antioxidantes e da sensibilidade insulínica^{16,17,18}. No entanto, a maioria dos estudos negligencia a influência da RC em animais jovens, dificultando a compreensão de sua consequência imediata e posterior sobre a condição nutricional, os fatores de risco CV e as defesas antioxidantes. Além disso, os efeitos diferenciais da RC iniciada em animais jovens e mantida até a fase adulta são pouco explorados. Neste estudo investigamos em ratos *Wistar* adultos, submetidos à RC nas fases de vida adulta e jovem, os efeitos da RC moderada e crônica sobre o estado nutricional e metabólico, o risco aterogênico associado ao perfil lipídico e a atividade de uma importante enzima antioxidante e antiaterogênica, a PON1.

Materiais e Métodos

Animais e Delineamento Experimental

Para a realização deste estudo foram utilizados quarenta e oito ratos *Wistar* machos, 16 animais adultos com 65 dias de idade e 32 jovens com 35 dias de idade, provenientes do Biotério Central (UFPEL). Os animais foram pesados, distribuídos aleatoriamente em 6 caixas, com 8 animais cada, mantidos em gabinetes ventilados, alojados em caixas moradia, em sala com temperatura (22-24°C) e umidade relativa (65-75%) controladas, com livre acesso à água e ração, expostos a ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante os primeiros cinco dias os ratos foram adaptados às condições ambientais e após iniciaram-se os tratamentos os quais foram mantidos por um período de 12 ou 16 semanas (Fig.1). O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)¹⁹ e aprovado pela autoridade local, sob protocolo número 9826.

Delineamento Experimental

Os animais foram divididos de acordo com o tratamento a ser administrado durante um período de 12 ou 16 semanas, em dois grupos *i*- Controle-C, alimentados *ad libitum* e *ii*- Restrição Calórica-RC, submetidos a restrição calórica moderada (30% abaixo do consumo *ad libitum*). Formaram-se assim os seguintes grupos (Fig.1): CA12-ratos adultos alimentados *ad libitum*, CJ12- ratos jovens

alimentados *ad libitum* por 12 semanas e CJ16- ratos jovens alimentados *ad libitum* por 16 semanas e os respectivos grupos restrição, RCA12, RCJ12 e RCJ16 submetidos à RC moderada por 12 ou 16 semanas.

Os animais de ambos os grupos, C e RC, receberam ração padrão para roedores (Puro Trato – Puro Lab 22, Brasil), tiveram o consumo de água e ração monitorados diariamente e peso corporal (PC) foi mensurado semanalmente durante os períodos de tratamento. A RC foi realizada de forma progressiva, sendo que os animais tiveram duas semanas de adaptação à dieta: a primeira semana consistiu em restrição calórica de 10%, alterada para 20% na segunda semana. A partir da terceira semana foi iniciada a restrição de 30%, mantida até o final do experimento.

Obtenção do Soro e Dosagens Bioquímicas

Após os períodos de tratamento os ratos em jejum de 12 horas durante a noite, foram submetidos ao procedimento de decapitação. O sangue foi coletado no momento da decapitação e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi armazenado a -20°C até o momento das análises. As dosagens bioquímicas foram realizadas com kits enzimáticos comerciais e quantificadas em espectrofotômetro (Fento Cirrus, 80MB®). Foram dosados: proteína total (biureto, Bioclin), albumina (verde de bromocresol, Bioclin), uréia (UV,Urease, Bioclin), creatinina (Picrato alcalino, Bioclin), glicose (Glicose oxidase, Doles), colesterol total-CT (colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, Vida Biotecnologia), triacilgliceróis-TG (Trinder, Vida Biotecnologia), colesterol HDL (indireto, Doles). O colesterol LDL foi determinado pela equação de Friedewald²⁰, por diferença entre o

colesterol total e a soma do HDL+VLDL (TG/5). O colesterol não-HDL foi calculado deduzindo-se do CT o colesterol HDL, os valores foram expressos em mg/dL.

Análise Enzimática

A atividade arilesterase da PON1 foi medida no soro, a partir da velocidade de formação de fenol por meio do aumento da absorbância a 270 nm, a temperatura de 25°C, conforme descrito por Browne et al.²¹. As amostras foram diluídas 1:3 em 20 mM de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, com 1 mM de CaCl₂. A solução reagente consistiu de Tampão Tris/HCl, pH 8,0 a qual foi acrescido 4 mM fenilacetato. A reação foi determinada imediatamente após a adição da amostra. Uma unidade de atividade arilesterase da PON1 foi considerada igual a 1 uM de fenol/minuto e expressa em kU/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Inicialmente a parametricidade dos dados foi analisada e a comparação entre C e RC realizada por meio do Teste t de Student (dados paramétricos) ou teste U- Mann Whitney (dados não paramétricos). Para comparações entre as idades e tempos de tratamento entre animais dos RC ou C foi utilizado Anova de uma via seguida pelo *post hoc* Tukey (dados paramétricos) ou Kruskal Wallis (dados não paramétricos). O

nível de significância adotado foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa *BioEstat 5.3* (Software livre, Instituto Mamirauá).

Resultados

Os ratos adultos e jovens, dos grupos C e RC, submetidos a diferentes períodos de tratamento mostraram evolução ascendente do PC (Fig.2). No entanto, a RC moderada, resultou em PC significativamente menor ($p < 0,05$) em todos os grupos quando comparados aos respectivos controles (Fig. 2). Os ratos do grupo RCA12 apresentaram PC final 16% inferior ($p < 0,05$) ao respectivo controle (Fig. 2A). Já nos animais jovens, J12 ou J16, a RC determinou um PC final, em média, 21% inferior ($p < 0,05$) ao verificado nos controles J12 e J16, respectivamente (Fig. 2B e C). Entretanto, as taxas semanais de incremento foram diferentes entre as idades, mas não diferiram com o prolongamento da RC (Fig. 2). Após o período de adaptação, por volta da 4ª semana, os ratos adultos (RCA12) estagnaram o ganho de peso e os jovens (RCJ12 e RCJ16) o mantiveram numa taxa média de 37% (Fig.2). A partir da 4ª semana, os adultos restabeleceram o PC e passaram a apresentar evolução ascendente de ganho de peso (Fig.2). No final dos períodos de tratamento, considerando-se entre 8 e 12 ou entre 12 e 16 semanas, o PC aumentou em média 10%. Este valor não diferiu entre os grupos C e RC e quanto à fase da vida em que foram iniciados os tratamentos, bem como aos períodos avaliados (Fig.2).

Os indicadores bioquímicos da condição nutricional e metabólica dos grupos C e RC são apresentados na Tabela 1. Quanto aos efeitos da RC constatou-se nos RCA12 que apenas a ureia diminuiu ($p < 0,05$) em relação ao CA12 (Tab.1). Por outro

lado, nos animais RCJ12 o tratamento resultou em diminuição ($p<0,05$) das concentrações de albumina, glicose e ureia em comparação aos CJ12 (Tab.1). Contudo, nos jovens RCJ16 as concentrações avaliadas não sofreram alterações, quando comparadas ao CJ16 (Tab.1). Ao conferir o efeito da RC em relação à idade verificou-se que nos RCJ12 a glicose foi menor ($p<0,05$) e a proteína e ureia foram maiores a dos RCA12. Em relação ao efeito do tempo de intervenção, verificou-se que nos RCJ12 a glicose foi menor ($p<0,05$) a dos RCJ16. Apesar disso, o prolongamento do período de restrição nos jovens RCJ16 não alterou os demais parâmetros bioquímicos, quando comparados ao RCJ12 (Tab.1)

O perfil lipídico dos ratos pode ser observado na Figura 3. Ao analisar os efeitos da RC sobre os lipídios séricos constatou-se diferenças relacionadas ao controle, à idade de início e ao tempo de exposição à dieta (Fig.3). Nos ratos RCA12 a RC diminuiu ($p<0,05$) em 55% a concentração sérica de TG, porém aumentou ($p<0,05$) em 57% o LDL em comparação a CA12 (Fig.3). Já nos ratos RCJ12 verificou-se diminuição de 21% ($p<0,05$) no CT e 25% no HDL, em relação ao CJ12. Já o perfil lipídico dos RCJ16 não apresentou diferença quando comparado ao CJ16 (Fig.3). Quando se avalia o impacto da RC em relação à idade de começo observa-se nos ratos RCJ12 redução ($p<0,05$) de 20% no CT, de 47% no LDL e manutenção do HDL, em comparação a RCA12. Já nos ratos que iniciaram jovens e foram mantidos por maior tempo em RC moderada (RC16) observou-se aumento ($p<0,05$) do HDL, mas também dos TG e do CT, quando comparados aos RCJ12.

Para verificar o efeito da RC sobre índices bioquímicos preditores de risco metabólico e de doença arterial as razões de TG/HDL e LDL/HDL e os níveis de colesterol não-HDL foram analisados (Tab.2). A RC moderada diminuiu 2,7 vezes ($p<0,05$) a razão TG/HDL nos RCA12, entretanto elevou em 2,4 vezes a razão

LDL/HDL comparada ao CA12 (Tab.2). Já ao observar o impacto da RC em relação à idade de início verificou-se nos RCJ12 uma redução ($p<0,05$) de 40% e 50%, respectivamente, dos níveis de colesterol não-HDL e da razão LDL/HDL comparados a RCA12 (Tab.2). Contudo, o aumento do tempo de intervenção nutricional (RCJ16) resultou em índices de risco semelhantes aos encontrados nos RCJ12(Tab.2).

Quanto à atividade arilesterase da PON1, evidenciou-se que a RC moderada e crônica manteve a atividade da enzima, independente da idade e do tempo de intervenção nutricional (Fig. 4A). Entretanto, a razão PON1/HDL foi maior no RCJ12 comparado a CJ12. A razão analisada foi maior ($p<0,05$) nos ratos J12 mantidos sob RC moderada (Fig.4B).

Discussão

No presente estudo, o estado nutricional foi avaliado com base no PC e nas concentrações de proteína total e albumina. A RC foi eficaz na redução do PC de adultos e jovens, porém seu efeito foi mais expressivo nos jovens independente do tempo de intervenção. De fato, uma diminuição significativa do PC dos ratos de ambas as idades foi detectada já durante as primeiras semanas de tratamento. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com ratos adultos submetidos ao mesmo percentual de RC^{22,23,24}. Nos adultos a menor taxa de ganho de peso pode estar associada à fase de início da RC, uma vez que na fase adulta ocorre menor impacto da redução da ingestão energética. Por outro lado, uma importante implicação da RC iniciada em ratos jovens foi à redução de 43% na taxa

inicial de ganho de peso em relação ao C. Este efeito determinou o estabelecimento de um PC mantido, em média, 25% inferior ao dos ratos sob RC na fase adulta.

Considerando que os animais em RC tiveram uma proteinemia dentro da faixa adequada para ratos *Wistar*, a possibilidade de comprometimento do estado nutricional proteico, resultante de insuficiente ingestão proteica e ganho de peso, pode ser desconsiderada neste estudo. Estudos com animais na fase adulta submetidos à RC de 30% por 12 semanas também não encontraram alterações nos valores de albumina^{22,24}. Por outro lado, pode-se perceber que manter a RC por maior período de tempo, em ratos jovens, ocasionou uma melhor adaptação e preservação do estado nutricional proteico.

Para atribuir com segurança os efeitos da RC, é necessário que a intervenção seja efetuada sem má-nutrição, com a garantia de ingestão adequada de todos os nutrientes. Os marcadores bioquímicos do estado nutricional e metabólico podem ao mesmo tempo indicar desvios nutricionais e fornecer dados importantes a respeito da maneira que o organismo dos animais respondeu à RC.

A modulação do metabolismo da glicose é um dos efeitos benéficos evidenciados na RC. Neste estudo, a RC mantida por 12 semanas nos ratos jovens teve como consequência uma glicemia 20% inferior a de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum*, embora os valores indiquem adequação glicêmica de acordo com *Canadian Council on Animal Care*²⁵. Estudos mostram que a intervenção promove diminuição nos níveis glicêmicos e de insulina bem como uma melhor sensibilidade à ação do hormônio^{21,26}.

Um importante indicador da reserva proteica muscular é a creatinina. Este metabólito da fosfocreatina tem constante produção e liberação nos líquidos corporais e seus valores plasmáticos se mantêm dentro de limites estreitos. Em

razão de a creatinina endógena ser proporcional a massa muscular, sua produção varia com a idade e gênero. Seus níveis séricos são utilizados para um indicativo da taxa de filtração glomerular. Níveis aumentados de creatinina plasmática estão associados ao comprometimento da função renal e a degradação intensa do músculo esquelético²⁷. No atual estudo não foram observadas diferenças nos níveis de creatinina, indicando preservação da massa muscular proteica e da função renal. De outro lado, a RC causou redução do conteúdo de ureia no soro, a qual possivelmente está associada a uma maior retenção nitrogenada e ausência de catabolismo proteico. Este efeito pode ser considerado positivo, especialmente na presença de ingestão proteica constante e adequada, como foi possível constatar pela dosagem de albumina sérica. Resultado similar foi observado em outros estudos realizados em ratos *Wistar* adultos submetidos percentuais e tempo de RC similares^{22,23}.

A RC moderada está associada à proteção contra as DCV^{28,29}, que têm entre os fatores de risco mais importantes as dislipidemias³⁰. Animais e humanos submetidos à RC apresentam níveis significativamente mais baixos de TG e aumento no HDL³. Neste estudo a RC promoveu diminuição dos TG para adultos e jovens, variando de 55% a 20%, respectivamente, com destaque para os animais que iniciaram a intervenção na fase adulta. Essa redução possivelmente relacionou-se a um menor fluxo de substratos para a síntese lipídica, embora outros mecanismos modulatórios também possam estar envolvidos³. Resultado positivo, mas diferente do encontrado em outros estudos, nos quais não houve diferenças entre C e RC^{22,23,24}.

A mensuração do risco CV na maioria das vezes é realizada com medidas tradicionais, como CT e LDL, todavia a utilização de outras medidas como colesterol

não-HDL e razões como TG/HDL e LDL/HDL, apenas recentemente tem sido estabelecidas. As lipoproteínas constituem uma classe heterogênea de partículas e evidências sugerem que as diferentes subclasses de LDL e HDL apresentam diferentes riscos à aterosclerose. A relação entre apolipoproteínas-Apo aterogênicas (apo-B) e antiaterogênicas (A-I), fornece informações mais precisas sobre as Apo, podendo ser mensurada pela estimativa do colesterol não-HDL. Os resultados deste trabalho mostraram que a RC iniciada na fase adulta provocou aumento significativo do risco CV associado razão LDL/HDL. Entretanto, nos ratos jovens submetidos à RC por 12 semanas evidenciou-se importantes efeitos protetores relacionados ao perfil lipídico aterogênico. Contudo, o prolongamento não resultou em mudança do risco CV.

A manutenção nos níveis de CT e elevação do LDL podem ser consequência do efeito da RC sobre a redução na taxa metabólica basal de animais adultos. Essa redução ocorre como parte de uma resposta adaptativa à intervenção e tem como principal determinante a diminuição de triiodotironina - T_3 . Menores níveis desse hormônio relacionam-se a uma baixa expressão hepática do receptor do LDL, acarretando em uma maior permanência dessas partículas na corrente sanguínea e, ao mesmo tempo mantendo inalterada a enzima chave na síntese de colesterol³¹.

A proteção CV não depende apenas de altos níveis de HDL, mas sim, de uma concomitante alta atividade da PON1 uma esterase sintetizada e secretada no fígado, considerada como uma das responsáveis pela atividade antioxidante e antiaterogênica do HDL^{13,14}. Estudos têm demonstrado que a PON1 parece sensível à RC, sendo a intervenção associada com uma diminuição na atividade da enzima^{11,12,15}. Nosso estudo mostra que a atividade da PON1 foi similar entre os 3 e 4 meses de idade, e que a RC, independentemente da idade de início e de seu

prolongamento, promoveu a manutenção da atividade enzimática. Costa et al³² argumentam que a atividade da PON1, uma vez atingidos os valores da fase adulta, permanece constante. Karanth e Pope³³ não encontraram diferenças na atividade da PON1 em ratos com 3 e 24 meses de idade. No entanto, estudos recentes observam que a atividade da PON1 diminui com o avançar da idade, fato que pode estar relacionado a elevação do estresse oxidativo inerente ao envelhecimento^{34,35}. Por outro lado, nos jovens após 12 semanas a maior razão PON1/HDL indica como possibilidades uma maior expressão e/ou atividade da enzima.

Conclusão

Conclui-se que a RC moderada iniciada em ratos Wistar adultos e jovens manteve o estado nutricional proteico adequado. Já a idade de início da RC, mas não seu prolongamento, ocasionou diferenças no risco CV associado ao perfil lipídico. Nos jovens a intervenção mantida por 12 semanas proporcionou redução do risco CV associado ao perfil lipídico quando comparada à iniciada na fase adulta. Porém, seu prolongamento não manteve esse efeito, indicando que o avanço da idade possa ser um forte determinante dos parâmetros avaliados. Ainda, a RC manteve a atividade da PON1 independentemente da idade de início e do tempo de tratamento. Estudos adicionais são necessários para entender a modulação da atividade da PON1 iniciada em ratos jovens submetidos à RC e os efeitos do prolongamento da intervenção.

Referências

1. Trepanowski JF, Canale RE, Marshall KE, Kabir MM, Bloomer RJ. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr. J.* 2011;10:107-19.
2. Roth LW, Polotsky AJ. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas.* 2012;71:315-19.
3. Cruzen C; Colman R. Effects of Caloric Restriction on Cardiovascular Aging in Non-human Primates and Humans. *Clin Geriatr Med.* 2009;25:733–43.
4. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez- Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes.* 2003;52(2):268-76.
5. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes.* 2003;52(6):1355-63.
6. Ugochukwu NH, Figgers CL. Attenuation of plasma dyslipidemia and oxidative damage by dietary caloric restriction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2007;169:32–41.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
8. Valko M; Leibfritz D; Moncol J; Cronin MTD; Mazur M.; Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:44–84

9. Yu BP. Calorie restriction as potent anti-aging intervention: modulation of oxidative stress. In: Rattan S (Ed) *Aging Interventions and Therapies*. World Scientific Publisher. 2005a;193:217.
10. Yu BP. Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction. *Mech Ageing Dev.* 2005b;126(9):1003–1010.
11. Moya ET, Gianotti M, Llado I, Proenza, AM. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. *J Nutr Biochem.* 2006a;17:197–203.
12. Moya ET, Gianotti M, Proenza, AM, Llado, I. The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. *J Lipid Res.* 2006b;47:2042-48.
13. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci.* 2004;107:435–47.
14. Ng DS, Chu T, Esposito B, Hui P, Connelly PW, Gross PL. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. *Cardiovasc Pathol.* 2008;17(4):226-32.
15. Skrha J. Effect of caloric restriction on oxidative markers. *Adv Clin Chem.* 2009;47:224-42.
16. Burger, JMS, Buechel SD, Kawecki TJ. Dietary restriction affects lifespan but not cognitive aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*; 2010 (9):327–35.
17. Poljsak B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2011;2011:1-15.
18. Meydani M, Das S, Band M, Epstein S, Roberts S. The effect of caloric restriction and glycemic load On measures of oxidative stress and antioxidants in Humans:

results from the calerie trial of human Caloric restriction. *J Nutr Health Aging*. 2011;15(6):456–60.

19. COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 8 de set 2012.

20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem*. 1972;18(6):499-502.

21. Browne, RW, Koury, ST, Marion, S, Wilding, G, Muti, P, Trevisan, M. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. *Clin Chem*, 2007; 53(2):310–317.

22. Ribeiro LC, Quincozes-Santos A; Leite MC, Abib RT, Kleinkauf-Rocha J, Biasibetti R, Rotta LN, Wofchuk ST, Perry MLS, Gonçalves CA, Gottfried C. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. *Neuroscience Res*. 2009;64:330–34.

23. Santin K, da Rocha RF, Cechetti F, Quincozes-Santos A, de Souza DF, Nardin P, Rodrigues L, Leite MC, Moreira JC, Salbego CG, Gonçalves, CA. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res*. 2011;1421:1-10.

24. Ribeiro LC, Rodrigues L, Quincozes-Santos A, Tramontina AC, Bambini-Junior V, Zanotto C, Diehl LA, Biasibetti R, Kleinkauf-Rocha J, Dalmaz C, Gonçalves CA, Gottfried C. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of *Wistar* rats. *Brain Res*. 2012;1472(7):11-19.

25. Canadian Council on Animal Care, Guide to the care and use of experimental animals, v. I, Ottawa, 1993, 140 p.

26. Martin B, Mattson, MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Reviews*. 2006;5:332–53.
27. Dalton RN. Tradutores: Flávio Alcântara e Adagmar Andriolo. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. *L editorial J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(1):8-11.
28. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 2009;325(5937):201–4.
29. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*. 2010;328(5976):321–6.
30. Grundy SM, Cleeman, JI, Merz NB, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake, DB, Pasternak RC, Sidney C; Smith, Neil J. Stone. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *V*. 44 (3), 2004.
31. Van der Wal AMG, Bakker O, Wiersinga WM. The decrease of liver LDL receptor mRNA during fasting is related to the decrease in serum T3. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998;30(2):209-215.
32. Costa, LG, Vitalone, A, Cole, TB, Furlong, CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:541–550.
33. Karanth S, Pope C. Carboxylesterase and A-esterase activity during maturation and aging: relationship to toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci* 2000;58:282–9.

34. Mehdi MM, Rizvi SI. Human plasma paraoxonase 1(PON1) arylesterase activity during aging: correlation with susceptibility of LDL oxidation. Arch Med Res. 2012a;43:438-43.
35. Mehdi MM, Rizvi SI. Plasm protein hydroperoxides during aging in humans: correlation with paraoxonase 1 (PON1) arylesterase activity and plasma total thiols. Arch Med Res. 2012b;44:136-41.

TABELAS

Tabela 1 – Análises bioquímicas séricas de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida adulta, jovem e jovem com prolongamento.

	Adultos		Jovens		Jovens com prolongamento	
	CA12	RCA12	CJ12	RCJ12	CJ16	RCJ16
Proteína total (g/dL)	6,17±0,29 ^b	5,74±0,93 ^β	7,81±1,11 ^a	7,25±0,91	6,80±0,77 ^{ab}	6,78±0,42
Albumina (g/dL)	3,18±0,58	3,40±0,49	4,25±0,60 ^a	3,27±0,63*	3,48±0,33	3,44±0,51
Glicose (mg/dL)	192,82±8,92 ^a	182,58±23,18	166,13±20,86 ^b	134,22±24,68 ^{*β}	179,58±20,66 ^{ab}	163,22±14,47
Ureia (mg/dL)	50,47±12,09	32,22±7,70 ^{*β}	57,22±9,38	43,24±5,03 ^{*α}	48,24±12,68	38,42±6,15 ^{αβ}
Creatinina (mg/dL)	0,58±0,15	0,51±0,13	0,31±0,08 ^b	0,32±0,12	0,50±0,09	0,49±0,31

Os valores representam as médias ± desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre animais do C, *Kruskall Wallis*, *pos Hoc Student Newman Keulls*, para proteína total e Anova de 1 via, *pos hoc Tukey*, para as demais análises. Letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, *pos hoc Tukey*.

