

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**Dissertação Mestrado**

**Potencial cardioprotetor da restrição calórica: influência sobre o estresse oxidativo e a sinalização para inflamação**

**Caroline Bitencourt Pedrotti**

**Pelotas 2016**

CAROLINE BITENCOURT PEDROTTI

Potencial cardioprotetor da restrição calórica: influência sobre o estresse oxidativo e a sinalização para inflamação

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

Orientador: Professor Doutor Paulo Cavalheiro Schenkel  
Coorientadora: Professora Doutora Sandra Costa Valle

Pelotas | 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na  
Publicação

P372p Pedrotti, Caroline Bitencourt

Potencial cardioprotetor da restrição calórica : influência sobre o estresse oxidativo e a sinalização para inflamação / Caroline Bitencourt Pedrotti ; Paulo Cavalheiro Schenkel, orientador ; Sandra Costa Valle, coorientadora. — Pelotas, 2016.

58 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Castração. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação. 5. Restrição calórica. I. Schenkel, Paulo Cavalheiro, orient. II. Valle, Sandra Costa, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram nessa jornada - professores, amigos, meu esposo e em especial aos meu pais, que mesmo em momentos de desânimo não me fizeram desistir.

## Agradecimentos

À minha família e amigos pelo apoio, carinho e bons momentos. Ao meu marido Mauro por sempre ter acreditado em mim, ter me ajudado a superar as dificuldades que surgiram e ter me estendido a mão nos momentos de estresse. As minhas filhas de coração por num simples olhar em um dia difícil me fazerem não desistir.

Ao Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel e a prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Costa Valle pela orientação, oportunidade e confiança.

Ao laboratório de fisiologia cardiovascular e estresse oxidativo da UFRGS, Prof. <sup>a</sup> Adriane Belló Klein, Prof. Alex Sander da Rosa Araujo, Tânia Regina Gattelli Fernandes, Cristina Campos Carraro, Denise dos Santos Lacerda, Bruna Grazzi de Lima, Patrick Türck, pelo apoio nas análises de tecido cardíaco.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisa admiráveis.”

José de Alencar

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAT	Enzima Catalase
Cox-2	Ciclo-oxigenase-2
CT	Colesterol Total
Cu/ZnSOD	Superóxido Dismutase dependente de Cobre e Zinco
CV	Cardiovascular
DCV	Doença Cardiovascular
E2	17 $\beta$ -estriol
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Fêmeas Controle
FOC	Fêmeas Ovariectomizadas Controle
FORC	Fêmeas Ovariectomizadas Restrição Calórica
FRC	Fêmeas Restrição Calórica
GPx	Glutathione Peroxidase
HDL	High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
I/R	Isquemia-Reperfusão
ICOM-1	Molécula de Adesão Intracelular 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
LPS	Lipopolissacarídeos
MnSOD	Superóxido Dismutase dependente de Manganês
MyD88	Myeloid Differentiation Primary response gene 88
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
OVX	Ovariectomia
PAMP	Moléculas-padrão associadas a patógenos
PC	Peso Corporal
PON1	Paraoxanase 1
PPR	Receptores de reconhecimento Padrão
QL	Lipoperoxidação por Quiluminescência
RC	Restrição Calórica
SOD	Superóxido Dismutase
TG	Triacilgliceróis
TLR	Toll Like Receptors
TLR-4	Toll Like Receptors – tipo 4
TNF- $\alpha$	(Fator de necrose tumoral – $\alpha$ )
TRAP	Potencial Reativo Antioxidante Total
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
VCOM-1	Molécula de Adesão Celular 1

## Resumo

PEDROTTI, C.B. **Potencial cardioprotetor da restrição calórica: influência sobre o estresse oxidativo e a sinalização para inflamação, Pelotas, RS, Brasil.** 2016. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2016.

O estrogênio é um hormônio esteroide que promove cardioproteção por combater o estresse oxidativo e a inflamação. Seus níveis reduzidos, como após a menopausa nas mulheres, aumentam a propensão às doenças cardiovasculares. Tais doenças são as principais causas de morte nos países ocidentais, acometem predominantemente mulheres após a menopausa. Neste contexto, tem sido estimulada cada vez mais a descoberta de terapias profiláticas que possam evitar/retardar a patogênese das doenças cardiovasculares. A restrição calórica (RC) tem mostrado papel promissor nesse sentido, embora seus mecanismos não sejam bem conhecidos. Portanto, torna-se fundamental aprofundarmos a investigação dos mecanismos envolvidos para podermos sugerir novas abordagens terapêuticas. O objetivo do estudo foi verificar se a RC é capaz de modular a influência exercida pelo estrogênio sobre alguns fatores de risco associados a doenças cardiovasculares. Para isso, foram utilizadas 20 ratas *Wistar* divididas em 4 grupos experimentais (FC- dieta *ad libitum*, FRC-restrição calórica de 30%, FOC- dieta *ad libitum* e ovariectomia e FORC-restrição calórica 30% e ovariectomia). Após aclimação à dieta, foram submetidas à RC de 30% até o dia do sacrifício. Passado 5 semanas de RC de 30%, as ratas foram castradas por ovariectomia bilateral ou submetidas a simulação do mesmo em plano anestésico profundo. Feito isso, elas permaneceram em RC de 30% por mais 4 semanas, totalizando 9 semanas em RC de 30 %. Após o sacrifício por decapitação, foi realizada a coleta de sangue, para as medidas dos lipídios séricos e da paraoxanase 1, e do tecido cardíaco, para medidas de estresse oxidativo e da quantificação da expressão proteica do TLR4 e NF- $\kappa$ B por *western blot*. Como resultado observou-se que as ratas submetidas à RC tiveram uma taxa de ganho de peso menor que as alimentadas *ad libitum*, mesmo com a escassez de estrogênio. Nos parâmetros séricos, a RC diminuiu o TG das ratas FRC comparadas às FC e a escassez estrogênica aumentou os níveis de CT nas ratas FOC comparadas às FC e elevou também o HDL tanto nas FOC como nas FORC. A atividade da PON1 foi semelhante em todos grupos. Já a razão PON1/HDL foi significativamente reduzida nos grupos FOC e FORC em relação aos seus grupos controles. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no coração, a atividade da enzima antioxidante SOD foi menor nas ratas com menos estrogênio, a RC foi capaz de diminuir a lipoperoxidação e a capacidade antioxidante total foi aumentada nos grupos FOC e FRC em relação ao grupo FC. O grupo FORC apresentou uma menor capacidade antioxidante total em relação aos seus controles (FRC e FOC). Quanto à expressão proteica do TLR4, observamos uma diminuição nos grupos FOC e FRC em relação ao grupo FC, que não diferiu do grupo FORC. A expressão do NF- $\kappa$ B foi significativamente menor no grupo FORC em relação ao grupo FRC. Conclui-se que a RC de 30%, ao promover a diminuição da expressão de proteínas chave para a sinalização intracelular da inflamação e da morte celular, possui potencial benéfico na prevenção de danos cardíacos ocasionados pela escassez estrogênica.



**Palavras-chave:** castração; doenças cardiovasculares; estresse oxidativo; estrogênio; inflamação; restrição calórica

## Abstract

PEDROTTI, C.B. **Cardioprotective potential of calorie restriction: effects on oxidative stress and signaling to inflammation, Pelotas, RS, Brasil.**2016. Dissertation (Master) – Pós Graduate Program in Nutrition and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas/RS, 2016.

Estrogen is an steroid hormone that promotes cardioprotection for combating oxidative stress and inflammation. Their low levels, such as after women menopause, increase the propensity to cardiovascular disease. Such diseases are the leading causes of death in Western countries, predominantly affects women after menopause. In this context, it has been increasingly encouraged the discovery of prophylactic therapies which can prevent/delay the pathogenesis of cardiovascular diseases. Caloric restriction (CR) has shown promising role in this regard, although the mechanisms are not well known. Therefore, it becomes essential to deepen in the investigation of the mechanisms involved in order to suggest new therapeutic approaches. The aim of the study was to determine whether the CR is able to modulate the influence exerted by estrogen on some risk factors associated with cardiovascular diseases. For this, it was used 20 rats Wistar shared in 4 experimental groups (FC-diet *ad libitum*; FRC-caloric restriction 30%; FOC-diet *ad libitum* and ovariectomy; FORC-caloric restriction 30% and ovariectomy). After diet acclimatization, they were subjected to CR 30% until the day of sacrifice. Spent 5 weeks of CR 30%, the rats were ovariectomy bilateral castrated or subjected to the same simulation in deep anesthesia. After that, they remained in 30% CR for another 4 weeks, totalizing 9 weeks in 30% CR. After sacrifice by decapitation, blood collection was performed for measurements of serum lipids and paraoxanase 1, and cardiac tissue to oxidative stress measurements and quantification of protein expression TLR4 and NF-kB by western blot. As a result, it was observed that the rats submitted to CR had a gain weight rate less than those fed *ad libitum*, even with lack of estrogen. In serum parameters, CR decreased the TG of FRC rats compared to FC and estrogenic shortage increased CT levels in FOC rats compared to FC and also raised HDL both in FOC and in FORC. The activity of PON1 was similar in all groups. Already the PON1 / HDL ratio was significantly reduced in the FOC and FORC groups in relation to their control groups. Regarding the oxidative stress parameters evaluated in the heart, the activity of the antioxidant enzyme SOD was lower in rats with less estrogen, the CR was able to decrease lipid peroxidation and total antioxidant capacity was increased in FOC and FRC groups against the FC group. The FORC group had a lower total antioxidant capacity compared to its control (FRC and FOC). As the protein expression of TLR4, we observed a decrease in FOC and FRC groups against the FC group, which did not differ from FORC group. The expression of NF-kB was significantly lower in FORC group compared to the FRC group. We conclude the CR 30%, when promoting the reduction of the expression of key proteins to intracellular signaling of inflammation and cell death, has potential benefit in preventing heart damage caused by estrogen shortage.

**Keywords:** castration; cardiovascular diseases; oxidative stress; estrogen; inflammation; caloric restriction.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Objetivos e metas .....	16
1.1.1. Objetivo geral:.....	16
1.1.2. Objetivos específicos: .....	16
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Estrogênio.....	17
2.2. Estresse oxidativo .....	18
2.3. Inflamação .....	21
2.4. Restrição calórica .....	23
3.METODOLOGIA .....	26
3.1. Local de realização .....	26
3.2. Animais e grupos .....	26
3.3. Dieta e restrição calórica.....	27
3.4. Ovariectomia bilateral .....	27
3.5. Determinação do ciclo estral.....	28
3.6. Monitoramento do peso .....	29
3.7. Sacrifício dos animais, morfometria e descartes.....	29
3.8. Análises séricas .....	29
3.8.1. Obtenção do soro e dosagens bioquímicas .....	29
3.9. Análises em tecido cardíaco .....	30
3.9.1. Preparo dos homogeneizados de tecido cardíaco .....	30
3.9.2. Quantificação de proteínas .....	31
3.9.3.Determinação da Superóxido Dismutase (SOD) .....	31
3.9.4. Avaliação da lipoperoxidação (QL) .....	31
3.9.5. Potencial reativo antioxidante total (TRAP).....	32
3.9.6. Quantificação da expressão proteica por <i>Western blot</i> .....	32

3.10. Análise estatística .....	33
4.RESULTADOS.....	34
4.1. Peso corporal e peso dos órgãos .....	34
4.2. Parâmetros bioquímicos séricos .....	36
4.3. Análises de tecido cardíaco .....	37
4.3.1. Parâmetros de estresse oxidativo: SOD, QL e TRAP .....	37
4.3.2. Expressão proteica de TLR4 e NF-kB .....	39
5.DISSCUSSÃO.....	41
6.CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte nos países ocidentais. Somado a isso, o número de internações e os custos com o tratamento dos pacientes que sobrevivem aos eventos agudos são exorbitantes para os cofres públicos. Neste contexto, dois tipos de abordagens têm sido propostos: a prevenção e o tratamento.

Dentre outros agentes cardioprotetores conhecidos, destaca-se o estrogênio uma vez que a incidência de doenças coronarianas é menor em mulheres na pré-menopausa quando comparadas com homens na mesma faixa etária e com mulheres pós-menopausa que fazem terapia de reposição de estrogênio (SALEH, et al. 2000). Ou seja, tem sido observado uma correlação inversa entre os níveis de estrogênio e os fatores de risco associados com as doenças cardiovasculares. Logo, a diminuição dos seus níveis, após a menopausa, desempenha um papel crítico na patogênese de algumas doenças cardiovasculares (MENDELSON e KARAS, 1999; SOLIMENE, 2010; SIMONCINI e GENAZZANI, 2003). Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são completamente entendidos, mas se sabe que o estrogênio exerce ação moduladora sobre o estresse oxidativo e a inflamação por potencializar direta e indiretamente as capacidades antioxidantes e algumas citocinas antiinflamatórias (POZZI et al., 2006; VEGETO et al., 2003).

O estresse oxidativo, distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor do pró, que leva ao dano, caracteriza-se por uma situação em que uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) normalmente está presente, estando assim associado ao processo de envelhecimento e a doenças como as cardiovasculares (HALLIWELL, 2006<sup>a</sup>). Estudos tem buscado desvendar melhor os mecanismos envolvendo as EROs e as citocinas pró-inflamatórias na fisiopatologia de doenças cardíacas utilizando terapias antioxidantes e antiinflamatórias (KHAPER et al., 2010; TAKAHASHI, 2011; MEDZHITOV, 2000; HILL e SINGAL, 1996).

Visando a prevenção contra injúrias cardiovasculares, a restrição calórica (RC), não associada com a desnutrição, tem se mostrado promissora. Quando realizada de uma maneira consistente, torna-se uma das intervenções mais

eficazes para melhorar a saúde, podendo expandir a expectativa média de vida de muitas espécies por prevenir ou retardar a ocorrência de doenças crônicas como diabetes, cardiomiopatias, doenças autoimunes, respiratórias, renais, etc. (BISHOP e GUARENTE, 2007; LEVENSON e RICH, 2007; TREPANOWSKI et al., 2011; ROTH e POLOTSKI, 2012). O primeiro estudo que utilizou uma dieta de restrição calórica em ratos foi realizado em 1935 e demonstrou que, quando implementada após a puberdade, a RC aumenta a expectativa média e máxima de vida, além de prevenir ou atenuar a severidade de doenças crônicas (MCCAY, CROWELL e MAYNARD, 1935). Desde então, os possíveis benefícios da dieta de RC têm sido investigados, sendo preconizada 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 e AUWERX, 2009; TREPANOWSKI et al., 2011).

Os efeitos cardioprotetores da RC são associados a modulação de alguns biomarcadores, tais como: redução de triacilgliceróis (TG), aumento do HDL e redução de citocinas pró-inflamatórias. Somado a isso, a RC também é capaz de modular o estresse oxidativo do coração (MARZETTI et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2012; CRUZEN e COLMAN, 2009). Uma importante enzima antiaterogênica e anti-inflamatória associada ao HDL, a paraoxonase1 (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 A-I e J (apo A-I e apo-J) das partículas de HDL (DEAKIN e JAMES, 2004; NG et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a RC se relaciona à diminuição da atividade sérica da PON1, sem o entendimento dos mecanismos envolvidos (MOYA et al., 2006a; MOYA, 2006b; SKRHA, 2009). Sendo assim, destaca-se a necessidade de identificarmos moléculas-chave envolvidas na cardioproteção induzida pela RC para aprofundarmos o conhecimento mecanístico e, assim, podermos sugerir uma abordagem terapêutica ainda mais eficaz nesses casos.

Outro componente importante associado as doenças cardiovasculares é a inflamação. Neste sentido, os receptores semelhantes ao Toll (TLRs), originalmente descobertos como receptores de um sistema de sinalização no desenvolvimento embrionário das moscas *Drosophila melanogaster* têm merecido destaque

(MEDZHITOV, JANEWAY; 2000). Em humanos, já foram descritos nove tipos de TLRs que funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) classicamente envolvidos no reconhecimento de moléculas-padrão associadas a patógenos (PAMP). A associação PRR-PAMP resulta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular que estimula a expressão de vários genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória. O lipopolissacarídeo (LPS) oriundo da parede celular de bactérias gram-negativas é uma PAMP classicamente reconhecida pelo TLR do tipo 4 (TLR4). Além dos PAMP's, moléculas endógenas também parecem modular a ativação do TLR4 e a consequente sinalização intracelular pela via dependente da *Myeloid Differentiation Primary response gene 88* (MyD88). Essa, sinaliza para inflamação/estresse oxidativo por ser uma proteína adaptadora chave na formação do complexo ativador da translocação do Fator Nuclear Kappa B (NFκB) para o núcleo (LUCAS, MAES; 2013). A importância da ativação do NFκB mediada pelo TLR4 já é bem conhecida (AVLAS,2011).

Amparados por esses achados prévios, o presente estudo visa analisar se a conhecida cardioproteção promovida pela restrição calórica é eficaz em mitigar a injúria cardíaca promovida pela redução dos níveis de estrogênio. Além do mais, visa explorar se há envolvimento do estresse oxidativo e da via de sinalização ativada pelo TLR4.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Verificar se a restrição calórica modula a influência exercida pelo estrogênio sobre alguns fatores de risco de doenças cardiovasculares.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Analisar a evolução do peso corporal;
- Verificar os níveis dos lipídios séricos;
- Mensurar a atividade da paraoxonase-1 sérica;
- Verificar a capacidade antioxidante e pró-oxidante no tecido cardíaco;
- Analisar a participação da via do TLR4 na sinalização para a inflamação em amostras de tecido cardíaco;
- Determinar se a restrição calórica exerce cardioproteção por modular os níveis dos lipídios séricos, da atividade da paraoxonase-1 sérica e/ou do estresse oxidativo cardíaco.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Estrogênio

Os estrógenos são um grupo de esteroides sexuais que exercem ações pleiotrópicas em vários órgãos além do âmbito da sua função reprodutiva. As fontes primárias de estrogênios em mulheres pré-menopausa são os ovários. Mas são também produzidos em inúmeros locais extra-gonadais, incluindo ossos, mama, tecido adiposo e cérebro (STOCCO, 2012). Os três estrogênios sintetizados naturalmente são estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3), destes, E2 é o mais potente. A secreção de E2 é pulsátil e a sua concentração varia dentro de um ciclo menstrual (100-600 pg/ml) (TROTTER et al., 1999). Após a menopausa, a concentração sérica de E2 cai precipitadamente para valores semelhantes ou menores do que aqueles em homens de idade semelhante (5-20 pg/ml) (BELL et al., 2011).

Existe uma evidência crescente de que a aromatase, enzima que age como mediador da aromatização de andrógenos em estrógenos, é expressa no coração (LING 2006; GROHE, 1998; JASBUTYTE et al., 2012). Assim estes achados sugerem uma produção de estrogênio local no coração. Dada a relação entre os hormônios sexuais e a expressão de aromatase relatada em outros órgãos e a associação de polimorfismos aromatase com risco de DCV, estes dados fornecem implicações funcionais sobre a atividade de E2 local e aromatase cardíaca na cardioproteção mediada por E2 (BALTHAZART et al., 2011; KUMAR, 2009; BEITELSHEES et al., 2010).

Já está bem estabelecido que as mulheres apresentam certa cardioproteção em relação aos homens durante o período reprodutivo (YANG e RECKELHOFF, 2011). No entanto, há um aumento significativo na incidência de doenças cardiovasculares após a menopausa, indicando um papel chave do estrogênio nesse processo (MURPHY, 2011). Ao longo das últimas décadas, a terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido utilizada para reduzir os riscos cardiovasculares em mulheres após a menopausa (YANG e RECKELHOFF, 2011). Porém, contrariamente a estas indicações, o estudo da *Women's Health Initiative* (WHI) evidenciou que a TRH não apenas foi ineficaz em reduzir as complicações

cardiovasculares, como as aumentou (ROSSOUW, 2002). Quando iniciada logo após a menopausa, a TRH mostra-se benéfica com os clássicos efeitos cardioprotetores. Por outro lado, quando iniciada tardiamente, como no caso do estudo WHI com mulheres de aproximadamente 63 anos, a TRH está associada com uma deterioração no controle do tônus coronariano e, conseqüentemente, com o maior risco de morte por complicações cardiovasculares.

Vários estudos já demonstraram que o estrogênio, além de ter característica antioxidante, pode agir modulando a ação tanto dos antioxidantes enzimáticos como dos não enzimáticos e, assim, manter o equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes (BARP et al., 2002; MORGAN-MARTINS, 2003).

Neste contexto, tem sido destacado o papel do estrogênio no processo inflamatório e no estresse oxidativo, embora seus mecanismos ainda não tenham sido completamente elucidados.

## **2.2. Estresse Oxidativo**

Aproximadamente 90% do oxigênio que ingressa nas células é usado para a produção mitocondrial da adenosina trifosfato (ATP) necessária pelas células humanas. Durante este processo, há uma redução tetravalente da molécula de oxigênio, resultando na formação de energia e duas moléculas de água (FRIEDMAN 2011). No entanto, uma pequena parte dos elétrons desvia da rota e reduz o oxigênio de forma monovalente. Ou seja, estes recebem somente um elétron de cada vez e se tornam radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (FRIEDMAN 2011).

O radical livre é uma estrutura química capaz de existir independentemente e que possui um ou mais elétrons desemparelhados (LLESUY, 2002). Isso o torna instável, reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular, levando a oxidação de proteínas, lipídios e DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; VALKO et al, 2007). Há muitos tipos de radicais livres, tais como de oxigênio, nitrogênio, cloro e bromo e uma grande variedade de termos têm sido utilizados na literatura para descrevê-los. De acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (2006),

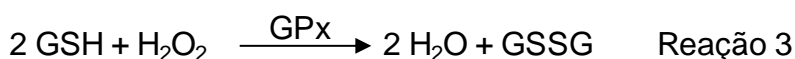
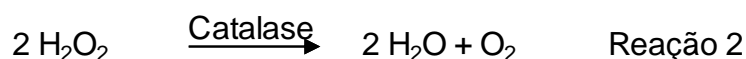
em relação aos radicais de oxigênio, a terminologia mais correta é a de espécies reativas de oxigênio (ERO), um descritor coletivo que não engloba apenas os radicais de oxigênio, como também alguns derivados não radicais de  $O_2$ , como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A maioria das ERO, bem como as demais espécies reativas, são produzidas como subprodutos do metabolismo celular, tendo como principais locais 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. O seu envolvimento em doenças como câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e no envelhecimento está estabelecido na literatura (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006; VALKO, 2007).

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, as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e os antioxidantes, glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$  – tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides, bem como (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 catalisar a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  (Reação 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  $H_2O$  (Reação 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água ou álcool usando a glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons (Reação 3) (MARGIS, 2008).



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 e 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).

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. (FUHRMAN et al, 2002; KONTUSH e CHAPMAN, 2006).

Em conjunto com o estresse oxidativo, a resposta inflamatória contribui para eventos cardiovasculares fisiológicos e patológicos em resposta às demandas cardíacas. Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo está conectado com a resposta inflamatória durante a progressão para a insuficiência cardíaca (KHAPER

et al., 2010). Achados recentes sugerem que pró-oxidantes parecem estar envolvidos com a ativação de mediadores da indução de várias citocinas pró-inflamatórias (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; GIL, TSUNG E BILIAR, 2010). Reciprocamente, citocinas pró-inflamatórias tem sido implicada na cascata de eventos que levam ao aumento do estresse oxidativo. Enquanto o TNF- $\alpha$  é conhecido por suprimir antioxidantes e estimular a produção e expressão de pró-oxidantes, a interleucina-10 (IL-10) aumenta a expressão de antioxidantes assim como suprime de pró-oxidantes (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; GIL, TSUNG E BILIAR, 2010). Essa divergência salienta a interação entre a inflamação e o estresse oxidativo e também destaca mais uma vez o significativo potencial desse balanço na doença cardíaca.

### 2.3. Inflamação

A inflamação crônica é reconhecida como um poderoso fator de risco independente para DCV (ROSS, 1999). Além disso, ela pode ser um processo convergente que liga o envelhecimento normal com doenças relacionadas à idade (CHUNG et al., 2008). De acordo com esta proposta, com o avançar da idade há um aumento do estresse oxidativo que culmina com a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo o NFkB, que por sua vez aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ROSS, 1999). Dentre os biomarcadores inflamatórios preditivos de eventos cardiovasculares, a proteína C reativa (PCR), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) têm sido os mais amplamente investigados (SINNING, 2008). Nesse contexto, a sinalização inflamatória mediada pela família dos receptores semelhantes ao Toll também tem merecido destaque.

Os TLRs são membros de um sistema de reconhecimento e de sinalização evolutivamente conservado, originalmente descoberto como tendo um papel no desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila Melanogaster*. Adicionalmente, os TLRs, associados com a resposta imune inata, atuam na defesa contra bactérias e infecções (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). Tradicionalmente o sistema imune é dividido em inato e adaptativo, os quais apresentam diferentes funções e papéis. Enquanto o sistema adaptativo, organizado em células especializadas (linfócitos T e B), necessita de alguns dias para ter eficiência na resposta imune, o sistema inato,

mais simples, é ativado imediatamente após o insulto (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). A estratégia do sistema imune inato é focada no reconhecimento de grandes grupos de microrganismos que apresentam estruturas conservadas em suas membranas. Ou seja, é uma resposta pouco específica. Essas estruturas são referidas como moléculas padrão associadas ao patógeno que são identificadas pelos receptores de reconhecimento padrão. O mecanismo efetor da imunidade inata, os quais fazem parte peptídeos antimicrobianos, fagócitos e um sistema complemento, ao ser ativado rapidamente controla a infecção/inflamação. Desta forma, o sistema inato controla a infecção até que o sistema adaptativo esteja apto a atuar nesse sentido.

Nos mamíferos, os TLRs parecem estar envolvidos, além da resposta imune inata clássica, na fisiopatologia de diversas doenças (HA et al., 2011). De fato, muito mais do que simplesmente atuar como primeiro sistema de defesa, tem sido mostrado que o sistema imune inato parece ter um importante papel na lesão cardíaca e na insuficiência cardíaca congestiva (HA et al., 2011). Dentre vários TLRs, o TLR-4 tem merecido destaque por seu conhecido envolvimento na resposta inflamatória (HA et al., 2011; ZANG e GHOSH, 2001; BRIGHTBILL e MODLIN, 2000). Recentemente, vários trabalhos têm salientado o papel do TLR-4 nas doenças cardiovasculares ao estimular algumas vias de sinalização (CALIPPE et. al., 2008; GIL, TSUNG E BILIAR, 2010). Em consequência da ativação desse receptor há uma maior ativação do NFkB, um fator de transcrição que estimula a expressão gênica de promotores das respostas imune e inflamatória (HA et al., 2011). Portanto, atenuar a ativação do NFkB pode reduzir o dano ao miocárdio após um dano cardíaco, melhorando a recuperação da função cardíaca e diminuindo agentes pró-inflamatórios. De fato, Cha et al. (2008) mostraram uma melhora significativa na função cardíaca em camundongos com deficiência de TLR-4 após isquemia-reperfusão (I/R) global em relação ao grupo controle. Apesar desses achados, os mecanismos envolvidos ainda não são bem conhecidos. Visando melhorá-los, tem sido utilizada a administração de um antagonista específico do TLR-4 (Eritoran). Foi demonstrado que sua administração reduziu significativamente o tamanho do infarto em camundongos submetidos a I/R (HA et. al., 2011). A menor ativação do TLR-4, tanto pela sua menor expressão quanto pela administração de seu antagonista, resulta na menor atividade do NFkB e diminui a

produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido cardíaco após I/R (CHA et al., 2008). Esses achados, sugerem fortemente que estas moléculas de fato desempenham um papel ativo na patogênese de doenças cardiovasculares (VENUGOPAL et al., 2002; RETTER & FRISHMAN, 2001; KANDA & TAKAHASHI, 2004).

Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo está conectado com a resposta inflamatória durante a progressão para a insuficiência cardíaca (KHAPER et al., 2010). Achados recentes sugerem que pró-oxidantes parecem estar envolvidos com a ativação de mediadores da indução de várias citocinas pró-inflamatórias (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; GIL, TSUNG E BILIAR, 2010). Reciprocamente, citocinas pró-inflamatórias têm sido implicadas na cascata de eventos que levam ao aumento do estresse oxidativo (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; GIL, TSUNG E BILIAR, 2010). Essa divergência salienta a interação entre a inflamação e o estresse oxidativo e também destaca mais uma vez o significativo potencial desse balanço na doença cardíaca.

Uma vez que o estrogênio é capaz de exercer tanto ação antioxidante quanto antiinflamatória, sua influência sobre os TLRs foi testada (VEGETO et al., 2003). Embora contraditórias, ele apresentou respostas benéficas para o tecido nervoso (POZZI et al., 2006;). Achados prévios também destacam o potencial protetor do estrogênio contra a injúria vascular por modularem a ativação do TLR-4 (VEGETO et al., 2003). É postulado que o estrogênio possa ser necessário para limitar a resposta inflamatória excessiva, presente em diversos distúrbios e, assim, preserve a integridade estrutural e funcional dos tecidos. Embora promissores esses achados precisam ser confirmados e testados em outros tecidos como o coração.

## **2.4. Restrição Calórica**

A RC sem má nutrição é uma intervenção nutricional capaz de estender a longevidade em várias espécies, inclusive mamíferos (TREPANOWSKI et al., 2011; ROTH e POLOTSKI, 2012). A maior parte dos estudos preconiza uma restrição de 20 a 40% da densidade energética consumida ao longo de 24 horas, com a garantia da ingestão adequada de todos os macronutrientes (CANTÓ e AUWERX,

2009; TREPANOWSKI et al., 2011). O primeiro estudo científico em ratos utilizando uma dieta de restrição calórica foi realizado em 1935 e demonstrou que a RC, quando iniciada após a puberdade, aumenta a expectativa média e máxima de vida, além de prevenir ou atenuar a severidade de doenças crônicas (MCCAY, CROWELL e MAYNARD, 1935). Ela também tem sido associada à prevenção de doenças relacionadas à idade, dentre as quais diabetes (HE et al., 2012), câncer (KLEBANOV, 2007) e as DCV (WEISS e FONTANA, 2011). O possível benefício advindo da RC tem sido investigados e tem recebido grande atenção nos últimos anos.

Estudos têm mostrado que a RC pode promover a prevenção das DCV por modular o estresse oxidativo e a inflamação (MASORO, 2005; MARZETTI et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2012). A RC tem como uma das hipóteses de seu mecanismo de ação a capacidade de redução da produção de ERO, por aumentar de forma significativa a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (KOIZUMI et al, 1987; RAO et al, 1990; GOMI, et al, 1998) e, conseqüentemente, atenuar os danos oxidativos (MASORO, 2005). 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 lipídios, proteínas e DNA. De fato, Ribeiro et al (2012) evidenciaram que a RC foi capaz de aumentar o conteúdo de glutathione (GSH), diminuir a produção de ERO e o dano ao DNA no hipocampo e córtex de ratos adultos. No coração, a RC é capaz de atenuar a produção de ERO e o dano oxidativo, pelo menos no contexto da vasculatura, e aumentar os níveis de glutathione (GUO et al., 2002; CSISZAR et al., 2009).

Paralelamente, tem sido evidenciado que a RC e outros padrões dietéticos são capazes de modular fatores de risco para diversas doenças (MOYA et al, 2006a; MOYA, 2006b; SANTOS et al., 2013). 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), estão intimamente associadas às DCV (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, antiinflamatório e antiaterogênico (SCHRADER E RIMBACH, 2011).

Com relação à inflamação, evidências convincentes indicam que RC atenua a inflamação sistêmica relacionada à idade (ROSS, 1999). Roedores velhos mantidos ao longo da vida em RC de 40% demonstraram níveis reduzidos de diversos marcadores inflamatórios, incluindo a PCR, IL-6, TNF- $\alpha$  e várias moléculas de adesão celular (KALANI et al., 2006; ZOU et al., 2004; PHILLIPS et al., 2005; YOU et al., 2007). Além disso, Kalani et al.(2006) descobriram que RC de 8% sozinha ou combinada com exercício impediu o aumento nos níveis de PCR no plasma em ratos velhos. A atenuação da inflamação sistêmica por RC também foi avaliada em primatas não humanos (LANE et al., 1995). Além disso, efeitos antiinflamatórios semelhantes podem ser obtidos com RC em seres humanos (MEYAER et al., 2006, FONTANA et al., 2006; BOSUTTI et al., 2008).

Em resumo, as evidências disponíveis indicam que RC protege contra a elevação da inflamação sistêmica e o estresse oxidativo. Além disso, estes efeitos podem ser obtidos mesmo com restrição leve na ingestão de alimentos, a qual é provável que seja mais viável para os seres humanos a longo prazo (MARZETTI et al., 2009).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Local de realização

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da UFPel, no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPel, e no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da UFRGS.

#### 3.2. Animais e grupos

Para a realização deste estudo foram utilizadas 20 ratas *Wistar* com 60 dias provenientes do biotério do Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram pesados e distribuídos em 4 grupos experimentais:

- 1) Fêmeas Controle (FC, n=5): ratas alimentadas com ração (Nuvilab) *ad libitum*;
- 2) Fêmeas Restrição Calórica (FRC, n=5): ratas submetidas a restrição calórica moderada pela oferta reduzida (30%) da ração (Nuvilab);
- 3) Fêmeas Ovariectomizadas Controle (FOC, n=5): ratas alimentadas com ração (Nuvilab) *ad libitum* submetidas a ovariectomia;
- 4) Fêmeas Ovariectomizadas Restrição Calórica (FORC, n=5): ratas submetidas a restrição calórica moderada pela oferta reduzida (30%) da ração (Nuvilab) e submetidas a ovariectomia.

Os animais ficaram alojados em caixas (5 animais cada) padrão do biotério da UFPel em gabinetes ventilados, temperatura (22-24°C), umidade relativa (65-75%), e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após uma semana de aclimação ao ambiente, iniciaram-se os tratamentos que duraram 12 semanas (Fig. 1).



Figura 1 – Sequência experimental.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório publicados pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS) e aprovado junto à Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (código CEEA 1590).

### 3.3. Dieta e restrição calórica

Os animais de todos os grupos receberam a ração padrão para roedores marca Nuvilab. Essa foi oferecida *ad libitum* durante a primeira semana experimental (aclimação) para determinação do consumo diário. Para isso, a ingestão alimentar foi monitorada diariamente em balança eletrônica e calculada pela diferença em gramas entre a quantidade ofertada e a quantidade restante em 24 horas. Em seguida, enquanto os animais controle receberam dieta livre, iniciou-se a restrição calórica progressiva: 10% na primeira semana e 20% na segunda semana. Na terceira semana, foi iniciada a restrição de 30% que foi mantida até o fim do experimento, totalizando 9 semanas em restrição calórica de 30% (GONZÁLES et al., 2012). O percentual de restrição 30%, calculado a partir da média do consumo alimentar na primeira semana experimental (período de adaptação ao ambiente), foi utilizado durante todo o período experimental.

### 3.4. Ovariectomia bilateral

Após cinco semanas de RC 30%, as ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral (Figura 2). Para isso, foram devidamente anestesiadas com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), por via

intraperitoneal. Foi feita uma incisão lateral logo abaixo das costelas na derme e peritônio e se introduziu um estilete até encontrar uma massa de gordura que delimita o ovário. Em seguida a sua identificação e a realização de uma ligadura abaixo da trompa uterina, o ovário foi retirado (BAKER, 1979). O procedimento foi repetido no lado contralateral. Nos animais Sham, realizou-se a mesma cirurgia sem haver, no entanto, a ligadura nem a retirada dos ovários. Após a cirurgia, foi realizada a sutura da incisão da pele em planos separados, primeiro a camada muscular e depois a cutânea. Posteriormente ao procedimento, os animais seguiram por mais 4 semanas de restrição 30%, até o final do experimento.

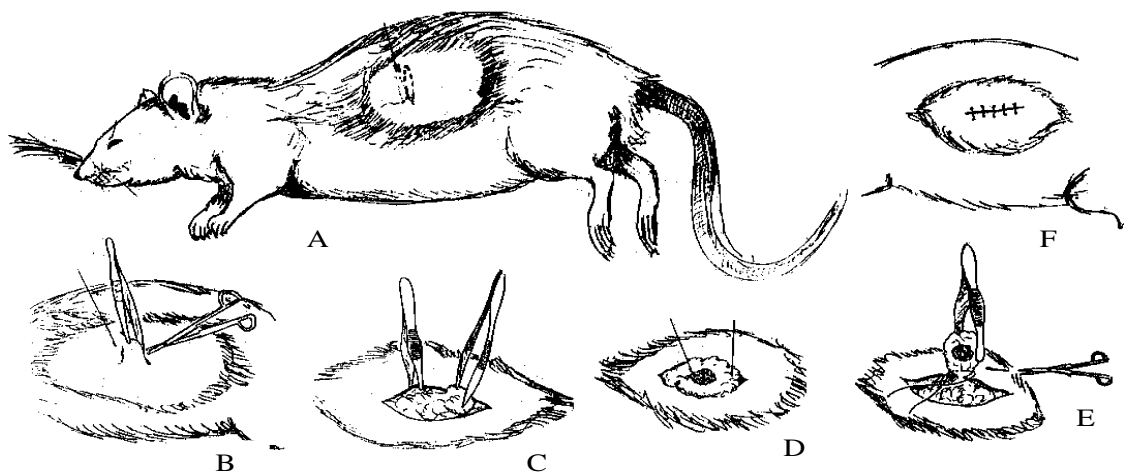


Figura 2 – Procedimento da cirurgia de castração

### 3.5. Determinação do ciclo estral

Nos animais não submetidos à OVX, a determinação do ciclo estral foi iniciada a partir do 28º dia após o procedimento cirúrgico de simulação da ovariectomia bilateral. O ciclo estral de cada fêmea controle foi determinado por observação do esfregaço vaginal, o qual foi coletado usando pipeta de plástico. Para isso, solução salina foi colocada na abertura vaginal, aspirada e colocada em lâminas para serem observadas a fresco no microscópio. As lâminas foram comparadas com os achados de Freeman (1994). Todos os animais não OVX foram sacrificados na fase do diestro.

### **3.6. Monitoramento do peso**

Foi realizado um monitoramento semanal, em balança eletrônica, do peso dos animais. O peso final (PF) de cada animal foi subtraído do peso do inicial (PI), sendo o resultado expresso como variação do peso inicial. Para avaliar a taxa de variação de peso realizou-se o seguinte cálculo:  $\Delta$  de peso =  $P_{sn}/P_{s0}$  ( $P_{sn}$ = peso da semana N;  $P_{s0}$ = peso da semana 0).

### **3.7. Sacrifício dos animais, morfometria e descartes**

Após 9 semanas de RC 30%, os animais foram eutanasiados por decapitação e uma amostra de sangue foi coletada. Feito isso, foi realizada a coleta do coração e do fígado que foram devidamente pesados e rapidamente congelados em freezer -80°C para as análises bioquímicas. O útero também foi coletado para a mensuração do seu trofismo. Após ter sido feito a pesagem dos órgãos, calculou-se o índice de hipertrofia desses através da razão do peso de tecido (g) pelo peso corporal final (g).

As carcaças dos animais mortos foram levadas ao biotério da UFPel, onde foram recolhidas pela empresa especializada, responsável pelo serviço de coleta de materiais contaminados. Materiais tóxicos foram tratados conforme protocolo da instituição.

### **3.8. Análises séricas**

#### **3.8.1. Obtenção do soro e dosagens bioquímicas**

O sangue coletado no momento da decapitação foi centrifugado a 3500 rotações por minuto durante 10 minutos, em centrífuga modelo Eppendorf/Centrifuge 5415. O soro obtido foi transferido para Eppendorfs e congelado a -20°C até o momento das análises.

Após obtenção do soro, as análises foram realizadas com auxílio de espectrofotômetro FemtoCirrur 80MB®, utilizando-se kits comerciais, com base nas recomendações dos fabricantes, realizou-se a quantificação colorimétrica de

albumina (Doles®, GO-Brasil), triglicerídeos-TG (Vida Bodiagnóstica®, MG-Brasil), colesterol total-CT (Vida Bodiagnóstica®, MG-Brasil), colesterol HDL (indireto, Doles®, GO-Brasil). O LDL foi estimado por diferença entre o Colesterol total e a soma de HDL + TG/5 (Friedewald et al., 1972).

A atividade arilesterase da PON1 também foi mensurada no soro, a partir da velocidade de formação de fenol por meio do aumento da absorbância a 270 nm, temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro, conforme descrito por Browne et al., 1998. As amostras foram diluídas 1:3 em 20 µL de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. A solução reagente foi o tampão Tris/HCl, adicionado de 4 mM de fenil acetato. A reação foi determinada após 20 segundos de retenção e a absorbância mensurada por 60 segundos. Uma unidade de atividade arilesterase da PON1 foi considerada igual a 1µM 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.

### **3.9. Análises em tecido cardíaco**

#### **3.9.1. Preparo dos homogeneizados de tecido cardíaco**

Para as análises bioquímicas de estresse oxidativo, os corações foram homogeneizados durante 40 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores (LLESUY et al., 1985).

### **3.9.2. Quantificação de proteínas**

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY et al., 1951).

### **3.9.3. Determinação da Superóxido Dismutase (SOD)**

A técnica para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do ânion radical superóxido com o pirogalol. Para isso, utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mmol/L; EDTA na concentração de 1 mmol/L em pH 8,2), pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L) e catalase a 30  $\mu$ mol/L. Para se ter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de SOD, disponível comercialmente (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO). Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima. No ensaio, adicionou-se a cubeta 988 $\mu$ L de tampão Tris, 4 $\mu$ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 $\mu$ L de pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD das amostras. Com as amostras, procedeu-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Essa reação leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (MARKLUND, 1985).

### **3.9.4. Avaliação da lipoperoxidação (QL)**

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta LiquidScintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram

realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 4mL de uma solução reguladora de KCl 140mM, fosfatos 20mM, pH 7,4, na qual foi adicionado 10 $\mu$ L do homogeneizado de tecido. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada esta a emissão de luz basal. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila, na concentração de 400mM, dos quais foram adicionados 30 $\mu$ L no meio de reação, para uma concentração final de 3mM. Foi medida, então, a emissão de luz e, dessa, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de proteína (GONZALEZ-FLECHA, et al. 1991).

#### **3.9.5. Capacidade antioxidante total (TRAP)**

A técnica utilizada para medir a capacidade antioxidante total é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto que gera radicais livres emite luz detectada pelo contador beta (LKB Rack Beta LiquidScintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) (Lissi et al., 1992).

#### **3.9.6. Quantificação da expressão proteica por *Western blot***

Utilizando-se uma amostra do tecido cardíaco, foi realizada a técnica para quantificação da expressão proteica por western blot descrita por Laemmli 1970 e Klein 1995. As membranas foram processadas por imunodeteção usando-se os seguintes anticorpos primários: TLR4, NFkB e  $\beta$ -tubulina. Como anticorpos secundários utilizou-se os anticorpos policlonais anti-cabra, anti-camundongo e anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA e Amersham Pharmacia Biotech do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil).



### **3.10. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  DP). Os dados foram analisados por meio de Anova de 2 vias seguido do teste de Bonferroni. Para avaliar a variação do peso corporal dentro do mesmo grupo utilizou-se Teste t. O nível de significância adotado foi de 5%. Para as análises foi utilizado o Software Graph Pad Prism 6.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso corporal e peso de órgãos

O peso corporal no início do experimento foi maior no grupo FRC em relação ao grupo FC (FC= 201,4±6,9; FRC= 255,8±30,5; FOC= 233,0±19,5; FORC= 234,8±18,1). Apesar disso, a média do consumo alimentar não foi diferente entre os grupos (FC= 85±0,8; FRC= 81±1,6; FOC= 84±1,0; FORC= 80±1,5).

Na análise da variação de peso corporal por 12 semanas observou-se que a taxa de ganho de peso das ratas submetidas à RC foi menor ( $p<0,05$ ), tanto nas FRC quanto nas FORC, comparadas as ratas alimentadas *ad libitum*, durante todo o período de tratamento (Figura 3). No período de adaptação não houve diferença significativa na taxa de ganho de peso em nenhum dos grupos (Figura 3).

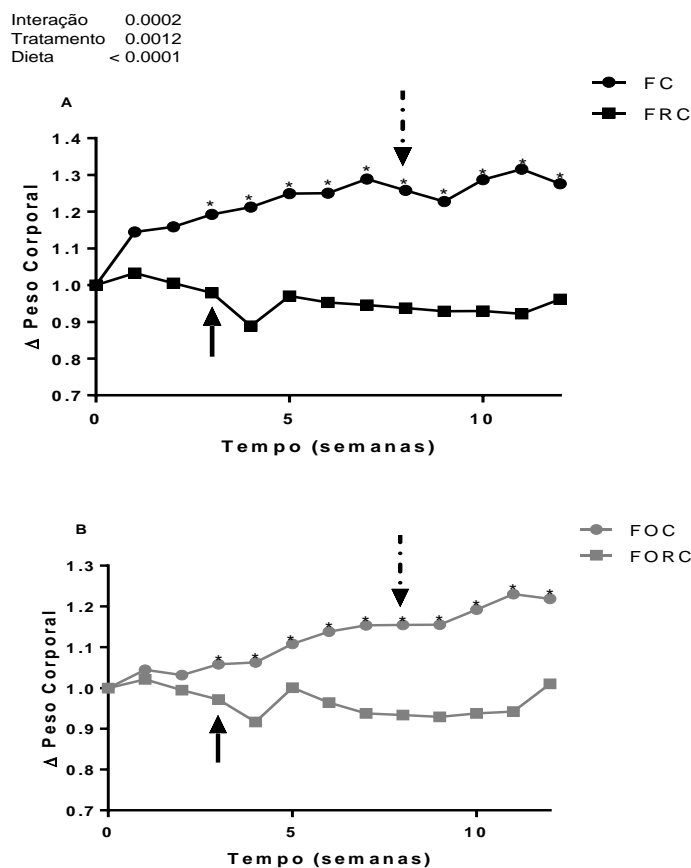


Figura 3 – Variação do peso corporal de ratas *Wistar* durante 12 semanas de restrição calórica (RC). 3A - Submetidas a cirurgia fictícia de ovariectomia na 8ª semana. 3B - Submetidas a ovariectomia bilateral na 8ª semana. Resultados expressos como média ± desvio padrão da média das variações do peso corporal aferido durante 12 semanas (5 animais por grupo). ↑ Início da RC 30%. ↓ Realização das cirurgias. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \*Indica diferença significativa ( $p<0,001$ ) comparando a RC com a dieta controle na mesma semana.

Ao analisarmos a variação do peso corporal de cada grupo, observou-se um aumento significativo da taxa de ganho de peso corporal nos grupos alimentados *ad libitum* (FC= 8,4% e FOC= 9,1%) após o tratamento cirúrgico em relação ao período pré cirúrgico. Já os grupos submetidos a RC não apresentaram diferença significativa no peso corporal entre os períodos pré e pós cirúrgico (Figura 4).

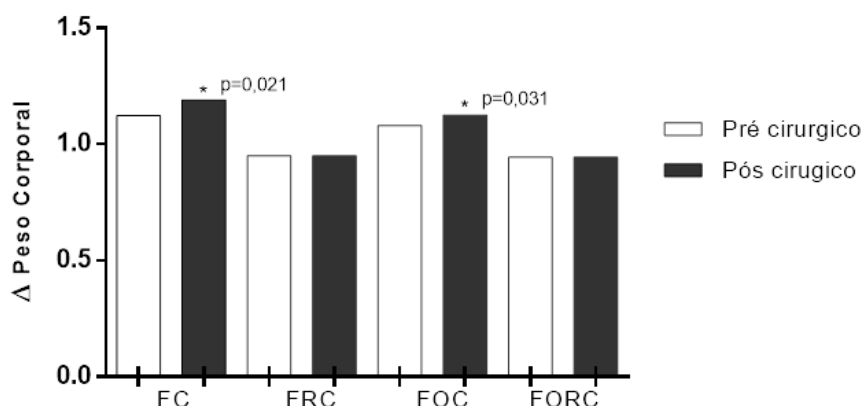


Figura 4 – Comparação da variação do peso corporal de ratas *Wistar* entre os períodos pré (4<sup>a</sup> – 8<sup>a</sup> semana) e pós (8<sup>a</sup> - 12<sup>a</sup> semana) cirúrgico. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Teste t. \*Indica diferença significativa (p<0,05) comparado ao período pré cirúrgico.

Peso final das ratas FORC foi significativamente menor (16,5%) em relação as ratas FOC (Tabela 1).

O peso uterino e seu índice de hipertrofia foram significativamente menores nos grupos ovariectomizados em relação aos seus controles (Tabela 1). Em relação ao peso dos órgãos, observou-se um aumento significativo do peso do coração (11,1%) no grupo FOC comparado ao grupo FC. Já o peso do fígado foi significativa menor no grupo FORC comparado ao grupo FOC (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso corporal, peso dos órgãos e índice de hipertrofia em ratas *Wistar*. N= 5 animais por grupo.

	FC	FRC	FOC	FORC	Valor p		
					Interação	Dieta	Tratamento
PF (g)	257,0±11,3	246,4±12,7	284,0±13,7	237,2±19,0**	0,013	<0,001	0,188
PU (g)	0,6±0,2	0,5±0,1	0,2±0,0*	0,2±0,0***	0,419	0,625	<0,001
PU/PFx100 (g)	0,2±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0*	0,1±0,0***	0,407	0,145	<0,001
PCor (g)	0,9±0,1	0,9±0,5	1,4±0,5*	0,9±0,1	0,062	0,081	0,047
PCor/PFx100 (g)	0,3±0,1	0,4±0,1	0,5±0,2	0,4±0,1	0,210	0,890	0,069
PFí (g)	8,0±1,3	5,7±1,2	6,8±1,1	5,4±0,6**	0,383	0,002	0,118
PFí/PFx100 (g)	3,0±0,3	2,5±0,5	2,4±0,6	2,5±0,4	0,166	0,334	0,160

PF: peso final; PU: peso do útero; PCor: peso do coração; PFí: peso do fígado. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. Valores expressos em média ± desvio padrão para análises em duplicata a partir de 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \*Indica diferença significativa comparada ao grupo FC; \*\*Indica diferença significativa comparada ao grupo FOC; \*\*\* Indica diferença significativa comparada ao grupo FRC.

## 4.2. Parâmetros bioquímicos séricos

A albumina sérica, que foi analisada como um indicador de condição nutricional, não foi diferente entre os grupos (Tabela 2).

Ao analisarmos os efeitos da RC sobre os lipídios séricos, verificamos uma diminuição (22,8%) nos TG do grupo FRC em relação ao grupo FC. A ovariectomia promoveu um aumento significativo nos níveis de colesterol total e de colesterol HDL de 35% e 90%, respectivamente, nas ratas FOC comparadas às FC. O nível sérico de colesterol HDL também apresentou um aumento significativo (52,7%) no grupo de ratas ovariectomizadas submetidas a RC em relação ao grupo FRC.

Quanto à atividade arilesterase da PON1, evidenciou-se que a RC não alterou a atividade da enzima, independente do nível de estrogênio. Já a razão PON1/HDL foi significativamente reduzida nos grupos FOC e FORC (43,3% e 36%, respectivamente), em relação aos seus grupos controles. A razão não foi modificada pela dieta.

Tabela 2 – Análises bioquímicas séricas em ratas *Wistar*. N= 5 animais por grupo.

Dosagens bioquímicas	FC	FRC	FOC	FORC	Valor p		
					Interação	Dieta	Tratamento
Albumina (mg/dL)	2,1±0,4	2,2±0,4	2,3±0,4	2,1±0,3	0,446	0,744	0,565
Triacilgliceróis (mg/dL)	127,0±20,4	98,0±21,8*	112,7±12,9	103,0±5,6	0,207	0,018	0,520
Colesterol (mg/dL):							
Total	99,3±19,6	114,0±20,0	134,0±17,4*	124,3±1,4	0,148	0,744	0,012
HDL	44,7±5,5	56,0±14,0	85,0±14,0**	85,5±13,6**	0,365	0,286	<0,001
LDL	29,1±15,5	38,4±28,3	26,5±18,7	18,1±14,5	0,342	0,960	0,220
PON1 (kU/L)	128,3±31,6	136,0±32,0	144,0±29,1	130,0±22,1	0,410	0,807	0,723
PON1/HDL	3,0±1,1	2,5±0,5	1,7±0,4**	1,6±0,4**	0,582	0,280	0,002

FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. Valores expressos como média ± desvio padrão para análises em duplicata a partir de 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \* Indica diferença significativa comparado ao grupo FC; \*\* Indica diferença significativa comparada aos grupos FC e FRC.

### 4.3. Análises de tecido cardíaco

#### 4.3.1. Parâmetros de estresse oxidativo: SOD, QL e TRAP

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase foi significativamente menor nas ratas ovariectomizadas em relação aos seus controles (Figura 5). A dieta não influenciou significativamente na atividade da SOD.

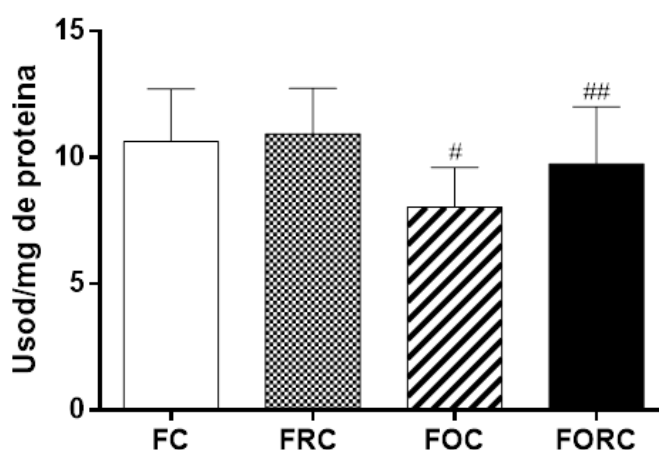


Figura 5 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco de ratas *Wistar*. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. #Indica diferença significativa comparado ao grupo FC; ## Indica diferença significativa comparado ao grupo FRC.

A figura 6 mostra a lipoperoxidação em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco. Essa não foi modificada pela ovariectomia bilateral. Já a restrição calórica reduziu significativamente a lipoperoxidação.

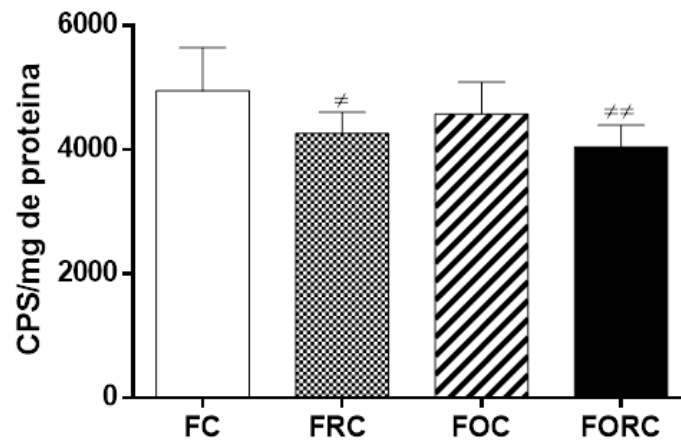


Figura 6 – Lipoperoxidação por quimiluminescência (QL) em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco de ratas *Wistar*. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. # Indica diferença significativa comparado ao grupo FC; ## Indica diferença significativa comparado ao grupo FOC.

A figura 7 mostra a capacidade antioxidante total em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco. Essa foi significativamente aumentada pela ovariectomia (FOC vs FC). Um aumento semelhante foi observado no grupo FRC em relação ao FC. Já nos animais com dieta de restrição calórica e submetidos a ovariectomia bilateral observamos uma menor capacidade antioxidante total em relação aos seus controles (FRC e FOC). A capacidade antioxidante total não foi diferente entre os grupos FC e FORC.

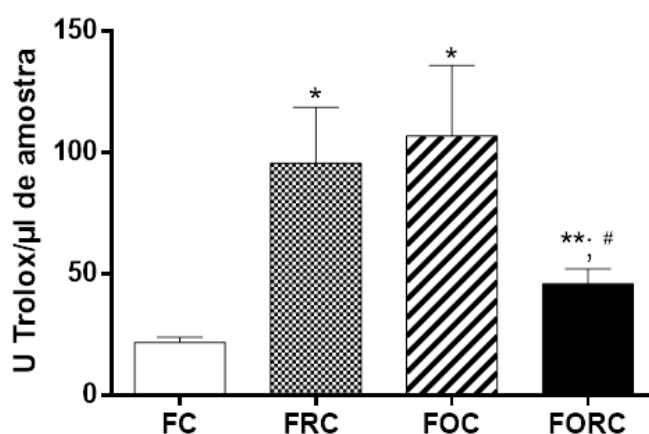


Figura 7 – Capacidade antioxidante total (TRAP) em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco de ratas *Wistar*. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \*Indica diferença significativa comparado ao grupo FC; \*\*Indica diferença significativa comparado ao grupo FRC; # Indica diferença significativa comparado ao grupo FOC.

#### 4.3.2. Expressão proteica deTLR4 e NFkB

A figura 8 mostra a expressão proteica do TLR4 em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco. A expressão do TLR4 foi significativamente diminuída nos grupos FOC e FRC em relação ao grupo FC. Essa não foi diferente no grupo FORC em relação aos seus controles (FRC e FOC).

A figura 9 mostra a expressão proteica do NFkB em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco. A expressão do NFkB foi significativamente menor no grupo FORC em relação ao grupo FRC. Não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos experimentais.

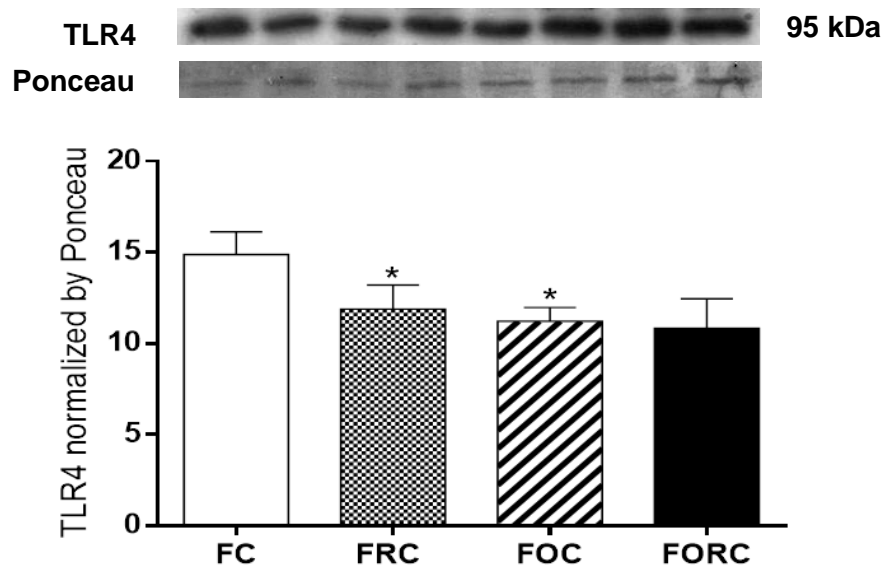


Figura 8 – Expressão proteica do TLR4 por *Western blot* em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco de ratas *Wistar*. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \*Indica diferença significativa comparado ao grupo FC.

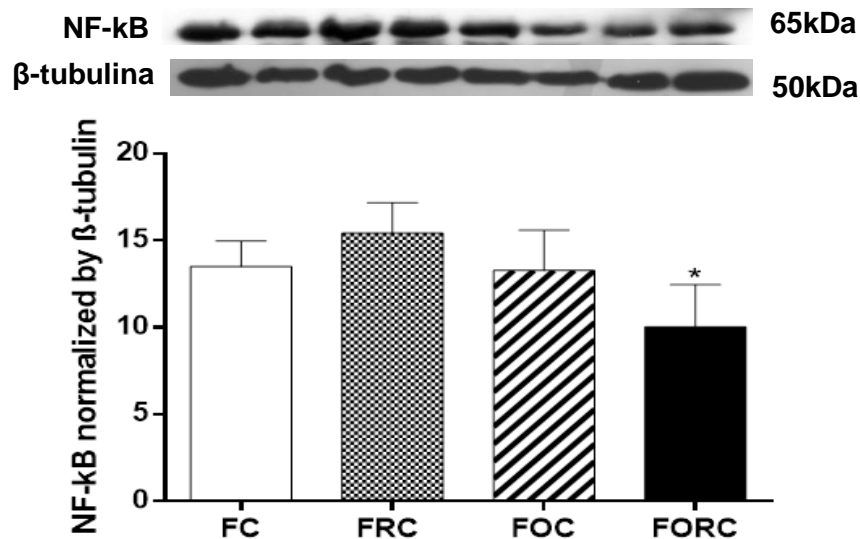


Figura 9 – Expressão proteica do NF-kB por *Western blot* em amostras de homogeneizado do tecido cardíaco de ratas *Wistar*. FC: ratas alimentadas com ração *ad libitum*, FRC: ratas submetidas a RC de 30%, FOC: ratas alimentadas com ração *ad libitum* submetidas a ovariectomia, FORC: ratas submetidas a RC 30% e submetidas a ovariectomia. N= 5 animais por grupo. Anova de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. \*Indica diferença significativa comparado ao grupo FRC.



## 5. DISCUSSÃO

A castração induzida pela ovariectomia bilateral parece ter sido efetiva em reduzir os níveis séricos de estrogênio no presente estudo, uma vez que esses têm sido classicamente associados com a diminuição do trofismo dos úteros e trompas de Falópio (BARP et al., 2002; MORGAN-MARTINS, 2003; SCHENKEL et al., 2014). A hipotrofia desses órgãos não foi diferente entre os grupos castrados, indicando uma possível semelhança nos níveis de estrogênio entre eles. Somado a isso, todas as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal com o intuito de determinar a fase do ciclo estral ou efetividade da castração. Como era de se esperar, as ratas castradas não apresentaram oscilações no ciclo estral, mais um indicativo da efetividade da técnica cirúrgica empregada. Logo após a ovariectomia bilateral, os níveis de estrogênio diminuem significativamente ao longo dos primeiros 7 dias, quando se tornam praticamente indetectáveis (BARP et al., 2002). No presente estudo, escolhemos sacrificar as ratas 28 dias após a cirurgia de ovariectomia por já termos certo conhecimento prévio sobre os efeitos do estrogênio na função cardiovascular nesse período (BARP et al., 2002; MORGAN-MARTINS, 2003; SCHENKEL et al., 2014). As ratas não castradas tiveram o ciclo estral monitorado e, buscando a padronização dos níveis de estrogênio, todas foram mortas na fase do diestro (menor nível de estrogênio ao longo de todo o ciclo que tem duração de aproximadamente 4 dias).

A castração normalmente está associada ao ganho de peso corporal. De fato, Camporez et al. (2013) mostraram que camundongos ovariectomizados tem maior aumento de peso corporal e massa gorda em comparação aos controles. Por si só a ovariectomia pode provocar o aumento do peso corporal devido a uma maior proliferação das células adiposas e uma diminuição da massa esquelética. Perfil semelhante foi observado em humanos em que a incidência da obesidade aumenta significativamente com o declínio nos níveis de estradiol após a menopausa (CARR, 2003).

Porém, em nosso estudo a castração não influenciou no ganho de peso, uma vez que esse foi semelhante entre os grupos FC e FOC (Figura 4). Além do mais, não observamos diferença significativa no ganho de peso corporal entre esses mesmos grupos com dieta livre ao longo de todo o protocolo experimental. A

quantidade de alimento ingerida por dia por cada animal alimentado *ad libitum* não foi monitorada em nosso estudo. Esse poderia ser um dado complementar interessante para normalizar de forma mais efetiva o ganho de peso corporal ao longo do tempo. No entanto, para esse monitoramento, torna-se necessário o isolamento dos animais em gaiolas metabólicas, o que demanda mais espaço no alojamento.

Já a restrição calórica se mostrou efetiva em mitigar o ganho de peso corporal nas ratas. Resultados semelhantes foram observados em estudos prévios com ratos submetidos ao mesmo percentual de RC (DAS et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012). Desde seu início, passando pelo período de adaptação até atingir RC de 30% e, mesmo após a castração, as ratas não apresentaram variação no peso corporal. Tamanha restrição calórica poderia estar associada à desnutrição dos animais. No entanto, isso não foi observado no presente estudo uma vez que os níveis de albumina sérica foram semelhantes entre todos os grupos. Ou seja, o protocolo empregado no presente estudo foi efetivo em restringir as calorias sem causar dano nutricional aos animais. Nossos resultados corroboram os achados de Ribeiro et al. (2012) que mostraram um menor ganho de peso corporal associado com a manutenção da albumina sérica em ratos após 12 semanas de RC 30% quando comparados aos animais alimentados *ad libitum*. O peso do coração e do fígado foi maior no grupo FOC. O estrogênio parece exercer ação trófica sobre alguns órgãos por atuar em sinergismo com o hormônio do crescimento (GRUBER et al., 2002). Tal efeito parece ser sistêmico, uma vez que foi prevenido com a restrição calórica (grupo FORC). Além do mais, quando calculado o índice de hipertrofia (peso do órgão/peso corporal final) não foi observado diferença entre os grupos.

Um dos objetivos deste estudo foi caracterizar o perfil lipídico dos animais. As lipoproteínas constituem uma classe heterogênea de partículas e evidências sugerem que as diferentes subclasses de LDL e HDL apresentam diferentes riscos cardiometabólicos. O HDL refere-se a uma classe de complexos proteicos e lipídicos, que diferem em tamanho (5-12 nm), forma e conteúdo, e que estão sob influência de fatores genéticos e ambientais. Uma redução dos níveis dessa lipoproteína tem sido relacionada a menores níveis de estrogênio. Nesse sentido, foi observado em outros estudos que níveis reduzidos do hormônio implicariam em

inibição da expressão genica de enzimas responsáveis pelo efluxo de colesterol dos tecidos para o HDL, na transferência de proteínas do HDL para outras lipoproteínas, assim como a liberação de colesterol para o fígado e dos macrófagos para o HDL. Entretanto, neste estudo concentrações mais elevadas de HDL relacionaram-se a ovariectomia, resultados que, embora controversos e pouco explorados, já foram descritos (KIM et al., 2000; DOST et al., 2014). Em particular Dost et al, ao analisarem o teor de colesterol total e frações após 6 semanas de ovariectomia em ratos, verificaram aumento do HDL nestes animais. No presente estudo, o aumento do colesterol total também foi influenciado pela ovariectomia, assim como mostrado anteriormente em estudos similares (DOST et al., 2014). Por outro lado, a restrição calórica associou-se a uma redução do TG no grupo controle, efeito que pode ser atribuído a um menor fluxo de substratos para a síntese lipídica hepática.

Ao analisarmos os parâmetros de estresse oxidativo, verificamos uma diminuição na atividade da enzima antioxidante SOD. Essa é uma enzima importante que atua catalisando a redução do ânion radical superóxido. Além da atividade da SOD ter uma relação direta com a oferta de substrato, essa pode ser influenciada diretamente pelo estrogênio (KIM et al., 2012; KHOSLA, OURSLER e MONROE, 2012). Neste contexto, torna-se necessário que outros mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, compensem a diminuição da atividade da SOD após a castração visando à manutenção de um estado redox predominantemente reduzido. Dentre outros mecanismos, já são bem conhecidos o sistema da glutathione, da tioredoxina, da glutarredoxina, etc. No mesmo sentido, observamos que a razão PON1/HDL acompanhou a diminuição dos níveis de estrogênio, reforçando o indicativo de maior susceptibilidade a um ambiente mais oxidado. A PON1, uma esterase sintetizada e secretada principalmente pelo fígado, é uma enzima associada fisicamente à partícula de HDL e, assim, é capaz de inibir a oxidação lipídica nas partículas de LDL, nos macrófagos e no próprio HDL (JARVIK et al., 2002). Sendo assim, a proteção cardiovascular não depende somente de altos níveis de HDL, mas também da alta atividade da PON1 (DEAKIN & JAMES, 2004; NG et al., 2008). Concomitantemente com a diminuição da SOD e da razão PON1/HDL, observamos no presente estudo um aumento significativo na capacidade antioxidante total no grupo FOC. Embora seja uma técnica pouco específica na determinação dos antioxidantes em questão, ela nos permite

identificar a presença de uma resposta antioxidante contra-regulatória. Ou seja, o favorecimento ao estresse oxidativo pela redução dos níveis de estrogênio é atenuado, pelo menos em parte, pelo aumento de algumas defesas antioxidantes. Tal resposta também pode ser reforçada pelo mesmo padrão de oxidação aos lipídios, parâmetro clássico de dano oxidativo, observado entre os grupos FC e FOC. Em paralelo a isso, a redução dos níveis de estrogênio promoveu diminuição da expressão proteica do TLR4, sugerindo uma menor sinalização para a inflamação por essa via. Nossos achados corroboram trabalhos prévios que sugerem a interação do estrogênio com os TLRs (SVENSON et al., 2014). Pelo nosso conhecimento, o presente estudo é pioneiro em mostrar essa interação no tecido cardíaco *ex vivo*. Acreditamos que o estrogênio possa promover um efeito direto sobre tais receptores. Ou seja, com a redução dos seus níveis após a castração, momento de maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, há uma diminuição na expressão proteica do TLR4 visando atenuar a sinalização para a inflamação nesse período. Apesar disso, a expressão do NFkB não foi alterada no grupo FOC. Se sabe que a ativação do TLR4, assim como outras vias inflamatórias, tem como desfecho comum a ativação do NFkB (HA et al., 2011). Ao ser ativado, o NFkB é translocado para o núcleo a fim de aumentar a expressão gênica de citocinas inflamatórias e de fatores envolvidos na apoptose celular. Isso não foi observado em nosso estudo, o que mais uma vez sugere certa prevenção aos efeitos deletérios promovidos pela diminuição do estrogênio para o sistema cardiovascular.

A partir do conhecimento prévio da influência que o estrogênio exerce sobre o estresse oxidativo e a inflamação, avançamos para a investigação dos efeitos da restrição calórica nesse modelo experimental.

Tem sido mostrado na literatura que a RC exerce seus conhecidos efeitos cardioprotetores por atenuar o estresse oxidativo e a inflamação (MASORO, 2005; MARZETTI et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2012). A RC de 40% realizada por 4 meses foi eficaz em reduzir significativamente a oxidação de lipídios e proteínas no coração de ratos (PAMPLONA et al., 2002). De forma semelhante, Diniz et al. (2003) mostraram uma diminuição dos níveis de lipoperoxidação no tecido cardíaco de ratos jovens submetidos a RC de 50% por 35 dias. Somado a isso, os ratos em RC exibiam aumento da atividade das enzimas antioxidantes GPx e catalase em

relação aos alimentados *ad libitum* (DINIZ et al., 2003). No presente estudo, nós observamos uma diminuição da lipoperoxidação nas ratas em RC, corroborando os dados da literatura. Concomitantemente, a RC aumentou a capacidade antioxidante total no grupo FRC e mostrou uma tendência em evitar a diminuição da SOD no grupo FORC. Acreditamos que devido ao pequeno número de animais por grupo essa diferença não foi estatisticamente diferente.

Mesmo nesse ambiente menos oxidado promovido pela RC, a expressão proteica do TLR4 no grupo FORC foi semelhante ao grupo FOC. Esse resultado, por expressar uma possível diminuição na sinalização para a inflamação e morte celular, sugere um potencial cardioprotetor da RC. A RC pode exercer seus efeitos antiinflamatórios por influenciar atividades metabólicas, hormonais e a expressão de genes que reprimem precursores de inflamação em vários tipos de tecidos, incluindo o coração. (CLEMENT et al., 2004; HIGAMI et al., 2004; LAMAS et al., 2003; MATSUZAKI et al., 2001; SWINDELL, 2009). Estudos mostram que a RC pode reforçar a expressão de genes que codificam proteínas com propriedades antiinflamatórias, tais como inibidor alfa de NFkB (NFKBIA), inibidor tecidual de metaloproteinases-3 (TIMP3), e receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) (SUNG et al., 2004; SWINDELL, 2009). Por outro lado, genes pró-inflamatórias, tais como TNF $\alpha$ , IL-6, COX-2, iNOS, VCAM-1 e ICAM-1 parecem ser inibidos pela RC (HIGAMI et al., 2006, JUNG et al., 2009). Quando somados, os efeitos para reduzir a inflamação, promovidos pela diminuição dos níveis de estrogênio e pela RC, foram significativamente efetivos em reduzir a expressão proteica do NFkB (grupo FORC). Além do mais, esses efeitos somados podem estar modulando outras vias de sinalização intracelular além do TLR4, uma vez que a ativação do NFkB é um desfecho comum de várias vias inflamatórias.

## 6. CONSLUSÕES

Conclui-se com o presente estudo que a RC de 30%, sem má nutrição, apresenta potencial cardioprotetor em ratas. Tal efeito parece estar associado com a diminuição preventiva da expressão proteica de TLR4 e do NFkB, proteínas chave para a sinalização intracelular da inflamação e morte celular. Além do mais, a RC demonstrou ter um potencial benéfico na prevenção de danos cardíacos por modular alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e aos lipídios plasmáticos, bem como reduzir o peso corporal. Pelo nosso conhecimento, o presente estudo é pioneiro em mostrar uma possível interação entre o estrogênio e o TLR4 no tecido cardíaco *ex vivo*.

## REFERÊNCIAS

AVLAS O, FALLACH R, SHAINBERG A, PORAT E, HOCHHAUSER E. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility. **Antiox Redox Signal**,15:1895-909, 2011.

BAKER, H.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H. The laboratory rat biology and disease. **Academic Press**, v.1, 1979.

BALTHAZART J, CHARLIER TD, CORNIL CA, et al. Sex differences in brain aromatase activity: Genomic and non-genomic controls. **Front Endocrinol** , 2:34, 2011.

BARP, J.; ARAÚJO, A.S.R.; FERNANDES, T.R.G.; RIGATTO, K.V.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; SINGAL, P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Braz Med Biol Res**, v.35, n.9, p.1075-81, 2002.

BEITELSHEES AL, JOHNSON JA, HAMES ML, et al. Aromatase gene polymorphisms are associated with survival among patients with cardiovascular disease in a sex-specific manner. **PloS One**,5:e15180, 2010.

BELL JR, MELLOR KM, WOLLERMANN AC, et al. Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection. **Endocrinology**, 152:4937-47, 2011.

BISHOP N A & GUARENTE L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. **Nat ReGenet**, 8; 835-844, 2007.

BOSUTTI A, MALAPONTE G, ZANETTI M, et al. Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. **J Clin Endocrinol Metab**, 93:3226–9, 2008.

BRIGHTBILL HD AND MODLIN RL. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. **Immunology** 101: 1–10, 2000.

CALIPPE B, DOUIN-ECHINARD V, LAFFARGUE M, LAURELL H, RANA-POUSSINE V, PIPY B, et al. Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **J Immunol** ,180:7980-88, 2008.

CAMPOREZ JP, JORNAYVAZ FR, LEE HY, KANDA S, GUIGNI BA, KAHN M, SAMUEL VT, CARVALHO CR, PETERSEN KF, JURCZAK MJ, et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. **Endocrinology** 154 1021-1028, 2013.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, issue 7, p.325-331, 2009.

CARR, M C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **J Clin Endocrinol Metab** 88 2404-2411, 2003.

CHA J, WANG Z, AO L, ZOU N, DINARELLO CA, BANERJEE A, et al. Cytokines link Toll-like receptor 4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia. **Ann Thorac Surg**, 85:1678-85, 2008.

CHUNG HY, SUNG B, JUNG KJ, et al. The molecular inflammatory process in aging. **Antioxid Redox Signal**, 8:572–81, 2006.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Laemmli UK. **Nature**. 1970 Aug 15;227(5259):680-5

CLEMENT K, VIGUERIE N, POITOU C, CARETTE C, PELLOUX V, CURAT CA, SICARD A, ROME S, BENIS A, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. **FASEB J.**, 18:1657–1669, 2004.

CRUZEN C; COLMAN R. Effects of Caloric Restriction on Cardiovascular Aging in Non-human Primates and Humans. **Clin Geriatr Med.**,25:733–43, 2009.

CSISZAR A, LABINSKY N, JIMENEZ R, PINTO JT, BALLABH P, LOSONCZY G, PEARSON KJ, DE CABO R, UNGVARI Z. Anti-oxidative and antiinflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. **Mech Ageing Dev** 130: 518 –527, 2009.

DAS SK, SALTZMAN E, GILHOOLY CH, et al. Low or moderate dietary energy restriction for long-term weight loss: what works best? **Obesity.**, 17:2019–24, 2009.

DEAKIN SP, JAMES RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. **Clin Sci.**, 107:435–47, 2004.



DINIZ YS, CICOONA AC, PADOVANI CR, et al. Dietary restriction and fibre supplementation: oxidative stress and metabolic shifting for cardiac health. **Can J Physiol Pharmacol**, 81:1042–8, 2003.

DOST T, KAFKAS S, GOKALP F, et al., **J Pharmacol Pharmacother.**, 5(1): 21–26, 2014.

FONTANA L, KLEIN S, HOLLOSZY JO, et al. Effect of long-term calorie restriction with adequate protein and micronutrients on thyroid hormones. **J Clin Endocrinol Metab**, 91:3232–5, 2006.

FREEMAN, M.E. In: Knobil E and Neill JD (eds). The physiology of reproduction. **New York, Raven Press**, p.613-647, 1994.

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**, p. 1-17, 1 ed, 2011.

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.

GILL R, TSUNG A, BILLIAR T. Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors. **Free Radic Med**, 48:1121-32, 2010.

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.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S. & BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Rad. Biol. Med.** 10: 93-100, 1991.

GONZÁLEZ O, TOBIA C, EBERSOLE J, NOVAK MJ. Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. **Oral Dis**,18:16-31, 2012.

GROHE C, KAHLERT S, LOBBERT K, VETTER H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: Role of local oestrogen synthesis. **J Endocrinol**, 156:R1-7, 1998.

GRUBER CJ, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, HUBER JC. Production and Actions of Estrogens. **N Engl J Med**, Vol 346(5) 340-351, 2002.

GUO Z, MITCHELL-RAYMUNDO F, YANG H, IKENO Y, NELSON J, DIAZ V, RICHARDSON A, REDDICK R. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. **Mech Ageing Dev** 123: 1121–1131, 2002.

HA T, LIU L, KELLEY J, KAO R, WILLIAMS D, LI C. Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Antiox Redox Signal**, 15:1875-93, 2011.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. **Clarendon Press**, Oxford, 2006.

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. 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.

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  $\beta$  cells in aging rats. **Tohoku J. Exp. Med.** 227 (n.4), 245-252, 2012.

HIGAMI Y, BARGER JL, PAGE GP, ALLISON DB, SMITH SR, PROLLA TA, WEINDRUCH R. Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. **J Nutr.**,136:343–352, 2006.

HILL MF & SINGAL PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **Am J Pathol**, 148:291-300, 1996.

JARVIK GP, TSAI NT, MCKINSTRY LA, WANI R, BROOPHY VH, RITCHER, RJ, et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Journal of the American Heart Association**, 22: 1329-1333, 2002.

JAZBUTYTE V, STUMPNER J, REDEL A, et al. Aromatase inhibition attenuates desflurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo. **PloS One**, 7:e42032, 2012.

KALANI R, JUDGE S, CARTER C, et al. Effects of caloric restriction and exercise on age-related, chronic inflammation assessed by C-reactive protein and interleukin-6. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 61:211–7, 2006.

KANDA T, TAKAHASHI T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. **Jpn Heart J**, 45:183–93, 2004

KHAPER N, BRYAN S, DHINGRA S, SINGAL R, BAJAJ A, PATHAK CM, et al. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. **Antiox Redox Signal**, 13:1033-49, 2010.

KHOSLA S, OURSLER M.J., MONROE D.G., Estrogen and the skeleton, **Trends Endocrinol. Metab.** 23, 576–581, 2012.

KIM CJ, KIM TH, RYU WS, RYOO UH. Influence of menopause on high density lipoprotein-cholesterol and lipids. **J Korean Med Sci**, 15:380-6, 2000.

KIM O.Y., CHAE J.S., PAIK J.K, SEO H.S., JANG Y., et al., Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women, **Age Dordr.** 34 415–425, 2012.

KLEIN D, KERN RM, SOKOL RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol**, 36:59-66, 1995.

KLEBANOV, S., 2007. Can short-term dietary restriction and fasting have a long-term anticarcinogenic effect? **Interdiscip. Top. Gerontol.** 35, 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.

KUMAR P, KAMAT A, MENDELSON CR. Estrogen receptor alpha (ERalpha) mediates stimulatory effects of estrogen on aromatase (CYP19) gene expression in human placenta. **Mol Endocrinol**,23:784-93, 2009.

LAMAS O, MORENO-ALIAGA MJ, MARTINEZ JA, MARTI A. NF-kappa B-binding activity in an animal dietinduced overweightness model and the impact of subsequent energy restriction. **Biochem Biophys Res Commun.**, 311:533–539, 2003.

LANE MA, REZNICK AZ, TILMONT EM, et al. Aging and food restriction alter some indices of bone metabolism in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **J Nutr**,125:1600–10, 1995.

LEVENSON, C.W., RICH, N.J., Eat less, live longer? New insights into the role of caloric restriction in the brain. **Nutr. Rev.** 65 (n.9), 412-415, 2007.

LING S, KOMESAROFF P, SUDHIR K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. **Clin Sci**, 111:107-18, 2006.

LISSI E, PASCUAL C, DEL CASTILLO MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Community**. V. 17, p.299-311., 1992.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidrimycin in mice. **Tumori**, v.71, p. 241–249, 1985.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.265–275, 1951.

LUCAS K, MAES M. Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical Cycle in Chronic Inflammation: Possible Treatments Targeting the TLR4 Pathway. **Mol Neurobiol**, 48:190-204, 2013.

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.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Rat CRC Press, p.243-247, 1985.

MARZETTI E, WOHLGEMUTH SE, ANTON SD, et al. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. **Clin Geriatr Med**, 25:715-32, 2009.

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

MATSUZAKI J, KUWAMURA M, YAMAJI R, INUI H, NAKANO Y. Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. **J Nutr.**, 131:2139–2144, 2001.

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.

MEDZHITOV R, JANEWAY C Jr. Innate immunity. **N Engl J Med**, 343:338-44, 2000.

MENDELSON M. E. AND KARAS R. H., “The protective effects of estrogen on the cardiovascular system,” **N Engl J Med**, vol. 340, no. 23, pp. 1801–1811, 1999.

MEYER TE, KOVACS SJ, EHSANI AA, et al. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. **J Am Coll Cardiol**, 47:398–402, 2006.

MORGAN-MARTINS, M.I. **A reposição de estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas**. 2003. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia). –

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MOYA ET, GIANOTTI M, LLADO I, PROENZA, AM. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **J Nutr Biochem**, 17:197–203, 2006.

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**, 47:2042-48, 2006.

MURPHY E, LAGRANHA C, DESCHAMPS A, et al. Mechanism of cardioprotection: what can we learn from females? **Pediatr Cardiol**, 32:354-359, 2011.

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**, 17(4):226-32, 2008.

PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, REQUENA J, et al. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. **Mech Ageing Dev**, 123:1437–46, 2002.

PHILLIPS T, LEEUWENBURGH C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. **FASEB J**, 19:668–70, 2005.

POZZI S, BENEDUSI V, MAGGI A, VEGETO E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, 1089:302-23, 2006.

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.

RETTTER AS, FRISHMAN WH. The role of tumor necrosis factor in cardiac disease. **Heart Dis**, 3:319–25, 2001.

RIBEIRO, L.C.; RODRIGUES, L.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TRAMONTINA, A.C.; BAMBINI-JUNIOR, V., et al., Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. **Brain Research**, v. 1472, p. 11-19, 2012.

ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340:115–26, 1999.

ROSSOUW JE, ANDERSON GL, PRENTICE RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, 288:321-333, 2002.

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.

SALEH TM, CONNELL BJ, SALEH MC. Acute injection of 17 $\beta$ -estradiol enhances cardiovascular reflexes and autonomic tone in ovariectomized female rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 84: 78-88, 2000.

SALTIKI, K.; ALEVIZAKI, M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. **Hormones (Athens)**, v.6, n.1, p. 9–24, 2007.

SANTOS, A.P.; FREITAS, C.; RODRIGUES, E.; CARDOSO, H.; FONSECA, H.; et al., 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: 10 dez 2015.

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.

SCHENKEL, PAULO C. ; FERNANDES, RAFAEL O. ; VIEGAS, VINÍCIUS U. ; CAMPOS, CRISTINA , et al., Catalase Influence in the Regulation of Coronary Resistance by Estrogen: Joint Action of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** , v. 2014, p. 1-6, 2014.

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

SIES, H., Oxidative Stress. II: Oxidants and Antioxidants, **Academic Press**, London, 1991.

SIMONCINI T. AND GENAZZANI A. R., "Non-genomic actions of sex steroid hormones," **European Journal of Endocrinology**, vol. 148, no. 3, pp. 281–292, 2003.

SINNING C, SCHNABEL R, PEACOCK WF, et al. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? **Congest Heart Fail** 2008;14:46–8, 2008.

SKRHA J. Effect of caloric restriction on oxidative markers. **Adv Clin Chem**, 47:224-42, 2009.

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.

SOLIMENE M. C., "Coronary heart disease in women: a challenge for the 21st century," **Clinics**, vol. 65, no. 1, pp. 99–106, 2010.

STOCCO C. Tissue physiology and pathology of aromatase. **Steroids**, 77:27-35, 2012.

SUNG B, PARK S, YU BP, CHUNG HY. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, 59:997–1006, 2004.

SWINDELL WR. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. **BMC Genomics.**, 10:585, 2009.

SVENSON J, CUNNINGHAM M, DASGUPTA S, GILKESON G S. Estrogen Receptor Alpha Modulates Mesangial Cell Responses to Toll-Like Receptor Ligands, **The American Journal of the Medical Sciences**, Volume 348, Issue 6, Pages 492-500, 2014

TAKAHASHI M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. **Trends Cardiovasc Med**, 21:37-41, 2011.

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.



TROTTER A, MAIER L, GRILL HJ, WUDY SA, POHLANDT F. 17beta-estradiol and progesterone supplementation in extremely low-birth-weight infants. **Pediatr Res**, 45:489-93. 14, 1999.

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.

VEGETO E, BELCREDITO S, ETTERI S, GHISLETTI S, BRUSADELLI A, MEDA C, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. **Proc Natl Acad Sci**, 100:9614-9, 2003.

VENUGOPAL SK, DEVARAJ S, YUHANNA I, et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, 106:1439–41, 2002.

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.

YANG XP&RECKELHOFF JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 2011;20:133-8, 2011.

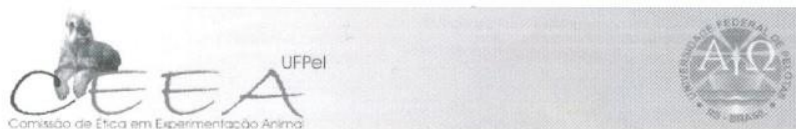
YOU T, SONNTAG WE, LENG X, et al. Lifelong caloric restriction and interleukin-6 secretion from adipose tissue: effects on physical performance decline in aged rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 62:1082–7, 2007.

ZHANG G & GHOSH S. Toll-like receptor-mediated NF-kB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J Clin Invest** 107: 13–19, 2001

ZOU Y, JUNG KJ, KIM JW, et al. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. **FASEB J**, 18:320–2, 2004.

## ANEXOS

## Anexo A – Parecer do CEEA



Pelotas, 02 de abril de 2014

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)*

**Para:** Professor Paulo Cavalheiro Schenkel

*Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia*

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Influência do receptor semelhante ao Toll4 na cardioproteção promovida pela restrição calórica 7 dias após o infarto agudo do miocárdio em ratos”**, processo nº23110.001590/2014-50, 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 1590).

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

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 17/04/2014

Assinatura do Professor Responsável: