# **GABRIEL DE GABRIEL TAFFARELLO DORIGHELLO**

# EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO 2,4 DINITROFENOL SOBRE O METABOLISMO E DESENVOLVIMENTO DA ATEROCLEROSE EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

CAMPINAS

2013

SECRETARIA DE FÓ9-GRADUAÇÃO I. B.

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

## GABRIEL DE GABRIEL TAFFARELLO DORIGHELLO

## EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO 2,4 DINITROFENOL SOBRE O METABOLISMO E DESENVOLVIMENTO DA ATEROCLEROSE EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Este	exemplar corresponde à redação fina
de te	ese defendida pelo(a) candidato (a
Jal	nel de gebra Taffarello Dorighello
04	Delen Colucin
e apr	ovada pela Comissão Julgadora.
any the roll home	

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

## CAMPINAS

2013

i

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Dorighello, Gabriel Gabriel, 1982-

D733e Efeitos da restrição calórica e do 2,4 dinitrofenol sobre o metabolismo e desenvolvimento da aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos / Gabriel de Gabriel Taffarello Dorighello. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

 Hipercolesterolemia. 2. Aterosclerose. 3. Restrição calórica. 4. Diabetes.
Oliveira, Helena Coutinho Franco de, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

### Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of caloric restriction and 2,4 dinitrophenol on metabolism and atherosclerosis development in hypercholesterolemic mice Palavras-chave em inglês: Hypercholesterolemia Atherosclerosis Caloric restriction Diabetes Área de concentração: Biologia Funcional e Molecular Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Helena Coutinho Franco de Oliveira [Orientador] Ana Paula Couto Davel Roger Frigério Castilho Maria Esméria Corezola do Amaral Eder Carlos Rocha Quintão Data de defesa: 29-05-2013 Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas 29 de Maio de 2013

### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (Orientadora)

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Roger Frigerio Castilho

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel

Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral

Prof. Dr. Eder Carlos Rocha Quintão

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Profa. Dra. Marisa Passarelli

Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

nary

Assinatura

Assinatura

C Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Metabolismo de Lipídeos**, Área de Fisiologia e Biofísica, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (**Fapesp**, processo 2006/59786-0 e 2011/50400-0), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processos 140875/2009-3, 201348/2011-0, 304532/2010-0), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT – Obesidade e Diabetes (CNPq e Fapesp), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) – Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular da UNICAMP.

#### AGRADECIMENTOS

À minha esposa Carolina pelo amor e companheirismo, além de me ajudar inúmeras vezes corrigindo erros de português e inglês em resumos/artigos/relatórios/projetos. Obrigado meu amor.

A minha família Dorighello e minha nova família Taffarello pelo apoio incondicional

A minha orientadora professora Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira por todos os ensinamentos científicos e pelo exemplo profissional a ser seguido. Aos professores Drs. Antonio Carlos Boschero e Everardo Magalhães Carneiro pelos aprendizados adquiridos com a convivência semanal.

A Juliana C. Rovani e ao Chistopher Luhman pela colaboração fundamental no desenvolvimento da tese.

Aos meus amigos do laboratório 15: Helena Raposo, Patrícia, Mariana, Larissa, Adriene, ``Balboa``, Juliana e Christopher pelo companheirismo diário e pelo espírito de equipe sempre presente. Aos meus colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica e principalmente do laboratório 14 pela convivência sempre muito amigável.

Ao professor Dr Aníbal Vercesi e seu (ex) aluno Bruno Paim pela realização das análises bioenergéticas mitocondriais.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelos cuidados com os animais e pela atenção e auxilio dispensados sempre que necessário.

À FAPESP, CNPq e Capes, pelo financiamento deste trabalho.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	11	
RESUMO		
ABSTRACT		
INTRODUÇÃO		
Lipoproteínas plasmáticas	17	
Aterosclerose	19	
Geração mitocondrial de oxigênio reativo	25	
Fontes extra-mitocondriais de oxigênio reativo	27	
Disfunções mitocondriais em dislipidemias	28	
Síndrome metabólica e aterosclerose	29	
Restrição calórica e possíveis "miméticos"	32	
Modelo experimental de aterosclerose	37	
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS		
MATERIAIS E MÉTODOS	40	
RESULTADOS	49	
Estudo da Restrição Calórica	49	
Estudo do tratamento com 2,4 dinitrofenol	56	
DISCUSSÃO	60	
Estudo da Restrição Calórica	60	
Estudo do tratamento com 2,4 dinitrofenol	65	
CONCLUSÕES		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
TABELAS	79
FIGURAS	87
ANEXOS	98
Autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal e da	98
Comissão Interna de Biossegurança	

## **INDICE DE TABELAS E FIGURAS**

**Tabela 1:** Parâmetros de crescimento corporal e de consumo alimentar de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC)

**Tabela 2:** Lipídeos e lipoproteínas plasmáticos de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Tabela 3:** Composição corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Tabela 4** Homeostase glicêmica de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Tabela 5:** Marcadores do estado redox em plasma e fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Tabela 6** Marcadores inflamatórios sistêmicos em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC)

**Tabela 7:** Parâmetros de crescimento corporal e de consumo alimentar de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Tabela 8:** Lipídeos e lipoproteínas plasmáticos de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Tabela 9:** Composição corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Tabela 10:** Homeostase glicêmica de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Tabela 11:** Marcadores do estado redox em plasma e fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Tabela 12:** Marcadores inflamatórios sistêmicos em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 1:** Curva de crescimento e ganho de peso corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 2:** Produção de  $CO_2$  *in vivo* de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 3:** Perfil de lipoproteínas plasmáticas de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 4:** Concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 5:** Teste oral de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva total do GTT de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 6:** Teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva total do ITT de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 7:** Curva representativa da suscetibilidade de oxidação da VLDL induzida por CuSO4 em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 8:** Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 9:** Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 10:** Fotomicrografias representativas da raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

**Figura 11:** Curva de crescimento e ganho de peso corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 12:** Produção de  $CO_2$  *in vivo* de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 13:** Perfil de lipoproteínas plasmáticas de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 14:** Concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 15:** Teste oral de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva total do GTT de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 16:** Teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva total do ITT de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 17:** Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 18:** Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

**Figura 19:** Fotomicrografias representativas da raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

# LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	Transportadores Cassete de ligação a ATP A1
AGL	Ácidos graxos livres
АМРК	Proteína quinase ativada por AMP
ANT	Adenina nucleotídeo translocase
BAR	Receptor nuclear de ácidos biliares
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
COL	Colesterol
DCF	Diclorofluoresceína
DNP	2,4-dinitrofenol
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FOXO1	Proteína Forkhead box Ol
FPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
GTT	Teste de tolerância à glicose
H <sub>2</sub> -DCFDA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HMG-CoA reductase	3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-CoA redutase
HOMA	Modelo de avaliação homeostática
IDH2	Isocitrato desidrogenase
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFNγ	Interferon-gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
INSIG	Insulin-induced gene protein
ITT	Teste de tolerância à insulina
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LP	Lipoproteínas plasmáticas
LPL	Lipoproteína-lipase
LXR	Receptor X do fígado
mitoK <sub>ATP</sub>	Canal de potássio mitocondrial sensível ao ATP
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês

MPO	Mieloperoxidase
NOS	Oxido nítrico sintase
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
QM	Quilomícrons
RBP4	Proteína ligadora de retinol 4
RC	Restrição calórica
SCAP	Proteína de ativação da clivagem do SREBP
SIRT	Sirtuína
SREBP	Proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol
TG	Triglicérides
TNF-α	Fator de necrose tumoral $\alpha$
UCP	Proteínas desacopladoras
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

#### **RESUMO**

As doenças cardiovasculares permanecem como a maior causa de mortalidade no mundo ocidental. A aterosclerose é o principal responsável pela patogênese dessas doenças. Distúrbios metabólicos como as dislipidemias, hipertensão arterial, resistência à insulina e obesidade são considerados fatores de risco aterogênico. Atualmente, intervenções dietéticas e farmacológicas são utilizadas na tentativa de prevenir ou reduzir a incidência desses distúrbios. Uma dessas intervenções é o uso de regimes de restrição calórica, que está relacionada com o aumento da longevidade e a diminuição da incidência de doenças crônicas ligadas ao envelhecimento. Drogas que mimetizam alguns efeitos metabólicos da restrição calórica também estão sendo estudadas como, por exemplo, o 2,4-dinitrofenol (DNP), que promove o desacoplamento mitocondrial. Em nosso laboratório, demonstramos que os camundongos hipercolesterolêmicos, deficientes do receptor de LDL (R0), apresentam alterações importantes no metabolismo e no estado redox. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da restrição calórica e do tratamento com DNP sobre o metabolismo e a aterosclerose em camundongos R0. Os camundongos R0 foram separados em 3 grupos: R0 controles com alimentação ad libitum, R0 com restrição calórica (R0-RC) alimentados em dias alternados e R0 tratados com 1 mg/L de 2,4 dinitrofenol na água de beber (R0-DNP). A restrição calórica apesar de diminuir o consumo alimentar, gerou diversos efeitos metabólicos não esperados como o aumento na concentração do colesterol total e das frações VLDL e LDL plasmáticas, dos depósitos adiposos viscerais e subcutâneos, assim como, tornou os camundongos hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos, intolerantes à glicose e resistentes à insulina. Além disso, os camundongos R0 sob restrição calórica apresentaram aumento de marcadores inflamatórios plasmáticos como o TNFa e a proteína C-reativa. Apesar da diminuição observada em alguns parâmetros no estado redox sistêmico e tecidual, os camundongos R0 restritos caloricamente apresentaram um aumento de quase 3 vezes na área de lesão aterosclerótica, o qual pôde ser explicado devido à piora dos diversos fatores de risco aterosclerótico. Por outro lado, o tratamento com DNP, causou uma diminuição na concentração dos ácidos graxos plasmáticos, sem alterar os níveis plasmáticos de outros lipídeos, a homeostase glicêmica, a massa dos depósitos adiposos e marcadores inflamatórios. No entanto, o desacoplamento mitocondrial brando, os promovido pelo DNP, gerou efeitos significativos sobre o estado redox tecidual, tais como a diminuição na geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e no conteúdo de proteínas carboniladas hepáticas. O desenvolvimento espontâneo da aterosclerose foi significativamente diminuído nos camundongos R0 tratados com DNP, independentemente de outros fatores de risco já bem estabelecidos, como o colesterol e marcadores inflamatórios plasmáticos. Deste modo, o regime de restrição calórica, que é amplamente correlacionado com a longevidade e a menor incidência de doenças crônicas relacionadas com o envelhecimento, não é indicado para condição de hipercolesterolemia causada por deficiência do receptor de LDL. Em contrapartida, o tratamento com DNP, possivelmente via desacoplamento mitocondrial brando, promoveu a redução do desenvolvimento da aterosclerose, independentemente, de outros fatores de risco, demonstrando com isso, a relevância da fonte mitocondrial de oxigênio reativo no processo da aterogênese.

#### ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of death in the occidental world. Atherosclerosis is the main process responsible for the pathogenesis of these diseases. Metabolic disturbances such as dyslipidemias, hypertension, insulin resistance and obesity are well established atherosclerosis risk factors. Currently, different pharmacological and dietetic interventions have been used to reduce and avoid CVD. Caloric restriction is one of these strategies, which is associated with increases in life span and reductions of age related chronic diseases. The mitochondrial uncoupler 2,4 dinitrophenol (DNP) has been considered as a caloric restriction mimetic tool. We have demonstrated that a mouse model of human familial hypercholesterolemia exhibits metabolic and redox disturbances highly relevant for metabolic syndrome and atherosclerosis. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of caloric restriction and mild mitochondrial uncoupling induced by DNP on the metabolism and atherosclerosis development in hypercholesterolemic LDL receptor deficient mice (R0). Thus, R0 mice were compared after 3 months in three conditions: R0 fed ad libitum (control), R0 under caloric restriction (R0-RC) obtained by providing food in alternate days, and R0-DNP fed *ad libitum* and treated with DNP 1 mg/L in the drinking water. The caloric restriction regimen, despite reducing food intake, induced unexpected adverse metabolic effects, namely, increased plasma total-, VLDL- and LDLcholesterol, and increased visceral and subcutaneous adipose tissue masses. In addition, R0-RC mice became hyperglycemic, hyperinsulinemic, glucose intolerant and insulin resistant. Moreover, R0-RC mice presented elevated plasma levels of the inflammatory markers TNF $\alpha$  and C-reactive protein. Some benefits regarding systemic and tissue redox state were observed in R0-RC, however, atherosclerosis lesion areas were increased about 3 fold in R0-RC mice. DNP treatment had minimal effects on the lipid and glucose metabolism of

R0-DNP mice. It decreased plasma free fatty acids, but did not change other plasma lipids, inflammatory markers, glucose homeostasis, and the size of adipose depots. On the other hand, marked effects of DNP treatment on the tissue redox state were observed, namely, reduction in the generation of mitochondrial oxidative reactive species and in the liver content of carbonyl protein. The spontaneous atherosclerosis development was significantly reduced in the R0-DNP mice, independently other well established risk factors such as plasma cholesterol and inflammatory mediators. Therefore, the caloric restriction regimen is not indicated for the condition of familial hypercholesterolemia due to LDL receptor deficiency. On the other hand, DNP treatment, possibly via mild mitochondrial uncoupling, evidences the relevance of mitochondrial source of reactive oxygen for the atherosclerosis development independently of other risk factors.

### INTRODUÇÃO

#### Lipoproteínas plasmáticas

O colesterol (COL) e os ésteres de colesterol, assim como os triglicérides (TG) e os fosfolípides (PL) provenientes da dieta ou sintetizados pelos tecidos são transportados na circulação sanguínea complexados com proteínas, formando as lipoproteínas, sendo distribuídos para os diferentes tecidos por processos mediados por receptores ou transportadores. Há cinco classes principais de lipoproteínas plasmáticas (LP) transportadoras de lipídeos, classificadas de acordo com a sua densidade: as LP de densidade alta, baixa, intermediária e muito baixa, respectivamente, HDL, LDL, IDL, VLDL e os quilomícrons (QM). As várias LP diferem entre si em termos de densidade, tamanho e migração eletroforética, já que apresentam composição lipídica e proteica distintas. QM e VLDL são as chamadas LP ricas em triglicérides, de origem intestinal (lipídeos da dieta) e hepática, respectivamente. Essas LP são metabolizadas no compartimento vascular pela lipoproteína-lipase (LPL) que hidrolisa seus TG gerando partículas remanescentes de quilomícrons e de VLDL enriquecidas em colesterol. As IDL são os produtos intermediários e as LDL os produtos finais do catabolismo intravascular das VLDL. A LDL é a LP que transporta a maior parte do colesterol (cerca de 70%) do plasma dos seres humanos. As IDL e LDL são removidas da circulação sanguínea via receptores de LDL, amplamente expressos em tecidos em proliferação e tecidos esteroidogênicos, como gônadas e adrenal, mas principalmente no fígado (Brown e Goldstein, 1986). Os remanescentes de QM e as IDL são também rapidamente captados por outros receptores hepáticos chamados LRP (LDL receptor related protein) (Herz et al., 1988).

Uma vez dentro da célula, o colesterol derivado das LP exerce várias ações regulatórias, incluindo a supressão da expressão da enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol, a HMG-CoA reductase, e a supressão da transcrição do gene do receptor da LDL. Desta forma, as células tornam-se protegidas de um aumento excessivo da concentração de colesterol. Por outro lado, na deprivação de colesterol, as células aumentam a expressão da HMG-CoA reductase estimulando a síntese *de novo* de colesterol e aumentam também a expressão dos receptores de LDL, promovendo captação do colesterol exógeno.

Os mecanismos moleculares envolvidos nesta fina regulação da concentração intracelular de colesterol foram elucidados devido aos trabalhos pioneiros dos agraciados com o Prêmio Nobel de 1985, Michael Brown e Joseph Goldstein (Brown e Goldstein, 1997). Quando as concentrações intracelulares de colesterol estão altas, uma proteína de membrana do retículo endoplasmático, denominada SREBP (proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol), encontra-se inativa e ligada à outra proteína chamada SCAP (proteína de ativação da clivagem do SREBP), a qual atua como um sensor da quantidade de colesterol nas membranas. Quando a concentração de colesterol nas membranas diminui, ocorre uma mudanca conformacional na proteína SCAP, que permite que o complexo SCAP-SREBP se desligue da proteína INSIG (insulin-induced gene) e se associe às vesículas contendo COPII, as quais migram para o complexo de Golgi. No complexo de Golgi, a SREBP é clivada, sequencialmente, por duas diferentes proteases. A primeira clivagem é catalizada por uma serina-protease (S1P) ligada à membrana, que cliva a SREBP no lado luminal. Em seguida, uma metaloprotease também ligada à membrana (S2P) cliva o primeiro domínio transmembrana da SREBP, próximo a interface com o citoplasma, liberando a porção amino-terminal da SREBP, a qual pertence à família de fatores de transcrição bHLH (*basic helix-loop-helix*). Esse domínio constitui a SREBP ativa, que transloca-se para o núcleo e estimula a transcrição dos genes do receptor da LDL, da HMG-CoA reductase e outros genes responsivos ao colesterol (Gimpl et al., 2002).

A concentração de LDL no plasma varia em função do número de receptores de LDL nos tecidos, principalmente no fígado. Esses podem estar diminuídos por defeito genético ou por excesso de colesterol na dieta, que aumenta o aporte de lipoproteínas de origem intestinal (QM e remanescente) para o fígado, as quais além de competirem com as LDL pelos receptores de LDL resultam em aumento da concentração de colesterol nas membranas hepáticas, o que leva a *downregulation* da expressão destes receptores. Anormalidades no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, principalmente elevação da concentração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), são fatores de risco primários para aterosclerose (Assmann, 2001; Gordon e Rifkind, 1989).

### Aterosclerose

As doenças cardiovasculares permanecem como a maior causa de mortalidade no mundo, estando relacionada com um terço de todas as mortes (Lonn et al., 2012). A principal responsável pela patogênese do infarto do miocárdico e cerebral e outras doenças vasculares periféricas, é a aterosclerose. Dislipidemias, hipertensão arterial, resistência à insulina, obesidade e fatores ambientais, como a inatividade física, o tabagismo e dietas ricas em gordura têm sido identificados em estudos epidemiológicos como fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Concentração elevada de colesterol plasmático é condição suficiente para causar aterosclerose em humanos e animais experimentais, mesmo na ausência de outros fatores de risco conhecidos (Glass e Witztum, 2001). A aterosclerose é caracterizada pelo enrijecimento de artérias de diâmetros médios e largos, causado por placas de ateroma, constituídas de acúmulo de colesterol, detritos celulares e cálcio na parede das artérias (Lonn et al., 2012). A progressão da formação da placa na parede arterial gera o estreitamento do vaso, podendo comprometer o fluxo sanguíneo. Pressões exercidas pelo fluxo sanguíneo dificultado podem causar o rompimento do endotélio arterial, expondo os componentes da placa aterosclerótica, causando formação de trombo e interrupção do fluxo sanguíneo e do fornecimento de oxigênio em partes de órgãos como coração e cérebro. A isquemia gerada pelo trombo pode causar disfunções nos tecidos cardíaco e cerebral, as quais são denominadas infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, respectivamente (Stocker e Keaney, 2004).

Vários processos estão implicados nos eventos iniciais que desencadeiam o desenvolvimento da aterosclerose, tais como: injúria, disfunção ou ativação endotelial; eventos associados à pressão de cisalhamento do fluxo sanguíneo (*shear stress*); infiltração, retenção e modificações químicas das lipoproteínas aterogênicas, especialmente oxidação; quimiotaxia de monócitos e macrófagos e formação de células espumosas (*foam cells*). A questão sobre qual destes processos pode ser considerado como o principal evento na aterogênese vêm sendo debatida desde a década de 70 em várias hipóteses. A primeira hipótese descrita foi a da resposta à injúria endotelial (Ross e Glomset, 1973), que permite a entrada passiva e acúmulo de LDL no espaço sub-endotelial. No entanto, Carew et al demonstraram que artérias normais, sem injúrias, continham acúmulo de LDL no espaço sub-endotelial (Carew et al., 1984). Outra hipótese aponta a retenção de lipoproteínas aterogênicas no espaço subendotelial, via interação da apoB com os proteoglicanos da matriz extracelular, como o evento central (Williams e Tabas, 1995). A teoria mais aceita

atualmente baseia-se na hipótese da modificação oxidativa da LDL, que descreveremos mais detalhadamente a seguir (Chisolm e Steinberg, 2000).

Concentrações elevadas de LDL plasmática resultam em aumento de infiltração de LDL no espaco subendotelial e maior retenção desta lipoproteína neste microambiente (Madamanchi et al., 2005). Neste compartimento, as LDL são susceptíveis às diversas alterações químicas, tais como clivagem enzimática e, principalmente, a oxidação. As LDLs podem sofrer oxidação tanto de seus componentes lipídicos como proteicos, através da ação de espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas pelas células da parede arterial (Ting et al., 1997); com isso, apresentando diversos graus de oxidação, se diferenciando estruturalmente e funcionalmente, das LDL nativas (Frei, 1999; Steinberg e Witztum, 2002). Uma vez modificada quimicamente, a LDL estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, facilitando a adesão e transmigração de células linfomonocitárias circulantes para o espaço subendotelial (Nedeljkovic et al., 2003). Os monócitos proliferam-se e diferenciam-se em macrófagos, que captam as LDL modificadas, via receptores scavenger. Diferentemente dos receptores de LDL, os receptores scavenger não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol e os macrófagos captam as LDL modificadas de maneira contínua, transformando-se em células espumosas (Brown e Goldstein, 1983; Stocker e Keaney, 2004).

As principais propriedades aterogênicas das LDL oxidadas podem ser assim resumidas: 1- estímulo ao recrutamento de monócitos circulantes para camada íntima da artéria, 2- inibição da habilidade dos macrófagos residentes de deixarem o espaço subendotelial, 3- aumento da taxa de captação de lipoproteínas modificadas pelos macrófagos, que levam a formação de células espumosas, 4- citotoxicidade e indução de

21

disfunção endotelial (Stocker e Keaney, 2004). A hipótese da modificação oxidativa pode ser visualizada na figura abaixo.



**Hipótese da modificação oxidativa:** A LDL aprisionada no espaço sub-endotelial estará sujeita a modicações oxidativas por células vasculares residentes como as células do musculo liso, células endoteliais e os macrófagos. A LDL oxidada estimula a quimioatração de monócitos (A), previne a saída dos monócitos (B) e promove a formação de células espumosas (C). A LDL oxidada também resulta em injúria e disfunção endotelial (D) e as células espumosas se tornam necróticas, devido o acúmulo de LDL oxidada (E). (Traduzido de Stocker, R. e Keaney, J.F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev *84*, 1381-1478.)

Com a evolução do processo, as células espumosas morrem, tanto por necrose, como por apoptose e vão constituir o núcleo necrótico da lesão aterosclerótica avançada. Células musculares lisas também migram da camada adventícia para íntima, proliferam-se e, eventualmente, transformam-se em células espumosas. Além disso, as células musculares lisas sintetizam proteínas da matriz-extracelular, as quais serão responsáveis pela formação da capa fibrosa da lesão (Paulsson et al., 2000; Ross, 1999), fato que caracteriza a evolução da lesão para estágios avançados. Citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos ativados no espaço subendotelial induzem a produção de proteinases pelas células da parede do vaso, como as metaloproteases e colagenases intersticiais, as quais degradam as macromoléculas constituintes da capa fibrosa, desestabilizando a sua estrutura (Dollery e Libby, 2006). Além disso, Amento et al. demonstraram que a citocina inflamatória IFNγ pode limitar fortemente a habilidade das células musculares lisas em sintetizar colágeno para o reparo e manutenção da capa fibrosa (Amento et al., 1991). Deste modo, o enfraquecimento da capa fibrosa nas lesões avançadas aumenta a suscetibilidade a rupturas e consequentes eventos trombóticos.

Vários autores criticam a hipótese da modificação oxidativa da LDL (Libby e Ridker, 2006; Lonn *et al.*, 2012; Stocker e Keaney, 2004) baseados nos insucessos observados em testes clínicos utilizando antioxidantes em humanos. Stocker e Keaney propuseram uma teoria alternativa denominada hipótese da resposta oxidativa à inflamação, na qual o estresse oxidativo é secundário à inflamação (Stocker e Keaney, 2004). Ao analisar dados referentes ao estudo epidemiológico de *Framingham* (Keaney et al., 2003), Stocker e Keaney verificaram que a peroxidação lipídica estava relacionada com alguns fatores de risco cardiovascular, mas não com todos. De outro modo, a inflamação estava relacionada com todos os fatores de risco da aterosclerose (Libby e Ridker, 2004). Desta maneira, esses autores consideram que os eventos oxidativos são consequência e não causa do processo aterogênico. Contudo, Steinberg reafirma a importância do estresse oxidativo nos estágios iniciais do processo aterosclerótico (Steinberg, 2009), uma vez que as espécies reativas de oxigênio (EROS) são importantes na atividade vaso-motora, proliferação do músculo liso, expressão de moléculas de adesão, apoptose, ativação de metaloproteases, peroxidação lipídica, sendo que todos esses eventos podem estar associados à oxidação da LDL, ou podem ocorrer de forma independente. Além disso, os testes clínicos com antioxidantes que não apresentaram benefícios utilizaram em sua maioria populações gerais tratadas com baixas doses de antioxidantes, sendo que os tratamentos foram iniciados em uma fase tardia da vida. Por outro lado, tratamentos em subgrupos específicos de pacientes com estresse oxidativo, como por exemplo, no estudo SPACE realizado em pacientes em fase final de doença renal, o tratamento com vitamina E reduziu em 70% a frequência de infarto do miocárdio (Boaz et al., 2000). Para testes clínicos futuros em populações gerais, Steinberg sugere que devem ser considerados antioxidantes que possuam ação efetiva contra oxidantes de 2 elétrons desemparelhados, uma vez que, a maioria dos estudos foram utilizados antioxidantes com ação contra oxidantes de 1 elétron desemparelhado. Além disso, também devem ser testados diferentes doses e tempos de tratamentos, incluindo tratamentos em pacientes mais jovens.

Outras evidências em favor da hipótese oxidativa da aterogênese advêm de estudos que dissecam vias de sinalização inflamatórias em macrófagos ativados (Hulsmans et al., 2012; Kasahara et al., 2011; Naik e Dixit, 2011), nos quais foi mostrado que a geração de EROS mitocondrial precede a secreção de citocinas pró-inflamatórias, e estas por sua vez contribuem para o ciclo vicioso EROS-inflamação-EROS. Portanto, o estresse oxidativo pode ser consequência da inflamação, assim como a inflamação pode estar rigorosamente relacionada com a regulação do estado redox celular, sendo muito difícil dissociar esses dois eventos na aterogênese. Para isso, estudos adicionais precisam ser realizados no intuito de esclarecer, precisamente, como a inflamação e o estresse oxidativo estão interligados e como isso está relacionado com a iniciação e o progresso da aterosclerose (Lonn et al., 2012).

#### Geração mitocondrial de oxigênio reativo

As mitocôndrias são organelas responsáveis pelo metabolismo energético oxidativo celular. Durante a transferência de elétrons provenientes dos substratos do ciclo de Krebs, através da cadeia respiratória mitocondrial, até o aceptor final oxigênio, ocorre liberação de energia, primeiramente, conservada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons, através da membrana mitocondrial interna e, posteriormente, na forma de ATP, gerado pela ATP sintetase, que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons para fosforilação de ADP (Mitchell, 1966). Análises in vitro mostram que, em condições fisiológicas e dependendo do tipo de tecido, até 2% do O<sub>2</sub> consumido pela mitocôndria pode ser convertido no radical ânion superóxido (Boveris, 1977), durante o transporte eletrônico pela cadeia respiratória. Isso ocorre pela redução monoeletrônica do O2 pelas óxido-redutases, principalmente, do complexo respiratório I e III (Kowaltowski et al., 2009). O radical livre superóxido apresenta reatividade química moderada em solução aquosa e pode sofrer diversas reações na mitocôndria, gerando outros produtos reativos, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, aqui chamados, coletivamente, de espécies reativas de oxigênio (EROS). Como a produção do superóxido é um processo fisiológico e contínuo, a mitocôndria possui também um eficiente sistema antioxidante formado por enzimas, nucleotídeos de piridina e vitaminas, como a manganês superoxido dismutase, a catalase (coração), o sistema glutationa e tioredoxina redutase/peroxidase e o tocoferol (vitamina E) (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Em situações em que a geração de superóxido supera a capacidade antioxidante da mitocôndria, o acúmulo de EROS pode causar danos oxidativos no DNA, lipídeos e proteínas das próprias mitocôndrias e resultar em morte celular (Kowaltowski e Vercesi, 1999).

Além dos mecanismos antioxidantes mitocondriais descritos acima, têm sido demonstrado em diferentes condições e tecidos, que o aumento da velocidade do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial proporciona diminuição da geração de EROS. Assim, por exemplo, quando ocorre desacoplamento mitocondrial por mecanismos que dissipam o gradiente de prótons (não ligados a ATP sintase), ocorre aumento da velocidade da respiração para restabelecer o gradiente de prótons e consequentemente menor geração de EROS (Brookes, 2005; Kowaltowski et al., 2009; Tahara et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que o aumento nas taxas respiratórias mitocondriais in vivo, induzido por tratamento de camundongos com baixas doses do desacoplador mitoncondrial 2,4 dinitrofenol, proporcionou efeitos antioxidantes importantes como a diminuição da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do conteúdo hepático de proteínas carboniladas no cérebro e fígado. (Caldeira da Silva et al., 2008). A diminuição na geração de EROS por aumento da velocidade do transporte de elétrons ocorre por vários mecanismos: 1diminuição da tensão de oxigênio no micro-ambiente mitocondrial; 2- favorecimento de estados mais oxidados dos intermediários da cadeia respiratória; 3- manutenção de baixas concentrações de NADH, que previne a formação de EROS por flavoenzimas da matriz mitocondrial; 4- desfavorecimento da transferência reversa de elétrons do complexo II para o complexo respiratório I (Kowaltowski et al., 2009). As mitocôndrias possuem diferentes mecanismos que resultam em aumento da velocidade do transporte de elétrons que incluem a atividade de proteínas desacopladoras (UCP), de canais de potássio sensíveis à ATP (mitoKATP) e da adenina nucleotídeo translocase (ANT). Por mecanismo de feedback, as próprias EROS são capazes de ativar proteínas desacopladoras e os canais mitoK<sub>ATP</sub> promovendo um desacoplamento mitocondrial brando, o qual reduz a geração de EROS (Kowaltowski 2009). et al., Nosso grupo demonstrou que camundongos hipertrigliceridêmicos possuem aumento da produção e EROS por enzimas de compartimentos extra-mitocondriais (NADPH-oxidase e Xantina oxidase) e esse estado pró-oxidativo proporcionou ativação de canais mitocondriais de potássio, que resultou em aumento da taxa respiratória e diminuição da produção mitocondrial de EROS (Alberici et al., 2009). A relevância das EROS de origem mitocondrial para o processo de aterogênese tem sido recentemente documentada (Hulsmans et al., 2012).

#### Fontes extra-mitocondriais de oxigênio reativo

Além da geração mitocondrial de EROS, existem outras fontes de oxigênio reativo nas células da parede da aorta, incluindo as enzimas NADPH oxidase, a mieloperoxidase, a xantina oxidase, a lipooxigenase e a óxido nítrico sintetase desacoplada, as quais também são relevantes no processo aterosclerótico. Nas células da parede vascular, a NADPH oxidase pode ser ativada por estímulos como angiotensina II, trombina, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), TNF-a, IL-1, forças mecânicas e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Singh e Jialal, 2006). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que cataliza a reação que converte Cl<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no oxidante com 2 elétrons desemparelhados HOCl. A MPO pode utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivados da atividade da NADPH oxidase para produzir o HOCl, amplificando a injúria vascular (Singh e Jialal, 2006). A xantina oxidase está presente no plasma e em células endoteliais, mas não em células musculares lisas. Essa enzima gera radicais superóxido através da conversão da hipoxantina e xantina em ácido úrico (Madamanchi et al., 2005). A lipooxigenase tem sido apontada como uma fonte importante de EROS na parede vascular, além de estar ligada com a biossíntese dos leucotrienos (Droge, 2002). A ativação da lipooxigenase promove o

crescimento de células musculares lisas, hipertrofia e expressão de genes pró-inflamatórios (Singh e Jialal, 2006). A óxido nítrico sintase (NOS), em condições normais, catalisa a reação de formação de L-citrulina e óxido nítrico a partir de L-arginina, utilizando o tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como um cofator. No entanto, se a disponibilidade de co-fatores e substratos for limitada, a NOS se torna disfuncional ou desacoplada, e os elétrons do grupo heme reduzem o oxigênio ao radical superóxido (Madamanchi et al., 2005). O radical superóxido reage rapidamente com o óxido nítrico formando o peroxinitrito, que além de prejudicar a vasodilatação endotelial, é um potente agente oxidante, inclusive pode oxidar o BH4, mantendo com isso a NOS desacoplada (Singh e Jialal, 2006).

#### Disfunções mitocondriais em dislipidemias

Na última década, acumularam-se evidências do envolvimento de disfunções mitocondriais em várias doenças metabólicas e degenerativas (Lemasters e Nieminen, 2001). Recentemente, nosso grupo demonstrou que as dislipidemias primárias podem repercutir na função mitocondrial, assunto revisado por Vercesi e colaboradores (Vercesi et al., 2007; Vercesi et al., 2006). Modelos animais modificados geneticamente, que exibem hipercolesterolemia ou hipertrigliceridemia, apresentaram alterações na função mitocondrial. Nosso grupo demonstrou que camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos apresentaram uma elevada produção de EROS mitocondrial devido à diminuição na capacidade do sistema mitocondrial em consequência de depleção de NADPH (Oliveira et al., 2005). Uma possível explicação para essa redução é a alta taxa de lipogênese e esteroidogênese observada no fígado destes camundongos, uma vez que estas vias consomem uma grande quantidade NADPH celular (Oliveira et al., 2005). Como a maior fonte de NADPH celular é a enzima isocitrato desidrogenase (Jo et al., 2001), a suplementação de mitocôndrias com isocitrato *in vitro* reverteu e com citrato *in vivo* corrigiu, parcialmente, o estresse oxidativo mitocondrial hepático nos camundongos hipercolesterolêmicos (Paim et al., 2008).

Camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos, com aumento severo tanto na concentração de triglicérides como de ácidos graxos circulantes, apresentam um aumento de respiração mitocondrial de repouso devido a aumento na atividade do canal de potássio mitocondrial (mitoK<sub>ATP</sub>). Esta maior atividade do mitoKATP não afetou a velocidade de respiração de fosforilação e representa um desacoplamento mitocondrial brando, que repercutiu em aceleração do metabolismo hepático e corporal global (Alberici et al., 2006). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o mitoK<sub>ATP</sub> é ativado *in vivo* por EROS de origem extra-mitocondrial (NADPH e xantina oxidases) Os resultados sugerem que a hipertrigliceridemia causa um aumento na produção de EROS extra-mitocondrial, o que ativa os canais mitoK<sub>ATP</sub> promovendo um leve desacoplamento mitocondrial (Alberici et al., 2009). Assim, nosso grupo demonstrou pela primeira vez, em um modelo animal, o papel biológico do canal mitoK<sub>ATP</sub> como sensor do estado redox, permitindo uma comunicação entre os compartimentos extra e intra-mitocondriais (Alberici et al., 2009).

#### Síndrome metabólica e aterosclerose

A síndrome metabólica é caracteriza pela presença de um conjunto de fatores de risco inter-relacionados, de origem metabólica, os quais estão diretamente ligados com a incidência das doenças cardiovasculares (NCEPIII (2002)). Isomaa et al. descreveram que a síndrome metabólica está diretamente relacionada como o aparecimento de aterosclerose prematura e a elevação da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (Isomaa et al., 2001). Os distúrbios presentes na síndrome metabólica são: obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial, intolerância à glicose, resistência à insulina e os estados próinflamatórios e pró-trombóticos (Grundy et al., 2004). Com propósitos clínicos, o diagnóstico da síndrome metabólica é realizado em indivíduos que possuem, no mínimo, três das condições mencionadas acima (NCEPIII (2002)). Discute-se que a patogênese da síndrome metabólica pode ter três diferentes etiologias: obesidade ou disfunção no tecido adiposo; resistência à insulina ou distúrbios da homeostase glicêmica, ou a simultaneidade de fatores independentes, como, por exemplo, disfunção hepática, vascular e imunológica (Grundy et al., 2004).

A epidemia global da obesidade, observada na atualidade, é considerada a principal responsável pela alta prevalência de síndrome metabólica. A obesidade, independente de outros fatores, contribui para hipertensão arterial, hiperlipidemia, diminuição na concentração da HDL e resistência à insulina (Grundy et al., 2004), e, por isso tem sido correlacionada diretamente com a incidência das doenças cardiovasculares (Van Gaal et al., 2006). Há 18 anos atrás, após a identificação da leptina (Zhang et al., 1994), verificou-se que o tecido adiposo tem também uma função secretória importante na produção de hormônios e adipocinas. Atualmente, sabe-se que as células adiposas secretam inúmeras outras adipocinas, tais como a adiponectina, resistina, IL-6, proteína ligadora de retinol 4 (RBP4) e TNF $\alpha$  (Galic et al., 2010). Beltowski descreve os potentes efeitos aterogênicos da hiperleptinemia, tais como disfunção endotelial; estímulo à reação inflamatória; desbalanço no estado redox, agregação plaquetária; diminuição da atividade da paraoxonase e estimulo

a migração, hipertrofia e proliferação das células do músculo liso vascular (Beltowski, 2006).

Outro componente central da síndrome metabólica é a resistência à insulina. Evidências clínicas indicam que a resistência à insulina aumenta a incidência de doenças cardiovasculares, mesmo na ausência de hiperglicemia (DeFronzo, 2010). A resistência à insulina pode promover tanto a aterogênese, como a progressão de placas ateroscleróticas avançadas. Os principais fatores responsáveis para essa correlação são a presença de dislipidemia, hipertensão arterial e o estado pró-inflamatório que acompanham a resistência à insulina, assim como, os prejuízos da sinalização da insulina nas células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (Bornfeldt e Tabas, 2011). Assim, muitos estudos demonstram a importância da obesidade e resistência à insulina na indução da aterosclerose (Bornfeldt e Tabas, 2011; Olefsky e Glass, 2010; Rocha e Libby, 2009; Van Gaal *et al.*, 2006).

Mecanismos moleculares que correlacionam a obesidade e a resistência à insulina estão sendo propostos na literatura. Na obesidade, são observadas concentrações aumentadas de ácidos graxos livres no plasma, os quais estão associados com a resistência à insulina (Boden, 1997). O aumento na concentração de ácidos graxos resulta na elevação intracelular de seus metabólitos como os diacilgliceróis e as ceramidas, os quais ativam vias celulares que promovem a fosforilação dos substratos do receptor de insulina em serina, diminuindo, com isso, a função dos mesmos. A partir disso, a sinalização da insulina celular fica prejudicada, o que caracteriza a resistência à insulina (Kahn et al., 2006). Além disso, o tecido adiposo, na obesidade, sintetiza e secreta as adipocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-6, as quais ativam vias inflamatórias celulares, que também resultam no prejuízo da sinalização da insulina. Por outro lado, a adiponectina promove o aumento da sensibilidade à insulina tecidual, e esta adipocina está reduzida na obesidade (Kahn et al., 2006).

Além da relevância da obesidade e da resistência à insulina, outros distúrbios presentes na síndrome metabólica, como a hipertensão arterial, as dislipidemias, os estados pró-inflamatório e pró-trombótico, assim como, a inatividade física e alimentação desequilibrada, também contribuem para as altas incidências de doenças cardiovasculares encontradas atualmente na população humana (Grundy et al., 2004).

#### Restrição calórica (RC) e possíveis "miméticos"

A redução moderada na ingestão calórica de 20 a 40% tem sido amplamente correlacionada com aumento da longevidade e redução na incidência de doenças crônicas relacionadas com o avanço da idade. As primeiras evidências que relacionaram a restrição calórica com o aumento da expectativa de vida foram demonstradas em meados dos anos 30, quando McCay et al. observaram que roedores com ingestão alimentar controlada viveram por um período maior que animais que se alimentavam *ad libitum* (ingestão livre) (McCay et al., 1935). Efeitos similares foram posteriormente demonstrados em vermes, fungos, ratos e peixes (Barrows e Kokkonen, 1982; Lin *et al.*, 2000; Weindruch e Walford, 1988). Em humanos, estudos indicam que dietas restritas em calorias melhoram alguns marcadores do envelhecimento, como por exemplo, a glicemia sanguínea, a pressão arterial e o colesterol plasmático (Heilbronn e Ravussin, 2003; Verdery e Walford, 1998; Walford *et al.*, 2002). Essas modulações ocorrem devido à redução de aporte energético, o que proporciona importantes alterações metabólicas relacionadas à mobilização de substratos energéticos, termogênese, e alterações nas concentrações

hormonais, tais como, redução de insulina e leptina, aumento de glucagon, glicocorticóides e adiponectina (Bordone e Guarente, 2005).

A hipótese vigente para explicar a maior parte dos efeitos benéficos da restrição calórica baseia-se na ativação de proteínas denominadas sirtuínas (Guarente, 2000). As sirtuínas são desacetilases com atividade dependente da abundância do co-fator NAD+ (Landry et al., 2000), o qual apresenta concentrações intracelulares dependentes da disponibilidade de nutrientes. Baixas concentrações de NAD+ resultam na inativação da atividade enzimática das sirtuínas, enquanto em períodos de privação alimentar, as concentrações de NAD+ aumentam, tanto no núcleo como no citoplasma, o que resulta na ativação das sirtuínas. Em mamíferos já foram identificadas 7 diferentes sirtuínas (SIRT 1-7), as quais podem regular diferentes funções celulares através da desacetilação de numerosos substratos. A SIRT-1 promove a gliconeogênese através da ativação da Proteína Forkhead box O1 (FOXO1), o aumento da oxidação de ácidos graxos via ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)a, assim como a biogênese mitocondrial, através da ativação do coativador de  $PPAR\gamma$ -1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ). Além disso, a SIRT-1 reduz lipogênese e síntese de colesterol através da inibição do sterol responsive element binding protein (SREBP-1 e -2), aumenta o transporte reverso de colesterol, através da ativação do receptor X do fígado  $(LXR)\alpha$ , o qual promove a expressão do transportador cassete de ligação a ATP A1 (ABCA1), e promove o catabolismo do colesterol através da ativação do receptor nuclear de ácidos biliares (BAR) (Chalkiadaki e Guarente, 2012).

Além das alterações do metabolismo energético mencionadas acima, a restrição calórica também é capaz de modificar o balanço redox celular, o que é altamente relevante para o contexto da longevidade (Barja, 2004; Gredilla *et al.*, 2001; Sohal e Weindruch,

1996). A RC em ratos causou uma diminuição na geração EROS mitocondrial em diferentes tecidos, como fígado, cérebro, coração, músculo esquelético e rins (Gredilla et al., 2001; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005). Um provável mecanismo responsável pela redução da produção de EROS nas mitocôndrias dos animais sob regime de restrição calórica seria a diminuição do potencial eletroquímico de membrana mitocondrial (Speakman e Mitchell, 2011). A redução do potencial da membrana mitocondrial aumenta a velocidade da passagem dos elétrons através dos componentes da cadeia transportadora, resultando na diminuição da probabilidade de escape dos elétrons da cadeia e reação destes com o oxigênio do meio, iniciando a geração de EROS (Brand et al., 2004; Skulachev, 1998). Speakman et al (2004) encontraram uma associação positiva entre intensidade de metabolismo corporal global e longevidade de camundongos MF1 outbred. Os camundongos com alto metabolismo possuíam mitocôndrias de músculo esquelético com maior grau de desacoplamento causado por maior atividade da UCP-3 e da adenina nucleotídeo translocase (ANT) (Speakman et al., 2004). Em ratos sob regime de restrição alimentar, a inibição da ANT em mitocôndrias de fígado e músculo causou diminuição da dissipação do gradiente de prótons e aumento da geração de EROS em níveis similares aos animais controles alimentados ad libitum (Ash e Merry, 2011). Assim sendo, na restrição calórica, quando há aumento dos fluxos de ácidos graxos durante o período de privação alimentar, a ANT e a UCP podem estar ativadas pelas altas concentrações intracelulares destes substratos.

Alguns efeitos da RC em reduzir o estresse oxidativo mitocondrial são creditados as SIRTs mitocondriais, SIRT-3, 4 e 5. A SIRT-3 é ativada seletivamente durante o jejum e restrição calórica (Newman et al., 2012). A ativação da SIRT-3, além de ativar o catabolismo lipídico, leva a ativação da superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), da

isocitrato desidrogenase (IDH2) que gera poder redutor (NADPH), e também, aumenta a eficiência do transporte de elétrons através da cadeia respiratória por interação/ativação dos complexos respiratórios (Chalkiadaki e Guarente, 2012), ações que resultam em efetiva redução da geração de EROS.

Outro mecanismo que também explica a redução na produção de EROS mitocondrial na restrição calórica é o aumento da biogênese mitocondrial e consequente maior eficiência de transporte de elétrons (Guarente, 2008), mediado pelo aumento do PGC1α induzido pela SIRT-1.

Atualmente, diferentes protocolos de manipulação dietética são usados com o intuito de estudar os efeitos fisiológicos e moleculares da restrição calórica sobre o aumento da longevidade e modulação do risco de doenças relacionadas com a idade. McCay et al. se preocuparam com a diminuição dos micronutrientes na dieta restrita caloricamente, suplementando os ratos diariamente com vitaminas e minerais (McCay et al., 1935). Nas décadas seguintes, os pesquisadores prosseguiram suplementando as dietas para que os animais sofressem apenas a restrição de calorias, sem a limitação de micronutrientes (Cerqueira e Kowaltowski, 2010). No entanto, com o aumento de estudos, vários protocolos de restrição calórica com ou sem suplementação de vitaminas e minerais foram sendo usados. Em revisão recente, Cerqueira e Kowaltowski observaram que, entre os anos de 2006 a 2009, 60% dos artigos publicados que usaram restrição calórica não especificaram se houve a suplementação com micronutrientes. Além de poucas evidências de aumento da longevidade, os autores discutem que os estudos com restrição calórica sem suplementação de micronutrientes podem afetar o desenvolvimento dos animais (Cerqueira e Kowaltowski, 2010). Entretanto, outros estudos demonstram aumento da longevidade em
ratos sob restrição calórica mesmo sem suplementação de micronutrientes (Keenan et al., 1997), assim como a diminuição do estresse oxidativo (Gredilla et al., 2001) e das concentrações plasmáticas de glicose e insulina (Masoro et al., 1992). Além disso, um protocolo alternativo de restrição calórica, baseado na ingestão alimentar "dia-sim-dianão", também chamado de alimentação intermitente ou jejum intermitente, no qual o animal só recebe alimentação em dias alternados, também é muito utilizado. Vários estudos demonstraram que o regime de alimentação intermitente diminuiu efetivamente o risco de doenças cardiovasculares e diabetes em roedores e humanos (Varady e Hellerstein, 2007), a produção de EROS mitocondrial em fígado de camundongos (Caro et al., 2008), assim como aumentou a longevidade em roedores (Martin et al., 2006). Deste modo, conclui-se que, nos diferentes protocolos de intervenções dietéticas utilizados, foram observados efeitos benéficos relacionados à longevidade e às doenças ligadas ao envelhecimento.

Como a restrição calórica parece ter só efeitos benéficos de modo geral, atualmente, muitos estudos buscam intervenções farmacológicas que poderiam mimetizar os efeitos da restrição calórica. Moléculas potencialmente miméticas da restrição calórica podem ser classificadas em vários grupos, dependendo das via metabólicas alvos: 1- drogas que melhoram a via de sinalização da insulina (metformina), 2- drogas anti-lipotíticas no caso de resistência à insulina (derivados do ácido nicotínico), 3- drogas que ativam a via das sirtuínas (resveratrol), 4- drogas que inibem a sinalização da mTor (rapamicina), entre outras (Speakman e Mitchell, 2011). Além disso, Caldeira et al. demonstraram que a indução de um desacoplamento mitocondrial brando pode mimetizar a ação da restrição calórica sobre o estado redox mitocondrial. Neste estudo, os camundongos tratados com concentrações baixas de 2,4-dinitrofenol (DNP) apresentaram diminuição na produção de EROS no cérebro, fígado e coração, redução nas concentrações plasmáticas de glicose, insulina e triglicérides, além de aumento na longevidade (Caldeira da Silva et al., 2008).

# Modelo experimental de aterosclerose: camundongos hipercolesterolêmicos por deficiência genética (*knockout* do gene) do receptor de LDL

Uma das principais vias de entrada do colesterol nas células é o receptor de LDL. Defeitos genéticos neste receptor levam à hipercolesterolemia e aterosclerose precoce em seres humanos (Brown e Goldstein, 1986). A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética com alta frequência na forma heterozigótica (1:500) na população ocidental (Pauciullo e Mancini, 1998), e é caracterizada pela deficiência genética total ou parcial dos receptores de LDL. Ishibashi et al. empregaram a técnica da recombinação homóloga em células embrionárias para produzir camundongos com o gene do receptor de LDL inativado e, assim, reproduziram o fenótipo da hipercolesterolemia familiar. Camundongos machos e fêmeas, que não expressam receptor de LDL (camundongos R0) são viáveis e férteis. Sob dieta pobre em gordura e colesterol, a concentração de colesterol plasmático destes animais é 2 a 4 vezes maior que a dos camundongos selvagens, devido a um aumento de 7 a 9 vezes nas concentrações IDL e LDL, sem significativa alteração das HDL. O turnover de IDL e LDL nos camundongos R0 está aumentado em 30 vezes e 2 vezes, respectivamente, mas de HDL é normal. Quando submetidos à dieta rica em gordura, esses animais desenvolvem aterosclerose e xantomatose severas (Ishibashi et al., 1994).

Além disso, demonstramos que as células de vários tecidos destes animais estão sob estresse oxidativo de origem mitocondrial (Oliveira et al., 2005). O aumento de geração de EROS mitocondrial observado foi devido à redução na capacidade antioxidante das mitocôndrias, as quais apresentaram uma diminuição de seu conteúdo de NADPH, principal poder redutor para reconstituição do sistema enzimático glutationa redutase/peroxidase (Oliveira et al., 2005). Resultados ainda não publicados por nosso grupo demonstraram que existe uma correlação positiva entre a produção mitocondrial de EROS e a área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta dos camundongos R0, independentemente de outros fatores pró-aterogênicos, como o colesterol plasmático (Dorighello GG. Tese de Mestrado, Unicamp, 2009). Adicionando-se a isso, Bonfleur et al. demonstraram que os camundongos deficientes do receptor de LDL são intolerantes à glicose, devido a uma menor secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. Desta maneira, os camundongos R0 também apresentaram hiperglicemia e hipoinsulinemia (Bonfleur et al., 2010). Assim, os camundongos deficientes do receptor de LDL apresentam estresse oxidativo tecidual (Oliveira et al., 2005), intolerância à glicose (Bonfleur et al., 2010) e hipertensão arterial (Trieu e Uckun, 1998). Em conjunto, esses distúrbios caracterizam também um modelo da síndrome metabólica, além de modelo de hipercolesterolemia familiar.

#### **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Intervenções dietéticas e farmacológicas têm sido utilizadas na tentativa de prevenir ou reduzir a incidência de síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. A restrição calórica é uma das estratégias usadas que se correlaciona com o aumento da longevidade e diminuição da incidência de doenças crônicas relacionados ao envelhecimento. Drogas que mimetizem os efeitos metabólicos da restrição calórica têm sido intensamente buscadas. O composto 2,4-dinitrofenol (DNP) é um derivado benzênico com alta afinidade por membranas mitocondriais, onde funciona dissipando o gradiente de prótons e, portanto induzindo o desacoplamento mitocondrial. No entanto, seus efeitos deletérios para a saúde humana são bem conhecidos desde a década de 30 (Cutting et al., 1933). Porém, seu uso experimental em doses mínimas pôde reproduzir parte dos efeitos da restrição calórica (Caldeira da Silva et al., 2008)

Em nosso laboratório, demonstramos que os camundongos modelo de hipercolesterolemia familiar humana, deficientes do receptor de LDL (R0), apresentam alterações importantes no metabolismo energético e no estado redox tecidual que o caracterizam também como modelo de síndrome metabólica. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da restrição calórica e do desacoplamento mitocondrial brando, mediado pelo tratamento com 2,4 dinitrofenol, sobre o metabolismo energético e o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos (R0).

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

# Camundongos hipercolesterolêmicos deficientes do receptor de LDL (R0)

Os camundongos deficientes do receptor de LDL fundadores da colônia foram obtidos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA). Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp – Protocolo n<sup>o</sup> 1969-1 (CEEA/UNICAMP). Os camundongos tiveram acesso à dieta padrão para roedores (Nuvital CR1, Colombo, Paraná) e foram mantidos em câmaras com temperatura de 22 ± 1°C e ciclos de 12 h de claro-escuro. Os fenótipos dos filhotes descendentes dos cruzamentos realizados entre camundongos R0 (*intercrosses*) foram confirmados através da dosagem de colesterol plasmático, por ensaio enzimático-colorimétrico (colesterol superior a 200 mg/dl). Para controle interno, alguns animais também foram genotipados por PCR.

#### **Protocolo experimental**

Os camundongos foram separados em três grupos com dois meses de idade.

- Grupo R0 controle (R0): camundongos deficientes do receptor de LDL (*background* C57Bl6/J) com ingestão alimentar livre;
- Grupo R0 restrição calórica (R0-RC): camundongos deficientes do receptor de LDL com ingestão alimentar em dias alternados (dia sim, dia não);
- Grupo R0 2,4-dinitrofenol (R0-DNP): camundongos deficientes do receptor de LDL com ingestão alimentar livre e tratados diariamente com 1mg/L de DNP (Caldeira da Silva et al., 2008) na água de beber. Os camundongos ingeriram aproximadamente 100 µg/Kg de DNP por dia.

Após 3 meses de restrição calórica e do tratamento com o desacoplador mitocondrial 2,4dinitrofenol nos camundongos deficientes do receptor de LDL foram avaliados os parâmetros a seguir:

# Componentes corporais:

- 1- Crescimento corporal e consumo alimentar;
- 2- Gravimetria do tecido adiposo visceral;
- 3- Gordura da carcaça e massa magra;
- 4- Lipídeos hepáticos;
- 5- Leptina e adiponectina plasmática;
- 6- Metabolismo corporal (produção de gás carbônico).

# Estado redox hepático e sistêmico:

- 1- Produção mitocondrial de ROS hepático;
- 2- Proteínas carboniladas no fígado;
- 3- Antioxidantes totais plasmáticos;
- 4- Suscetibilidade na oxidação da lipoproteína VLDL.

# Homeostasia glicêmica:

- 1- Glicose e insulina plasmáticos;
- 2- Teste oral de tolerância à glicose (GTT);
- 3- Teste de tolerância à insulina (ITT);
- 4- Índice HOMA-IR.

# Aterosclerose, lipídeos e marcadores inflamatórios plasmáticos:

- 1- TNFα e Proteína C reativa;
- 2- Colesterol total, triglicérides e ácidos graxos;
- 3- Perfil das lipoproteínas;

#### 4- Aterosclerose na raiz da aorta.

### Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Os lipídeos plasmáticos (colesterol, triglicérides e ácidos graxos) foram determinados utilizando-se kits enzimáticos colorimétricos da Roche-Hitachi® (Alemanha) e Wako® (Japão), respectivamente, conforme instruções do fabricante. A glicemia foi quantificada com a utilização de glicosímetro (Roche-Accu-Chek, Suiça). A capacidade antioxidante total foi determinada através de ensaio enzimático conforme instruções do fabricante Cayman® (EUA). Para a quantificação de insulina, leptina e adiponectina (Millipore, EUA), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (eBioscience, EUA) e Proteína c-reativa (IBL, EUA) plasmáticos foram utilizados kits imuno-enzimáticos comerciais *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), conforme as instruções dos fabricantes.

### Crescimento corporal e Consumo alimentar

Os camundongos e a dieta foram pesados uma vez por semana durante três meses a partir do segundo mês de idade. Além da curva de crescimento, também foi determinada o ganho de peso após subtração dos pesos iniciais. O consumo alimentar foi obtido através da diferença do peso da ração adicionada e a remanescente nas gaiolas. A ingestão alimentar foi calculada dividindo-se o valor da ração consumida pelo número de animais na gaiola. A eficiência alimentar foi obtida dividindo-se o ganho de peso pela ingestão alimentar multiplicando-se por 100.

#### Composição Corpórea

Após o sacrifício dos camundongos, o tecido adiposo perigonadal e o fígado foram determinados por gravimetria e relativizados com o peso corporal. Após remoção total dos órgãos, as carcaças dos animais foram pesadas para a determinação do teor de gordura,

42

conteúdo de água e massa magra. Inicialmente, as carcaças foram desidratadas em estufa durante um período mínimo de 72 horas à temperatura de 50  $\pm$  5 °C, ou até o peso ficar constante. Após desidratação da carcaça, esta foi colocada em extrator de soxhlet para extração total da gordura com éter de petróleo (Synth®), por um período mínimo de 96 horas (Duivenvoorden et al., 2005). O conteúdo de água foi calculado através da subtração do peso da carcaça antes e após a desidratação na estufa. A gordura total foi calculada através da subtração do peso da carcaça antes e após a extração com éter de petróleo e a massa magra foi determinada através da subtração do peso da carcaça desidratada pelo peso da gordura total. O conteúdo de água foi normalizado com o peso da carcaça úmida, enquanto os depósitos adiposos e a massa magra foram normalizados com o peso da carcaça desidratada.

# Perfil de lipoproteínas

O fracionamento das lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL) foi determinado a partir do plasma dos camundongos, os quais foram submetidos à cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) utilizando-se uma coluna de Superose 6 (Amersham Pharmacia HR 10/30) (Jiao et al., 1990). Nas 40 frações eluídas da coluna foram determinadas às concentrações de colesterol total utilizando kit enzimático da Roche-Hitachi® (Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

# Taxa metabólica corporal (produção de CO<sub>2</sub>)

A taxa metabólica corporal foi determinada indiretamente através da produção de  $CO_2$  em camundongos *in vivo*. Para tal, foi utilizado o sistema de análise em fluxo, preparado de acordo com uma metodologia previamente estabelecida em nosso grupo (Calegario et al., 2003). O protocolo do uso desse método em camundongos foi descrito por (Alberici et al., 2006). O sistema é baseado na difusão de CO<sub>2</sub> gasoso da cuba onde os camundongos estão fechados através da membrana de Teflon® para o fluxo de água deionizada. O CO<sub>2</sub>, ao entrar em contado com a água, dissocia-se produzindo íons que, ao atravessarem a cela de condutividade, geram um gradiente de condutividade registrado em forma de curvas. O aumento na condutividade é proporcional à concentração de CO<sub>2</sub> expirado pelos camundongos. Os animais foram colocados individualmente no reator no período da manha (8h00 as 10h00) e a expiração de CO<sub>2</sub> registrada por 5 minutos, por no mínimo 3 dias. Durante as medições, a temperatura externa do reator foi mantida à  $22^{\circ}$ C e a interna foi mensurada para a base de cálculos (pV = nRT). A produção de CO<sub>2</sub> de cada animal foi a média de no mínimo 3 medições em diferentes dias.

#### Suscetibilidade da oxidação da VLDL

A suscetibilidade da oxidação da lipoproteína VLDL, foi avaliada através da cinética de oxidação de ácidos graxos, a qual é caracterizada pela formação de dienos conjugados, que absorvem o comprimento de onda 234 nm (Hau et al., 1996). A VLDL, obtida através da ultracentrifugação do plasma de camundongos em jejum por 12 horas, foi normalizada para concentração de triglicérides (0,1 mg/mL) e incubada com 40 µM de CuSO<sub>4</sub> a 37°C para promover a oxidação dos lipídeos. A formação de dienos conjugados foi monitorada continuamente em espectrofotômetro no comprimento de onda 234 nm. A curva cinética das absorbâncias possui 2 fases distintas. A fase em *lag*, na qual a absorbância não se altera, indicando com isso, a resistência da lipoproteína para oxidação e a fase de oxidação, na qual a absorbância em 234 nm aumenta rapidamente até atingir um valor máximo. Assim, foram avaliados 2 parâmetros da suscetibilidade da oxidação da VLDL: 1- o *lag time*, tempo em minutos que a lipoproteína resiste a oxidação; 2- inclinação da fase de

oxidação em absorbância/minuto, indicando a velocidade na qual os lipídeos da VLDL foram oxidados.

#### Determinação de lipídeos do fígado

Os lipídeos totais do fígado foram extraídos utilizando o método de FOLCH: (2 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol/  $\pm$  60 mg de fígado) overnight (Folch et al., 1957). O extrato total obtido foi filtrado e secado. O extrato lipídico seco foi ressuspendido em 500  $\mu$ L tampão de ressuspensão (0,5M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25M de NaCl, 25mM de ácido cólico e 0,5% de triton X-100 , pH=7,4), e as concentrações de colesterol e triglicérides foram determinadas através de kits enzimáticos da Roche-Hitachi® (Alemanha), conforme instruções do fabricante.

# Teste oral de tolerância à glicose (GTT), teste de tolerância à insulina (ITT) e índice HOMA-IR

<u>GTT:</u> Primeiramente, a glicemia basal (tempo = 0 min) de camundongos em jejum por 12 horas foi determinada em uma gota de sangue proveniente da cauda, através do glicosímetro. Após isso, os animais receberam por via oral (gavagem) uma carga de glicose 1,5 g/Kg e a glicemia sanguínea foi dosada nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem, através do glicosímetro (Merat et al., 1999). A tolerância à glicose foi determinada através da área sob a curva glicêmica. <u>ITT:</u> Primeiramente, a glicemia basal (tempo = 0 min) de camundongos alimentados foi determinada em uma gota de sangue proveniente da cauda, através do glicosímetro. Após isso, os animais foram injetados intraperitonialmente com 0,5 U/Kg de insulina humana (Biohulin® R, Biobrás, Brasil) e a glicemia sanguínea foi dosada nos tempos 10, 15, 30 e 60 minutos após injeção (Pappan et al., 2005), através do glicosímetro. A tolerância à insulina foi determinada através da área sob a curva glicêmica. O índice HOMA-IR foi calculado utilizando as concentrações de insulina e glicose no estado de jejum: [Insulina (pM)/glicose (mM]/22,5 (Matthews et al., 1985).

#### Conteúdo de proteína carbonilada

O conteúdo de proteína carbonilada foi determinado de acordo Reznick e Packer e modificada de Schid et al (Reznick e Packer, 1994; Schild et al., 1997). Aproximadamente 100 mg de fígado foram homogeneizadas em tampão tris-HCl em tubos de vidros, nos quais foram adicionados 4 mL de dinitrofenilhidrazina 10 mM em HCl 2,5 M. Após incubação por 1 h em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de ácido tricloroacético 20 %. Após centrifugação e descarte dos sobrenadantes, os precipitados foram lavados 2 vezes com etanol absoluto /acetato de etila (1:1) e mais uma vez com ácido tricloroacético 10 %. O precipitado de proteínas foi ressuspendido em 2mL hidrocloreto de guanidina 6M e a absorção foi determinada em 370 nm. O conteúdo de proteica carbonilada foi calculado usando o coeficiente de absorção molar para hidrazonas alifáticas, 0,022  $\mu$ M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, e expressa como nmol de proteína carbonilada/mg de proteína hepática.

# Análise histológica das lesões ateroscleróticas

Os camundongos foram anestesiados e seus corações foram lavados com tampão fosfato (PBS) e em seguida com PBS-formaldeído 10%. Posteriormente, os corações foram removidos e congelados em gel de congelamento O.C.T. e mantidos em freezer -80°C. O processamento e coloração das raízes das aortas foram realizados de acordo com Paigen et al. (Paigen et al., 1987). Os lipídeos das lesões ateroscleróticas foram corados com *oil red* e quantificados como descrito por Rubin et al. (Rubin et al., 1991) usando o software *Image J* (versão 1.45h) para análise das fotomicrografias (*National Institutes of Health, Bethesda, Md*). As lâminas foram analisadas sem identificação dos grupos de estudo. A área das

lesões de seis secções de 10 µm, distantes 80 µm umas da outras, em um total de 600 µm de comprimento da aorta, foram quantificadas. Para determinar a região aórtica correta do inicio das coletas (surgimento das válvulas aórticas), secções não coradas foram observadas em microscópio de luz, durante o processamento dos tecidos.

# Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado dos camundongos sob jejum de 12 hs, utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Schneider et al (Schneider et al., 1950). O fígado foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm e a fase lipídica flutuante foi retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por ml.

#### Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

A geração de EROS foi monitorada espectrofluorimetricamente, usando o corante permeável à membrana H<sub>2</sub>-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1 $\mu$ M) (Garcia-Ruiz et al., 1997; LeBel et al., 1992). A fluorescência foi monitorada em 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. A calibração foi feita pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), uma vez que o produto da oxidação do H<sub>2</sub>-DCF apresenta fluorescência. A geração mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

nas mitocôndrias isoladas foi monitorada através da fluorescência da forma oxidada do probe Amplex Red (Molecular Probes) na presença de peroxidase de raiz forte.

# Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (epm). Foi utilizado o teste "t" de *Student* para comparação entre dois grupos. Nas análises de correlação foi utilizado o teste de Spearman's r (coeficiente de correlação de Spearman). Para todos os testes foi utilizado o programa *GraphPad Prism*. Como o mesmo grupo de camundongos deficientes do receptor de LDL foram usados como controles em ambos os estudos, para todos os experimentos realizados, consideramos diferença estatisticamente significante quando P< 0,025.

#### RESULTADOS

Por razões éticas, para limitar o uso de animais de laboratório, conduzimos os estudos dos efeitos da restrição calórica e do tratamento com 2,4 dinitrofenol (DNP) nos camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) em paralelo, usando um único grupo de animais controles R0 (sem nenhum tratamento) para ambos os estudos. Desta forma, os resultados dos dois estudos são apresentados separadamente, mas o grupo controle é repetido para comparação estatística com os grupos experimentais em cada um dos estudos. Em alguns de nossos resultados também apresentamos, apenas como referencial, os dados de uma linhagem de camundongos wild type (WT) (C57Bl6/JUnib, Cemib, UNICAMP) cujo background genético é muito semelhante ao dos camundongos R0 (C57Bl6/J, Jackson Laboratory, USA). No entanto, os resultados dos animais WT não podem ser considerados controles perfeitos dos R0, pois estes últimos apresentam uma deficiência de uma enzima mitocondrial, a transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida mitocondrial (Toye et al., 2005), altamente relevante para o estado redox da organela, deficiência esta que não existe nos camundongos WT da UNICAMP. Assim, nenhuma comparação estatística foi realizada entre os camundongos R0 e WT. A comparação entre as duas sublinhagens de C57Bl6 (UNICAMP vs Jackson Laboratory) está sendo objeto de estudo atualmente em nosso grupo.

Estudo 1: Efeitos da restrição calórica sobre o metabolismo e o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes do receptor de LDL.

#### Crescimento corporal, consumo alimentar e metabolismo corporal

Spindler (Spindler, 2012) descreve em artigo de revisão vários estudos, nos quais roedores sob restrição calórica apresentaram aumento da longevidade, sem alteração na massa corporal. Porém, ainda não existem estudos em camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos sob restrição calórica. Assim, o crescimento corporal e o consumo alimentar foram mensurados semanalmente durante três meses em camundongos deficientes do receptor de LDL ad libitum (R0) e sob restrição calórica (R0-RC). Como já esperado, os camundongos com alimentação em dias alternados, apresentaram uma redução de 20% no consumo alimentar em relação aos R0. Apesar disso, o ganho de peso corporal 20% menor dos R0-RC, não estava estatisticamente diferente dos R0. As eficiências alimentares médias, assim como, as massas corporais iniciais e finais (com cinco meses de idade) também estavam similares entre os grupos R0 e R0-RC (Tabela 1). Os animais R0-RC apresentaram uma diminuição no ganho de peso nas primeiras semanas da restrição, porém posteriormente o crescimento ficou similar aos R0, como observado na Figura 1, enquanto o consumo alimentar permaneceu uniformemente menor durante os três meses de análise.

Para verificar se a intervenção alimentar poderia alterar o metabolismo energético corporal global dos camundongos R0, avaliamos a produção de  $CO_2$  *in vivo*. Os camundongos R0-RC apresentaram variações diárias extremas no metabolismo corporal. Como o protocolo de restrição calórica utilizado consistia em alimentação em dias alternados, os animais permaneciam 24 horas em jejum, seguida de 24 horas com alimentação *ad libitum*. Deste modo, durante os dias em jejum, os camundongos R0-RC apresentaram uma diminuição de 22%, enquanto nos dias com alimentação *ad libitum* os R0-RC apresentaram um aumento de 10% na produção de  $CO_2$  em relação aos camundongos R0 *ad libitum* (**Figura 2**). A diferença entre o metabolismo corporal nos diferentes estados alimentares (jejum *vs* alimentado) dos camundongos sob restrição calórica foi surpreendentemente de 40% (**Figura 2**).

# Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas

deficientes Os camundongos do receptor de LDL são modelos de hipercolesterolemia familiar, uma vez que apresentam concentrações plasmáticas de colesterol elevadas de 2 a 4 vezes em relação aos camundongos selvagens (Ishibashi et al., 1993). Deste modo, analisamos os efeitos da restrição calórica nos lipídeos plasmáticos e no perfil de lipoproteínas dos camundongos deficientes do receptor de LDL. Apesar de exibir ingestão alimentar reduzida, os camundongos sob restrição calórica apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol 37% maiores que os R0 com acesso a dieta ad libitum. O aumento do colesterol total nos RO-RC reflete o aumento de 3 vezes na fração VLDL e de 50% na fração LDL colesterol, quando comparados aos animais R0-ad libitum (Figura 3). A fração HDL-colesterol estava similar nos R0 e R0-RC (Tabela 2 e Figura **3**). A RC não teve efeito sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides  $(120 \pm 9.1 \text{ vs})$  $130 \pm 7.9 \text{ mg/dL}$ ) e nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (0,62 ± 0,05 vs  $0,62 \pm 0,05$  mM) nos camundongos R0 e R0-RC.

# Composição corporal e concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina.

Com a intenção de analisar os efeitos da restrição calórica sob a adiposidade nos camundongos hipercolesterolêmicos deficientes do receptor de LDL avaliamos a composição corporal, assim como, as concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina, as quais estão diretamente relacionadas com a massa adiposa (Galic et al., 2010). Apesar da diminuição de 20% na ingestão alimentar, os camundongos R0-RC exibiram diversas alterações inesperadas em parâmetros corporais e na concentração de leptina. Observamos

que a restrição calórica causou um surpreendente aumento de 72% na massa adiposa da carcaça dos animais R0-RC em relação aos animais *ad libitum*. Além disso, os R0-RC exibiram uma diminuição significante de 11% na massa magra da carcaça e aumento de 16% do depósito de tecido adiposo perigonadal (**Tabela 3**). Corroborando com essas alterações, as concentrações de leptina plasmática estavam 50% e 35% aumentadas nos estados de jejum e alimentado, respectivamente, nos camundongos em RC em relação aos *ad libitum* (**Figura 4**). A massa do fígado, assim como, a concentração de colesterol hepático  $(1,99 \pm 0,11 \text{ vs } 2,20 \pm 0,17 \text{ mg/g})$  estavam semelhantes entre os camundongos R0 e R0-RC, respectivamente (**Tabela 3**). No entanto, o conteúdo de triglicérides hepático estava 35% menor nos animais em RC comparados aos R0 (**Tabela 3**). As concentrações plasmáticas de adiponectina não foram moduladas pelo regime de restrição calórica, se mantendo similar nos R0 e R0-RC (7,68 ± 0,33 vs 8,45 ± 0,28 µg/mL, respectivamente) (**Figura 4**).

# Homeostase glicêmica

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que os camundongos R0 apresentam intolerância à glicose, devido a uma menor secreção de insulina, enquanto a sensibilidade periférica à insulina parece ser normal (Bonfleur et al., 2010). Na literatura, alguns estudos demonstraram os efeitos positivos da restrição calórica sobre a homeostase glicêmica (Anson et al., 2003; Masoro et al., 1992). Deste modo, averiguamos os efeitos da restrição calórica nestes camundongos hipercolesterolêmicos intolerantes à glicose. Ao contrário do previsto, os camundongos R0-RC apresentaram um aumento de 42% na concentração de glicose plasmática após jejum de 12 horas em relação aos R0 *ad libitum*. A glicemia no estado alimentado estava similar (144  $\pm$  3,9 vs 142  $\pm$  5,0 mg/dL) nos camundongos R0 e R0-RC, respectivamente (**Tabela 4**). Além disso, os camundongos sob restrição calórica exibiram um perfil de intolerância a glicose em relação aos R0 como observado nos resultados do teste oral de tolerância a glicose (GTT) (Figura 5). Além da glicemia de jejum aumentada, os animais restritos caloricamente apresentaram glicemias após 90 e 120 minutos da ingestão de glicose 40% maiores que os camundongos RO (Figura 5). A intolerância à glicose foi confirmada com a análise da área sob a curva glicêmica média, a qual estava 15% aumentada nos R0-RC em relação aos R0 (Figura 5). Adicionalmente, os R0-RC apresentaram um aumento de 50 e 60% na insulinemia nos estados de jejum e alimentado, respectivamente, em relação aos RO. Esse quadro de hiperinsulinemia juntamente com a glicemia de jejum aumentada e a intolerância à glicose observada nos camundongos RO-RC caracterizam o desenvolvimento de diabetes nestes animais. Para verificar a sensibilidade periférica à insulina, realizamos o teste de tolerância à insulina (ITT) e calculamos o índice HOMA-IR (modelo de avaliação homeostática) que é indicador de resistência à insulina (Matthews et al., 1985). Durante o ITT, os camundongos RO-RC apresentaram maiores concentrações de glicose nos tempos 10 e 60 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina em relação aos R0 (Figura 6). Esses dados sugerem que a restrição calórica esteja causando resistência periférica à insulina, que foi confirmada com as áreas sob a curva glicêmicas durante o ITT, as quais estavam 25% maiores nos R0 restritos em relação aos R0 ad libitum (Figura 6). Corroborando esses dados, os R0-RC exibiram o índice HOMA-IR 90% maior que os R0 (Tabela 4). Deste modo, podemos dizer que as alterações geradas pela restrição calórica nos camundongos deficientes do receptor de LDL são devidas a redução na sensibilidade periférica a insulina. Os R0-RC apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e à insulina e aumento do índice HOMA-IR, os quais são indicadores de diabetes mellitus tipo II.

### Estado redox sistêmico e tecidual

Na restrição calórica, a taxa de envelhecimento está reduzida proporcionalmente com a redução na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) mitocondriais (Barja, 2004). Guarente (Guarente, 2008) relata em sua revisão que a restrição calórica promove o aumento da taxa de respiração mitocondrial, e com isso, reduz a produção de EROS mitocondrial. A relação entre a taxa de respiração e a produção de EROS mitocondrial já foi demonstrada anteriormente (Korshunov et al., 1997; Skulachev, 1998). Deste modo, avaliamos se a restrição calórica poderia modular alguns indicadores do estado redox dos camundongos hipercolesterolêmicos, os quais já apresentam estresse oxidativo tecidual, como demonstrado anteriormente por nosso grupo (Oliveira et al., 2005; Paim et al., 2008). Como observado na Tabela 5, a capacidade antioxidante total plasmática não estava alterada nos grupos R0 *ad libitum* e R0-RC ( $1,02 \pm 0,04 \text{ vs} 1,08 \pm 0,06 \text{ nM}$ ). Por outro lado, os camundongos em restrição calórica exibiram um lag time para início da oxidação da lipoproteína VLDL 20% maior que os R0 (Tabela 5 e Figura 7), ou seja, as VLDL dos animais restritos caloricamente apresentaram maior resistência à oxidação induzida por sulfato de cobre que as VLDL dos camundongos R0 ad libitum.

Para verificar os efeitos da restrição calórica no estado redox tecidual dos camundongos hipercolesterolêmicos, avaliamos a o conteúdo de proteínas carboniladas hepáticas e a geração de EROS em mitocôndrias isoladas do fígado. Os camundongos com restrição calórica apresentaram concentrações das proteínas carboniladas semelhantes aos camundongos R0 *ad libitum* (7,4  $\pm$  1,7 *vs* 8,0  $\pm$  1,0 nM/mg, respectivamente) (**Tabela 5**). No entanto, ao analisar as mitocôndrias do fígado, os animais R0-RC exibiram uma redução de 40% na oxidação do probe H2DCF-DA, o que indica uma redução global na geração de várias espécies de oxigênio que atacam o probe (**Figura 8**). Dentre as várias EROS, a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial nos camundongos sob restrição

calórica não estava alterada em relação aos R0 (207  $\pm$  16 *vs* 228  $\pm$  3,1 nM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg/min), conforme indicado pelo probe específico amplex red (**Figura 8**). Deste modo, a restrição calórica gerou alguns efeitos benéficos sobre a suscetibilidade ao estresse oxidativo em lipoproteínas plasmáticas e nas mitocôndrias hepáticas dos camundongos R0.

#### Inflamação e Aterosclerose

Os mecanismos iniciais responsáveis pela formação das placas aterogênicas ainda são muito discutidos na literatura. Na aterogênese, o estresse oxidativo e a inflamação estão intrinsecamente ligados, podendo um fator modular o outro e vice versa (Hulsmans et al., 2012). Assim, além de investigar parâmetros do estado redox, avaliamos os efeitos da restrição calórica sobre alguns indicadores de inflamação sistêmica e sobre o desenvolvimento da aterosclerose nestes camundongos deficientes do receptor de LDL. Para isso, foram analisados a citocina inflamatória TNF- $\alpha$  e o marcador de fase aguda proteína C-reativa (PCR). Os camundongos restritos caloricamente apresentaram perfis de inflamação crônica sistêmica, com aumento de 28% na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e uma elevação de 23% na concentração plasmática de PCR (**Tabela 6**).

Ao analisar o desenvolvimento da aterosclerose, observamos que a restrição calórica gerou efeitos surpreendentes. Os camundongos sob regime de restrição calórica apresentaram um aumento de 2,8 vezes na área de deposição de lipídeos na parede interna da raiz aorta em relação aos R0 *ad libitum* (80,8  $\pm$  8,4 *vs* 28,4  $\pm$  3,5 x 10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup>, respectivamente) (**Figura 9**). Fotografias representativas das secções histológicas podem ser observadas na **Figura 10**. Assim, podemos dizer que o aumento do desenvolvimento da aterosclerose nos camundongos restritos caloricamente ocorreu devido à presença de diversos fatores com caráter aterogênico, como a hipercolesterolemia, obesidade, resistência à insulina e a inflamação sistêmica. Para determinar as relações diretas desses

distúrbios com o desenvolvimento da aterosclerose, usamos o teste de correlação de Spearman r. Assim, a aterosclerose estava correlacionada positivamente com o colesterol plasmático (R = 0,60, P = 0,0009), com a massa de gordura da carcaça (R = 0,60, P = 0,0078), com a leptina plasmática (R = 0,056, P = 0,013) e com o TNF $\alpha$  plasmático (R = 0,85, P = 0,0037). As correlações da gordura da carcaça, leptina e TNF $\alpha$  plasmáticos permaneceram significativas após ajuste do teste para o colesterol plasmático, demonstrando com isso que esses 3 parâmetros estão relacionados com a aterosclerose independentemente das concentrações de colesterol.

Estudo 2: Efeitos do tratamento com 2,4 dinitrofenol (DNP) no metabolismo e desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes do receptor de LDL.

#### Crescimento corporal, consumo alimentar e metabolismo corporal

O uso do desacoplador mitocondrial químico 2,4 dinitrofenol (DNP) aumenta a dissipação do gradiente de prótons e como consequência reduz a produção de ATP (Harper et al., 2001). Assim, a diminuição de ATP poderia afetar o crescimento corporal, desta maneira, investigamos os efeitos do tratamento com DNP durante 3 meses sobre o crescimento corporal e comportamento alimentar de camundongos R0. As pequenas doses de DNP usadas não afetaram o crescimento, consumo alimentar, ganho de peso e eficiência alimentar dos camundongos R0 (**Tabela 7 e Figura 11**).

Para verificar se o desacoplamento mitocondrial brando poderia alterar o metabolismo energético corporal global dos camundongos R0, avaliamos a produção de  $CO_2$  *in vivo*. Os camundongos tratados com DNP apresentaram taxas metabólicas corporais semelhantes aos R0 não tratados (12,74 ± 0,32 vs 12,39 ± 0,23, g CO<sub>2</sub>/Kg/h) (**Figura 12**).

#### Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas

Analisamos os efeitos do tratamento com DNP sobre os lipídeos plasmáticos e o perfil de lipoproteínas dos camundongos R0 (**Tabela 8 e Figura 13**). Não houve alterações significativas nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides e lipoproteínas VLDL, LDL, HDL pelo tratamento com baixas doses de DNP (**Tabela 8 e Figura 13**). No entanto, ao avaliar as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, verificamos que os camundongos tratados com DNP estavam com as concentrações plasmáticas 22% reduzidas em relação aos R0 (**Tabela 8**).

### Composição corporal, leptina e adiponectina plasmáticas

Os camundongos R0 tratados com DNP exibiram depósitos de tecido adiposo visceral (perigonadal) e subcutâneo (carcaça), massa magra, massa hepática, e conteúdo hepático de lipídeos semelhantes aos animais R0 não tratados (**Tabela 9**). As concentrações plasmáticas das adipocinas leptina e adiponectina também estavam semelhantes entres os grupos R0-DNP e R0 (**Figura 14**).

## Homeostase glicêmica

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que os camundongos R0 apresentam intolerância à glicose, devido a uma menor secreção de insulina (Bonfleur et al., 2010). Caldeira et al. demonstraram que os camundongos *Swiss* tratados com baixas doses do desacoplador mitocondrial 2,4 dinitrofenol apresentaram menor glicemia e insulinemia (Caldeira da Silva et al., 2008). Deste modo, investigamos os efeitos do tratamento com DNP nos camundongos R0. Os camundongos tratados com DNP apresentaram glicemia e insulinemia, tanto no estado de jejum como alimentado, semelhantes aos R0 não tratados (**Tabela 10**). Esse resultado difere do trabalho anterior (Caldeira da Silva et al., 2008) que utilizou um modelo animal diferente e tempo de tratamento maior quando comparado com nosso estudo. Os camundongos R0 tratados com DNP também não apresentaram alterações na tolerância à glicose, como observado nas curvas glicêmicas praticamente sobrepostas na **Figura 15**. Para verificar se o tratamento com DNP teria causado alguma alteração na sensibilidade periférica da insulina, foi realizado o teste de tolerância à insulina (**Figura 16**). Os camundongos tratados com DNP não apresentaram alterações na sensibilidade periférica da insulina, foi realizado o teste de tolerância à insulina (**Figura 16**). Os camundongos tratados com DNP não apresentaram alterações na sensibilidade periférica à insulina, concordando com o índice HOMA-IR que estava inalterado nestes animais (**Tabela 10**).

# Estado redox sistêmico e tecidual

Estudo prévio mostrou que camundongos tratados com baixas doses do desacoplador mitocondrial, 2,4-dinitrofenol apresentaram diminuição na produção de EROS no cérebro, fígado e coração (Caldeira da Silva et al., 2008). Assim, avaliamos se o tratamento com DNP poderia modular o estado redox dos camundongos R0, que além da hipercolesterolemia, também apresentam estresse oxidativo tecidual (Oliveira et al., 2005; Paim et al., 2008). Para isso, avaliamos a capacidade antioxidante total do plasma, e a suscetibilidade à oxidação da lipoproteína VLDL e verificamos que ambos indicadores sistêmicos não estavam alterados no plasma dos animais tratados com DNP (**Tabela 11**). O estado redox tecidual foi investigado através da quantificação das proteínas carboniladas hepáticas e da geração de EROS em mitocôndrias do fígado. Os camundongos R0 tratados com DNP exibiram uma redução de 35% na concentração de proteínas carboniladas hepáticas (**Tabela 11**) e uma redução de 32% na produção mitocondrial de EROS

(oxidação de  $H_2DCF$ -DA) e de 15% na produção de  $H_2O_2$  (amplex red) (**Figura 17**). Essa modulação foi provavelmente decorrente do aumento na taxa de respiração mitocondrial causado pelo desacoplamento mitocondrial induzido pelo DNP.

# Inflamação e Aterosclerose

Como na aterogênese o estresse oxidativo e a inflamação estão intrinsecamente ligados, além de investigar parâmetros do estado redox, avaliamos os efeitos do tratamento com DNP na inflamação sistêmica e aterosclerose em camundongos R0. O tratamento com DNP não causou modificações nos marcadores inflamatórios clássicos analisados, o TNF- $\alpha$  e a proteína C-reativa (**Tabela 12**). Apesar de não modular a inflamação sistêmica e a maioria dos parâmetros metabólicos analisados, os camundongos R0 tratados com DNP exibiram resultados surpreendentes no desenvolvimento da aterosclerose na raiz da aorta: uma redução de 35% no tamanho médio das lesões, representadas pelo acúmulo lipídico da raiz da aorta, quando comparados aos camundongos R0 não tratados (18,5 ± 4,4 *vs* 28,4 ± 3,5 x 10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup>, respectivamente) (**Figuras 18 e 19**).

# DISCUSSÃO

# Estudo 1: Efeitos da restrição calórica sobre o metabolismo e o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes do receptor de LDL.

Estudos demonstraram que a restrição calórica em roedores causou uma diminuição na geração de EROS mitocondrial (Gredilla et al., 2001; Sanz et al., 2005), assim como, nas concentrações plasmáticas de glicose e insulina (Argentino et al., 2005; Masoro et al., 1992). A restrição calórica também aumentou à tolerância a glicose e a sensibilidade à insulina em ratos (Park et al., 2005). Varady e Hellerstein demonstraram em revisão que a restrição calórica (alimentação intermitente) reduziu indicadores de risco cardiovascular, diabetes e câncer em estudos com humanos e animais (Varady e Hellerstein, 2007). Além disso, a concentração de colesterol total, triglicérides e ácidos graxos plasmáticos, assim como, a proliferação de células de músculo liso vascular da aorta estavam reduzidas em camundongos C57BL/6 sob regime de alimentação em dias alternados (Varady et al., 2009). Com isso, levantamos a hipótese de que a RC poderia corrigir vários distúrbios metabólicos presentes no modelo experimental de hipercolesterolemia familiar que é suscetível à aterosclerose, o camundongo deficiente de receptor de LDL.

Como esperado, os R0-RC apresentaram redução no consumo alimentar. O regime de alimentação dia-sim-dia-não refletiu em taxas de metabolismo corporal (produção de CO<sub>2</sub>) extremamente diferentes diariamente, conforme o esperado, taxas metabólicas reduzidas em dias de jejum e aumentadas nos dias de alimentação. Hambly e Speakman mostraram que camundongos MF1, sob restrição dietética de 20%, apresentaram menor metabolismo corporal em relação a camundongos *ad libitum*, porém não apresentaram diferenças entre os estados de jejum e alimentado (Hambly e Speakman, 2005).

Diferentemente, em ratos sob restrição calórica de 40%, o metabolismo basal não foi modulado (Greenberg e Boozer, 2000). Portanto, podemos dizer que os efeitos da restrição calórica sobre o metabolismo corporal podem variar em função do protocolo de restrição, da espécie animal estudada, ou do background genético da espécie.

Apesar de exibir ingestão alimentar cumulativa reduzida, os camundongos sob restrição calórica apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total e das frações VLDL e LDL em relação aos R0 com dieta ad libitum. Essa alteração poderia ser resultado de uma elevada taxa de síntese de lipídeos, que já está presente nestes animais alimentados ad libitum (Oliveira et al., 2005). Após 24 horas de jejum, os camundongos devem ingerir um volume muito grande de ração nas primeiras horas em contato com a ração. Em estudo recente, foi observado que camundongos, C57BL6 em restrição calórica de 30%, ingeriram em apenas 1 hora após contato com a dieta a mesma quantidade que os animais ad libitum ingeriram durante 24 horas (Bruss et al., 2010). Bruss et al. observaram um aumento na secreção de VLDL-TG nas primeiras 6 horas após alimentação nestes camundongos sob restrição calórica (Bruss et al., 2010). Assim, essa alta ingestão alimentar em período curto de tempo poderia ser responsável pelas taxas elevadas de síntese e secreção de lipídeos no fígado. Como os camundongos deficientes do receptor de LDL possuem clearance da VLDL e da LDL extremamente reduzido (Ishibashi et al., 1993), os triglicérides da VLDL produzida em excesso no fígado dos R0-RC seriam metabolizado no compartimento intravascular, liberando AGL para todos os tecidos, enquanto o colesterol permaneceria na circulação, gerando com isso, o aumento do colesterol total e das frações VLDL- e LDL-COL. Nossos dados de redução de TG no fígado e elevação de VLDLcolesterol no plasma reforçam a hipótese de secreção aumentada de VLDL pelo fígado dos animais em restrição calórica.

Além da hipercolesterolemia, a restrição calórica gerou um aumento inesperado de tecido adiposo perigonadal (15%) e massa de gordura na carcaça (72%), assim como uma diminuição da massa magra e elevação nas concentrações plasmáticas de leptina nos camundongos deficientes do receptor de LDL. Apesar da elevação dos dois depósitos adiposos, visceral (perigonadal) e subcutâneo (carcaça), provavelmente o depósito subcutâneo seria o principal responsável pelo aumento da leptina plasmática, uma vez que já foi demonstraram que a leptina é secretada 2 a 3 vezes mais no tecido adiposo subcutâneo do que no visceral (Van Harmelen et al., 1998). Camundongos, C57BL6 sob restrição calórica de 30%, apresentaram aumento no armazenamento de ácidos graxos recém-sintetizados no tecido adiposo subcutâneo e perigonadal nas primeiras horas após início da alimentação em relação aos camundongos ad libitum (Bruss et al., 2010). Os R0-RC apresentaram um aumento de 3 vezes na concentração de VLDL-COL, sem alterações nas concentrações plasmáticas de triglicérides, o que demonstra que o triglicérides absorvidos e sintetizados estariam sendo armazenado nos depósitos adiposos. A alimentação intermitente de longo prazo promoveu um aumento de deposição lipídica no tecido adiposo branco de ratos, através da regulação positiva da proteína FSP27, a qual está envolvida na formação das gotículas lipídicas nos adipócitos (Karbowska e Kochan, 2012). Interessante, camundongos C57BL/6J, sob alimentação intermitente modificada, com redução de 15% do volume de ração nos dias alimentados em relação ao consumo diário dos animais ad libitum, apresentaram aumento nos depósitos subcutâneos e diminuição nos depósitos viscerais em relação aos camundongos ad libitum (Varady et al., 2009), porém sem diferença na massa adiposa total.

Os camundongos R0, que já são intolerantes à glicose em alimentação *ad libitum* (Bonfleur et al., 2010), quando sob restrição calórica, apresentaram aumento da glicemia de

jejum e da insulinemia, piora da intolerância à glicose e aparecimento de resistência à insulina. Portanto, este regime alimentar levou ao aparecimento de Diabetes Tipo II nestes animais. Diferentemente, na literatura são encontrados dados opostos em roedores sobregime de alimentação intermitente (Anson et al., 2003; Wan et al., 2003). Portanto, podemos dizer que a deficiência genética do receptor de LDL provavelmente é responsável pelas diferenças de respostas à restrição calórica observadas nos R0 e nos animais controles estudados previamente. Os distúrbios na homeostase glicêmica estão diretamente associados com a obesidade encontrada nos R0 em restrição calórica, uma vez que a massa adiposa da carcaça dos camundongos está correlacionada positivamente com a hiperglicemia (R = 0,65, P = 0,01) e com a intolerância à glicose (R = 0,88, P<0,0001). Como se sabe, a obesidade e a resistência à insulina estão intimamente ligadas (Kahn et al., 2006). É possível ainda, que tenha havido aumento de deposição de gordura no tecido muscular (incluído na carcaça), o que teria contribuído para resistência periférica à insulina.

Muitos estudos demonstraram anteriormente os efeitos benéficos da restrição calórica sobre o estresse oxidativo celular (Gredilla *et al.*, 2001; Sohal e Weindruch, 1996). De fato, as VLDL dos camundongos R0-RC apresentaram menor suscetibilidade à oxidação, o que indica que a restrição calórica poderia ter modulado o balanço de pró- e anti-oxidantes celular durante o empacotamento da VLDL no fígado. Além disso, os R0 restritos caloricamente apresentaram uma menor produção de EROS em mitocôndrias isoladas de fígado, observado quando utilizamos o probe H<sub>2</sub>-DCF-DA, o qual tem a vantagem de refletir a produção de um grande número de EROS, incluindo derivados do óxido nítrico, porém tem a desvantagem de ser sensível a interferentes não específicos. Das EROS possivelmente elevadas nas mitocôndrias hepáticas, exclui-se o peróxido de hidrogênio, uma vez que não houve diferença na oxidação do probe específico amplex-red.

Embora o indicador de oxidação de proteínas hepáticas (carbonilação) não tenha sido alterado pelo regime de restrição calórica, houve algum benefício no estado redox das lipoproteínas e em mitocôndrias hepáticas. Importantes mediadores inflamatórios estão presentes em todas as etapas da aterogênese (Libby, 2012). Os camundongos tratados com restrição calórica apresentaram um perfil sistêmico de inflamação crônica, com aumento na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e de proteína C-reativa. Ao contrário de nossos dados, foi mostrado que camundongos C3B10RF1 sob restrição calórica do tipo alimentação intermitente durante 27 meses apresentaram redução de 10 vezes na concentração plasmática de TNF $\alpha$  e de 4 vezes em IL-6 em relação aos controles *ad libitum* (Spaulding et al., 1997). Da mesma maneira, ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hiperlipídica sob restrição calórica de 40% apresentaram redução na expressão de proteína C-reativa (Park et al., 2012). Novamente, podemos atribuir os diferentes resultados à diferença de background genético e espécie em relação ao nosso modelo, além do tempo de tratamento.

Surpreendentemente, a restrição calórica nos animais R0 causou um aumento de quase 3 vezes na área de lesão aterosclerótica da raiz da aorta, sítio de predição de formação de lesão neste modelo. Observamos correlações positivas entre a área de lesão aterosclerótica e as concentrações plasmáticas de TNF $\alpha$ , leptina, e massa de gordura da carcaça, que são independentes das concentrações de colesterol (correlações ajustadas pelo colesterol). Assim, apesar de alguns efeitos benéficos sobre o estado redox de lipoproteínas e de mitocôndrias hepáticas, a restrição calórica tornou os camundongos deficientes do receptor de LDL ainda mais hipercolesterolêmicos, obesos, diabéticos e com inflamação sistêmica, todos, fatores que contribuem para agravar o desenvolvimento da aterosclerose (Bornfeldt e Tabas, 2011; Kleemann *et al.*, 2008; Rocha e Libby, 2009).

# Estudo 2: Efeitos do tratamento com 2,4 dinitrofenol sobre o metabolismo e o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes do receptor de LDL.

Drogas que mimetizam os efeitos metabólicos da restrição calórica têm sido buscadas e estudadas (Chiba et al., 2010; Spindler e Mote, 2007). O desacoplamento mitocondrial brando poderia ser uma boa opção para aumentar a velocidade do metabolismo e reduzir a produção de EROS, tal como observado nos camundongos hipertrigliceridêmicos que exibiram maior atividade do mitoKATP (Alberici et al 2009). O uso do DNP há muito tempo foi proibido por seus conhecidos efeitos deletérios sobre a saúde humana (Cutting et al., 1933). Na década de 1930, o dinitrofenol foi utilizado para promover o emagrecimento, no entanto, resultou em inúmeras mortes por hipertermia em indivíduos que ingeriram altas doses (Parascandola, 1974). Em nosso estudo, utilizamos doses 100 vezes menores que as doses usadas para emagrecimento em humanos no passado e cerca de 1000 vezes menores que a dose letal para camundongos (Caldeira da Silva et al., 2008). Com exceção de uma redução nos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, o tratamento dos animais hipercolesterolêmicos com estas doses mínimas de DNP não causou nenhuma alteração significativa no metabolismo lipídico e glicídico, nem na composição corporal dos animais. A redução de AGL plasmáticos deve refletir aumento de captação tecidual e aumento da velocidade da β-oxidação diretamente estimulada pelo desacoplamento mitocondrial. Além disso, o dinitrofenol promove ativação da AMPK, conforme demonstrado em músculos de ratos tratados (Hayashi et al., 2000), o que também causa aumento da β-oxidação (Hardie, 2008). Deste modo, o desacoplamento mitocondrial químico poderia estar direta e indiretamente promovendo a oxidação de ácidos graxos e consequentemente sua redução no plasma dos camundongos hipercolesterolêmicos.

No estudo prévio de Caldeira da Silva et al, camundongos *Swiss* tratados com estas mesmas doses baixas de DNP apresentaram redução do crescimento corporal, da glicemia, insulinemia e trigliceridemia (Caldeira da Silva et al., 2008). Essas diferenças de resposta ao DNP podem estar relacionadas às diferenças basais nas linhagens de camundongos, por exemplo, os camundongos *Swiss* com 5 meses de idade apresentam massa corporal 2 vezes superior, glicemia 3 vezes maior, insulinemia e trigliceridemia 2 vezes maiores que os camundongos R0 da mesma idade (*background* C57BL6). Os camundongos *Swiss* são classicamente considerados mais suscetíveis a doenças metabólicas e mais responsivos a manipulações experimentais que os C57Bl6.

Em nosso estudo, o tratamento com DNP mostrou benefícios significativos no estado redox tecidual, conforme avaliado no fígado, reduções significativas do conteúdo de proteínas carboniladas e da produção mitocondrial de EROS. Estes resultados também foram observados nos camundongos Swiss (Caldeira da Silva et al., 2008).

A aterosclerose é uma doença com origem multifatorial, podendo ter seu desenvolvimento acelerado devido a fatores metabólicos (dislipidemias, resistência à insulina e obesidade), hemodinâmicos (hipertensão arterial) e inflamatórios (Glass e Witztum, 2001). O objetivo principal de nossa investigação foi avaliar o efeito do desacoplamento mitocondrial brando sobre o desenvolvimento espontâneo da aterosclerose nos camundongos R0. Esperávamos encontrar melhoras no perfil metabólico, inflamatório, redox e na manifestação da doença. Embora não tenhamos observado alterações no comportamento metabólico dos animais tratados com 2,4 dinitrofenol, observamos uma redução significativa de 35% no tamanho médio das lesões da raiz da aorta em relação aos camundongos R0 não tratados. Esse achado revela a importância do estado redox mitocondrial e dos efeitos antioxidantes do desacoplamento brando da organela na

manifestação da doença aterosclerótica, independentemente dos clássicos fatores de risco desta doença.

# CONCLUSÕES

1- A restrição calórica em camundongos deficientes do receptor de LDL, apesar ter gerado algum benefício sobre o estado redox sistêmico e tecidual, causou resistência à insulina, aumento adicional da colesterolemia, da massa de gordura, e de mediadores inflamatórios. A piora do conjunto de distúrbios metabólicos presentes nesses camundongos causaram aumento marcado de aterosclerose nos animais sob restrição calórica. Portanto, podemos concluir que o regime de restrição calórica induziu obesidade e diabetes e piorou a aterosclerose de camundongos com deficiência de receptores de LDL, e que não deve ser utilizado em organismos com este defeito genético.

2- O tratamento com o protonóforo DNP, que causa um desacoplamento mitocondrial brando, não modificou o comportamento alimentar, a composição corporal, a homeostase lipêmica e glicêmica, e os níveis dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e PCR de camundongos deficientes do receptor de LDL. No entanto, o DNP induziu efeitos antioxidantes teciduais expressivos, a saber, redução de carbonilação de proteínas e redução da produção de EROS mitocondrial. Estes efeitos se refletiram na redução significativa do desenvolvimento espontâneo da aterosclerose nos camundongos tratados com DNP, independentemente de clássicos fatores de risco para a doença. Estes resultados evidenciam o papel central do estresse oxidativo mitocondrial na aterogênese de organismos com deficiência genética de receptor de LDL.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alberici, L.C., Oliveira, H.C., Paim, B.A., Mantello, C.C., Augusto, A.C., Zecchin, K.G., Gurgueira, S.A., Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (2009). Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. Free Radic Biol Med 47, 1432-1439.

Alberici, L.C., Oliveira, H.C., Patricio, P.R., Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (2006). Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K+ channel activity. Gastroenterology *131*, 1228-1234.

Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H. e Libby, P. (1991). Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb *11*, 1223-1230.

Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A. e Mattson, M.P. (2003). Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6216-6220.

Argentino, D.P., Dominici, F.P., Munoz, M.C., Al-Regaiey, K., Bartke, A. e Turyn, D. (2005). Effects of long-term caloric restriction on glucose homeostasis and on the first steps of the insulin signaling system in skeletal muscle of normal and Ames dwarf (Prop1df/Prop1df) mice. Exp Gerontol 40, 27-35.

Ash, C.E. e Merry, B.J. (2011). The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation. Mech Ageing Dev *132*, 43-54.

Assmann, G. (2001). Pro and con: high-density lipoprotein, triglycerides, and other lipid subfractions are the future of lipid management. Am J Cardiol 87, 2B-7B.

Barja, G. (2004). Free radicals and aging. Trends Neurosci 27, 595-600.

Barrows, C.H. e Kokkonen, G.C. (1982). Dietary Restriction and Life Extension, Biological Mechanisms (Boca Raton, Nutritional approaches to aging research).

Beltowski, J. (2006). Leptin and atherosclerosis. Atherosclerosis 189, 47-60.

Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafter, U., Iaina, A., Knecht, A., Weissgarten, Y., Brunner, D., Fainaru, M., *et al.* (2000). Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. Lancet *356*, 1213-1218.

Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes *46*, 3-10.

Bonfleur, M.L., Vanzela, E.C., Ribeiro, R.A., de Gabriel Dorighello, G., de Franca Carvalho, C.P., Collares-Buzato, C.B., Carneiro, E.M., Boschero, A.C. e de Oliveira, H.C. (2010). Primary hypercholesterolaemia impairs glucose homeostasis and insulin secretion

in low-density lipoprotein receptor knockout mice independently of high-fat diet and obesity. Biochim Biophys Acta 1801, 183-190.

Bordone, L. e Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 298-305.

Bornfeldt, K.E. e Tabas, I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. Cell Metab 14, 575-585.

Boveris, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. Adv Exp Med Biol 78, 67-82.

Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. e Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic Biol Med *37*, 755-767.

Brookes, P.S. (2005). Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. Free Radic Biol Med *38*, 12-23.

Brown, M.S. e Goldstein, J.L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 52, 223-261.

Brown, M.S. e Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 34-47.

Brown, M.S. e Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell *89*, 331-340.

Bruss, M.D., Khambatta, C.F., Ruby, M.A., Aggarwal, I. e Hellerstein, M.K. (2010). Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. Am J Physiol Endocrinol Metab 298, E108-116.

Caldeira da Silva, C.C., Cerqueira, F.M., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H. e Kowaltowski, A.J. (2008). Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. Aging Cell 7, 552-560.

Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P. e Vercesi, A.E. (2003). Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. J Bioenerg Biomembr *35*, 211-220.

Carew, T.E., Pittman, R.C., Marchand, E.R. e Steinberg, D. (1984). Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta. Predominance of intimal degradation. Arteriosclerosis *4*, 214-224.

Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R. e Barja, G. (2008). Effect of every other day feeding on mitochondrial free radical production and oxidative stress in mouse liver. Rejuvenation Res *11*, 621-629.

Cerqueira, F.M. e Kowaltowski, A.J. (2010). Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. Ageing Res Rev 9, 424-430.

Chalkiadaki, A. e Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. Nat Rev Endocrinol 8, 287-296.

Chiba, T., Tsuchiya, T., Komatsu, T., Mori, R., Hayashi, H. e Shimokawa, I. (2010). Development of calorie restriction mimetics as therapeutics for obesity, diabetes, inflammatory and neurodegenerative diseases. Curr Genomics *11*, 562-567.

Chisolm, G.M. e Steinberg, D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radic Biol Med 28, 1815-1826.

Cutting, W.C., Mehrtens, H.G. e Tainter, M.L. (1933). Actions and uses of dinitrophenol - Promising metabolic applications. J Amer Med Assoc *101*, 193-195.

DeFronzo, R.A. (2010). Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. Diabetologia *53*, 1270-1287.

Dollery, C.M. e Libby, P. (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. Cardiovasc Res 69, 625-635.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82, 47-95.

Duivenvoorden, I., Teusink, B., Rensen, P.C., Romijn, J.A., Havekes, L.M. e Voshol, P.J. (2005). Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. Diabetes *54*, 664-671.

Folch, J., Lees, M. e Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226, 497-509.

Frei, B. (1999). On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. Proc Soc Exp Biol Med 222, 196-204.

Galic, S., Oakhill, J.S. e Steinberg, G.R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol *316*, 129-139.

Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A. e Fernandez-Checa, J.C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. J Biol Chem 272, 11369-11377.

Gimpl, G., Burger, K. e Fahrenholz, F. (2002). A closer look at the cholesterol sensor. Trends Biochem Sci 27, 596-599.

Glass, C.K. e Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. Cell 104, 503-516.

Gordon, D.J. e Rifkind, B.M. (1989). High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. N Engl J Med *321*, 1311-1316.
Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. e Barja, G. (2001). Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. Faseb J *15*, 1589-1591.

Greenberg, J.A. e Boozer, C.N. (2000). Metabolic mass, metabolic rate, caloric restriction, and aging in male Fischer 344 rats. Mech Ageing Dev *113*, 37-48.

Grundy, S.M., Brewer, H.B., Jr., Cleeman, J.I., Smith, S.C., Jr. e Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation *109*, 433-438.

Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. Genes Dev 14, 1021-1026.

Guarente, L. (2008). Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? Cell 132, 171-176.

Hambly, C. e Speakman, J.R. (2005). Contribution of different mechanisms to compensation for energy restriction in the mouse. Obes Res 13, 1548-1557.

Hardie, D.G. (2008). AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. Int J Obes (Lond) *32 Suppl 4*, S7-12.

Harper, J.A., Dickinson, K. e Brand, M.D. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. Obes Rev 2, 255-265.

Hau, M.F., Smelt, A.H., Bindels, A.J., Sijbrands, E.J., Van der Laarse, A., Onkenhout, W., van Duyvenvoorde, W. e Princen, H.M. (1996). Effects of fish oil on oxidation resistance of VLDL in hypertriglyceridemic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol *16*, 1197-1202.

Hayashi, T., Hirshman, M.F., Fujii, N., Habinowski, S.A., Witters, L.A. e Goodyear, L.J. (2000). Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. Diabetes *49*, 527-531.

Heilbronn, L.K. e Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. Am J Clin Nutr 78, 361-369.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. e Stanley, K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. Embo J 7, 4119-4127.

Hulsmans, M., Van Dooren, E. e Holvoet, P. (2012). Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 14, 264-276.

Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E. e Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest *92*, 883-893.

Ishibashi, S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Herz, J. e Burns, D.K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. J Clin Invest *93*, 1885-1893.

Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsen, B., Lahti, K., Nissen, M., Taskinen, M.R. e Groop, L. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. Diabetes Care 24, 683-689.

Jiao, S., Cole, T.G., Kitchens, R.T., Pfleger, B. e Schonfeld, G. (1990). Genetic heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. Metabolism *39*, 155-160.

Jo, S.H., Son, M.K., Koh, H.J., Lee, S.M., Song, I.H., Kim, Y.O., Lee, Y.S., Jeong, K.S., Kim, W.B., Park, J.W., *et al.* (2001). Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem 276, 16168-16176.

Kahn, S.E., Hull, R.L. e Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 444, 840-846.

Karbowska, J. e Kochan, Z. (2012). Intermittent fasting up-regulates Fsp27/Cidec gene expression in white adipose tissue. Nutrition 28, 294-299.

Kasahara, E., Sekiyama, A., Hori, M., Hara, K., Takahashi, N., Konishi, M., Sato, E.F., Matsumoto, S., Okamura, H. e Inoue, M. (2011). Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett *585*, 2263-2268.

Keaney, J.F., Jr., Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J.M., Sutherland, P., Vita, J.A. e Benjamin, E.J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 434-439.

Keenan, K.P., Ballam, G.C., Dixit, R., Soper, K.A., Laroque, P., Mattson, B.A., Adams, S.P. e Coleman, J.B. (1997). The effects of diet, overfeeding and moderate dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival, disease and toxicology. J Nutr *127*, 851S-856S.

Kleemann, R., Zadelaar, S. e Kooistra, T. (2008). Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. Cardiovasc Res *79*, 360-376.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. e Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett *416*, 15-18.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F. e Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med *47*, 333-343.

Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med 26, 463-471.

Landry, J., Slama, J.T. e Sternglanz, R. (2000). Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun 278, 685-690.

LeBel, C.P., Ali, S.F. e Bondy, S.C. (1992). Deferoxamine inhibits methyl mercuryinduced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. Toxicol Appl Pharmacol *112*, 161-165.

Lemasters, J.J. e Nieminen, A.L. (2001). Mitochondria in pathogenesis (New York, Academic/Penum Publishers).

Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32, 2045-2051.

Libby, P. e Ridker, P.M. (2004). Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. Am J Med *116 Suppl 6A*, 9S-16S.

Libby, P. e Ridker, P.M. (2006). Inflammation and Atherothrombosis : From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. J Am Coll Cardiol *48*, A33-A46.

Lin, S.J., Defossez, P.A. e Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. Science 289, 2126-2128.

Lonn, M.E., Dennis, J.M. e Stocker, R. (2012). Actions of 'antioxidants' in the protection against atherosclerosis. Free Radic Biol Med.

Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A. e Barja, G. (2002). Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. Free Radic Biol Med *32*, 882-889.

Madamanchi, N.R., Vendrov, A. e Runge, M.S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25, 29-38.

Martin, B., Mattson, M.P. e Maudsley, S. (2006). Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. Ageing Res Rev 5, 332-353.

Masoro, E.J., McCarter, R.J., Katz, M.S. e McMahan, C.A. (1992). Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. J Gerontol 47, B202-208.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. e Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28, 412-419.

McCay, C.M., Crowell, M.F. e Maynard, L.A. (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. Jornal of Nutrition *10*, 63-79.

Merat, S., Casanada, F., Sutphin, M., Palinski, W. e Reaven, P.D. (1999). Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. Arterioscler Thromb Vasc Biol *19*, 1223-1230.

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol Rev Camb Philos Soc 41, 445-502.

Naik, E. e Dixit, V.M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. J Exp Med 208, 417-420.

NCEPIII - Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation *106*, 3143-3421.

Nedeljkovic, Z.S., Gokce, N. e Loscalzo, J. (2003). Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. Postgrad Med J 79, 195-199; quiz 198-200.

Newman, J.C., He, W. e Verdin, E. (2012). Mitochondrial Protein Acylation and Intermediary Metabolism: Regulation by Sirtuins and Implications for Metabolic Disease. J Biol Chem.

Olefsky, J.M. e Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu Rev Physiol 72, 219-246.

Oliveira, H.C., Cosso, R.G., Alberici, L.C., Maciel, E.N., Salerno, A.G., Dorighello, G.G., Velho, J.A., de Faria, E.C. e Vercesi, A.E. (2005). Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. Faseb J *19*, 278-280.

Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P.A., Mitchell, D. e Williams, R.A. (1987). Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis *68*, 231-240.

Paim, B.A., Velho, J.A., Castilho, R.F., Oliveira, H.C. e Vercesi, A.E. (2008). Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. Free Radic Biol Med *44*, 444-451.

Pappan, K.L., Pan, Z., Kwon, G., Marshall, C.A., Coleman, T., Goldberg, I.J., McDaniel, M.L. e Semenkovich, C.F. (2005). Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. J Biol Chem 280, 9023-9029.

Parascandola, J. (1974). Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective. Mol Cell Biochem 5, 69-77.

Park, S., Park, N.Y., Valacchi, G. e Lim, Y. (2012). Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. Mediators Inflamm *2012*, 984643.

Park, S.Y., Choi, G.H., Choi, H.I., Ryu, J., Jung, C.Y. e Lee, W. (2005). Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Arch Biochem Biophys *436*, 276-284.

Pauciullo, P. e Mancini, M. (1998). Treatment challenges in hypercholesterolemia. Cardiovasc Drugs Ther *12*, 325-337.

Paulsson, G., Zhou, X., Tornquist, E. e Hansson, G.K. (2000). Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 10-17.

Reznick, A.Z. e Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol 233, 357-363.

Rocha, V.Z. e Libby, P. (2009). Obesity, inflammation, and atherosclerosis. Nat Rev Cardiol 6, 399-409.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 340, 115-126.

Ross, R. e Glomset, J.A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science *180*, 1332-1339.

Rubin, E.M., Krauss, R.M., Spangler, E.A., Verstuyft, J.G. e Clift, S.M. (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. Nature *353*, 265-267.

Sanz, A., Caro, P., Ibanez, J., Gomez, J., Gredilla, R. e Barja, G. (2005). Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. J Bioenerg Biomembr *37*, 83-90.

Schild, L., Reinheckel, T., Wiswedel, I. e Augustin, W. (1997). Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. Biochem J *328* (*Pt 1*), 205-210.

Schneider, W.C., Hogeboom, G.H. e Ross, H.E. (1950). Intracellular distribution of enzymes. VII. The distribution of nucleic acids and adenosinetriphosphatase in normal mouse liver and mouse hepatoma. J Natl Cancer Inst *10*, 977-982.

Singh, U. e Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. Pathophysiology 13, 129-142.

Skulachev, V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. Biochim Biophys Acta *1363*, 100-124.

Sohal, R.S. e Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273, 59-63.

Spaulding, C.C., Walford, R.L. e Effros, R.B. (1997). Calorie restriction inhibits the agerelated dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice. Mech Ageing Dev 93, 87-94.

Speakman, J.R. e Mitchell, S.E. (2011). Caloric restriction. Mol Aspects Med 32, 159-221.

Speakman, J.R., Talbot, D.A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J.S., Redman, P., Krol, E., Jackson, D.M., Johnson, M.S. e Brand, M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. Aging Cell *3*, 87-95.

Spindler, S.R. (2012). Review of the literature and suggestions for the design of rodent survival studies for the identification of compounds that increase health and life span. Age (Dordr) *34*, 111-120.

Spindler, S.R. e Mote, P.L. (2007). Screening candidate longevity therapeutics using gene-expression arrays. Gerontology *53*, 306-321.

Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. J Lipid Res *50 Suppl*, S376-381.

Steinberg, D. e Witztum, J.L. (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? Circulation *105*, 2107-2111.

Stocker, R. e Keaney, J.F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev 84, 1381-1478.

Tahara, E.B., Navarete, F.D. e Kowaltowski, A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med *46*, 1283-1297.

Ting, H.H., Timimi, F.K., Haley, E.A., Roddy, M.A., Ganz, P. e Creager, M.A. (1997). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. Circulation *95*, 2617-2622.

Toye, A.A., Lippiat, J.D., Proks, P., Shimomura, K., Bentley, L., Hugill, A., Mijat, V., Goldsworthy, M., Moir, L., Haynes, A., *et al.* (2005). A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. Diabetologia *48*, 675-686.

Trieu, V.N. e Uckun, F.M. (1998). Male-associated hypertension in LDL-R deficient mice. Biochem Biophys Res Commun 247, 277-279.

Van Gaal, L.F., Mertens, I.L. e De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature 444, 875-880.

Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thorne, A., Hoffstedt, J., Lonnqvist, F. e Arner, P. (1998). Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. Diabetes *47*, 913-917.

Varady, K.A. e Hellerstein, M.K. (2007). Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. Am J Clin Nutr *86*, 7-13.

Varady, K.A., Hudak, C.S. e Hellerstein, M.K. (2009). Modified alternate-day fasting and cardioprotection: relation to adipose tissue dynamics and dietary fat intake. Metabolism *58*, 803-811.

Vercesi, A.E., Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J. e Oliveira, H.C. (2007). Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. IUBMB Life *59*, 263-268.

Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Oliveira, H.C. e Castilho, R.F. (2006). Mitochondrial Ca2+ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci *11*, 2554-2564.

Verdery, R.B. e Walford, R.L. (1998). Changes in plasma lipids and lipoproteins in humans during a 2-year period of dietary restriction in Biosphere 2. Arch Intern Med *158*, 900-906.

Walford, R.L., Harris, S.B. e Gunion, M.W. (1992). The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 11533-11537.

Walford, R.L., Mock, D., Verdery, R. e MacCallum, T. (2002). Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57, B211-224.

Wan, R., Camandola, S. e Mattson, M.P. (2003). Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats. Faseb J *17*, 1133-1134.

Weindruch, R. e Walford, R.L. (1988). The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction (Springfield, Charles C Thomas).

Williams, K.J. e Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15, 551-561.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. e Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature *372*, 425-432.

Parâmetros (g)	R0	R0-RC
Peso Corporal Inicial	$20,9 \pm 0,4$	$21,3 \pm 0,4$
Peso Corporal	$25,2 \pm 0,3$	$24,9 \pm 0,4$
Ganho de Peso	$4,5 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,4$
Consumo alimentar	$325 \pm 3,2$	$263 \pm 2,3*$
Eficiência Alimentar (&)	$1,37 \pm 0,07$	$1,39 \pm 0,15$

**Tabela 1:** Parâmetros de crescimento corporal e de consumo alimentar de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

&: (ganho de peso/consumo alimentar)\*100. R0 (N=22) e R0-RC (N=16) \* P<0,0001 teste T de Student

**Tabela 2:** Lipídeos e lipoproteínas plasmáticos de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

Parâmetros (mg/dL)	R0	Ν	R0-RC	Ν
Colesterol total	$219 \pm 7,8$	15	$300 \pm 10,3*$	15
VLDL (COL)	$13,1 \pm 1,5$	8	38,7 ± 5,2*	10
LDL (COL)	$104,2 \pm 3,0$	8	155,7 ± 3,7*	10
HDL (COL)	$101,3 \pm 2,1$	8	$105,5 \pm 5,0$	10
Triglicérides	$120 \pm 9,1$	16	$130 \pm 7,9$	15
Ácidos graxos (mM)	$0,62 \pm 0,05$	17	$0,62 \pm 0,05$	14

\* P<0,001 teste T de *Student* 

Parâmetros	R0	Ν	R0-RC	Ν
T.A. Perigonadal		21		20
(% do peso corporal)	$1,00 \pm 0,05$		$1,16 \pm 0,05*$	
(mg)	$224 \pm 12$		$261 \pm 12$	
T.A. Subcutâneo		12		11
(% do peso da carcaça)	$13,5 \pm 1,8$		$23,2 \pm 1,0^*$	
(mg)	$742 \pm 116$		$1261 \pm 70^*$	
Massa Magra (% do	$86,5 \pm 1,8$	12	76,7 ± 1,0*	11
peso da carcaça)				
Fígado (% do peso	$4.20 \pm 0.13$	17	$4.28 \pm 0.10$	12
corporal)	4,29 ± 0,13		4,20 ± 0,19	
TG Hepático (mg/g)	$22,5 \pm 2,2$	13	15,1 ± 1,7*	10
COL Hepático (mg/g)	$1,99 \pm 0,11$	13	$2,20 \pm 0,17$	10

**Tabela 3:** Composição corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

\*P<0,025 teste T de *Student*.

Parâmetros	RO	Ν	R0-RC	Ν
Glicemia (mg/dL)				
Alimentado	$144 \pm 3,9$	27	$142 \pm 5,0$	25
Jejum	$86 \pm 2,7$	16	$122 \pm 6,1*$	15
Insulina (ng/mL)				
Alimentado	$1,12 \pm 0,14$	7	$1,78 \pm 0,22 \#$	8
Jejum	$0,36 \pm 0,01$	7	$0,54 \pm 0,06*$	8
Índice HOMA-IR	$14,2 \pm 1,7$	7	$27,1 \pm 3,5^*$	8

**Tabela 4:** Homeostase glicêmica de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

Jejum de 12 horas, HOMA-IR: (insulina de jejum (pM)\*glicemia de jejum (mM))/22,5. \* P<0,015, # P = 0,029 teste T de *Student*.

Parâmetros	Ν	WT	R0	R0-RC
Antioxidantes Totais (mM)	6-8	$1,28 \pm 0,12$	$1,02 \pm 0,04$	1,08 ± 0,06
Proteína Carbonilada (nM/mg de proteína)	8-9	4,5 ± 1,1	8,0 ± 1,0	7,4 ± 1,7
Oxidação da VLDL	6 10	282 + 80	72 + 4 0	99 + 2 6*
Velocidade (inclinação)	5-10 5-11	$382 \pm 80$ 4,5 ± 0,5	$73 \pm 4,9$ 8,5 ± 0,2	$30 \pm 3,0^{+}$ 7,3 ± 0,5

**Tabela 5:** Marcadores do estado redox em plasma e fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial.\* P=0,021 teste T de *Student* em relação ao R0.

**Tabela 6:** Marcadores inflamatórios sistêmicos em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC).

Parâmetros	RO	Ν	R0-RC	Ν
TNFa (pg/ml)	$7,2 \pm 0,3$	11	$9,2 \pm 0,7*$	11
PCR (ng/ml)	$7,5 \pm 0,3$	8	$9,2 \pm 0,3*$	7

\* P<0,02 teste T de *Student* 

Parâmetros (g)	R0	R0-DNP
Peso Corporal Inicial	$20,9 \pm 0,4$	21,0 ± 0,3
Peso Corporal	$25,2 \pm 0,3$	$25,2 \pm 0,3$
Ganho de Peso	$4,5 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$
Consumo alimentar	$325 \pm 3,2$	$328 \pm 7,5$
Eficiência Alimentar (&)	$1,37 \pm 0,07$	$1,30 \pm 0,09$

**Tabela 7:** Parâmetros de crescimento corporal e de consumo alimentar de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

&: ((ganho de peso/consumo alimentar)\*100). R0 (N=22) e R0-DNP (N=16)

**Tabela 8:** Lipídeos e lipoproteínas plasmáticos de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

Parâmetros (mg/dL)	R0	Ν	R0-DNP	Ν	
Colesterol total	$219 \pm 7,8$	15	$223 \pm 10,6$	13	
VLDL (COL)	$13,1 \pm 1,5$	8	$14,2 \pm 2,1$	7	
LDL (COL)	$104,2 \pm 3,0$	8	111,0 ± 2,9	7	
HDL (COL)	$101,3 \pm 2,1$	8	$97,3 \pm 2,5$	7	
Triglicérides	$120 \pm 9,1$	16	116 ± 8,5	13	
Ácidos graxos (mM)	$0,62 \pm 0,05$	17	$0,48 \pm 0,03*$	15	

\* P=0,02 teste T de *Student* 

Parâmetros	R0	Ν	R0-DNP	Ν
T.A. Perigonadal		21		19
(% do peso corporal)	$1,00 \pm 0,05$		$0,98 \pm 0,04$	
(mg)	$224 \pm 12$		$214 \pm 10$	
T.A. Subcutâneo		12		10
(% do peso da carcaça)	$13,5 \pm 1,8$		$12,1 \pm 1,0$	
(mg)	$742 \pm 116$		$647 \pm 65$	
Massa Magra (% do peso da carcaça)	86,5 ± 1,8	12	87,9 ± 1,0	10
Fígado (% do peso corporal)	$4,29 \pm 0,13$	17	$4,35 \pm 0,08$	12
TG Hepático (mg/g)	$22,5 \pm 2,2$	13	$19,2 \pm 2,3$	10
COL Hepático (mg/g)	$1,99 \pm 0,11$	13	$2,02 \pm 0,10$	11

**Tabela 9:** Composição corporal de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

Parâmetros	R0	Ν	R0-DNP	Ν	
Glicemia (mg/dL)					
Alimentado	$144 \pm 3,9$	27	$140 \pm 4,0$	24	
Jejum	86 ± 2,7	16	$85 \pm 3,3$	13	
Insulina (ng/mL)					
Alimentado	$1,12 \pm 0,14$	7	$1,31 \pm 0,21$	5	
Jejum	$0,36 \pm 0,01$	7	$0,33 \pm 0,04$	5	
Índice HOMA-IR	$14,2 \pm 1,7$	7	$12,3 \pm 1,8$	5	

**Tabela 10:** Homeostase glicêmica de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

Jejum de 12 horas, HOMA-IR: (insulina de jejum (pM)\*glicemia de jejum (mM))/22,5.

Parâmetros	Ν	WT	R0	R0-DNP
Antioxidantes Totais (mM)	6-8	$1,28 \pm 0,12$	$1,02 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,05$
Proteína Carbonilada (nM/mg de proteína)	8-9	4,5 ± 1,1	8,0 ± 1,0	5,1 ± 0,8*
Oxidação da VLDL	6 11	292 + 90	72 + 4.0	71 . 4 5
Velocidade (inclinação)	6-11 5-11	$382 \pm 80$ 4,5 ± 0,5	$73 \pm 4,9$ 8,5 ± 0,2	$71 \pm 4,5$ 9,0 ± 0,4

**Tabela 11:** Marcadores do estado redox em plasma e fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial.\* P=0,024 teste T de *Student one tail* em relação ao R0.

**Tabela 12:** Marcadores inflamatórios sistêmicos em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (R0-DNP).

Parâmetros	R0	Ν	R0-DNP	Ν
TNFa (pg/ml)	$7,2 \pm 0,3$	11	$8,2 \pm 0,7$	12
PCR (ng/ml)	$7,5 \pm 0,3$	8	$7,3 \pm 0,6$	7



**Figura 1:** Curva de crescimento (Painel A) e de ganho de peso corporal (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. n= 16-22.



**Figura 2:** Produção de  $CO_2$  *in vivo* de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. n= 8. Devido ao protocolo de restrição calórica, com alimentação dia-sim, dia-não, os camundongos RC foram avaliados nos estados de jejum e alimentado., \* P<0,025 teste T de *Student*.



**Figura 3:** Perfil de lipoproteínas plasmáticas de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. n= 8-10. As frações de lipoproteínas foram separadas por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC). A VLDL, LDL e HDL são visualizadas no primeiro, segundo e terceiro pico, respectivamente.



**Figura 4:** Concentrações plasmáticas de leptina (jejum e alimentado) (Painel A) e adiponectina (jejum) (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. n= 7-14. \* P<0,015 teste T de *Student*.



**Figura 5:** Teste oral de tolerância à glicose (GTT) (Painel A) e área sob a curva total do GTT (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial. n = 8-10, \* P<0,003 teste T de *Student*.



**Figura 6:** Teste de tolerância à insulina (ITT) (Painel A) e área sob a curva total do ITT (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. n = 7-8. \* P<0,025 teste T de *Student*.

### Suscetibilidade de oxidação da VLDL



**Figura 7:** Curva representativa da suscetibilidade de oxidação da VLDL induzida por 40  $\mu$ M de CuSO4 em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial. A oxidação foi determinada através do aumento da absorbância no comprimento de onda de 234 nm, devido à formação dos dienos conjugados. As VLDL foram incubadas na concentração de 0,1 mg/mL de triglicérides.



**Figura 8:** Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Painel A) e de peróxido de hidrogênio  $(H_2O_2)$  (Painel B) em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (RO) sob regime de restrição calórica (RO-RC) durante o período de três meses. Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial. n= 5-6. \* P=0,0023 teste T de *Student one tail* em relação ao RO. A geração de EROS foi determinada através da oxidação de diaclorofluoresceína (DCF) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da oxidação de *amplex red*.



# Aterosclerose na raiz da aorta

**Figura 9:** Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta em camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses . n=15-18. \* P<0,0001 teste T de *Student*.



**Figura 10:** Fotomicrografias representativas com aumentos de 5,10 e 20 vezes da raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) sob regime de restrição calórica (R0-RC) durante o período de três meses. As lesões de aterosclerose foram coradas com *oil red* e estão representadas em vermelho na parede interna da aorta.



**Figura 11:** Curva de crescimento (Painel A) e de ganho de peso corporal (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n= 16-22.



### Metabolismo corporal

**Figura 12:** Produção de  $CO_2$  *in vivo* de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n= 8

# Perfil de Lipoproteínas



**Figura 13:** Perfil de lipoproteínas plasmáticas de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n= 7-8. As Frações de lipoproteínas foram separadas por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC). A VLDL, LDL e HDL são visualizadas no primeiro, segundo e terceiro pico, respectivamente.



**Figura 14:** Concentrações plasmáticas de leptina (jejum e alimentado) (Painel A) e adiponectina (jejum) (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n= 7-14



**Figura 15:** Teste oral de tolerância à glicose (GTT) (Painel A) e área sob a curva total do GTT (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial. n = 9-10.



**Figura 16:** Teste de tolerância à insulina (ITT) (Painel A) e área sob a curva total do ITT (Painel B) de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n = 7-8.



**Figura 17:** Velocidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Painel A) e de peróxido de hidrogênio  $(H_2O_2)$  (Painel B) em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). Camundongos selvagens (WT) foram utilizados apenas como referencial. n= 5-6. \* P<0,025 teste T de *Student one tail* em relação ao R0. A geração de EROS foi determinada através da oxidação de diclorofluoresceína (DCF) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da oxidação de *amplex red*.



**Figura 18:** Área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). n=15-18. Na análise estatística, as áreas de lesão foram transformadas em LOG, devido distribuição não-normal. \* P=0,015 teste T de *Student*.



**Figura 19:** Fotomicrografias representativas com aumentos de 5,10 e 20 vezes da raiz da aorta de camundongos deficientes do receptor de LDL (R0) tratados com 2,4 dinitrofenol (1mg/L) na água de beber durante o período de três meses (R0-DNP). As lesões de aterosclerose foram coradas com *oil red* e estão representadas em vermelho na parede interna da aorta.

## ANEXOS

#### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada

Efeitos da restrição calórica e do 2,4 dinitrofenol sobre o metabolismo e desenvolvimento da aterosclerose em camundongos hipercolesterolêmicos

 não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biosseguranca.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. 2008/02, Instituição: CiBio-**IB/UNICAMP** 

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 1969-1 Instituição: CEEA/UNICAMP

) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No.\_\_\_\_\_, Instituição:

\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Aluno: (Gabriel de Gabriel Taffarello Dorighello )

Orientador: (Helena Coutinho Franco de Oliveira)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da CEUA/UNICAMP

Rara uso da Comissão ou Comitê pertinente: X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

TANK Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Presidente da Comissão Interna de Biossegurança Instituto de Biologia - UNICAMP