Tabela 2 - Risco cardiovascular e metabólico associado ao perfil lipídico sérico em ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida adulta, jovem e jovem com prolongamento.

	Adultos		Jovens		Jovens com prolongamento	
	CA12	RCA12	CJ12	RCJ12	CJ16	RCJ16
Colesterol-não HDL	40,15±16,12	44,83±15,24 ^a	37,85±7,58	27,92±8,11 ^{*b}	36,97±5,75	38,45±5,88 ^a
Razão LDL/HDL	0,33±0,29	0,80±0,31 ^{*a}	0,52±0,21	0,45±0,16 ^b	0,34±0,07	0,50±0,16 ^a
Razão TG/HDL	4,16±0,51 ^a	1,54±0,22 [*]	1,73±0,51 ^b	1,81±0,54	2,09±1,28 ^{ac}	2,04±0,50

Os valores representam as médias ± desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre animais do C, *Kruskall Wallis*, *pos Hoc Student Newmann Keulls*. Letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, *pos hoc Tukey*.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo. 48 Ratos *Wistar* com 70 e 40 dias de vida (adultos e jovens) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais e alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) por 12 ou 16 semanas, eutanásia com 22 (adultos e jovens com prolongamento) ou 18 (jovens) semanas de vida.

Figura 2 - Evolução do peso corporal de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*.

Figura 3 – Perfil lipídico sérico de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*. **a** indica diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, *pos hoc Tukey*.

Figura 4 - Atividade arilesterase da PON1 (**A**) e relação PON1/HDL (**B**) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, Anova de 1 via, *pos hoc Tukey*.

FIGURA 1

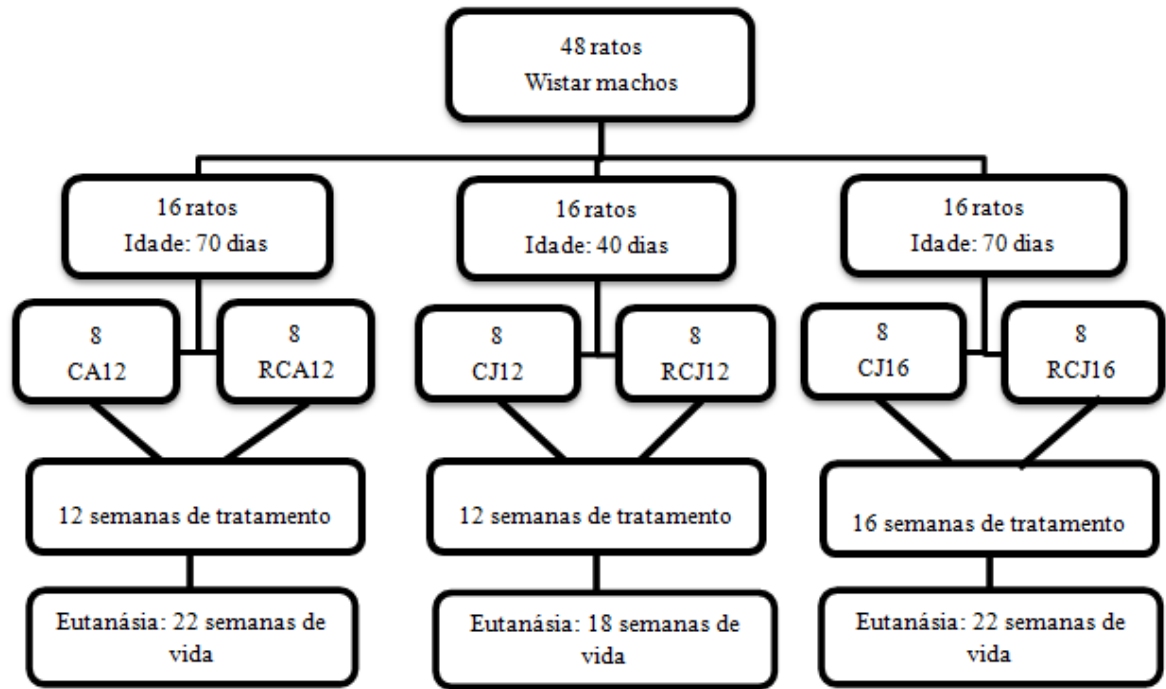


FIGURA 2

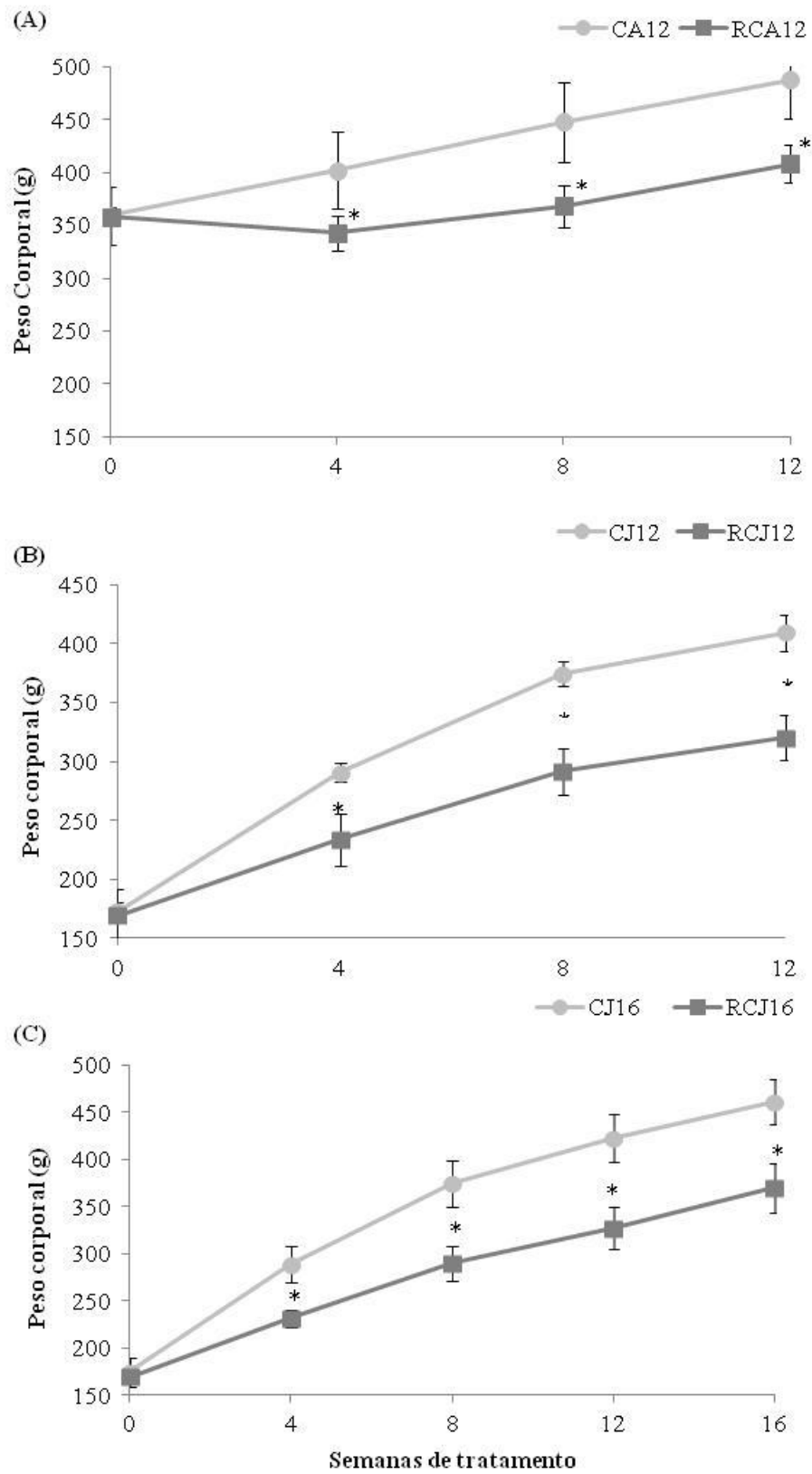


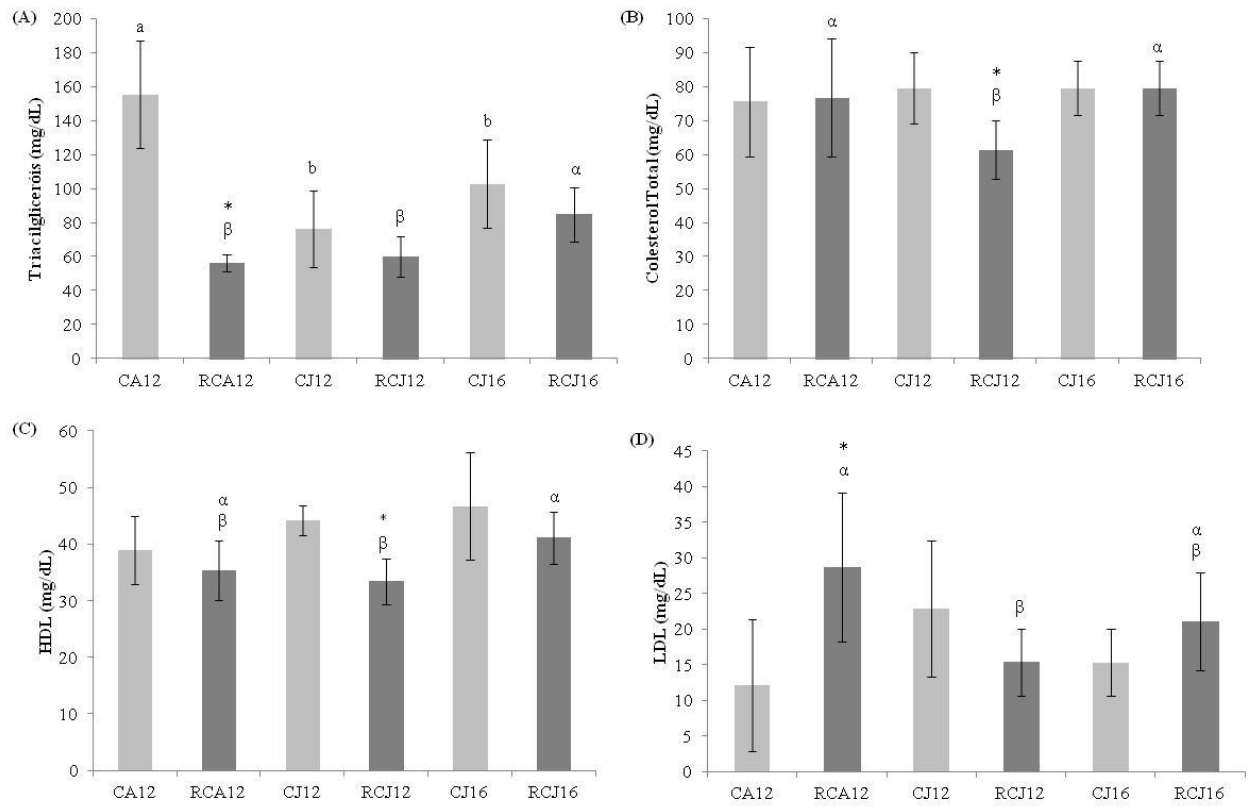
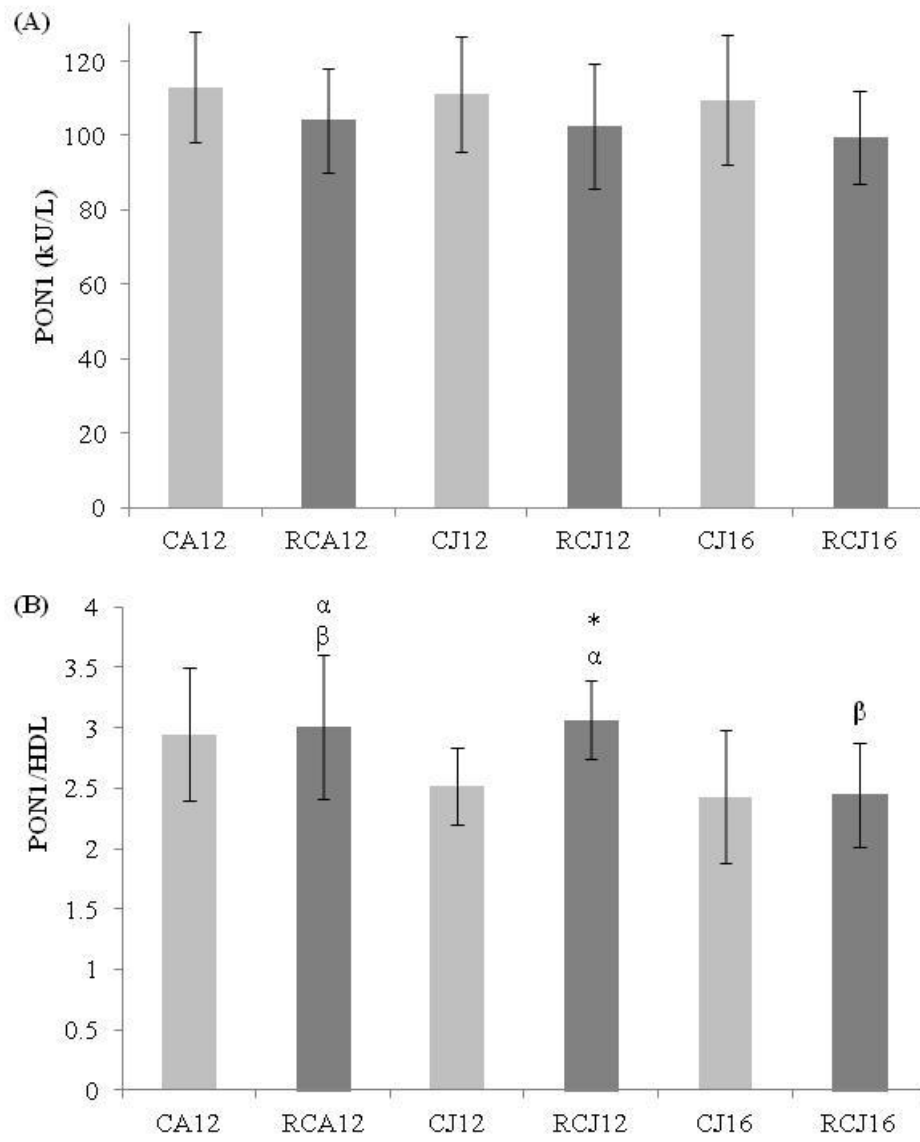
FIGURA 3

FIGURA 4

6 Artigo 2

Este manuscrito será submetido após a defesa da dissertação para a revista **Brain Research**

EFEITO DIFERENCIAL DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA EM PARÂMETROS BASAIS REDOX DO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR

Cristiane Pereira^{*a}, Renata T Abib^a, Sandra C Valle^a, Elizabete Helbig^a

^a Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

EFEITO DIFERENCIAL DA RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA EM PARÂMETROS BASAIS REDOX DO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR

Cristiane Pereira^{*a}, Renata T Abib^a, Sandra C Valle^a, Elizabete Helbig^a

^a Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

*** Autor para correspondência**

Cristiane Pereira, Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil, Tel.: 55 53 3921-1259; E-mail: crispnutri@yahoo.com.br

Resumo

A Restrição Calórica (RC) moderada associa-se a um menor dano oxidativo ao encéfalo, a prevenção e atenuação de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade em diversas espécies animais. No entanto, o impacto da RC, quando iniciada em ratos *Wistar* jovens ou adultos, sobre o hipocampo ainda é pouco explorado. O presente estudo avaliou parâmetros de estresse oxidativo em resposta à RC no hipocampo de ratos *Wistar* jovens e adultos. Ratos com 40 ou 70 dias de vida foram alimentados *ad libitum* ou submetidos à RC moderada (30%) por 12 semanas. Os resultados mostraram que o peso corporal (PC) dos ratos submetidos à RC foi 21% menor nos jovens e 16% menor nos adultos, comparados aos controles ($p < 0,05$). Os parâmetros bioquímicos séricos avaliados indicaram bom estado de saúde. Após 12 semanas, no hipocampo, a RC aumentou os níveis de glutathiona (GSH) nos jovens e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica nos adultos, comparados aos controles ($p < 0,05$). A GSH e glutathiona peroxidase (GPx) parecem aumentar com a idade independente do tratamento. Nenhuma alteração foi observada na memória, produção de óxido nítrico (ON) e superóxido dismutase (SOD). A idade *per se* não ocasionou diferenças na modulação dos parâmetros avaliados. Este estudo indica que a RC resultou em melhora significativa de parâmetros celulares de autodefesa do hipocampo, tanto iniciada em jovens, quanto na fase adulta. Contudo, a RC iniciada em ratos jovens alterou de forma positiva e expressiva um importante tampão redox do hipocampo. Palavras chave: restrição calórica, hipocampo, neuroproteção, parâmetros redox

Introdução

A Restrição Calórica (RC), limitação na ingestão calórica abaixo do *ad libitum* sem má nutrição, é uma das intervenções não farmacológicas mais consistentes na promoção do aumento da expectativa de vida e proteção contra a deterioração das funções biológicas (Cantó e Auwerx, 2009).

Estudos em modelos animais têm demonstrado que a RC diminui ou previne a progressão de doenças relacionadas à idade, dentre as quais diabetes (He et al., 2012), câncer (Klebanov, 2007) e as doenças cardiovasculares (Weiss e Fontana, 2011). Além disso, a RC diminui a neurodegeneração, previne a perda neuronal, assim como uma variedade de doenças neurodegenerativas que estão associadas à idade (Levenson e Rich, 2007).

Com o avançar da idade há um aumento no estresse oxidativo, desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e defesas antioxidantes (Liu et al., 2004; Johnson et al., 2012). Este excesso de ERO provocam danos a lipídios, proteínas e DNA e está associado a inúmeras doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006a). O hipocampo é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo que ocorre durante o envelhecimento devido à capacidade reduzida dos neurônios em manter a homeostase redox (Serrano e Klann, 2004). Uma vez que o hipocampo está envolvido na aprendizagem e na memória (Morris, 2006), o dano oxidativo a esta área do cérebro pode causar prejuízos nas funções cognitivas (Serrano e Klann, 2004). A manutenção equilibrada do estado redox em neurônios do hipocampo é, portanto, importante na prevenção do declínio cognitivo durante o envelhecimento.

A fim de se proteger de danos ocasionados pelas ERO, o organismo conta com uma série de mecanismos de defesa. Dentre os mais importantes estão, por exemplo, os antioxidantes, glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α – tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides, bem como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Estes mecanismos de defesa antioxidantes podem ser regulados de acordo com a produção de espécies reativas e a peroxidação lipídica (Valko et al., 2007). No entanto, apesar de protegerem as células contra o excesso de ERO, essas defesas não são completamente eficazes na prevenção dos danos relacionados com o envelhecimento. Estudos têm demonstrado que o aumento do dano oxidativo no encéfalo é devido ao aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e diminuição nos níveis de GSH e enzimas antioxidantes (Dröge e Schipper, 2007).

Os benefícios da RC sobre o processo de envelhecimento do encéfalo e, principalmente, sua proteção contra doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade têm sido alvo de vários estudos (Martin et al, 2006; Levenson e Rich, 2007). No entanto, uma melhor compreensão a respeito dos parâmetros bioquímicos que são modificados pela RC é essencial para o estabelecimento de intervenções terapêuticas adicionais para o tratamento de tais doenças. Como os efeitos da RC no SNC são ainda pouco compreendidos e a maioria dos estudos aborda animais adultos, no presente estudo buscamos investigar se a idade de início em que a RC é estabelecida pode ocasionar diferentes mudanças metabólicas neurais no hipocampo de ratos em que a intervenção foi iniciada quando jovens ou quando na fase adulta. Parâmetros bioquímicos séricos e comportamentais também foram avaliados.

Materiais e métodos

Animais e Delineamento Experimental

Trinta e dois ratos Wistar machos, 16 animais com 35 dias de idade (jovens) e 16 animais com 65 dias de idade (adultos), provenientes do Biotério Central (UFPel) foram alimentados *ad libitum* ou submetidos à RC por 12 semanas. Os animais foram mantidos em gabinetes ventilados, alojados em caixas moradia, em sala com temperatura e umidade relativa (22-24°C e 65-75%, respectivamente) controladas, com livre acesso à água e expostos a um ciclo claro/escuro de 12 horas. O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (processo nº 23110.009827/2012-89/CEEA 9827). Os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 4 grupos (n = 8: controle jovem – CJ, controle adulto – CA, restrição calórica jovem – RCJ, restrição calórica adulto – RCA) (Figura 1). Todos os animais receberam ração padrão para roedores (Puro Trato – Puro Lab 22, Brasil). Durante os primeiros cinco dias os animais foram adaptados às condições ambientais e após iniciaram-se os tratamentos. A RC foi progressiva, 10% de RC na primeira semana, 20% na segunda e 30% da terceira até o final do experimento. O consumo alimentar foi monitorado diariamente e os animais foram pesados semanalmente.

Dietas Experimentais

A composição centesimal da dieta experimental (tabela 1) foi realizada de acordo com os seguintes procedimentos: Umidade: Pearson (1976); Proteínas: AOAC (1995); Lipídeos: Bligh & Dyer (1959); Cinzas: Lees (1979); Fibra Bruta: Angelucci et al. (1987); Carboidrato: por diferença, por meio da fórmula: $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ fibra bruta} + \% \text{ cinzas})$.

Testes Comportamentais

O método utilizado seguiu a proposta de De Lima et al. (2005). Na última semana de experimento os animais foram colocados em uma arena de campo aberto que consiste em uma caixa de madeira de tamanho 40x50 cm e altura de 50 cm, com uma parede de vidro frontal. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação em que exploraram livremente o campo aberto, sem objetos, por 5 min. Vinte e quatro horas depois do período de exploração ocorreu o treinamento em que, durante 5 minutos, os animais foram colocados individualmente no campo aberto contendo dois objetos idênticos (A 1 e A2) posicionados em cantos opostos a 10 cm das paredes. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz ou patas dianteiras. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treinamento, em que os ratos puderam explorar a caixa por 5 minutos na presença de um objeto já conhecido (A) e de um objeto novo (B). Todos os objetos utilizados possuíam tamanho, cor e textura semelhantes, porém formas distintas. Após o treinamento e teste os objetos foram limpos com etanol 10% para descartar cheiros ou resíduos. O índice de reconhecimento foi calculado para cada animal e expresso

pela razão: $TB / (TA + TB)$ [TA= tempo em explorar o objeto familiar A; TB= Tempo gasto na exploração do novo objeto B].

Coleta de Sangue e Análises

No final do experimento, os ratos foram deixados em jejum de 12 horas durante a noite, e em seguida submetidos ao procedimento de decapitação. O sangue foi coletado no momento da decapitação e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos. O soro foi armazenado a -20°C até o momento das análises. As análises foram realizadas com auxílio de espectrofotômetro Femto Cirrus 80MB®. Foram dosados: proteína total (biureto, Bioclin), albumina (verde de bromocresol, Bioclin®), uréia (UV, Urease, Bioclin®), creatinina (Picrato alcalino, Bioclin®), glicose (Glicose oxidase, Doles®), colesterol total-CT (colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, Vida Biotecnologia®), triacilgliceróis-TG (Trinder, Vida Biotecnologia®), colesterol HDL (indireto, Doles®). O LDL foi estimado por diferença entre o Colesterol total e a soma de HDL + TG/5 (Friedewald et al.,1972).

Dissecação do Hipocampo

O encéfalo foi removido, o hipocampo dissecado e colocado em solução tampão salina/fosfato (PBS) com a seguinte composição: 3g NaCl, 2,64g de fosfato de sódio monobásico monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 11,5g de fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4), com pH ajustado em 7,4. A estrutura foi pesada, colocada em frascos Eppendorf e congelada a - 70 °C em nitrogênio líquido até o momento das dosagens. Antes da realização das análises, imediatamente após o descongelamento, o hipocampo foi cortado em cortes transversais de 0,3 mm por

meio do Mcllwain Tissue Chopper, A estrutura foi mantida em solução tampão salina/fosfato em pH 7,4.

Análise da Glutathiona (GSH)

O conteúdo de glutathiona foi determinado conforme o método descrito por Browne e Armstrong (1998). As fatias do hipocampo foram homogeneizadas em um tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) contendo 5 mM EDTA e a proteína foi precipitada com ácido metafosfórico 1,7%. O sobrenadante foi analisado com o-ftaldialdeído (1mg/mL de metanol) à temperatura ambiente durante 15 minutos. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de 350 e 420 nm de excitação e emissão, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com soluções padrão de glutathiona (0-500 μ M). As concentrações de GSH foram expressas como μ mol / mg de proteína.

Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi mensurada no hipocampo conforme descrito por Wendel (1981) utilizando tert-butil hidroperóxido como substrato. A atividade da GPx foi determinada pelo monitoramento da depuração do NADPH (0,1 mM) a 340 nm em um meio contendo 2 mM de GSH, 0,15U/ml de glutathiona redutase, 0,4 mM de azida e 0.5 mM de terc-butil hidroperóxido. Uma unidade de GPx foi definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi representada como U/mg de proteína.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada no hipocampo por meio do método descrito por Misra e Fridovich (1972), quantificando a inibição da auto-oxidação do superóxido dependente de adrenalina em espectrofotômetro em 480 nm. Os resultados foram expressos como U SOD/ mg de proteína.

Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção intracelular de ERO foi detectada usando um composto celular permeável não fluorescente, 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). As amostras do hipocampo foram homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio, pH 7,4 com 140 mM de KCl e foram tratadas com DCF-DA (10 μ M) durante 30 min a 37 °C. A fluorescência foi medida em leitor (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm, como descrito por LeBel e Bondy (1992), com adaptações para análise em fatias de tecido. Os valores foram expressos como unidade de fluorescência/mg de proteína.

Mensuração das substâncias reativas ao ácido tilbarbitúrico (TBARS)

A formação de malonaldeído (MDA), um índice de peroxidação lipídica, foi avaliada no hipocampo pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Resumidamente, 100 μ L do homogenado foram adicionados a 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 300 μ L de 0,67% TBA em 7,1% de sulfato de sódio foram colocados em banho de água fervente por 15 min. A mistura foi colocada em água fria por 1 min. Posteriormente, 400 μ L de álcool butílico foram adicionados e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 X g por 5 min. Os resultados

da coloração rósea do TBARS foram determinados do sobrenadante em um espectrofotômetro de microplacas a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol TBARS/mg de proteína.

Produção de óxido nítrico (ON)

Metabólitos do ON, nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2) foram determinados de acordo com Hevel e Marletta (1994). De modo resumido, homogenizados de fatias do hipocampo foram misturados com 25% de TCA e centrifugados a 1800 X g por 10 min. O sobrenadante foi imediatamente neutralizado com 2 M de bicarbonato de potássio. NO_3 foi reduzido a NO_2 pela nitrato redutase. Após, o total de NO_2 da incubação foi medido por análise colorimétrica a 540 nm com base na reação de Griess. Uma curva padrão foi realizada usando nitrato de sódio (0-80 μM). Os resultados foram expressos como μM de nitrito/mg de proteína.

Conteúdo de proteína

A proteína total foi determinada pelo método de Lowry (Peterson, 1977) modificado, usando albumina sérica bovina como padrão.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças entre os grupos experimentais foram determinados pelo teste *t* de *Student* ou pelo teste de U *Mann* Whitney (nas comparações entre grupo RC e seu respectivo controle, entre controles ou entre restrições) em dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Todas as

análises foram realizadas com o auxílio do programa *BioEstat* 5.3 (Software livre, Instituto Mamirauá).

Resultados

Parâmetros bioquímicos e nutricionais

Os ratos submetidos à RC apresentaram um peso final, 21% menor quando iniciada nos jovens e 16% menor quando iniciada na fase adulta, comparados aos controles ($p < 0,05$) (Figura 2). Em relação aos controles, nos animais jovens submetidos à RC foram encontradas diferenças nos níveis de albumina, glicose e ureia, colesterol total e HDL e nos adultos nos níveis de ureia, triacilgliceróis e LDL. Em relação à idade de início da RC, a proteína total e ureia foram maiores quando iniciada nos jovens e a glicose, creatinina, colesterol total e LDL foram menores (Tabela 2).

Parâmetros comportamentais de reconhecimento de objetos

O teste realizado 24 horas após o treino a idade não promoveu alterações na taxa de reconhecimento, exceto na comparação entre os grupos controle, no qual os animais do grupo CA apresentaram uma taxa de reconhecimento maior quando comparados aos do grupo CJ. Não foram encontradas diferenças entre os grupos RC e seus respectivos grupos controle (Figura 3).

Parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo: GSH, GPx, SOD, ERO, TBARS e NO

O conteúdo de GSH não apresentou alterações em relação a idade de início da RC, exceto na comparação entre os grupos controle, no qual os animais do grupo CA apresentaram maiores níveis de GSH quando comparados aos do grupo CJ. Quanto aos efeitos da RC, o conteúdo de GSH encontrado no hipocampo foi em média 56% maior no RCJ quando comparada ao CJ ($p < 0,05$, Figura 4).

Como ilustrado na Figura 5, os níveis de GPx foram mais elevados nos animais adultos (CA e RCA), independente do tratamento. A atividade da SOD não diferiu entre os grupos (Tabela 3).

A produção de ERO não sofreu impacto da idade de início da RC. No entanto, nos ratos adultos, a RC promoveu uma diminuição significativa de 42% na produção de ERO em comparação ao seu controle ($p < 0,05$) (Figura 6). A idade de início da RC não promoveu alterações na peroxidação lipídica. Quanto aos efeitos da RC, nos adultos, a intervenção ocasionou uma diminuição significativa na peroxidação lipídica, em média 29% em relação ao controle (Figura 6). Não foram evidenciadas diferenças na produção de ON entre os grupos (Tabela 4).

Discussão

Como esperado, os ratos submetidos à RC apresentaram um PC final inferior aos seus controles – 21% e 16% nos grupos RCJ e RCA, respectivamente. Os parâmetros bioquímicos avaliados se enquadram nos valores de referência para ratos *wistar* adultos e indicam que a nutrição foi adequada e que os animais

apresentaram um estado nutricional e metabólico adequado (Canadian Council on Animal Care, 1993).

Estudos indicam que a RC exerce efeito protetor para as doenças neurodegenerativas, mas ainda existem controvérsias se a RC melhora, não exerce efeito ou interrompe as funções cognitivas durante o envelhecimento (Carter et al., 2009). A proposta deste estudo foi avaliar qual o efeito da RC na tarefa de reconhecimento de objetos, teste que avalia a memória episódica que é sensível aos efeitos do envelhecimento em humanos (Lebrun et al., 2000). Não foram encontradas diferenças na taxa de reconhecimento indicando que a memória não sofreu influência da RC bem como da idade de início da intervenção. Outros estudos sugerem que o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos não é prejudicado com o avançar da idade em roedores (Soffi et al., 1992; Shukitt-Hale et al., 2001), de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo.

O encéfalo é particularmente vulnerável aos danos oxidativos devido ao seu alto consumo de oxigênio e pelo elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (Valko et al., 2007). O estresse oxidativo aumenta com a idade e é um dos maiores responsáveis pelo início e progressão das doenças neurodegenerativas (Liu et al., 2004; Johnson et al., 2012). Por isso, a manutenção de um equilíbrio no sistema antioxidante é essencial para a prevenção de tais doenças.

O tripeptídeo GSH (Glicina-Cisteína-Glutamato) é o principal tiol presente no encéfalo e o mais importante tampão redox celular. Descontrole em sua homeostase tem sido implicado na indução e progressão de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington (Reynolds et al., 2007; Johnson et al., 2012). No presente estudo verificamos um aumento de 56% nos níveis de GSH nos ratos que iniciaram a RC jovens em comparação ao seu controle. Quando iniciada na fase

adulta, a RC não apresentou o mesmo efeito, diferentemente do observado na literatura (Santin et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). No entanto, os níveis de GSH permaneceram elevados no grupo RCA, 19% superiores em relação a RCJ. Desta forma, acredita-se que a RC possa modular de forma positiva o seu conteúdo e potencializar seus efeitos benéficos no encéfalo em desenvolvimento. Nas comparações entre os animais dos grupos controle, a GSH pareceu aumentar com a idade. Kumar et al. (2013) também observaram um aumento na GSH em ratos até os 8 meses de idade e posterior declínio aos 12, 18 e 24 meses. Semelhantemente, os níveis de GPx, tanto nas comparações entre os grupos controle quanto entre os grupos restrições, foram mais elevados nos animais CA e RCA, indicando que a enzima, assim como a GSH, pode aumentar com a idade, independente do tratamento. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o estresse oxidativo, que aumenta com o envelhecimento, induz o aumento das defesas antioxidantes como uma resposta adaptativa do organismo (Yu e Chung, 2006).

Níveis elevados de ERO podem ocasionar danos a lipídios, proteínas e DNA (Halliwell, 2006b). Nesse contexto, a diminuição significativa de ERO pode ser uma importante estratégia para a manutenção de um encéfalo saudável. Neste estudo, a RC iniciada nos animais adultos ocasionou uma diminuição de 42% na produção de ERO em relação ao seu controle, e como esperado, também uma menor peroxidação lipídica. Estudos anteriores evidenciaram que a RC, iniciada em ratos adultos, promove uma diminuição da produção de ERO, mas não evidenciaram uma menor peroxidação lipídica (Ribeiro et al., 2012).

Este estudo mostra que a adaptação não enzimática pode ser a responsável pelos benefícios promovidos pela RC, como aumento da GSH, diminuição da produção de ERO e peroxidação lipídica, sem alterar a atividade da SOD e GPx. A

idade de início não ocasionou efeitos nos níveis de SOD. A produção de ON não sofreu influência da idade nem da RC.

Em suma, podemos verificar que a idade de início da RC não ocasionou diferenças na modulação dos parâmetros avaliados. Em relação aos efeitos da RC identificou-se uma modulação hipocampal com mudanças metabólicas que melhoram o estado basal de parâmetros de defesa celular tanto iniciada em jovens, com o aumento do GSH, como na iniciada na fase adulta com a diminuição da produção de ERO e peroxidação lipídica. Portanto, tanto a RC iniciada em jovens quanto em adultos mostraram ser benéficas para a manutenção do estado redox do hipocampo. A manutenção de uma estabilidade metabólica e fisiológica durante o desenvolvimento bem como no envelhecimento é determinante essencial para uma longevidade saudável.

Referências

- Angelluci, E., Carvalho, C.R.L., Carvalho, P..R.N., Figueiredo, I.B., Mantovani, D.M.B., Moraes, R.M., 1987. Manual técnico de análises de alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas.
- AOAC. Official Methods of Analysis International. 16 ed., Washington DC: Cunniff, 1995.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37 (n.8), 911-917.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. Methods Mol. Biol. 108, 347-352.

Canadian Council on Animal Care, Guide to the care and use of experimental animals, v. I, Ottawa, 1993, 140 p.

Cantó, C., Auwerx, J., 2009. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (n. 7), 325-331.

Carter, C.S., Leeuwenburgh, C., Daniels, M., Foster, T.C., 2009. Influence of calorie restriction on measures of age-related cognitive decline: role of increased physical activity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64 (n.8), 850-859.

COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 8 de set 2012.

De Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N., 2005. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40, 506–511.

Dröge, W., Schipper, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell.* 6 (n.3), 361–370.

Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-21.

Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18 (n.6), 499-502.

Halliwell, B., 2006a. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97 (n.6), 1634-58.

Halliwell, B., 2006b. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141 (n.2), 312–322.

- He, X.Y., Zhao, X.L., Gu, Q., Shen, J.P., Hu, Y., Hu, R.M., 2012. Caloric restriction from a young age preserves the functions of pancreatic β cells in aging rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 227 (n.4), 245-252.
- Hevel, J.M., Marletta, M.A. 1994. Nitric oxide synthase assays. *Methods Enzymol.* 233, 250-258.
- Johnson, W.M., Wilson-Delfosse, A.L., Mieyal, J.J., 2012. Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients.* 4 (n.10), 1399-1440.
- Klebanov, S., 2007. Can short-term dietary restriction and fasting have a long-term anticarcinogenic effect? *Interdiscip. Top. Gerontol.* 35, 176-92.
- Kumar, D., Rizvi, S.I., 2013. A critical period in lifespan of male rats coincides with increased oxidative stress. *Arch. Gerontol. Geriatr.* Article in press.
- LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1992. Oxidative damage and cerebral aging. *Prog. Neurobiol.* 38, 601-609.
- Lebrun, C., Pillière, E., Lestage, P., 2000. Effects of S 18986-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats. *Eur J Pharmacol.* 401 (n.2), 205-212.
- Lees, R. 1979. *Manual de análisis de alimentos.* Zaragoza: Acribia.
- Levenson, C.W., Rich, N.J., 2007 Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. *Nutr. Rev.* 65 (n.9), 412-415.
- Liu, H., Wang, H., Shenvi, S., Hagen, T.M., Liu, R.M., 2004. Glutathione Metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 1019, 346-349.
- Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* 5 (n.3), 332–353.

- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 (n.10), 3170–3175.
- Morris, R.G., 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur. J. Neurosci.* 23 (n.11), 2829–2846.
- Morris, K.C., Lin, H.W., Thompson, J.W., Perez-Pinzon, M.A., 2011. Pathways for ischemic cytoprotection: role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (n.4), 1003–1019.
- Pearson, D., 1976. *Técnicas de laboratório para el analisis de alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., 2007 Oxidative estress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 82, 297-325.
- Ribeiro, L.C., Rodrigues, L., Quincozes-Santos, A.; Tramontina, A.C., Bambini-Junior, V., Zanotto, C., Diehl, L.A., Biasibetti, R., Kleinkauf-Rocha, J., Dalmaz, C., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., 2012. Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of *Wistar* rats. *Brain Res.* 1472 (n.7), 11-19.
- Santin, K., da Rocha, R.F., Cechetti, F., Quincozes-Santos, A., de Souza, D.F., Nardin, P., Rodrigues, L., Leite, M.C., Moreira, J.C., Salbego, C.G., Gonçalves, C.A., 2011. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain res.* 1421, 1-10.

- Serrano, F., Klann, E., 2004. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 3, 431–443.
- Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., Cantuti-Castelvetri, I., Joseph, J.A., 2001. Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and nonspatial change. *Behav. Neurosci.* 115, 1059 – 1064 .
- Soffiθ, M., Buhot, M.C., Poucet, B., 1992. Cognitive and noncognitive processes involved in selective object exploration: comparison between young adult and old rats. *Physiol. Behav.* 52, 1029 – 1035.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (n.1), 44–84.
- Weiss, E.P., Fontana, L., 2011. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1205–H1219.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.
- Yu, B.P., Chung, H.Y., 2006. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech. Ageing Dev.* 127 (n. 5), 436–443.

TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química da dieta oferecida durante o tratamento experimental.

Composição	%
Umidade	12,3
Cinzas	7,5
Proteínas	22,1
Gordura total	15,9
Carboidratos	37,1
Fibras	5,1

Ração comercial para roedores, Puro Trato – Puro Lab 22 (RS-Brasil)

Tabela 2 – Análises bioquímicas séricas de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.

	Jovens		Adultos	
	CJ	RCJ	CA	RCA
Proteína total (g/dL)	7,81±0,39 ^a	7,25±0,32 ^a	6,17±0,10 ^b	5,74±0,35 ^b
Albumina (g/dL)	4,25±0,21 ^a	3,27±0,22 [*]	3,18±0,22 ^b	3,40±0,17
Glicose (mg/dL)	166,13±7,37 ^b	134,22±8,72 ^{*b}	192,82±3,37 ^a	182,58±8,19 ^a
Ureia (mg/dL)	57,22±3,31	43,24±1,78 ^{*a}	50,47±4,57	32,22±2,72 ^{*b}
Creatinina (mg/dL)	0,31±0,02 ^b	0,32±0,04 ^b	0,58±0,06 ^a	0,51±0,04 ^a
Colesterol total (mg/dL)	79,63±3,70	61,33±3,03 ^{*b}	75,70±6,09	76,80±6,12 ^a
Triacilgliceróis (mg/dL)	76,48±8,53 ^b	59,96±4,93	155,38±12,90 ^a	56,15±1,98 [*]
HDL (mg/dL)	44,16±0,91 ^a	33,40±1,42 [*]	39,02±2,27 ^b	35,35±1,85
LDL (mg/dL)	22,93±3,89	15,36±1,93 ^b	12,12±4,14	28,70±4,25 ^{*a}

Os valores representam as médias ± erro padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, *Mann Whitney*, para triacilgliceróis e teste *t* de *Student*, para as demais análises. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre animais do grupo C, *Mann Whitney*, para proteína total e teste *t* de *Student*, para as demais análises. Letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do grupo RC, teste *t* de *Student*.

Tabela 3 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle – C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.

	Jovens		Adultos	
	CJ	RCJ	CA	RCA
Atividade SOD (U SOD/mg proteína)	3,55±0,20	3,59±0,12	3,27±0,22	3,41±0,10

Os valores representam as médias ± erro padrão de duplicatas de 8 animais por grupo.

Tabela 4 – Produção de óxido nítrico (ON) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle – C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) nas fases da vida jovem e adulta.

	Jovens		Adultos	
	CJ	RCJ	CA	RCA
Oxido Nítrico (μmol nitrito/mg proteína)	3,43 $\pm$ 0,53	3,06 $\pm$ 0,36	3,84 $\pm$ 0,32	3,86 $\pm$ 0,32

Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo. 32 Ratos *Wistar* com 40 dias e 70 de vida (jovens e adultos) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC) por 12 semanas, eutanásia com 18 (jovens) ou 22 (adultos) semanas de vida.

Figura 2 - Evolução do peso corporal de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*.

Figura 3 – Efeitos da RC na taxa de reconhecimento de objetos 24 horas após o treino de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. **a** indica diferença significativa entre animais do C, teste *t* de *Student*.

Figura 4 - Conteúdo de glutathiona (GSH) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC e, **a** indica diferença significativa entre animais do C, teste *t* de *Student*.

Figura 5 - Atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. **a** indica diferença significativa entre animais do C e, letras gregas diferentes indicam diferença significativa entre animais do RC, teste *t* de *Student*.

Figura 6 - Produção intracelular de espécies reativas **(A)** e peroxidação lipídica **(B)** no hipocampo de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Controle - C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Restrição Calórica - RC). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo. Nível de significância de 5%. *indica diferença significativa entre C e RC, teste *t* de *Student*.

FIGURA 1

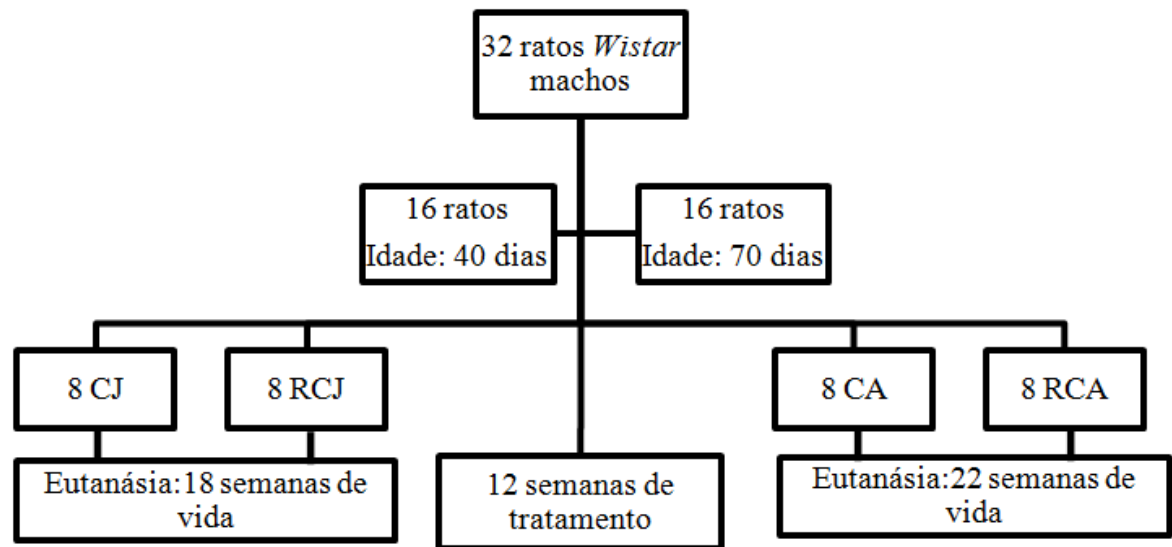


FIGURA 2

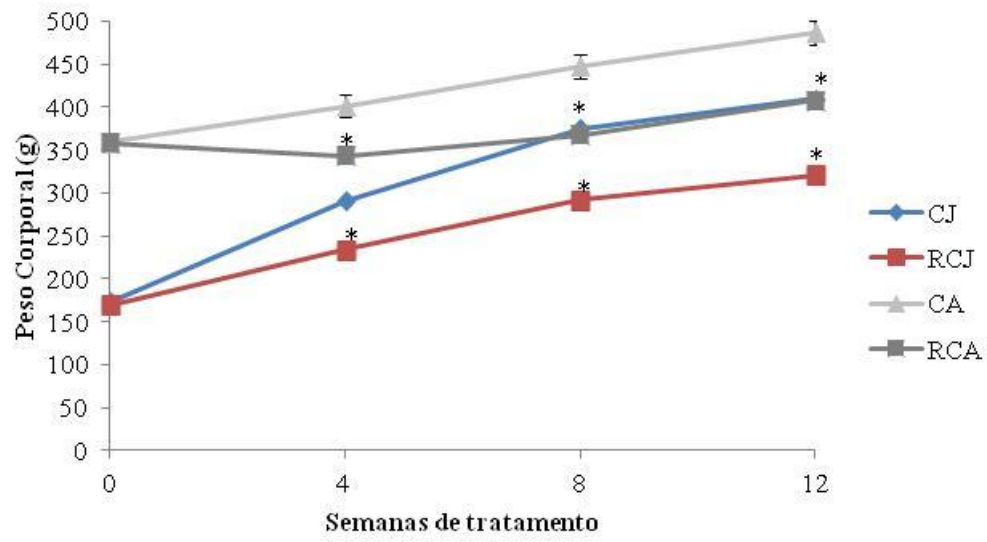


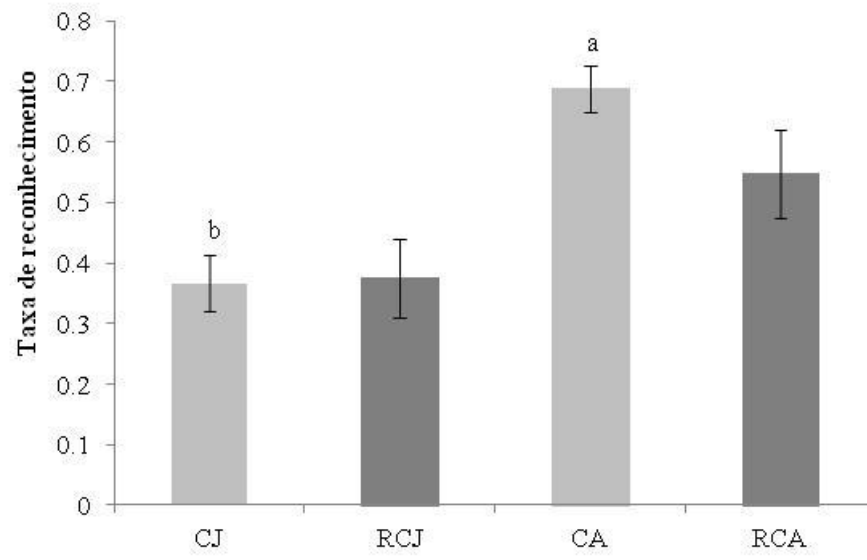
FIGURA 3

FIGURA 4

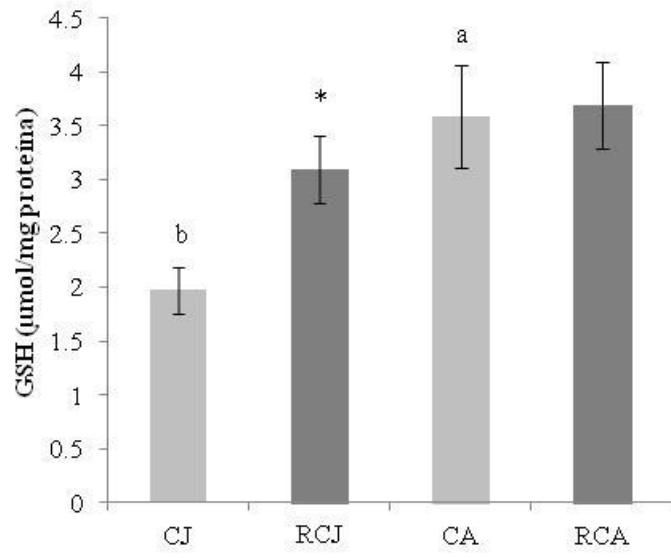


FIGURA 5

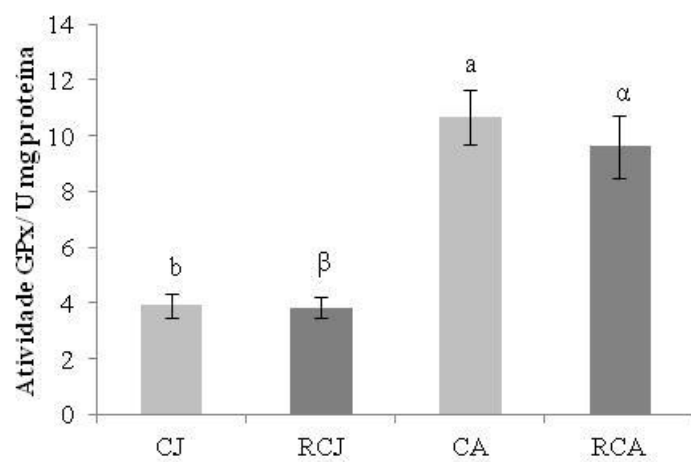
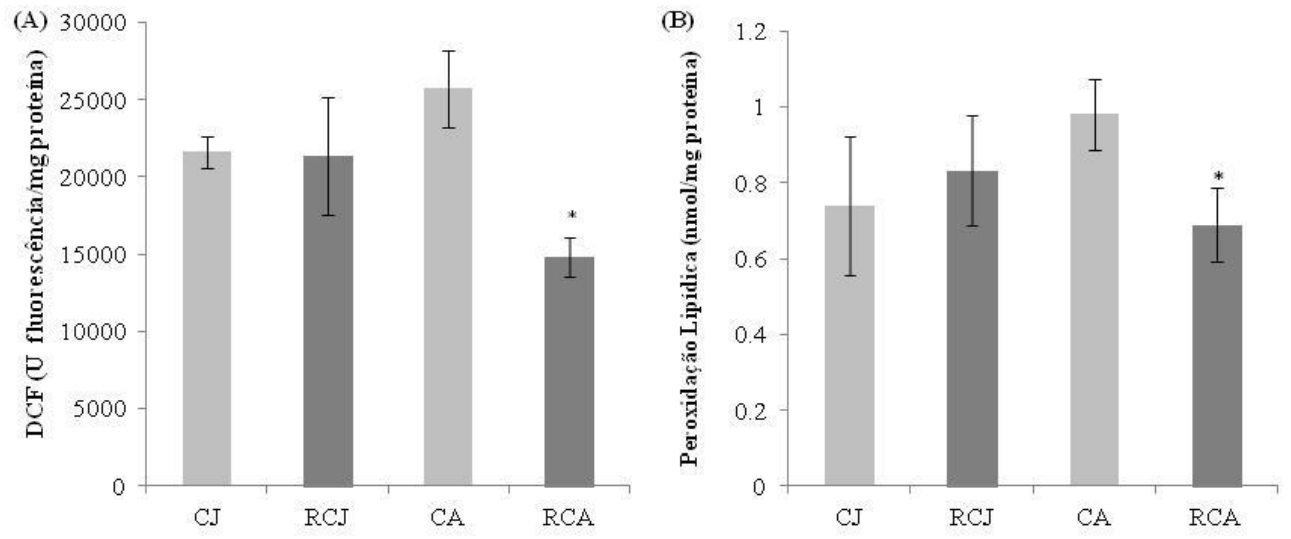


FIGURA 6



7 Conclusões

Conclui-se que a RC moderada iniciada em ratos Wistar adultos e jovens manteve o estado nutricional proteico. Já a idade de início da RC, mas não seu prolongamento, ocasionou diferenças no risco CV associado ao perfil lipídico. Nos jovens a intervenção mantida por 12 semanas proporcionou redução do risco CV comparada à iniciada na fase adulta. Porém, seu prolongamento não manteve esse efeito, indicando que o avanço da idade possa ser um forte determinante dos parâmetros avaliados. Ainda, a RC manteve a atividade da PON1 independentemente da idade de início e do tempo de tratamento. Estudos adicionais são necessários para entender a modulação da atividade da PON1 iniciada em ratos jovens submetidos à RC e os efeitos do prolongamento da intervenção.

A idade de início da RC não ocasionou diferenças na modulação dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados. Em relação aos efeitos da RC identificou-se uma modulação hipocampal com mudanças metabólicas que melhoram o estado basal de parâmetros de defesa celular tanto iniciada em jovens, com o aumento do GSH, como na iniciada na fase adulta com a diminuição da produção de ERO e peroxidação lipídica. Portanto, tanto a RC iniciada em jovens quanto em adultos mostraram ser benéficas para a manutenção do estado redox do hipocampo. A manutenção de uma estabilidade metabólica e fisiológica durante o desenvolvimento bem como no envelhecimento é determinante essencial para uma longevidade saudável.

8 Referências

- Aebi, H.; Lester, P. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology** - Academic Press, v. 105, p. 121-126, 1984.
- Alabarse, P.V.G. **Estresse oxidativo e envelhecimento no encéfalo de ratos machos reprodutores**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- Angelluci, E.; Carvalho, C.R.L.; Carvalho, P.R.N.; Figueiredo, I.B.; Mantovani, D.M.B.; Moraes, R.M. **Manual técnico de análises de alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. 1987.
- AOAC. Official Methods of Analysis International. 16 ed., Washington DC: Cunniff, 1995.
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 2009.
- BRASIL. Resolução RDC n.40, de 21 de março de 2001. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados. **Diário Oficial da União**. Brasília 22 de março de 2001; (57-E): 22; Seção 1.
- Browne, R.W.; Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology**. v. 108, p. 347-52, 1998.
- Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Fornasari, E.; Mollica, A.; Pinnen, F. Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Diseases Based on GSH Delivery Systems. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, article ID 240146, 12 p., 2012. Disponível em: doi:10.1155/2012/240146
- Cantó, C.; Auwerx, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, issue 7, p.325-331, 2009.
- COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 8 de set 2012.
- Colman, R.J.; Anderson, R.M.; Johnson, S.C.; Kastman, E.K.; Kosmatka, K.J.; Beasley, T.M.; Allison, D.B.; Cruzen, C.; Simmons, H.A.; Kemnitz, J.W.; Weindruch, R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 201–4, 2009.

- Cruzen, C.; Colman, R. Effects of Caloric Restriction on Cardiovascular Aging in Non-human Primates and Humans. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 25, p. 733–43, 2009.
- Deakin, S.P.; James, R.W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. **Clinical Science**, v. 107, p. 435–47, 2004.
- Deschaux, O.; Bizot, J.C.; Goyffon, M. Apamin improves learning in an object recognition task in rats. **Neuroscience Letters**, v. 222, p.159-62, 1997.
- Doumas, B.T.; Watson, W.A.; Biggs, H.G. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v.31, p. 87-96, 1971.
- Dröge, W.; Schipper, H.M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. **Aging Cell**, v. 6, n.3, p. 361–370, 2007.
- Dunet, V.; Ruiz, J.; Allenbach, G.; Izzo, P.; James, R.W.; Prior, J.O. Effects of paraoxonase activity and gene polymorphism on coronary vasomotion. **EJNMMI Research**, v.1, n.1, p.1-7, 2011.
- Durrington, P.N.; Mackness, B.; Mackness, M.I. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p.473-80, 2001.
- Dringen, R.; Hirrlinger, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 4, p. 505–516, 2003.
- Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-21, 1990.
- Fontan-Lozano, A.; Lopez-Lluch, G.; Delgado-Garcia, J.M.; Navas, P.; Carrion, A.M. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. **Molecular Neurobiology**, v. 38, p. 167–177, 2008.
- Fontana, L.; Partridge, L.; Longo, V.D. Extending healthy life span—from yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321–6, 2010.
- Forti, N.; Diament, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, n.5, p.671-79, 2006.
- Friedman, J. **The role of free radicals in the nervous system**. In: Gadoth N, Göbel HH (eds) Oxidative stress and free radical damage in neurology. Oxidative stress in

applied basic research and clinical practice. Totowa: Humana Press, 2011, p. 1-17, 1 ed., Disponível em: doi:10.1007/978-1-60327-514-9_1.

Fuhrman, B.; Volkova, N.; Aviram, M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. **Atherosclerosis**, v.161, n.2, p.307-16, 2002.

Gemma, C.; Vila, J.; Bachstetter, A.; Bickford, P.C. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. In: Riddle DR, editor. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3869>.

Gomi, F.; Matsuo, M. Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. **The Journal of Gerontology**, Series A, v. 53, p. 161–7, 1998.

Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.

Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312–322, 2006a.

Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634-58, 2006b.

Haug, A.; Hostmark, A. T. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissues lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **The Journal of Nutrition**, v.117, v. 6, p.1011-17, 1987.

He, X.Y.; Zhao, X.L.; Gu, Q.; Shen, J.P.; Hu, Y.; Hu, R.M. Caloric restriction from a young age preserves the functions of pancreatic β cells in aging rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 227, n.4, p. 245-252, 2012.

Hevel, J.M.; Marletta, M.A. Nitric oxide synthase assays. **Methods in Enzymology**. v. 233, p.250-8, 1994.

Idrobo, F.; Nandy, K.; Mostofsky, D.I.; Blatt, L.; Nandy, L. Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 6, p.355–362, 1987.

Ingram, D.K; Weindruch, R.; Spangler, E.L.; Freeman, J.R.; Walford, R.L. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. **Journal of Gerontology**, v. 42, p. 78–81, 1987

- Izquierdo, I.; Medina, J.H. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.
- Izquierdo, I.; Barros, D.M.; Melo e Souza, T.; de Souza, M.M.; Izquierdo, L.A.; Medina, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635-6, 1998.
- Izquierdo, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- Izquierdo, I.; Cammarota, M.; Silva, W.C.D.; Bevilaqua, L.R.M.; Rossato, J.I.; Bonini, J.S.; Mello, P.; Benetti, F.; Costa, J.C.; Medina, J.H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n.1, p 115-127, 2008.
- Klamt, F.; Gottfried, C.; Tramontina, F.; Dal-Pizzol, F.; Da Frola, M.L. Jr; Moreira, J.C.; Dias, R.D.; Moriguchi, E.; Wofchuk, S.; Souza, D.O. Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. **NeuroReport**, v.13, n.12, p.1515–1518, 2002.
- Klebanov, S. Can short-term dietary restriction and fasting have a long-term anticarcinogenic effect? **Interdisciplinary Topics in Gerontology**, v. 35, p.176-92, 2007.
- Koizumi, A.; Weindruch, R.; Walford, R.L. Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 117, p. 361–367, 1987.
- Kontush, A.; Chapman, M.J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.342-74, 2006.
- Lebel, C.P.; Bondy, S.C. Oxidative damage and cerebral aging. **Progress in Neurobiology**, v. 38, p. 601-9, 1992.
- Lee, J.; Seroogy, K.B.; Mattson, M.P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 539–547, 2002.
- LEES, R. **Manual de análises de alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1979.
- Levenson, C.W.; Rich, N.J. Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 412-415, 2007.
- Mackness, B.; Durrington, P.; Mcelduff, P.; Yarnell, J.; Azam, N.; Watt, M.; Mackness, M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v.107, p.2775-79, 2003.

Madamanchi, N.R.; Hakim, Z.S.; Runge, M.S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes.

Journal of Thrombosis and Haemostasis, v.3, n.2, p.254-67, 2005.

Margis, R.; Dudand, C.; Teixeira, F.K.; Pinheiro, M.M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 275, p. 3959–3970, 2008.

Markowska, A.L.; Savonenko, A. Retardation of cognitive aging by life-long diet restriction: implications for genetic variance. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 75–86, 2002.

Martin, S.J.; Grimwood, P.D.; Morris, R.G.M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual Reviews Neuroscience**, v.23, p. 649-711, 2000.

Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n.9, p. 913-22, 2005.

Mattson, M.P.; Magnus, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 278–294, 2006.

McCay, C.M.; Crowell, M.F.; Maynard, L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. **Nutrition**, v.5, n.3, p. 155–71, discussion 72, 1989.

Morris, R.G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2829–2846, 2006.

Moya, E.T.; Gianotti, M.; Llado, I.; Proenza, A.M. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 197–203, 2006a.

Moya, E.T.; Gianotti, M.; Proenza, A.M.; Llado, I. The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 2042-48, 2006b.

Montine, T.J.; Neely, M.D.; Quinn, J.F.; Beal, M.F.; Markesbery, W.R.; Roberts II, L.J.; Morrow, J.D. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p.620-626, 2002.

Morris, R.G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2829–2846, 2006.

Netto, C.A.; Izquierdo, I. On how passive is inhibitory avoidance. **Behavioral and Neural Biology**, v.43, p.327-330, 1985.

Ng, D.S.; Chu, T.; Esposito, B.; Hui, P.; Connelly, P.W.; Gross, P.L. Paraoxonase-1 deficiency in mice predisposes to vascular inflammation, oxidative stress, and thrombogenicity in the absence of hyperlipidemia. **Cardiovascular Pathology**, v. 17, n. 4, p. 226-32, 2008.

Pearson, D. **Técnicas de laboratório para el analisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1976.

Pitsikas, N.; Algeri, S. Deterioration of spatial and nonspatial reference and working memory in aged rats: protective effect of life-long calorie restriction. **Neurobiology of Aging**, v. 13, p. 369–373, 1992.

Pitsikas, N.; Carli, M.; Fidecka, S.; Algeri, S. Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. **Neurobiology of Aging**, v. 11, p. 417–423, 1990.

Primo-Parmo, S.L.; Sorenson, R.C.; Teiber, J.; La Du, B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v.33, n.3, p.498-507, 1996.

Rao, G.; Xia, E.; Nadakavukaren, M.J.; Richardson, A. Effect of dietary restriction on the agedependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. **The Journal of Nutrition**, v. 120, p. 602– 609, 1990.

Reynolds, A.; Laurie, C.; Mosley, R.L.; Gendelman, H.E. Oxidative estress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **International Review of Neurobiology**, v. 82, p. 297-325. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82016-2, 2007.

Ribeiro, L.C. **O papel da restrição calórica na neuroproteção**. 2009. 82f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Neurociências) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Ribeiro, L.C.; Quincozes-Santos, A.; Leite, M.C.; Abib, R.T.; Kleinkauf-Rocha, J.; Biasibetti, R.; Rotta, L.N.; Wofchuk, S.T.; Perry, M.L.S.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, C. Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. **Neuroscience Research**, v. 64, p. 330–334, 2009.

Ribeiro, L.C.; Rodrigues, L.; Quincozes-Santos, A.; Tramontina, A.C.; Bambini-Junior, V.; Zanotto, C.; Diehl, L.A.; Biasibetti, R.; Kleinkauf-Rocha, J.; Dalmaz, C.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, C. Caloric restriction improves basal redox parameters in

hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. **Brain Research**, v. 1472, p. 11-19, 2012.

Roth, L.W.; Polotsky, A.J. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. **Maturitas**, v. 71, p.315-19, 2012.

Santin, K.; Rocha, R.F.D.; Cechetti, F.; Quincozes-Santos, A.; Souza, D.F.D.; Nardin, P.; Rodrigues, L.; Leite, M.C.; Moreira, J.C.F.; Salbego, C.G.; Gonçalves, C.A. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. **Brain research**, v. 1421, p. 1-10, 2011.

Santos, A.P.; Freitas, C.; Rodrigues, E.; Cardoso, H.; Fonseca, H.; Palma, I.; Silva, I.; Pereira, J.L.; Nunes, J.S.; Raposo, L.; Carnevalheiro, M.; Ramos, M.H.; Oliveira, M.J.; Macedo, M.P.; Monteiro, M.; Martins, M.; Freitas, P.; Cerqueira, R.; Mendes, R.; Paiva, S.; Duarte, S.; Cruz, S.C.; Barata, T. Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. GEIR - Grupo de Estudos da Insulino-Resistência. **Manual sobre Insulino-Resistência**. Editora: Helena Cardoso, 3 ed., 190p. 2009. Disponível em: <http://www.spedm-geir.org>. Acesso em: 19 jan 2014.

Santos, R.D.; Gagliardi, A.C.M.; Xavier, H.T.; Magnoni, C.D.; Cassani, R.; Lottenberg, A.M., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.1, supl.3, 40p. 2013.

Schrader, C.; Rimbach, G. Determinants of Paraoxonase 1 Status: Genes, Drugs and Nutrition. **Current Medicinal Chemistry**. v.18, n.36, p.5624-43, 2011;

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.88, Suplemento I, 2007.

Serrano, F.; Klann, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 431–443, 2004.

Sies, H. (1991) Oxidative Stress. II: Oxidants and Antioxidants, Academic Press, London.

Silva, D.O. **Avaliação do crescimento e desenvolvimento de ratos tratados com Pereskia aculeata**, Miller. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

Silva, W.C.F.N. **Inibição da síntese de mRNA no hipocampo prejudica a consolidação e a reconsolidação de memória espacial**. 2009. 50f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Skrha, J. Effect of caloric restriction on oxidative markers. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 47, p. 224-42, 2009.

Squire, L.R.; Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v.93, p, 13515-13522, 1996

Squire, L.R.; Kandel, E.R. Memória: da mente às moléculas. Artmed, Porto Alegre, 2003

STATISTICA - StatSoft, Inc. STATISTICA (software de análise de dados do sistema), a versão 7. www.statsoft.com. 2004

Stewart, J.; Mitchell, J.; Kalant, N. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. **Neurobiology of Aging** v.10, p. 669–675, 1989.

Trepanowski, J.F.; Canale, R.E.; Marshall, K.E.; Kabir, M.M.; Bloomer, R.J. Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 107-19, 2011.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

Weiss, E.P.; Fontana, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, p. H1205–H1219, 2011.

Wolfson, W.Q; Chon, C.; Calvary, F.; Ichiba, F. A rapid procedure for the estimation of total protein, true albumin, total globulin, alpha globulin, and gamma globulin in 1.0 ml of serum. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 9, p. 723-30, 1948.

Yu, B.P. **Calorie restriction as potent anti-aging intervention: modulation of oxidative stress.** In: Rattan S (Ed) Aging Interventions and Therapies. World Scientific Publisher, p.193-217, 2005a.

Yu, B.P. Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 9, p.1003–1010, 2005b.

APÊNDICE

Tabela 1 – Número de cruzamentos e elevações de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Grupo Controle-C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Grupo Restrição Calórica-RC) na tarefa do campo aberto.

Grupo	N	Número de Cruzamentos	Número de elevações
CA12	8	94,42±9,43	36,00±7,33
CJ12	8	85,87±7,27	36,37±8,50
CJ16	8	97,37±15,08	24,75±6,88
RCA12	8	102,62±18,11	34,25±8,74
RCJ12	8	97,37±19,84	36,12±9,26
RJ16	8	91,12±14,40	24,87±4,99

Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* (Grupo Controle-C) ou submetidos à restrição calórica moderada (Grupo Restrição Calórica-RC) na tarefa do labirinto em cruz elevado.

Grupo	n	Braços abertos		Braços fechados	
		Nº de Entradas	Tempo de permanência	Nº de Entradas	Tempo de permanência
CA12	8	0	0	5,00±2,30	193,71±40,52
CJ12	8	0,75±1,16	8,25±4,68	8,25±4,43	193,00±41,94
CJ16	8	1,12±1,36	0,10±0,11	9,00±3,25	2,26±0,46
RCA12	8	0,12±0,35	2,12±6,01	3,00±1,85	194,25±37,49
RCJ12	8	0,50±1,06	6,87±14,90	7,62±3,33	209,50±59,46
RJ16	8	0,37±0,74	0,06±0,12	7,87±3,83	2,13±0,29

Os valores representam as médias ± desvio padrão de duplicatas de 8 animais por grupo. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

ANEXO



Pelotas, 18 de dezembro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professora Elizabete Helbig

Departamento de Nutrição da Faculdade de Nutrição

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **"Restrição calórica: Efeitos em parâmetros oxidativos, comportamentais e no estado nutricional de ratos Wistar"**, processo nº23110.009827/2012-89, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 9827).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 28 / 01 / 2013

Assinatura da Professora Responsável: