



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOQUÍ-**  
**MICA E BIOLOGIA MOLECULAR (PMBqBM)**

**Avaliação da Proteção Cardíaca contra Isquemia e Reperfusão por Restrição Calórica em**  
**Ratos**

**Pesquisador:** Heberly di Tarso Fernandes Facundo

## Resumo

A isquemia cardíaca pode ser definida como a deficiência de suprimento sanguíneo adequado para os cardiomiócitos, que por sua vez, é acompanhada pela privação de oxigênio e acumulação de subprodutos danosos. A lesão por reperfusão cardíaca está relacionada à reintrodução de oxigênio ao coração isquêmico o que, paradoxalmente, é capaz de ocasionar um dano ainda maior e, conseqüentemente, morte celular. A restrição calórica é capaz de promover cardioproteção, que está associada, principalmente, à diminuição do estresse oxidativo e aumento das defesas antioxidantes. Neste trabalho o nosso objetivo principal é avaliar o impacto da restrição calórica sobre o estresse oxidativo e a homeostasia mitocondrial durante a isquemia e reperfusão, analisando a produção de radicais livres, a atividade de enzimas antioxidantes e a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Além disso, pretendemos determinar o impacto do fechamento do canal mitocondrial de potássio na viabilidade dos corações em restrição calórica quando submetidos ao pré-condicionamento cardíaco. Para a realização dos experimentos de isquemia cardíaca, propomos a criação/adaptação de um aparelho de perfusão cardíaca que nos permita simular a isquemia/reperfusão bem como registrar a pressão intraventricular do coração.

## 1. INTRODUÇÃO

A energia gerada pelo músculo cardíaco é oriunda quase totalmente da oxidação de compostos que são fornecidos pelo fluxo sanguíneo coronário. A mitocôndria gera energia por um processo que acoplado entre transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa. Através deste processo a mitocôndria gera 90% do ATP celular, ocupa aproximadamente 30% do volume do miócito e sua função impacta tanto a frequência cardíaca quanto o consumo de oxigênio pelos miócitos (1). Adicionalmente, a mitocôndria tem papel essencial na regulação intracelular de cálcio, na sinalização, na morte celular e na geração de Espécies Reativas de oxigênio (EROs) (2).

Como muitas células, quando privadas de oxigênio, as células miocárdicas tentam manter os níveis de ATP pela produção de ATP glicolítico (3). Um coração em condições normais de nutrição e oxigênio capta energia do metabolismo de ácidos graxos (60-90%) que ocorre na matriz mitocondrial. O restante vem do metabolismo dos carboidratos (4). Se o fluxo sanguíneo é restrito, como no infarto do miocárdio, as células acumulam subprodutos, além de sofrerem privação de oxigênio. Esta é uma condição conhecida como isquemia e pode danificar irreversivelmente as células cardíacas (5).

O dano isquêmico é muito importante, entretanto, o maior dano às células isquêmicas ocorre durante a reintrodução do oxigênio. Durante a reperfusão, as células sofrem hipercontração e danos

à membrana, seguidas de morte celular (6). É extensivamente reconhecido que a isquemia e a reperfusão geram danos celulares e mitocondriais às células cardíacas (7–10). Além disso, a descrição das alterações mitocondriais que ocorrem na isquemia e reperfusão, junto aos estudos farmacológicos sobre os agentes que protegem contra tais alterações, sugerem que a disfunção mitocondrial pode ser um fator importante na lesão tecidual durante a isquemia e reperfusão (7).

A disfunção mitocondrial afeta a viabilidade celular por meio de uma ampla gama de eventos. Perda da síntese de ATP, aumento da hidrólise de ATP, comprometimento da homeostase iônica ( $\text{Ca}^{2+}$  em particular), formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de proteínas pró-apoptóticas, são todos reconhecidos como fatores-chave na geração de danos irreversíveis (7,11–14). Esta série de eventos explica por que as mitocôndrias estão envolvidas tanto na necrose quanto na apoptose após a reperfusão pós-isquêmica (7).

A produção de EROs aumenta constantemente durante a isquemia e aumenta consideravelmente no início da reperfusão a medida que a tensão de oxigênio aumenta (15). Além disso, a geração de EROs durante a reperfusão precoce em associação com a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial leva à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), que desempenha um papel importante na lesão por isquemia-reperfusão (16).

Atualmente, é amplamente aceito que a abertura do PTPM contribui para a perda de viabilidade associada à reperfusão pós-isquêmica. Embora a abertura do PTPM possa ser causada por isquemia na ausência de reperfusão (17), a combinação de abordagens farmacológicas e bioquímicas indica que a abertura do PTPM ocorre principalmente no início da reperfusão. De fato, as condições associadas à reperfusão pós-isquêmica, como acúmulo de EROs, normalização do pH e aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , criam um cenário ideal para a abertura do PTPM (7).

A restrição calórica (RC), também conhecida como restrição alimentar, é a redução da ingestão alimentar, porém sem desnutrição. Experimentalmente, a restrição calórica significa uma redução na ingestão de calorias quando comparada a uma dieta ad libitum (18). A RC pode prevenir ou retardar várias doenças, incluindo as doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes e doenças autoimunes (19). Em relação às doenças cardiovasculares, a RC diminui a pressão arterial, altera o perfil lipoprotéico, melhora a glicorregulação e induz alterações hormonais, consequentemente, retardando o início de alterações cardíacas relacionadas à idade e diminuindo os seus fatores de risco (19–22).

Os estudos têm mostrado que a RC promove efeitos pleiotrópicos no sistema cardiovascular, evitando a progressão de doenças cardiovasculares através de mecanismos diretos e indiretos. A RC previne a senescência cardíaca, diminuindo o dano oxidativo e aumentando a autofagia cardíaca, melhorando assim, a função cardíaca em animais idosos. Além disso, a RC é capaz de melhorar a

tolerância isquêmica miocárdica em roedores de todas as idades, além de poder abrandar a cardiomiopatia metabólica associada à obesidade e ao diabetes mellitus tipo 2 (23).

Pesquisas demonstraram que a RC desencadeia uma resposta de defesa ativa contra condições estressantes e, dessa maneira, age de forma cardioprotetora. Tais respostas estão relacionadas a mecanismos moleculares que incluem, principalmente, a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), sirtuínas e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (23).

### **1.1 LESÃO CARDÍACA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO**

A privação de oxigênio durante a isquemia, causa a suspensão da fosforilação oxidativa, diminuindo os níveis intracelulares de ATP, de creatina fosfato e comprometendo a contratilidade cardíaca (24). O acúmulo de ácido láctico e a diminuição do pH durante a isquemia, inibe a geração de ATP a partir da glicólise. O transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  é ativado na tentativa de restaurar o pH, o que resulta em um aumento simultâneo na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular. Por sua vez, o aumento da concentração de sódio intracelular diminui ou inverte a direção do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , o que leva a um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . As mitocôndrias atuam como um tampão para o cálcio intracelular e, em última análise, o aumento dos níveis de cálcio citosólico causam sobrecarga de cálcio na mitocôndria. Isso leva a um aumento na produção de EROs a partir dos complexos mitocondriais I e III e, conseqüentemente, à diminuição das defesas antioxidantes (25).

O processo de reperfusão, por sua vez, pode exacerbar o dano induzido pela própria isquemia. Após a reperfusão, as mitocôndrias são mais uma vez capazes de respirar e gerar um potencial de membrana para conduzir a síntese de ATP, mas isso também permite o rápido acúmulo de cálcio dentro da mitocôndria, levando à sobrecarga de cálcio. Além disso, há uma produção rápida e extensa de espécies reativas de oxigênio (EROs) à medida que a cadeia respiratória inibida é reexposta ao oxigênio (26).

As mitocôndrias danificadas podem liberar o citocromo c, desencadeando a ativação da caspase e, conseqüentemente, apoptose. No entanto, a apoptose não é o modo dominante de morte celular na lesão por isquemia e reperfusão. Pelo contrário, é a necrose, que é mediada em grande parte pela transição de permeabilidade mitocondrial. Tal fenômeno é uma resposta comum à lesão por isquemia e reperfusão e é induzida por estresses como EROs e sobrecarga de cálcio. A transição de permeabilidade mitocondrial, torna a membrana mitocondrial interna permeável a solutos de até 1.500 Da (27), resultando na despolarização do potencial de membrana devido à dissipação do gradiente eletroquímico. A perda do gradiente eletroquímico faz com que a ATP sintase funcione em sentido inverso, consumindo ATP, precedido por uma liberação transitória mas maciça de EROs e cálcio (28–30). Esta liberação de EROs sinaliza mitocôndrias vizinhas para fazer o mesmo,

culminando na ativação de proteases dependentes de cálcio, lipases e, finalmente, morte celular necrótica (31). As mitocôndrias danificadas mas ainda funcionais podem liberar até dez vezes mais  $H_2O_2$ , representando 10-20% do oxigênio consumido (32).

## **1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E O PORO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL**

As mitocôndrias são organelas que desempenham papéis cruciais na vida e na morte das células. Em células cardíacas saudáveis, sua função principal é a geração de ATP através da fosforilação oxidativa para atender às altas demandas energéticas do coração. A glicólise sozinha não é capaz de atender a essas demandas e a inibição da fosforilação oxidativa, que ocorre na anóxia ou na isquemia, leva ao comprometimento ou cessação da função cardíaca normal. Todavia, dentro das mitocôndrias, existem mecanismos que, uma vez ativados, convertem as mitocôndrias de organelas que mantêm a vida da célula à organela que induzem ativamente tanto a morte celular apoptótica quanto necrótica. Essa mudança de papéis, é mediada pela abertura de um poro não específico na membrana interna mitocondrial, conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (26).

Em condições fisiológicas normais, a membrana interna mitocondrial é impermeável a quase todos os íons e moléculas. Entretanto, sob condições de estresse, um poro não específico, conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial, pode se abrir na membrana interna mitocondrial, permitindo a passagem livre de qualquer molécula ( $<1,5$  kDa) (25). Quando o PTPM abre, a barreira de permeabilidade da membrana interna é interrompida com duas consequências principais. Em primeiro lugar, embora todos os solutos de pequeno peso molecular se movam livremente através da membrana, as proteínas não o fazem e, como resultado, exercem uma pressão osmótica coloidal que causa o inchaço das mitocôndrias. Embora o desdobramento das cristas permita que a matriz se expanda sem a ruptura da membrana interna, a membrana externa se romperá e levará à liberação de proteínas no espaço intermembranoso, como o citocromo c e outros fatores que desempenham um papel crítico na morte celular por apoptose (26).

Em segundo lugar, a membrana interna torna-se livremente permeável aos prótons. Isso desfaz a fosforilação oxidativa, fazendo com que a ATPase de translocação de prótons reverta a direção e, assim, hidrolisem ativamente o ATP, em vez de sintetizá-lo. Sob tais condições, as concentrações de ATP intracelular diminuem rapidamente, levando ao rompimento da homeostase iônica e metabólica e à ativação de enzimas degradativas, como fosfolipases, nucleases e proteases. A menos que ocorra o fechamento dos poros, essas alterações causarão danos irreversíveis à célula,

resultando em morte necrótica. Mesmo que ocorra o fechamento, o edema mitocondrial e a ruptura da membrana externa podem ser suficientes para colocar a cascata apoptótica em movimento (26,33).

Assim, não é de surpreender que o PTPM seja mantido fechado sob condições fisiológicas normais e só seja ativado sob condições patológicas. O principal fator responsável pela abertura do PTPM é a sobrecarga de cálcio mitocondrial, especialmente quando acompanhada por estresse oxidativo, depleção de nucleotídeos de adenina, concentrações elevadas de fosfato e despolarização mitocondrial. Essas condições são exatamente aquelas que o coração experimenta durante a reperfusão pós-isquêmica, e há evidências de que a abertura do PTPM é fundamental na transição da lesão de reperfusão reversível para irreversível (26,33).

### **1.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO**

A restrição calórica pode ser caracterizada como uma redução da ingestão dietética, sem desnutrição e geralmente 30-40% menor em relação ao grupo *ad libitum* (AL) (34). Desde 1935, a RC a longo prazo tem sido conhecida por exercer um efeito antienvhecimento, prolongando a vida média e máxima e atrasando o aparecimento de patologias associadas à idade em roedores (35). Além disso, a restrição calórica a curto prazo protege o coração do rato contra lesões isquêmicas, reduzindo o tamanho do infarto e melhorando a hemodinâmica cardíaca (36).

A cardioproteção proporcionada pela restrição calórica é mediada, à nível celular, pela diminuição do estresse oxidativo, melhora da função mitocondrial, diminuição da inflamação e alterações na autofagia. O estresse oxidativo está associado à lesão por isquemia-reperfusão, remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (27). Assim, estudos mostram que a RC pode diminuir o dano oxidativo cardíaco, alterando o potencial mitocondrial e a atividade respiratória, o que resulta em menor geração de EROs e menor dano oxidativo (37–39).

Além disso, a RC também aumenta as defesas antioxidantes (37,40–42). Um período de RC tão curto quanto 35 dias é suficiente para diminuir o estresse oxidativo cardíaco. Diniz et al. (43) submeteram ratos à restrição calórica de 50% por 35 dias e observaram um aumento na atividade da glutathione peroxidase, da catalase e uma diminuição na peroxidação lipídica em comparação com ratos *ad libitum*. Outro estudo utilizando ratos submetidos à restrição calórica de 50% por uma semana, seguida de uma semana de realimentação, mostrou que as mitocôndrias hepáticas se tornaram mais eficientes, como refletido pelo aumento da capacidade respiratória

mitocondrial do estado 3 (estado ativado) e aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (44).

Seymour et al. (45) usando ratos sensíveis ao sal (Dahl) que foram alimentados com uma dieta rica em sal, mostraram que uma restrição calórica de 15% reduz a peroxidação lipídica, melhorando o remodelamento ventricular esquerdo, a função diastólica e o índice cardíaco, e retardando o início da caquexia cardíaca. Ainda, Chandrasekar et al. (46) demonstraram que uma RC de 40% ao longo da vida atenua o dano oxidativo cardíaco em ratos de meia-idade após isquemia-reperfusão miocárdica.

Outros estudos também demonstraram que a RC pode prevenir ou mesmo reverter o acúmulo cardiovascular de dano oxidativo em uma variedade de cenários experimentais. Sohal et al. (42) demonstraram que ratos submetidos a RC de 40% apresentaram uma redução significativa na oxidação do DNA em relação aos roedores alimentados com AL. Além disso, o conteúdo de proteína carbonilada (um marcador da oxidação de proteínas) aumentou no coração de ratos alimentados com AL durante o envelhecimento, o que foi atenuado pela redução de 40% na ingestão alimentar. A atenuação do dano oxidativo proteico foi sustentada pela redução da geração mitocondrial de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (37). Além disso, a atividade da catalase foi reduzida durante o envelhecimento em camundongos alimentados com AL, enquanto um padrão oposto foi evidente em animais com CR (47).

Gredilla relatou que uma RC de 40% em 12 meses diminuiu a geração de  $H_2O_2$  mitocondrial, liberação de radicais livres e dano oxidativo ao DNA mitocondrial no coração de ratos idosos (40). Outro estudo demonstrou que 40% de RC em 4 meses foram suficientes para induzir uma redução significativa na glicoxidação e lipoxidação das proteínas mitocondriais no coração de ratos jovens (48). A eficácia da RC de curta duração na atenuação do estresse oxidativo do coração foi demonstrada por Diniz et al. (43), que relataram níveis miocárdicos reduzidos de lipoperoxidação em ratos jovens submetidos a 50% de RC por 35 dias. Além disso, os ratos RC apresentaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e catalase em relação aos controles alimentados com AL. Por fim, em um estudo conduzido por Colom et al., uma RC de 40% por 3 meses reduziram a geração de  $H_2O_2$  mitocondrial cardíaca e o conteúdo de proteína carbonilada em ratos de meia-idade (49).

#### **1.4 MECANISMOS CELULARES DE CARDIOPROTEÇÃO PROMOVIDOS PELA RESTRIÇÃO CALÓRICA**

A interrupção do fluxo sanguíneo para as artérias coronárias resulta em uma falta aguda de oxigênio e priva as células cardíacas de nutrientes. Essa interrupção, quando associada à posterior

restauração do fluxo sanguíneo, resulta na chamada lesão por isquemia-reperfusão. À nível celular, a isquemia é caracterizada pela falta de oxigênio e nutrientes e pelo acúmulo de metabólitos como o lactato. Através de alterações nos níveis de pH, sódio e ATP, a isquemia-reperfusão desencadeia uma cascata de eventos, incluindo a geração maciça de espécies reativas de oxigênio e perda da homeostasia do cálcio, culminando na transição de permeabilidade mitocondrial e ativação de caminhos de sinalização de morte celular (50).

Foi-se demonstrado que uma RC de oito meses de duração melhora a recuperação da função cardíaca após 25 minutos de isquemia em corações de ratos. O efeito é mediado por uma melhora na respiração mitocondrial e na taxa de fosforilação oxidativa (51). Outros estudos comprovaram que a curto prazo (4 semanas) e a longo prazo (6 meses), a RC é capaz de melhorar a tolerância isquêmica miocárdica (52–54). A cardioproteção oferecida pela RC de curta duração está associada a um aumento na atividade da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Os autores mostraram que a RC de curta duração induz um aumento nos níveis de adiponectina circulante que ativam a AMPK do miocárdio, resultando em proteção contra a isquemia.

A cardioproteção da RC a longo prazo parece estar relacionada a atividade de um tipo de histona desacetilase denominada sirtuína 1 (SIRT 1) (54). Um possível mecanismo é que a SIRT 1 ativa a autofagia ao promover a desacetilação de proteínas responsáveis por este processo (55) e também ativa a biogênese mitocondrial, via ativação de PGC-1 $\alpha$  (co-ativador de transcrição gênica) (56–58). O resultado líquido é que a restrição calórica garante uma boa função promovendo o “*turnover*” mitocondrial. A RC também demonstrou aumentar biogênese mitocondrial e a eficiência bioenergética através de um processo de sinalização via proteína quinase B (Akt), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico (NO) (59–63). Este aumento na biogênese mitocondrial foi considerado crucial para os efeitos benéficos da RC (59,62–64).

Nisoli et al. (62) mostraram que camundongos em RC por 3 meses têm níveis mais altos de DNA mitocondrial, de marcadores de biogênese mitocondrial (PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, Tfam), expressão de citocromo c oxidase e citocromo c, quando comparados com camundongos *ad libitum*. Cerqueira et al. (59) mostraram que camundongos alimentados com 60% da dieta normal por 6 meses tinham marcadores de biogênese mitocondrial aumentados, além de demonstrarem aumentos nas atividades da citrato sintase e citocromo c oxidase. A expressão e fosforilação da Akt e eNOS foram ativadas e os níveis plasmáticos de NO em jejum foram aumentados, o que se acredita ter levado ao aumento da biogênese mitocondrial (59).

Resultados semelhantes foram obtidos com o mimético da RC, o 2,4-dinitrofenol (59). O mecanismo sugerido é que a restrição calórica ativa a proteína quinase B (Akt), que diretamente fosforila a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ativando a enzima e levando à produção de



óxido nítrico (NO) (59–63). O óxido nítrico, então, ativa uma via de sinalização dependente de NO e proteína quinase G, que induz a ativação de PGC-1 $\alpha$ , aumentando a biogênese mitocondrial (64,65).

A exposição prolongada a níveis elevados de EROs prejudica a atividade da eNOS. Portanto, dado que as mitocôndrias produzem espécies reativas de oxigênio e que um excesso de mitocôndrias levará, conseqüentemente, ao aumento da produção dessas espécies, a eNOS funciona em um circuito de retroalimentação negativa, impedindo a geração de EROs excessivas (66,67). A expressão da eNOS é, portanto, acompanhada pelo aumento da biogênese mitocondrial, da respiração mitocondrial e da produção de ATP (62,68).

Shinmura et al. (54) forneceram evidências de que o aumento na SIRT1 nuclear está crucialmente envolvido na cardioproteção contra a lesão por isquemia-reperfusão ex vivo conferida em ratos de meia-idade submetidos à restrição calórica por 6 meses. O aumento nuclear de SIRT1 é dependente de óxido nítrico e a inibição crônica da eNOS impede não apenas a translocação SIRT1, mas também impede a cardioproteção induzida pela RC. Conseqüentemente, a superexpressão de SIRT1 nos cardiomiócitos inibe a lesão por isquemia-reperfusão, enquanto a perda cardíaca de SIRT1 aumenta tal lesão (69). A falta de SIRT1, portanto, inibe a autofagia in vivo, leva a uma acetilação elevada de proteínas necessárias para autofagia, e ao acúmulo de mitocôndrias danificadas e metabolismo prejudicado (55).

Em suma, vários fatores demonstraram estar envolvidos na regulação da atividade do co-regulador transcricional da biogênese mitocondrial PGC-1 $\alpha$ , incluindo, principalmente, as sirtuínas (SIRT1), o óxido nítrico, a isoenzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a proteína quinase B (Akt), dentre outros fatores que também tem sido relatados por serem regulados em resposta à restrição calórica (70).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o impacto da restrição calórica sobre o estresse oxidativo e a homeostasia mitocondrial em corações de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

### **2.2 Objetivos Específicos**

– Determinar a proteção de corações submetidos a isquemia e reperfusão com e sem restrição calórica através dos níveis de lactato desidrogenase e creatina kinase;

- Determinar o impacto do fechamento do canal mitocondrial de potássio na viabilidade dos corações em restrição calórica submetidos ao pré-condicionamento;
- Avaliar os níveis de glutathione, proteínas sulfidrilas e proteínas carbonilas em corações submetidos ao pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão em corações de ratos que foram submetidos a restrição calórica;
- Investigar a atividade das enzimas antioxidantes após a reperfusão em corações de ratos que foram submetidos a restrição calórica;
  - Avaliar a produção de EROs por corações em restrição calórica antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão com ou sem tratamento com inibidores do mitoKATP;
- Avaliar a atividade do mitoKATP em corações de ratos em restrição calórica antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão;
- Estudar o impacto da restrição calórica sobre a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzido por cálcio antes e após o pré-condicionamento cardíaco e isquemia/reperfusão.
- Criação de um aparelho de perfusão cardíaca para uso em pesquisa e na graduação de medicina.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Indução de Restrição Calórica**

Ratos Wistar machos (12 semanas de idade) serão alimentados com uma dieta padrão de roedores ad libitum durante 2 semanas. A ingestão calórica média será calculada a partir da ingestão diária destas 2 semanas. Em seguida, esses ratos (com 8 semanas de idade) serão divididos aleatoriamente em grupos: (1) Grupo com ingestão ad libitum (Grupo AL), (2) Grupo alimentado com 60% do consumo médio de calorias (calculadas a partir das 2 primeiras semanas) durante as 4 semanas adicionais do experimento (Grupo RC) .

#### **3.2 Indução do pré-condicionamento, isquemia e reperfusão**

Os ratos serão sacrificados após anestesia com 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Subsequentemente, o coração será removido e a aorta será rapidamente canulada para iniciar a perfusão usando o sistema de perfusão cardíaca isolada de Langendorff. Os corações serão perfundidos com tampão Krebs-Henseleit gaseificado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> contendo (em

mM): NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,25, glicose 10, and HEPES 10, pH 7,4, a 37°C. Os corações isquêmicos serão submetidos a 35 minutos de perfusão antes da isquemia longa de 40 minutos, enquanto corações preconditionados serão submetidos a 15 minutos de perfusão e dois ciclos de 5 minutos de isquemia global separados cada um por 5 minutos de reperfusão. Um balão conectado a um transdutor de pressão será inserido no ventrículo esquerdo através da remoção do átrio esquerdo e inflado com água destilada com a finalidade de monitorar a função hemodinâmica dos corações de rato.

### **3.3 Avaliação da Atividade de lactato desidrogenase e creatina kinase**

A avaliação dessas duas enzimas durante o pré-condicionamento, isquemia e reperfusão será conduzido usando kits disponíveis comercialmente.

### **3.4 Isolamento de Mitocôndrias**

O tecido cardíaco será submetido a disrupção física com homogeneizador para provocar a lise celular em tampão contendo: 300 mM sacarose, 10 mM de tampão Hepes, pH 7.2, and 1 mM EGTA. A precipitação do núcleo e resíduos celulares será promovida através de uma centrifugação com baixa rotação ( $\gg 600$  g). Após esta primeira centrifugação o sobrenadante é congelado em alíquotas e servirá para dosagens enzimáticas, por outro lado o pellet será ressuspensionado em 1 mL do tampão de homogeneização e servirá para dosagens de proteínas carboniladas. As mitocôndrias serão então separadas do sobrenadante através de centrifugações com maior rotação ( $\gg 10\,000$  x g), e lavadas até a obtenção de uma suspensão homogênea. As mitocôndrias serão ressuspensionadas no tampão de isolamento em quantidade mínima (~100  $\mu$ L) usada imediatamente (dentro de 1 hora) para experimentos de avaliação da abertura do mitoKATP ou estocada em -20 °C para posterior análise da susceptibilidade à oxidação com Fe<sup>2+</sup> e dosagem de proteínas.

### **3.5 Avaliação da Atividade do mitoKATP**

A atividade do mitoKATP será quantificada pela medida do espalhamento de luz devido à absorção de K<sup>+</sup> em suspensões mitocondriais. A entrada de K<sup>+</sup> causa inchamento que diminui o espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial e será acompanhado ao longo do tempo em 520 nm usando-se um espectrofotômetro, em temperatura ambiente, com agitação suave.

### **3.6 Avaliação da Abertura do Poro de Transição de Permeabilidade.**

Alterações de volume mitocondrial serão acompanhadas através da quantificação do espalhamento de luz da suspensão a 520 nm usando espectrofotômetro. A indução da abertura do poro de transição de permeabilidade será por adição de cálcio (200 micromolar/mg de proteína).

### **3.7 Quantificação das Espécies Reativas de Oxigênio**

Fragmentos de ventrículo esquerdo (50 mg) serão incubados em tampão krebs contendo em mM: NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,25, glicose 10, e HEPES 10, pH 7,4 a 37°C. Ao tampão serão adicionados peroxidase de raiz forte (2 U/mL) e amplex red (100 micromolar final). Ao fim de incubação em 37°C por 30 minutos a mistura é centrifugada em 12000 x g por 3 minutos e o sobrenadante é lido em uma cubeta de vidro em 560 nm. O cálculo da concentração é feito através da construção de uma curva padrão usando concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

### **3.8 Quantificação da atividade de glutathione peroxidase**

A atividade de glutathione peroxidase será acompanhada pelo desaparecimento do NADPH. Esta enzima utiliza glutathione reduzida (GSH) para degradar um peróxido orgânico, peróxido de cumeno, gerando glutathione oxidada (GSSG). A reação acoplada a atividade de glutathione redutase consome NADPH (Ext. Molar= 6.220 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm. Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O ensaio enzimático será realizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/ml de GR purificada de levedura. A reação é iniciada pela adição de 1 mM de hidróxido de cumeno.

### **3.9 Quantificação da atividade de superóxido dismutase total e mitocondrial**

O homogenato de tecido é adicionado a um meio de reação contendo 0.1 mM EDTA, 13 mM L-metionina, e 75 mM e nitro azul de tetrazólio (NBT) em tampão fosfato pH 7.8. A reação é iniciada pela adição de 2 µM de riboflavina e depois é exposta uniformemente a luz por 10 minutos. Uma cor azul é desenvolvida devido a oxidação do NBT e medida em 560 nm. A atividade de superóxido dismutase é expressa em U/mg de proteína. A atividade de superóxido dismutase

mitocondrial será medida na presença de cianeto que inibe a cobre-zinco superóxido dismutase. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir a redução de NBT por 50%.

### **3.10 Quantificação da Atividade de Catalase**

A atividade antioxidante da catalase será conduzida no sobrenadante dos homogenatos em tampão fosfato (pH = 7,4) contendo 50 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As mudanças na absorbância em 240 nm serão acompanhadas por 10 minutos. A atividade de catalase foi calculada em miliunidades de catalase por miligrama de proteína.

### **3.11 Determinação dos níveis de proteínas tiol**

O dano oxidativo às proteínas é inversamente correlacionado com o teor de tiol de proteína. Os tióis nas proteínas serão medidos através da redução de DTNB, gerando um produto amarelo (TNB) medido a 412 nm. Após homogenização do tecido com tampão de isolamento de mitocôndrias o sobrenadante será incubado no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente com DTNB 0,2 mM (preparado em PBS mais EDTA 1 mM). O teor de tiol proteico será calculado com base no coeficiente de extinção molar de TNB ( $14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e expresso como micromoles de TNB por miligrama de proteína. O branco da reação é feito após a precipitação das proteínas.

### **3.12 Quantificação dos níveis de Glutathiona**

Os níveis de glutathiona serão determinados utilizando um método baseado numa reação do DTNB (71). Esta reação produz um produto de cor amarela que será detectado em 412 nm. Uma alíquota do homogenato de coração será adicionada ao ácido sulfosalicílico (4%), para precipitação das proteínas. Após homogeneização, a mistura será centrifugada a  $1600 \times g$  durante 15 minutos. O sobrenadante resultante será adicionado ao DTNB (2 mM). Após 10 minutos a absorbância é medida em 412 nm. A glutathiona total será calculada utilizando-se uma curva padrão com glutathiona purificada. O teor total de GSH será expresso em microgramas por mg de proteína.

### **3.13 Quantificação de Proteínas Carbonilas**

O teor de proteína carbonil (PC) do coração será medido usando-se o método de Reznick e Packer (71). Em resumo, o homogenato do tecido será adicionado em 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM (DNPH) em HCl 2 N e incubados por 1 h em temperatura ambiente, com agitação a cada 15 min. Em seguida, adiciona-se ácido tricloroacético (TCA, 20%) e incuba no gelo durante 5 min. Após centrifugação por 10 minutos 12000 x g os precipitados serão lavados duas vezes com etanol-acetato de etila (v / v). O precipitado final é dissolvido em solução de cloridrato de guanidina 6 M e incubado por 15 minutos a 37 °C. A absorbância da amostra é medida em 370 nm. O teor de carbonila é calculado usando-se o coeficiente de extinção molar de DNPH ( $2.2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) e expressos como nanomoles/mg de proteína.

#### 4. Criação de aparelho de perfusão cardíaca.

É sempre uma deficiência em aulas práticas para o curso médico a demonstração do funcionamento do coração. Mesmo com o advento de softwares de alta resolução que permitem visualização do funcionamento cardíaco e do efeito de drogas ou patologias sobre este órgão é extremamente necessário que o estudante visualize (ou assista uma demonstração) ou manipule um órgão vivo. Dentro deste contexto nós propomos a criação de um aparelho de perfusão cardíaca simples, barato e que aproveite vários aparelhos que estão no nosso laboratório. O aparelho será criado usando-se uma bomba peristáltica para bombeamento da solução que perfundirá o coração, um banho maria para controle de temperatura, uma canula com balão de latex para registro de pressão em papel fixado em um suporte. O equipamento será calibrado para um volume de perfusão constante de 8 mLs de minuto em corações de rato. Um modelo do equipamento está desenhado na Figura 01.

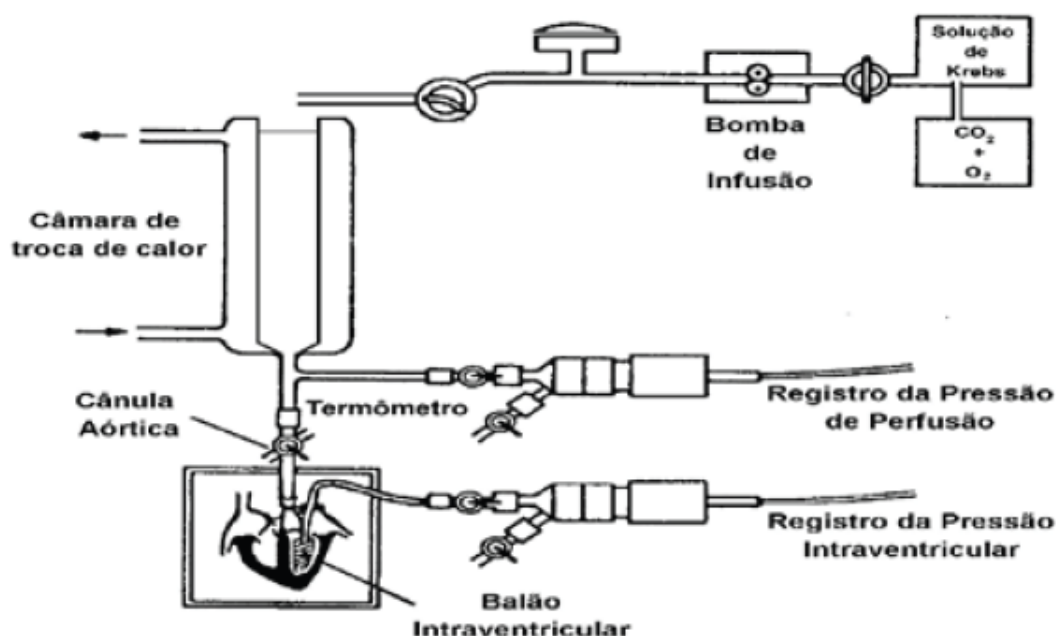


Figura 1 .(72)

## PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS.

A Isquemia cardíaca (infarto do miocárdio) é um importante fator de morte súbita cardíaca e morbidade no mundo. Não há cura e pode levar à insuficiência ou a morte do indivíduo em poucas horas após o evento. O infarto do miocárdio se caracteriza pela indução de uma grande quantidade de eventos celulares que induzem mudanças estruturais, de sinalização e de modificação de componentes. Segundo os dados do DATASUS de janeiro de 2017 a dezembro de 2018 houveram XXXXXX internações por isquemia cardíaca, destas XXXXXXXXXX ocorreram apenas no estado do ceará. Portanto, compreender bem os eventos relacionados a este evento , bem como evitar seu surgimento é de suma importância para a prática médica. Também, devemos procurar formas eficazes para reversão de seus efeitos deletérios.

A introdução de novas estratégias terapêuticas que possam ajudar a entender os eventos celulares que ocorrem durante ou após o evento isquêmico ou que ajudem a reverter ou reduzir a isquemia cardíaca é de suma importância. Com os experimentos propostos aqui esperamos desenvolver e usar um sistema de perfusão cardíaca que nos ajude a simular isquemia e reperfusão no laboratório e assim demonstrar que a restrição calórica inibe a isquemia cardíaca por impactar positivamente a função mitocondrial e o estado redox mitocondrial e celular. Adicionalmente, pretendemos demonstrar que esses efeitos benéficos são mecanisticamente mediados pela abertura do mitoKATP. A justificativa principal para este projeto é que estes resultados auxiliem na introdução de novas rotas terapêuticas de prevenção e tratamento desta patologia. O nosso projeto também se justifica pela sua proposta de contribuição para os avanços científicos nessa área pois se pretende contruir um sistema barato para o estudo deste evento e ajudará a entender como a restrição calórica pode influenciar o evento isquêmico cardíaco e ainda de maneira inovadora tentará entender os mecanismos e sua relação com a restrição da ingesta de calorias e o estado redox e mitocondrial.

## 4. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

<b>Ano 1</b>													
<b>Atividades</b>	<b>Mês</b>												
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
<b>Indução de restrição calórica</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Construção do aparelho de perfusão cardíaca</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
<b>Testes com animais e ajustes finos do sistema de perfusão</b>			X	X	X	X							
<b>Testes do sistema de registro de pressão</b>							X	X	X	X	X		
<b>Indução do pré-condicionamento, isquemia e reperfusão e avaliação da atividade de lactato desidrogenase e creatina kinase nos corações</b>					X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Análise da atividade de SOD,Glutathiona peroxidase</b>						X	X	X	X	X			
<b>Análise da atividade de catalase</b>							X	X	X	X			
<b>Análise da produção de EROs</b>						X	X	X	X				
<b>Análise de proteínas tiol e Glutathiona</b>										X	X		
<b>Tratamento estatístico dos dados e preparação de manuscritos</b>										X	X	X	
<b>ANO 2</b>													
<b>Indução de restrição calórica</b>					X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Indução do pré-condicionamento, isquemia e reperfusão e avaliação da atividade de lactato desidrogenase e creatina kinase nos corações</b>					X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Avaliação da atividade do mitoKATP</b>			X	X	X	X	X	X					
<b>Extração das mitocôndrias das amostras de corações e análise da abertura do poro de transição de permeabilidade</b>					X	X	X	X	X				
<b>Avaliação de proteínas carboniladas</b>								X	X	X	X	X	X



<b>Tratamento estatístico dos dados e preparação de manuscritos e da dissertação</b>										X	X	X
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---	---

## REFERÊNCIAS

1. Barth E, Stämmler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 1992 Jul [cited 2018 Apr 13];24(7):669–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002228289293381S>
2. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes [Internet]. Vol. 113, *Circulation Research*. 2013 [cited 2018 Apr 13]. p. 603–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845521/pdf/nihms-517194.pdf>
3. Das AM, Harris DA. Regulation of the mitochondrial ATP synthase in intact rat cardiomyocytes. *Biochem J* [Internet]. 1990 [cited 2018 Mar 30];266(2):355–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1131139/pdf/biochemj00188-0049.pdf>
4. Stanley WC, Chandler MP. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Hear Fail Rev* [Internet]. 2002 [cited 2018 Apr 13];7:115–30. Available from: <https://www.cardiometabolicresearchgroup.com/wp-content/uploads/2017/12/Bill-Stanley-heart-metabolism-2002.pdf>
5. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: Where do they come from; Where do they go to? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [Internet]. 1991 Sep [cited 2018 Mar 30];23(9):1077–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022282891916425>
6. Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection [Internet]. Vol. 61, *Cardiovascular Research*. 2004 [cited 2018 Mar 30]. p. 365–71. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2003.12.012>
7. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: Fixing a hole [Internet]. Vol. 70, *Cardiovascular Research*. 2006 [cited 2018 Mar 30]. p. 191–9. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2006.01.016>
8. Piper HM, Noll T, Siegmund B. Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1994 Jan 1 [cited 2018 Mar

30];28(1):1–15. Available from:

<https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/28.1.1>

9. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition [Internet]. Vol. 66, Cardiovascular Research. 2005 [cited 2018 Mar 30]. p. 222–32. Available from: [https://watermark.silverchair.com/66-2-222.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAcAwggG8BgkqhkiG9w0BBwagggGtMIIBqQIBADCCAAIGCSqGSIb3DQEHATAeBglgghkgBZQMEAS4wEQQM9oz2LfA73UEgVQKsAgEQgIIBc89iWSFhc71T1dkzQqVWk59YKsSf3XCQ\\_u4PatdzZ\\_ugbz](https://watermark.silverchair.com/66-2-222.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAcAwggG8BgkqhkiG9w0BBwagggGtMIIBqQIBADCCAAIGCSqGSIb3DQEHATAeBglgghkgBZQMEAS4wEQQM9oz2LfA73UEgVQKsAgEQgIIBc89iWSFhc71T1dkzQqVWk59YKsSf3XCQ_u4PatdzZ_ugbz)
10. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia - reperfusion, aging, and heart failure [Internet]. Vol. 33, Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2001 [cited 2018 Mar 30]. p. 1065–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282801913781>
11. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Petronilli V. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium [Internet]. Vol. 1366, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 1998 [cited 2018 Mar 30]. p. 69–78. Available from: [https://ac.els-cdn.com/S0005272898001212/1-s2.0-S0005272898001212-main.pdf?\\_tid=84d96633-055b-4fde-954d-c6f29195626e&acdnat=1522429657\\_9c67851c6d1d8f025e05960e8e97cb95](https://ac.els-cdn.com/S0005272898001212/1-s2.0-S0005272898001212-main.pdf?_tid=84d96633-055b-4fde-954d-c6f29195626e&acdnat=1522429657_9c67851c6d1d8f025e05960e8e97cb95)
12. Duchen MR. Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death [Internet]. Vol. 529, Journal of Physiology. 2000 [cited 2018 Mar 30]. p. 57–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2270168/pdf/tjp0529-0057.pdf>
13. Brenner. Outer membrane channels. 1995 [cited 2018 Mar 30];Beavis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2270186/pdf/tjp0529-0023.pdf>
14. Crow MT. The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. Circ Res [Internet]. 2004 Oct 21 [cited 2018 Mar 30];95(10):957–70. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000148632.35500.d9>
15. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology [Internet]. Vol. 61, Cardiovascular Research. 2004 [cited 2018 Mar 30]. p. 461–70. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>
16. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection [Internet]. Vol. 61, Cardiovascular Research. 2004 [cited 2018 Mar 30]. p. 372–85. Available from [Internet]. Vol. 61, Cardiovascular Research. 2004 [cited 2018 Mar 30]. p. 372–85. Available from: [https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(03)00533-9)
17. Borutaite V. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. J Mol Cell

Cardiol [Internet]. 2003 Apr [cited 2018 Mar 30];35(4):357–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282803000051>

18. Lee SH, Min KJ. Caloric restriction and its mimetics [Internet]. Vol. 46, BMB Reports. 2013 [cited 2018 Mar 30]. p. 181–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.4.033>
19. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Caloric restriction in humans: Potential pitfalls and health concerns [Internet]. Vol. 127, Mechanisms of Ageing and Development. 2006 [cited 2018 Mar 30]. p. 1–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637405002186>
20. Meyer TE, Kovács SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. J Am Coll Cardiol [Internet]. 2006 [cited 2018 Mar 30];47(2):398–402. Available from: [https://ac.els-cdn.com/S0735109705025775/1-s2.0-S0735109705025775-main.pdf?\\_tid=7b46ce27-857e-443b-86dd-4c3993bdd60d&acdnat=1522435271\\_79902599e772ee76bea3e0d6172f6309](https://ac.els-cdn.com/S0735109705025775/1-s2.0-S0735109705025775-main.pdf?_tid=7b46ce27-857e-443b-86dd-4c3993bdd60d&acdnat=1522435271_79902599e772ee76bea3e0d6172f6309)
21. Kemi M, Keenan KP, McCoy C, Hoe CM, Soper KA, Ballam GC, et al. The Relative Protective Effects of Moderate Dietary Restriction versus Dietary Modification on Spontaneous Cardiomyopathy in Male Sprague-Dawley Rats. Toxicol Pathol [Internet]. 2000 [cited 2018 Mar 30];28(2):285–96. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/019262330002800208>
22. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 [cited 2018 Mar 30];101(17):6659–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC404101/pdf/1016659.pdf>
23. Yamamoto T, Tamaki K, Shirakawa K, Ito K, Yan X, Katsumata Y, et al. Cardiac Sirt1 Mediates the Cardioprotective Effect of Caloric Restriction by Suppressing Local Complement System Activation after Ischemia/Reperfusion. Am J Physiol - Hear Circ Physiol [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2018 Mar 30];310(8):ajpheart.00676.2015. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00676.2015>
24. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart [Internet]. Vol. 1366, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 1998 [cited 2018 Apr 1]. p. 79–94. Available from: [https://ac.els-cdn.com/S0005272898001224/1-s2.0-S0005272898001224-main.pdf?\\_tid=63a927a8-9eb5-4490-bc1a-14972156b0c8&acdnat=1522627677\\_caf6e153e088cb052dd2515e0f4cd4ad](https://ac.els-cdn.com/S0005272898001224/1-s2.0-S0005272898001224-main.pdf?_tid=63a927a8-9eb5-4490-bc1a-14972156b0c8&acdnat=1522627677_caf6e153e088cb052dd2515e0f4cd4ad)
25. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis [Internet]. Vol. 12, Apoptosis. 2007 [cited 2018 Apr 1]. p. 815–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220352/pdf/10393078.pdf>

26. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - A target for cardioprotection [Internet]. Vol. 61, Cardiovascular Research. 2004 [cited 2018 Apr 1]. p. 372–85. Available from: [https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(03)00533-9)
27. Carreira RS, Lee P, Gottlieb RA. Mitochondrial therapeutics for cardioprotection. Curr Pharm Des [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 1];17(20):2017–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765248/pdf/nihms-469271.pdf>
28. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease [Internet]. Vol. 93, Circulation Research. 2003 [cited 2018 Apr 1]. p. 292–301. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000087542.26971.D4>
29. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: A new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. J Exp Med [Internet]. 2000 [cited 2018 Apr 1];192(7):1001–14. Available from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/7/1001>
30. Brady NR, Hamacher-Brady A, Westerhoff H V., Gottlieb RA. A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2006 Sep [cited 2018 Apr 1];8(9–10):1651–65. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2006.8.1651>
31. Mancuso DJ, Abendschein DR, Jenkins CM, Han X, Saffitz JE, Schuessler RB, et al. Cardiac ischemia activates calcium-independent phospholipase A2??, precipitating ventricular tachyarrhythmias in transgenic mice: Rescue of the lethal electrophysiologic phenotype by mechanism-based inhibition. J Biol Chem [Internet]. 2003 [cited 2018 Apr 1];278(25):22231–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/278/25/22231.full.pdf>
32. Grivennikova VG, Kareyeva A V, Vinogradov AD. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? Biochim Biophys ... [Internet]. 2010 [cited 2018 Apr 1];1797(495):939–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891298/pdf/nihms181337.pdf>
33. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart [Internet]. Vol. 1366, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 1998 [cited 2018 Apr 1]. p. 79–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272898001224>
34. Mair W, Dillin A. Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. Annu Rev Biochem [Internet]. 2008 Jun [cited 2018 Apr 1];77(1):727–54. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.77.061206.171059>

35. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* [Internet]. 1935 [cited 2018 Apr 1];5(3):63–79. DOI: Available from: <http://www.wealthandhealth.ltd.uk/over100/C. M. McCAY 1935.pdf>
36. Noyan H, El-Mounayri O, Isserlin R, Arab S, Momen A, Cheng HS, et al. Cardioprotective signature of short-term caloric restriction. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 1];10(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476723/pdf/pone.0130658.pdf>
37. Sohal RS, Ku H-H, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 1994 May [cited 2018 Apr 1];74(1–2):121–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004763749490104X>
38. Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 1994 Oct [cited 2018 Apr 1];76(2–3):215–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0047637494915954>
39. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Retarding Effect of Dietary Restriction on the Accumulation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Organs of Fischer 344 Rats During Aging. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1997 Jan [cited 2018 Apr 1];23(1):76–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584996006223>
40. Gredilla R. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* [Internet]. 2001 [cited 2018 Apr 1]; Available from: <http://www.fasebj.org/doi/pdf/10.1096/fj.00-0764fje>
41. Lambert AJ, Merry BJ. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004 Jan [cited 2018 Apr 1];286(1):R71–9. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00341.2003>
42. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* (80- ) [Internet]. 1996 [cited 2018 Apr 1];273(5271):59–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2987625/pdf/nihms-249190.pdf>
43. Diniz YSA, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli EL. Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids: Metabolic Shifting and Cardiac Health. *Nutrition* [Internet]. 2004 Feb [cited 2018 Apr 1];20(2):230–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900703002600>
44. Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP, Ferraro M, D'Andrea E, Mainieri D, et al. Altered skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial compartment during catch-up fat after caloric restriction. *Diabetes* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2018 Apr 1];55(8):2286–93. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db06-0312>

45. Seymour EM, Parikh R V., Singer AAM, Bolling SF. Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2018 Apr 1];41(4):661–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282806007279>
46. Chandrasekar B, Nelson JF, Colston JT, Freeman GL. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* [Internet]. 2001 [cited 2018 Apr 1];280(5):H2094–102. Available from: <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2094>
47. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, Bernabei R, Carter CS, Leeuwenburgh C. Cellular Mechanisms of Cardioprotection by Calorie Restriction: State of the Science and Future Perspectives [Internet]. Vol. 25, *Clinics in Geriatric Medicine*. 2009 [cited 2018 Apr 1]. p. 715–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786899/pdf/nihms-134524.pdf>
48. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena J, Gredilla R, Barja G. 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* [Internet]. 2002 Sep [cited 2018 Apr 1];123(11):1437–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637402000763>
49. Colom B, Oliver J, Roca P, Garcia-Palmer FJ. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage. 2007 [cited 2018 Apr 1]; Available from: [http://www.uib.es/digitalAssets/126/126341\\_1\\_article.pdf](http://www.uib.es/digitalAssets/126/126341_1_article.pdf)
50. Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Brookes PS, Nehrke K. Ischemic preconditioning: The role of mitochondria and aging [Internet]. Vol. 47, *Experimental Gerontology*. 2012 [cited 2018 Apr 1]. p. 1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245324/pdf/nihms337747.pdf>
51. Broderick TL, Driedzic WR, Gillis M, Jacob J, Belke TW. Effects of chronic food restriction and exercise training on the recovery of cardiac function following ischemia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2018 Apr 1];56(1):B33–7. Available from: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article-lookup/doi/10.1093/gerona/56.1.B33>
52. SHINMURA K, TAMAKI K, BOLLI R. Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K channels in both young and aged hearts. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2018 Apr 1];39(2):285–96. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282805000994>
53. Shinmura K, Tamaki K, Saito K, Nakano Y, Tobe T, Bolli R. Cardioprotective Effects of Short-Term Caloric Restriction Are Mediated by Adiponectin via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Circulation* [Internet]. 2007 Nov 26 [cited 2018 Apr 1];116(24):2809–17. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.725697>

54. Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1. *AJP Hear Circ Physiol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2018 Apr 1];295(6):H2348–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931029>
55. Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 [cited 2018 Apr 2];105(9):3374–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265142/pdf/zpq3374.pdf>
56. Lopez-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006 [cited 2018 Apr 2];103(6):1768–73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413655/pdf/pnas-0510452103.pdf>
57. Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction [Internet]. Vol. 20, *Genes and Development*. 2006 [cited 2018 Apr 2]. p. 2913–21. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1467506>
58. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. Barzilai N, editor. *PLoS Med* [Internet]. 2007 Mar 6 [cited 2018 Apr 2];4(3):485–94. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0040076>
59. Cerqueira FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, Akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 2];6(3). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0018433&type=printable>
60. Ritchie SA, Kohlhaas CF, Boyd AR, Yalla KC, Walsh K, Connell JMC, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine-615 contributes to nitric oxide synthesis. *Biochem J* [Internet]. 2010 Feb 15 [cited 2018 Apr 2];426(1):85–90. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20091580>
61. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2007 Jul 7 [cited 2018 Apr 2];22(10):2831–7. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfm269>
62. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Cell biology: Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* (80- ) [Internet]. 2005 Oct 14 [cited 2018 Apr 2];310(5746):314–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1117728>
63. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 [cited

2018 Apr 2];278(45):45021–6. Available from:  
<http://www.jbc.org/content/278/45/45021.full.pdf>

64. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science* (80- ) [Internet]. 2003 Feb 7 [cited 2018 Apr 2];299(5608):896–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1079368>
65. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 [cited 2018 Apr 2];101(47):16507–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534517/pdf/pnas-0405432101.pdf>
66. Zhou X, Bohlen HG, Unthank JL, Miller SJ. Abnormal nitric oxide production in aged rat mesenteric arteries is mediated by NAD(P)H oxidase-derived peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2018 Apr 2];297(6):H2227–33. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00325.2009>
67. Hu Z, Chen J, Wei Q, Xia Y. Bidirectional actions of hydrogen peroxide on endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function: Co-commitment and interplay of Akt and AMPK. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 [cited 2018 Apr 2];283(37):25256–63. Available from: <http://www.jbc.org/content/283/37/25256.full.pdf>
68. Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 14):2855–62.
69. Hsu C-P, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, et al. Sirt1 Protects the Heart from Ischemia Reperfusion. *Circulation* [Internet]. 2010 [cited 2018 Apr 2];122(21):2170–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003297/pdf/nihms-252890.pdf>
70. Rohrbach S, Aslam M, Niemann B, Schulz R. Impact of caloric restriction on myocardial ischaemia/reperfusion injury and new therapeutic options to mimic its effects [Internet]. Vol. 171, *British Journal of Pharmacology*. 2014 [cited 2018 Apr 2]. p. 2964–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055200/pdf/bph0171-2964.pdf>
71. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001;302(2–3):141–5.
72. Pezolato, Vítor Alexandre, et al. "Perfil eletrocardiográfico de ratos com escoliose induzida por coleto de PVC." *Saúde em Revista* 17.45: 19-28.